



**SERAMİD ve SFİNGOMİYELİNİN ÇEŞİTLİ HÜCRE HATLARI
ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ŞEYMA BÜSE SAĞLAMER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

Prof. Dr. Necmettin YILMAZ

AĞUSTOS, 2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPASA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERAMİD ve SFİNGOMİYELİNİN ÇEŞİTLİ HÜCRE HATLARI
ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ŞEYMA BÜSE SAĞLAMER

TOKAT

AĞUSTOS – 2019

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 2017/56 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

ÖMER FARUK CIBA tarafından hazırlanan “Yeşilirmak Havzası Toprak Sıcaklığı Veritabanının Oluşturulması ve Toprak Sıcaklığı ile Coğrafi, Topografik ve Bazı Toprak Değişkenleri Arasındaki Olası İlişkilerin Coğrafi Bilgi Sistemleri ile Araştırılması” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 6 EYLÜL 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çekliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü TOPRAK BİLİMİ VE BİTKİ BESLEME Anabilim dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Hakan Mete DOĞAN

Üye
Prof. Dr. D. Duygu KILIÇ
Amasya Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Halil ERDEM
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

ONAY

Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TEZ BEYANI

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu yüksek lisans tezinin yazılmasında bilimsel etik kurallarına uyulduğunu, başkalarının çalışmalarından yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir referanstan alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir bozma / değiştirme yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

ŞEYMA BÜSE SAĞLAMER

09.08.2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERAMİD ve SFİNGOMİYELİNİN ÇEŞİTLİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ŞEYMA BÜSE SAĞLAMER

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. NECMETTİN YILMAZ

Tüm dünyada ve ülkemizde en önemli sağlık sorunlarının başında gelmekte olan kanserin, son yıllarda yeni geliştirilen tedavilere rağmen 2018 yılında yaklaşık 9,6 milyon ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan araştırmalara göre seramid ve sfingomiyelinin hücrelerin apoptoz ve otofajiye gitmesinde önemli moleküller olduğu tespit edilmiştir. Seramid; kaspazlar ve BCL-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenen intrinsik apoptoza ve otofaji mediatörlerinden beclin-1 ve L3B' ye etki ederek otofajiyi indüklemektedir. Ayrıca hücre sel seramid birikiminin, prostat ve rahim ağzı tümörlerinde kanser hücrelerinin ölümüne neden olduğu, normal hücrelerin ise seramidin sitotoksik etkisine karşı daha az duyarlı oldukları yapılan araştırmalarda saptanmıştır. Seramidin, kolon kanserinde de antikanserojen etkinliği olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Sfingomiyelin; seramid metabolizması ve hücre membranının önemli bir molekülüdür. Tüm bu araştırmalar ışığında bu çalışmada seramid ve sfingomiyelinin kanser tedavisinde alternatif molekül olup olmayacağı C6, HT29, OV2008 ve CCD-18Co hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitesi iki farklı çözücü ile çözümlenerek SRB testi ile araştırıldı. Yaptığımız SRB testi ile seramid ve sfingomiyelinin birbirine benzer şekilde etki göstererek yüksek konsantrasyonlarda üç farklı kanser hücre hattı ve bir sağlıklı hücre hattında antiproliferatif etkisinin olduğu, düşük konsantrasyonlarda ise antiproliferatif etkinliğinin çok düşük olduğu hatta kontrolle karşılaştırıldığı canlılık oranlarında artış olduğu gözlenmiştir. Seramid ve sfingomiyelinin etkinliği konsantrasyona ve içerisinde çözüldüğü DMSO ve etanole göre değişmekte olduğu ve doğru konsantrasyon ve çözücü kullanılarak uygulanması halinde kanser hücrelerine spesifik bir ajan olarak kullanabileceği yönünde umut vermektedir. Bu sonuçların desteklenmesi için *in vivo* ortam yapılacak çalışmalara ve bu etkiyi daha iyi anlamak için moleküler düzeyde ileri araştırmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

2019, 45SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Seramid, Sfingomiyelin, Kanser, C6, HT29, OV2008, CCD-18Co

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF CERAMIDE AND SPINFOMYELINE ON VARIOUS CELL LINES

ŞEYMA BÜSE SAĞLAMER

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Prof. Dr. NECMETTİN YILMAZ

In spite of new developments in medical treatments, it is estimated that cancers, being (the leading) one of the most important health problems in our country and the whole world, have caused 9.6 million deaths in 2018. According to researches ceramide and sphingomyelin are found to be important molecules to lead the cells to apoptosis and autophagy. Ceramide induces intrinsic apoptosis which is regulated by caspases and BCL-2 family members, and autophagy by affecting beclin-1 and L3B which are autophagy mediators. In addition, it is found in the researches that cellular ceramide accumulation cause cancerous cells' death in prostate and cervix tumors and normal cells are resistant to cytotoxic effects of ceramide. There are evidences about ceramide also having anticarcinogenic effects in colon cancer. Sphingomyelin is an important molecule of cell membrane and ceramide metabolism. Considering all these studies, whether ceramide and sphingomyelin can be alternative molecules in cancer treatment or not, is investigated in this study using SRB test, by looking at their antiproliferative activity on C6, HT29, OV2008, CCD-18Co cell lines, while being dissolved in two different solvents. By SRB tests we conducted, it is observed that; affecting like one another, at high concentrations ceramide and sphingomyelin have antiproliferative effect in 3 different cancer cell lines and 1 healthy cell line, however at low concentrations their antiproliferative effect is too little and even there is increment at vitality rates of cells comparing to control groups. Effectiveness of ceramide and sphingomyelin is found to be variable depending on their concentration, and whether is it DMSO solution or ethanol in which they are dissolved; and using proper concentration in proper solvent they show promise for being able to be used against cancer cells as a specific agent. Studies performed in in vivo environment to support these results and advanced researches at molecular level to understand these effects are necessary.

2019,45 PAGE

KEYWORDS: Ceramide, Sphingomyelin, Cancer, C6, HT29, OV2008, CCD-18Co

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez konumun planlanmasında ve tez çalışmalarım sırasında yardımlarını bilgi birikimlerini, deneyimlerini ve hoşgörülerini esirgemeyen, değerli fikir ve katkılarıyla ışık tutan danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Necmettin YILMAZ' a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ercan ÇAÇAN' a teşekkürlerimi bildiririm. Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Çağlar BERKEL ve Arş. Gör. Burak KÜÇÜK' e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarım sırasında maddi manevi desteklerini ve hoşgörülerini gördüğüm babam Turan SAĞLAMER, annem Şükran SAĞLAMER ve sevgili kardeşim Büşra Buket SAĞLAMER'e gönül dolusu teşekkürlerimi sunarım.

ŞEYMA BÜSE SAĞLAMER

AĞUSTOS, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Sfingolipitlerin Yapısı.....	6
3. MATERYAL ve METOT.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Hücre hatları ve hücre kültürü.....	20
3.2. Metot.....	21
3.2.1. Hücre inkübasyon koşulları.....	21
3.2.2. Seramid ve sfingomiyelin dozlarının hazırlanması.....	22
3.2.3. SRB testi.....	23
3.2.4. İstatiksel metot.....	23
4. BULGULAR.....	18

4.1. Seramidin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	25
4.2. Sfingomiyelinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	35
6. KAYNAKLAR.....	39
7. ÖZGEÇMİŞ.....	42



KISALTMALAR

Kısaltma	Açıklama
AMPK	AMP Aktive edici protein kinaz
Ark	Arkadaşları
CDK	Siklin bağımlı kinaz
Cer	Seramid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu
P	Fosfor
PKC	Protein kinaz C
PP1	Protein fosfataz 1
PP2A	Protein fosfataz 2A
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
S1P	Sfingozin 1-fosfat
S1PP	Sfingozin-1-fosfat fosfataz
S1PR	Sfingozin-1-fosfat reseptörü
SDaz	Seramidaz
SGPL 1	Sfingozin-1-fosfat liyaz
SK1	Sfingozin kinaz 1
SL	Sfingolipit
SM	Sfingomiyelin

SMaz	Sfingomiyelinaz
Sph	Sfingozin
SRB	Sülforodamin B
TCA	Trikloroasetik asit
VPS34	Vakuol protein sorting



ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Zar lipitleri ve depo lipitlerinin moleküler yapıları.....	6
Şekil 2.2. Sfingolipitlerin moleküler yapısı.....	7
Şekil 2.3. Sfingolipitlerin moleküler yapısı.....	7
Şekil 2.4. Seramidin, de novo ve sfingomiyelinin, serebrosidlerin hidrolizi ile sentez edilmesi.....	9
Şekil 2.5. Seramid, sfingozin, sfingozin 1-fosfat ile kanser hücresi sağ kalımı arasındaki ilişki.....	10
Şekil 2.6. Sfingomiyelin ve seramidin kolonosidin büyüme ve farklılaşması üzerindeki muhtemel etkileri ilişki.....	11
Şekil 2.7. Sfingozin kinaz 1 (SK1) in ERK2 tarafından fosforlanmasının, sfingozinin hücre membranına translokasyonuna neden olması.....	12
Şekil 2.8. Seramidin indüklediği otofajik cevap.....	13
Şekil 2.9. Seramidin hücre döngüsü durdurması	15
Şekil 2.10. Kemoterapatik ajanlar ve radyoterapi ile tedavi edilen kanser hücresinde seramid düzeyindeki değişimler	18
Şekil 4.1. Farklı dozlardaki DMSO içerisinde çözünmüş seramidin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi.....	27
Şekil 4.2. Farklı dozlardaki etanol içerisinde çözünmüş seramidin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi.....	29
Şekil 4.3. Farklı dozlardaki DMSO içerisinde çözünmüş sfingomiyelinin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi.....	31
Şekil 4.4. Farklı dozlardaki etanol içerisinde çözünmüş sfingomiyelinin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi.....	33

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Hücre hatlarının genel özellikleri.....	19
Çizelge3.2. Deneyde kullanılan kimyasallar, cam ve plastik malzemeler ve cihazların listesi.....	20
Çizelge4.1. Farklı dozlardaki DMSO içerisinde çözülmüş seramidin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi.....	26
Çizelge 4.2. Farklı dozlardaki etanol içerisinde çözülmüş seramidin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi.....	28
Çizelge 4.3. Farklı dozlardaki DMSO içerisinde çözülmüş sfingomiyelinin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi.....	30
Çizelge 4.4. Farklı dozlardaki etanol içerisinde çözülmüş sfingomiyelinin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi.....	32
Çizelge 4.5. Seramid ve Sfingomiyelinin IC50 değerleri.....	34

1. GİRİŞ

Kanser, tüm dünyada ve ülkemizde en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından verilerine göre hazırlanan GLOBOCAN 2018 raporuna göre 2018 yılında 18,1 milyon yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanseri hariç 17,0 milyon) ve 9,6 milyon kanser nedeniyle ölüm (melanom dışı cilt kanseri hariç 9,5 milyon) meydana geldiği tahmin edilmektedir. (Bray ve ark., 2018). Kanser tedavisinde son yıllarda önemli gelişmeler olmuş ve bazı kanser türlerinde 5 yıllık sağ kalım oranlarında ciddi iyileşmeler olmuştur. Buna rağmen kanser tedavisine cevap vermeyen birçok kanser çeşidi bulunmaktadır.

Hücre membranının önemli bir molekülü olan sfingolipitler aynı zaman da hücre sinyal yolları üzerinden etki ederek apoptoz, proliferasyon, hücre döngüsü ve inflamasyonu düzenlemektedir. Sfingolipitlerin önemli bir üyesi olan seramid hücrelerde ikinci haberci olarak görev yaparak hücre sinyal yollarını düzenlemektedir. Seramid, sfingolipitlerin bir diğer üyesi olan sfingozin-1 fosfatla (S1P) beraber proliferasyon ve apoptozu düzenleyen genlerin anlatımını düzenlemektedir. Hücre içinde bir denge halinde bulunan seramid ve S1P düzeyi, dengenin seramid yönüne kaymasıyla hücre proliferasyonunun engellenmesine, hücrenin apoptoza gidmesine; dengenin S1P yönüne kayması ise hücrenin proliferasyonuna ve apoptozdan kaçmasına yol açmaktadır

Yapılan araştırmalara göre seramid ve sfingomiyelinin hücrelerin apoptoz ve otofajiye gitmesinde önemli moleküller olduğu tespit edilmiştir. Seramid; kaspazlar ve BCL-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenen intrinsik apoptoza ve otofaji mediatörlerinden beclin-1 ve L3B' ye etki ederek otofajiyi indükler. Ayrıca hücre seramid birikiminin, kanser hücrelerinin prostat ve rahim ağzı tümörlerinden ölümüne neden olduğu, normal hücrelerin seramidin neden olduğu sitotoksik etkilere karşı daha az duyarlı oldukları yapılan araştırmalarda saptanmıştır. Seramidin kolon kanserinde de antikanserojen etkinliği olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Sfingomiyelin; seramid metabolizması ve hücre membranının önemli bir molekülüdür. Tüm bu araştırmalar ışığında bu çalışmada seramid ve sfingomiyelinin kanser tedavisinde alternatif molekül olup olmayacağı C6, HT29, OV2008, CCD-18Co hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitesi iki farklı çözücü ile çözülerek SRB testi ile araştırıldı. Yaptığımız SRB testi

ile seramid ve sfingomiyelinin birbirine benzer şekilde etki göstererek yüksek konsantrasyonlarda üç farklı kanser hücre hattı ve bir sağlıklı hücre hattında antiproliferatif etkilerinin olduğu, düşük konsantrasyonlarda ise antiproliferatif etkinliğinin çok düşük olduğu hatta hücrelerin kontrolle karşılaştırıldığında canlılık oranlarında artış olduğu dahi gözlenmiştir. Seramid ve sfingomiyelinin etkinliği konsantrasyona ve içerisinde çözdüğümüz DMSO (Dimetil Sülfoksit) ve etanole göre değişmekte olduğu ve doğru konsantrasyon ve çözücü kullanılarak uygulanması halinde kanser hücrelerine spesifik bir ajan olarak kullanabileceği yönünde umut vermektedir. Bu sonuçların desteklenmesi için *in vivo* ortam da yapılacak çalışmalara ve bu etkiyi daha iyi anlamak için moleküler düzeyde ileri araştırmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

2. LİTERATÜR

2.1. Kanser

Tüm dünya ve ülkemizde en önemli sağlık sorunlarının başında kanser gelmektedir. Dünya da her yıl 10 milyon kişinin kanser tanısı aldığı ve 6 milyon kişinin de kanserden öldüğü Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2001 kayıtlarında bildirilmektedir Ülkemizde tüm ölümler içinde, kansere bağlı ölümlerin payı 1990 yılında %10,1 iken 1998 yılında %15'e ulaşmıştır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC) 2008 yılında 12,4 milyon yeni kanser vakası, 7,6 milyon kanser nedenli ölüm ve 28 milyon ilk tanıdan bu yana 5 yıl ya da daha az süre geçmiş kanserli hasta olduğunu tahmin etmektedir (Pınar R ve ark, 2003).

Kanser, hücrelerin metabolik ve davranış olarak değişiklikler geçirerek kontrolsüz zamansız aşırı büyümesi ve anormal şekilde yayılmasına neden olur. Kanseri hücrelerinin birçok biyolojik karakteristik özelliği vardır. Esas özelliği ise kontrolsüz çoğalmasıdır. Diğer özellikleri arasında da hücre kültürlerinde kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyarılara (sinyallere) gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozis (programlı hücre ölümü) yeteneğini kaybederek ve normal hücreye kıyasla daha uzun yaşayabilme, immün sistemden kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme, invazyon ve metastaz yapabilme sayılabilir (Aliustaoğlu M, 2009; Çefle K, 2009).

Hücrelerimizin sürekli yenilenmesi yaşamımızın devamı için gereklidir. Vücuttan atılan hücrelerin yerine yeni hücreler gelir ve bu süreç normalde hücre sayısını yaklaşık olarak hep aynı tutacak şekilde, hızlı ve kontrollü bir biçimde olur. Bu denge genlerin kontrolü altındadır. Bu genler ya hücrelerin bölünüp çoğalmasını sağlar ya da aşırı hücre üremesini önlerler. Ancak bir zedelenme olduğunda hücre kaybına bir yanıt olarak da hızlı hücre çoğalması ortaya çıkar. Bir geri bildirim mekanizmasıyla da normal hücre büyümesi durur ya da uyarılır. Ama maligniteyle beraber kanser hücrelerinin çoğalması normal kontrol mekanizmalarıyla kontrol edilemezler. Kanseri hücreleri, sürekli gelişme halinde bulunması ve kansorejen etki ortadan kalktıktan sonra bile büyümelerine devam etmeleri sonucunda normal dokulardan farklı anormal bir doku kitlesi meydana gelmesine neden olmaktadır. Kanseri hücreleri toksik ve proteolitik enzimler salgılayıp

sağlıklı doku hücrelerini lizis uğratarak fagosite edilmelerini ve böylece kendilerine yer açılarak ve kapladıkları alanının arttırılmasını sağlarlar. Buna ek olarak kanserli dokular, normal dokuların besinlerine ortak olup sayısı da giderek arttığı için bunları artan bir açlık ve besin yetersizliğine sokar (Aliustaoğlu M, 2009).

Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalma özelliğine ek olarak invazyon (diğer sağlıklı dokuları istila etme) ve metastaz (dolaşıma geçerek sağlıklı başka dokulara yayılma) gibi diğer malign özellikleri de bulunabilmektedir. Bu özellikler mutajenik olup önemli bir kısmı hücrenin mutasyonlara karşı hassas olduğu hücre siklusu esnasında meydana gelmektedir. (Ringer DP ve ark, 2001).

Hücre siklusu esas olarak dört evrede gerçekleşir. Bunlar, DNA sentezinin gerçekleştiği S evresi, mitoz bölünmenin görüldüğü M evresi ve bu iki süreç arasında kalan geçici duraklama evreleri olan G1 ve G2 evreleridir. Vücuttaki hücrelerin büyük çoğunluğu normalde bölünmeyip sadece uygun uyarı geldiğinde hücre siklusuna giren G0 olarak adlandırılan istirahat evresindedirler. Karaciğer hücrelerinin ve kemik iliğinin çoğu hücreleri bu durumdaki hücelere örnek verilebilirler. Bu gruptan olan hücreler arasında ileri evredeki solid tümör kitlesindeki hücrelerin çoğunluğu da vardır. Hücrelerde, hücre siklusundan sorumlu olan birçok denetim noktası (Cell cycle checkpoints) bulunmaktadır. Hücre siklusunun kontrol noktalarında olan değişimler kanser gelişimine neden olabilmektedir (Reed Sİ, 2008). Bu denetim noktalarında, hücre döngüsünün bir sonraki hücre fazına geçmeden önceki hücre fazı kontrol edilmektedir. Bu noktalar hücre siklusunun ilerlemesini durdurabildiği gibi, gerekli olan durumlarda apoptozu (programlı hücre ölümü) da aktive edebilmektedir. Hücre siklusunun kontrol noktaları sayesinde sadece DNA'sını doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin mitozu girmesi sağlanır (Aliustaoğlu M, 2009; Ringer DP, 2001).

Tümör baskılayıcı fonksiyon, DNA onarımı ve apoptoz kanser gelişiminde kritik basamaklardır. Hücre siklusunda yer alan siklinler ve siklin bağımlı kinazlar, hücrelerin tümör baskılayıcı genleri üzerindeki etkileri ile büyüme ve çoğalmaya yönelttikleri gibi bazen de hücrelerin ölümüne neden olabilirler (İçli F ve ark; 2014; Reed Sİ, 2008)

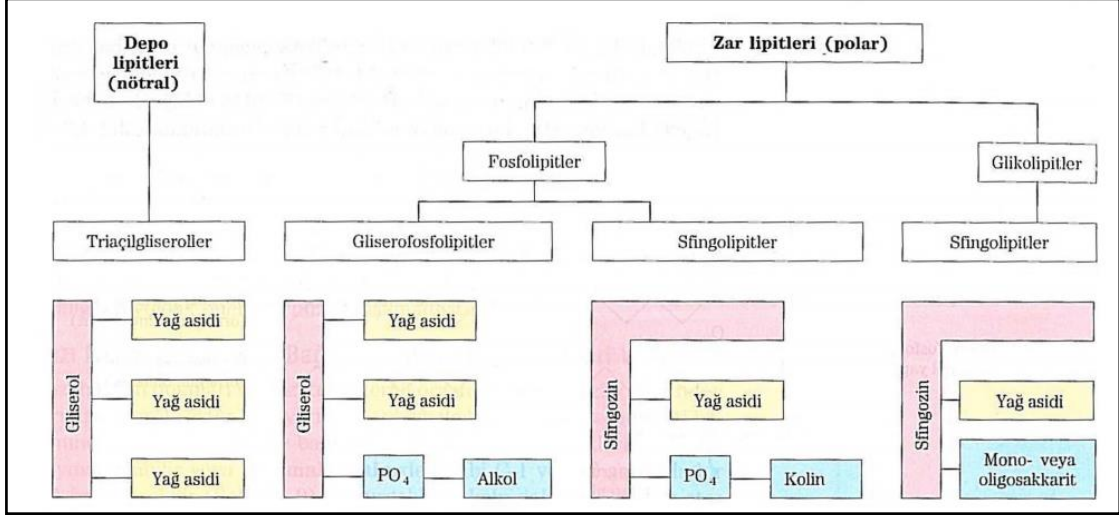
Kanser hücrelerinde aşırı hücre proliferasyonu bulunmaktadır. Hücre proliferasyonu için gerekli olan sinyal iletim sistemini başlıca büyüme faktörü olarak bilinen bir dizi

polipeptid oluşturur. Bunlardan en önemlileri şunlardır: PDGF (trombosit kökenli büyüme faktörü), EGF (epidermal büyüme faktörü), CSF (koloni stimulan faktörler), TGF alfa, beta (transforme edici büyüme faktörleri alfa ve beta), IL-2 (interlökin 2), IGF-1 ve 2 (insülin benzeri büyüme faktörü). Hem proto-onkogen hem de nonprotoonkogen kaynaklı büyüme faktörleri, hedef hücrelerdeki spesifik büyüme faktörü reseptörlere (GFR) bağlanırlar ve bu reseptörler üzerindeki sitoplazmik bölgedeki tirozin kinaz enzimlerini aktifleştirir. Aktifleşen tirozin kinazlar ekstrasellüler sinyali bazı mekanizmalarla stoplazmik proteinlere ve nükleusa aktarırlar. Bu sinyal iletimi sonucu hücre çekirdeğindeki transkripsiyon ve replikasyonu uyarılır ve hücre çoğalması aktive olur. Bu sinyal iletimde rol alan genlerin aşırı aktivasyonu, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olabilmektedir (Dalay N, 2000; Aliustaoğlu M, 2009).

Birçok kanser türünde yetersiz apoptoz görülmektedir. Apoptoz, hücrenin kendi otonom mekanizmaları ile yakındaki hücelere hasar vermeden ATP harcanarak hücrenin yok edilmesidir. Apoptoz, embriyonel gelişim sırasında, organizmanın hücre sayısının düzenlenmesinde, kontamine olmuş hücrelerin yok edilmesinde ve kanserli hücrelerin oluşumunu engellemekte rol oynamaktadır (Gültekin N, 2008).

Hücre proliferasyonu ve apoptozu kontrol eden genler, Kinzler ve Vogelstein tarafından bekçi genler (gatekeeper genes) olarak adlandırılmıştır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kansere neden olmaktadır. Bekçi genler, proto-onkogenler ve anti-onkogenler (tümör süpresör genler) olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Proto-onkogenler, hücre üremesini ve apoptozu kontrol eden genlerdir. Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar sonucu bu genlerin aktivitesinin değişmesiyle bu genler onkogenlere dönüşürler. Onkogenler hücre proliferasyonu hızlandırarak ya da hücrenin apoptozdan kaçmasını sağlayarak kansere neden olurlar. Anti-onkogenler (tümör süpresör genler) ise hücre proliferasyonunu inhibe eder veya geciktirirler. Bu genlerin inaktive olmaları kansere neden olmaktadır (Aslan G, 2010).

2.2 Sfingolipitlerin Yapısı



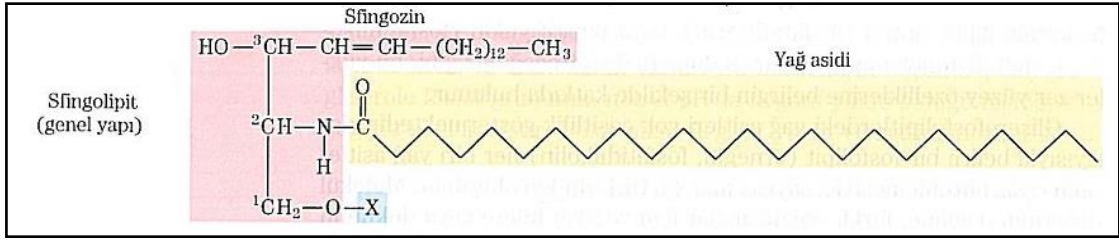
Şekil 2.1. Zar lipitleri ve depo lipitlerinin moleküler yapıları (Nelson DL, 2005)

Sfingolipitler, hücre zarının yapısında yer alan lipitlerden ikinci büyük zar lipiti sınıfını oluştururlar. Sfingolipitlerde, bir polar baş ve iki apolar kuyruk bulunmaktadır; fakat gliserofosfolipitlerin tersine gliserol yerine sfingozin alkolü içerirler. Sfingolipitler, uzun zincirli bir molekül olan amino alkol olan sfingozin (4-sfingenin) alkolü ile bir molekül uzun yağ asidi zincirini ve bazı durumlarda da fosfodiester bağıyla bağlanmış bir polar baş grubu içerir (Nelson DL, 2005).

Sfingolipitler, hücre yüzeyini dış çevrenin zararlı etkilerine karşı, iki tabakalı lipit plazma membranının en dış kısmı ile korurlar. Sentezleri endoplazmik retikulumda başlar ve golgi aygıtında tamamlanır. Sfingolipitler, sfingozin gibi tek hidrofobik zincirden oluştuğu için membranlar arasında hareket edebilmektedir. Sfingolipitlerin bir kısmı sinyal iletiminde de rol oynarlar (Tani M ve ark, 2007; Bandhuvula P ve ark, 2007; Kolter ve ark, 1999).

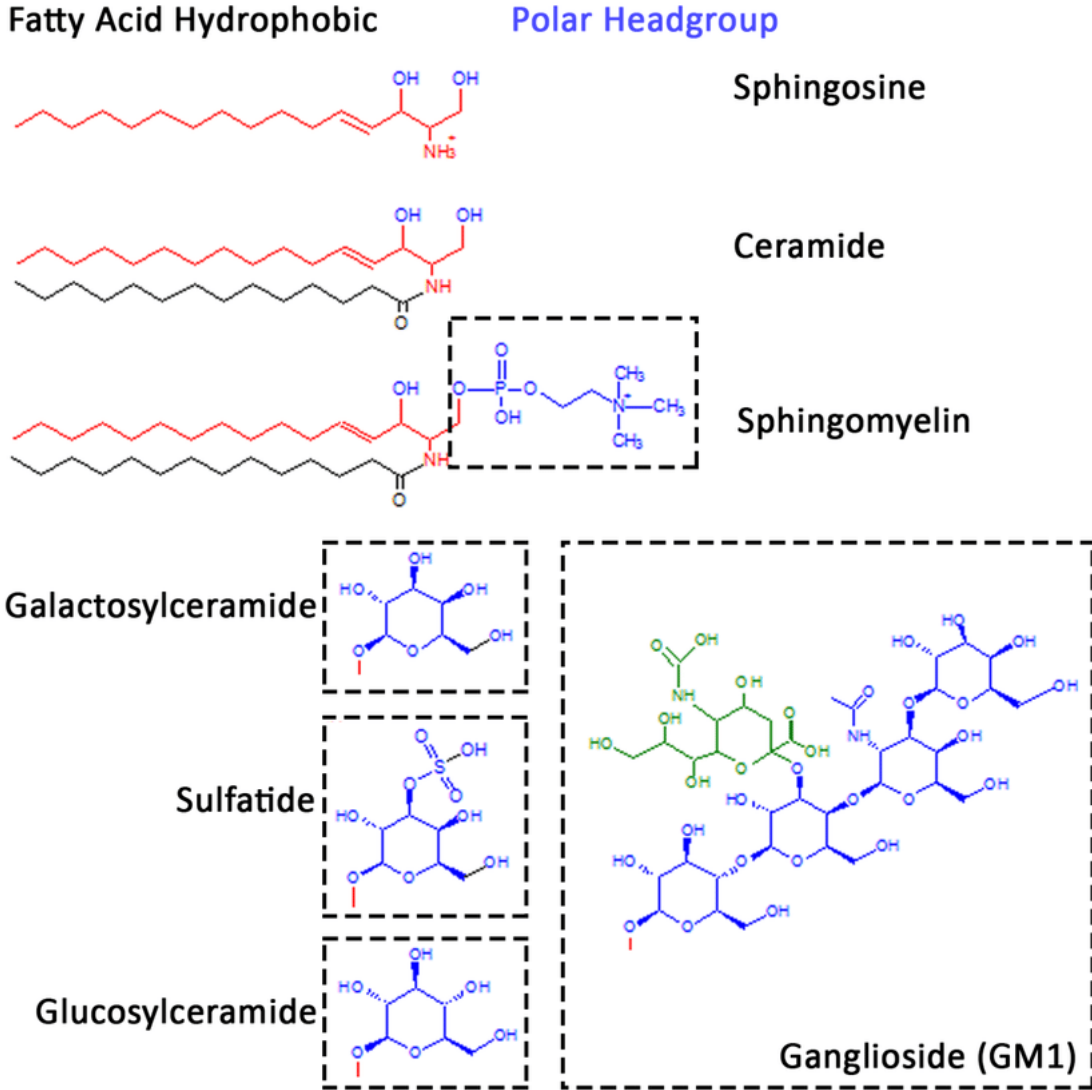
Sfingozin molekülünün ilk 3 karbonu, gliserolün gliserofosfolipitlerdeki üç karbonuna benzemektedir. Bir yağ asidi amid bağıyla C-2'deki -NH₂ 'ye bağlanınca oluşan bileşik yapısal olarak diaçilgliserole benzeyen seramittir. Seramit, bütün sfingolipitlerin ana

yapısıdır. Sfingolipitlerin, hepsi seramidin türevleri olan, fakat baş grupları farklı üç alt sınıfı bulunmaktadır; sfingomiyelinler, nötral (yüksüz) glikolipitler ve gangliozitler (Nelson DL, 2005).



Şekil 2.2.Sfingolipitlerin moleküler yapısı(Nelson DL, 2005)

Sfingomiyelinler polar baş grup olarak genelde fosfokolin ya da fosfoetanolamin içerir ve dolayısıyla gliserofosfolipitlerle beraber fosfolipitler diye sınıflandırılırlar. Gerçekten de, sfingomiyelinler genel özellikleri ve üç boyutlu şekilleri ve baş gruplarında net yük olmamasıyla fosfotidilkolinlere benzerler. Sfingomiyelinler, hayvan hücrelerinin plazma zarlarında bulunmaktadır ve özellikle miyelin adı verilen, bazı nöronların aksonlarını saran ve yalıtan zarımsı kılıfta göze çarpmaktadır. Sfingomiyelinler adı da buradan gelmektedir. Plazma zarlarının dış yüzünde çokça bulunan glikosfingolipitlerin, seramidin C-1 deki -OH kısmına doğrudan bağlanmış (fosfat içermeyen) bir veya daha fazla şeker içeren baş grupları vardır (Nelson DL, 2005; Medis BLHS, 2016).



Şekil 2.3.Sfingomyelinin moleküler yapısı (MendisBHLS, 2016)

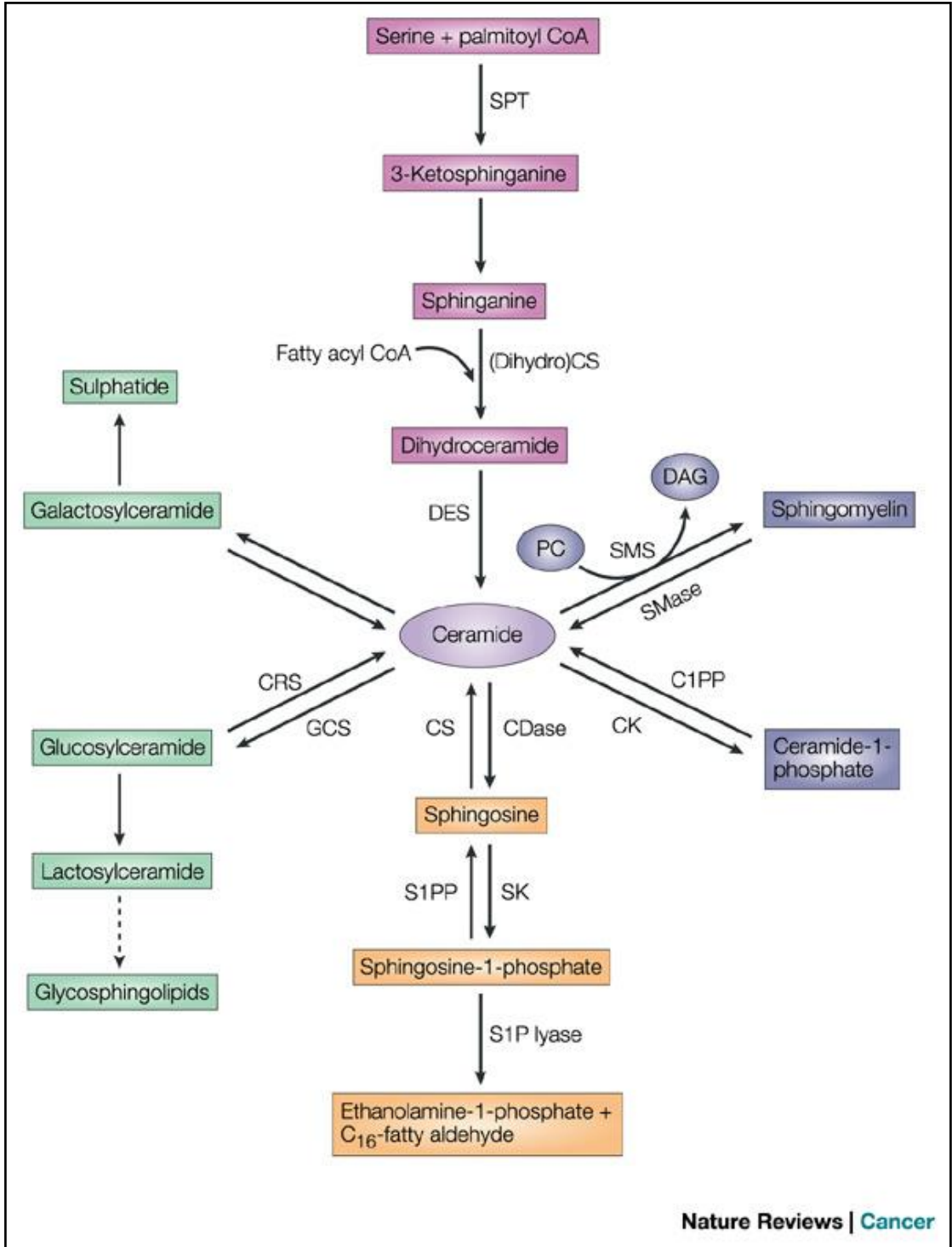
Sfingolipidlerin de novo sentezi endoplazmik retikulumun sitozolik yüzünde Seramid (N-açil sfingozin) oluşturmak üzere serin ve palmitoil-CoA'nın palmitoiltransferaz ile serine kondensasyonu ile başlatılır. Membran fosfolipidi olan sfingomyelinin hidrolizi ile oluşan seramid, sfingolipid metabolizmasının önemli bir molekülüdür (Bartke N ark, 2009; Skoura A ve ark, 2009).

Seramid hücrede farklı organellerde sentezi gerçekleştirilebilmektedir. Seramid, hücre membranında nötr sfingomyelinaz enzimi tarafından sfingomyelininden sentezlenir. Seramidin lizozomlarda sentezi ise asit sfingomyelinaz enzimiyle

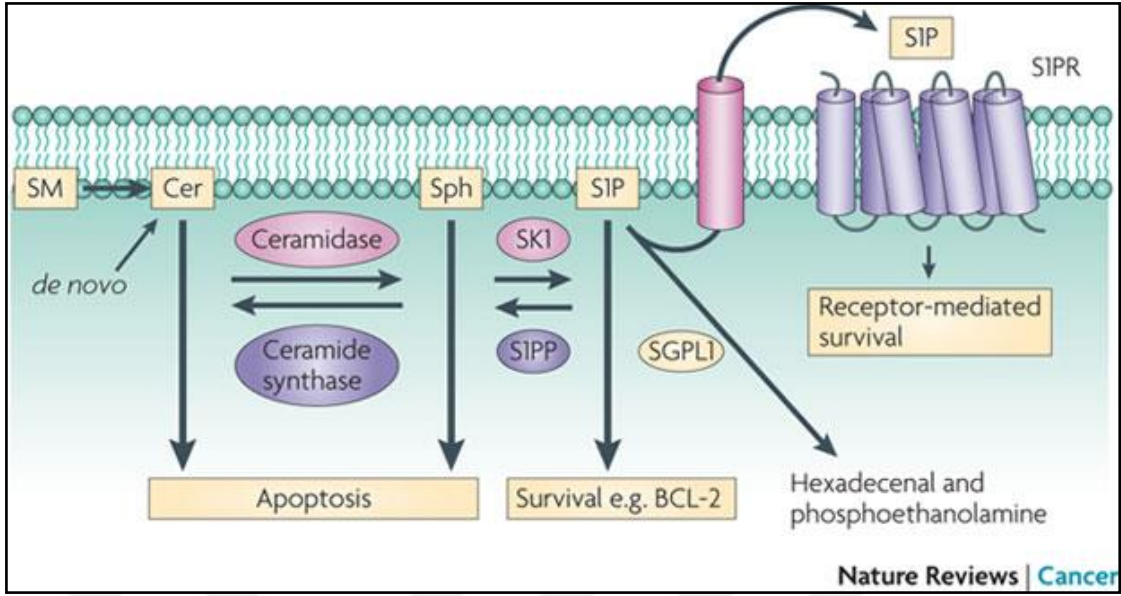
gerçekleştirilir. Mitokondride gerçekleştirilen seramid sentezinde nötr sfingomiyelinaz enzimi rol oynamaktadır. Seramidin *de novo* sentezi endoplazmik retikulumun sitozolik yüzeyinde gerçekleşir (Ogretmen, 2004).

Seramid seramidazlar ile deağıle olur, sfingoid bazı oluşur ve bunlardan memelilerde en yaygın bulunanı sfingozindir. Sfingoid bazın hızlıca katabolize olması için hücre için önemlidir çünkü yüksek seviyedeki sfingozin hücre için toksiktir. Bu nedenle sfingozin, Sfingokinazla ile 1-OH şeklinde fosforile olması gerekmektedir. Bu reaksiyonun ürünü, Sfingozin-1-fosfat da sfingozin fosfatazla defosforile olup sfingozine, irreversibl olarak endoplasmikretikulumda Sfingozin-1-fosfat liyaz ile etanolamin fosfat ve heksadekanale yıkılmaktadır (Skoura A ve ark, 2009; Ryu Y ve ark, 2002).

Hücrelerde Seramid, Sfingozin ve Sfingozin-1-fosfat dinamik bir denge içinde bulunmaktadır. Seramid, Sfingozin ve Sfingozin-1-fosfat sfingolipid yapılı ikincil habercilerdir. Sfingolipid metabolizmasının rol alan spesifik enzimlerinin hücre içindeki lokalizasyonu kesin olarak bilinmemektedir ancak Seramid, Sfingozin ve Sfingozin-1-fosfatın hücredeki lokalizasyonu iyi bilinmektedir. Seramidin *de novo* sentezinin gerçekleştiğı endoplazmik retikulundan golgi aygıtına taşınması iki farklı yolla gerçekleşmektedir. Bunlar ilki, seramid transferazla gerçekleştirilen yoldur. Diğeri ise seramidin glikozil seramide dönüştürüldüğü yoldur. Sfingomiyelin ve glikosfingolipitlerin sentezi golgi aygıtında gerçekleşmektedir. Sentezlenen glikosfingolipit ve sfingomiyelinlerin hücre membranına taşınması veziküller aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Sfingomiyelin, glikosfingolipit ve seramidlerin yıkımı lizozomlarda gerçekleşmektedir (Bartke N ve ark, 2009)



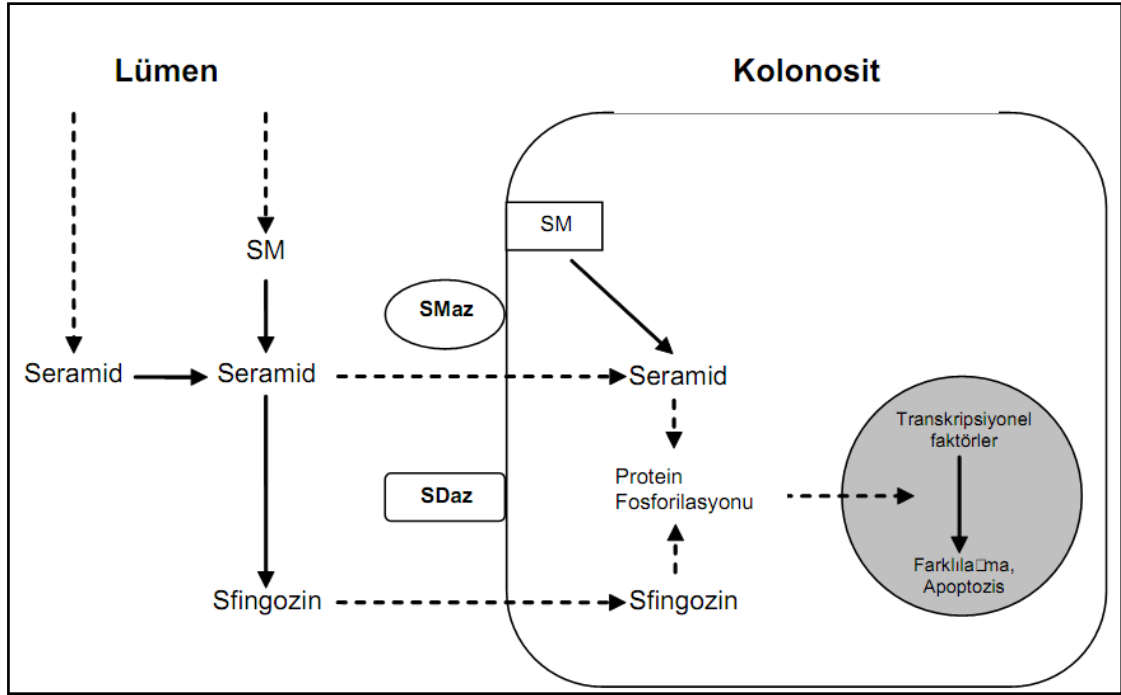
Şekil 2.4. Seramidinde *novo* (pembe) ve sfingomiyelinin (mavi), serebrosidlerin (yeşil) hidrolizi ile sentez edilmesi (Ogretmen, 2004)



Şekil 2.5. Seramid, sfingozin, sfingozin 1-fosfat ile kanser hücresi sağ kalımı arasındaki ilişki. *Kısaltmalar (Seramid (Cer), Sfingozin (Sph), sfingozin 1-fosfat (SIP), Sfingozin-1-fosfat fosfataz (SIPP), Sfingozin-1-fosfat reseptörü (S1PR), Sfingomiyelaz (SM), Sfingozin-1-fosfat liyaz (SGPL1)) (Pyne, 2010)*

Sfingomiyelinin hidrolizi ile oluşan ürünler hücre çoğalması ve farklılaşması üzerinde önemli etkilere sahiptirler. Sfingomiyelinin hidrolizinin ilk basamağı sfingomiyelinaz enzimi gerçekleştirilir. Kemoterapi ilaçları, radyasyon gibi çeşitli stres faktörleri ile aktivasyonu artan sfingomiyelinaz, sfingomiyelini seramid ve fosfokoline ayırır. Asidik sfingomiyelinaz, nötral sfingomiyelinaz ve alkalin sfingomiyelinaz olmak üzere üç tip sfingomiyelinaz bulunmaktadır. Asidik sfingomiyelinaz lizozomlarda bulunur. Bu hücre içindeki sfingomiyelini parçalar. Nötral sfingomiyelinaz ise hücre yüzeyinde bulunur. Nötral sfingomiyelinazın görevi ise hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozisini düzenleyen lipid mesajcıları'nın oluşturulmasıdır. Alkalin sfingomiyelinaz, Nilsson ve arkadaşları tarafından intestinal mukozada bulunan bir sfingomiyelinaz olarak tanımlanmıştır. Bu enzimin en yüksek aktivitesi pH 9.2'de olmaktadır. Alkalin sfingomiyelinazın aktive olabilmesi için alkalin pH, dolayısı ile safra asitleri gereklidir. Bu enzim tripsine karşı dayanıklıdır ve diyetle alınan sfingomiyelinin parçalanmasında önem kazanmaktadır. İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, alkalin sfingomiyelinaz aktivitesinin mide de hiç olmadığı, duodenumda artmaya başladığı ve en yüksek seviyelerine ince bağırsakta ulaştıktan sonra kolon ve rektumda giderek aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir. İnsan safrasında da alkalin sfingomiyelinaz saptanmıştır, ancak

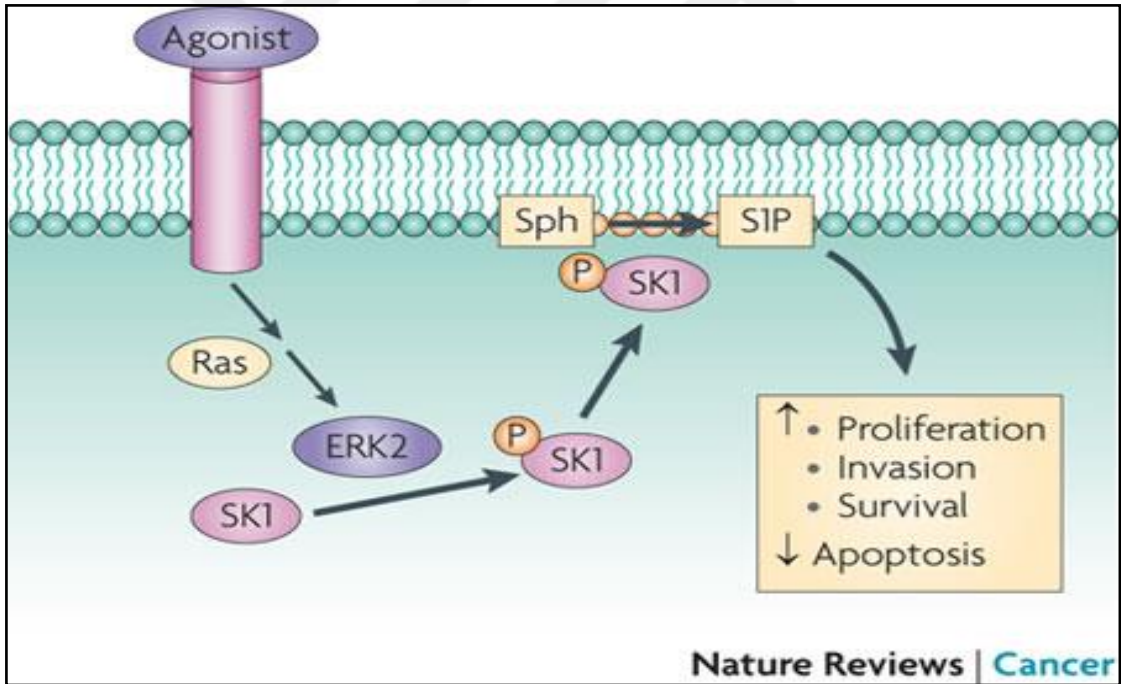
safranın gastrointestinal kanal lümenindeki yoğunluğuna paralel gibi gözükmemektedir. Çünkü duodenumda distal ileum ve kolondan çok daha az miktarda bulunduğu görülmüştür (Kıyıcı M, 2006)



Şekil 2.6.Sfingomyelin ve seramidın kolonosidin büyüme ve farklılaşması üzerindeki muhtemel etkileri. Kısaltmalar (Sfingomyelin (SM), Sfingomyelinaz (SMaz), Seramidaz (SDaz)) (Kıyıcı, 2006)

Diyetle alınan sfingomyelin doğrudan absorbe edilmez önce epitel hücrelerinin apikal membranlarında eksprese edilen alkalın sfingomyelinaz ve seramidaz ile seramid ve sfingozine indirgenir. Epitelyal hücreler, seramid ve sfingozinden Sfingozin-1-fosfat üretimi için gerekli Sfingozin kinaz gibi enzimler eksprese ettiği için, diyet sfingomyelininden Sfingozin-1-fosfat üretebilmektedirler. Sfingozin-1-fosfat üretimi, bağırsak bağışıklık hastalıklarını düzenlenmesi için gereklidir. Yapılan çalışmalarda bağırsak inflamasyonlarının sıklığı ve şiddetinin diyetle alınan sfingomyelin ile değişim gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda diyetle alınan kolesterolünün, sfingolipidlerin bağırsak emilimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Kunisawa J, 2012)

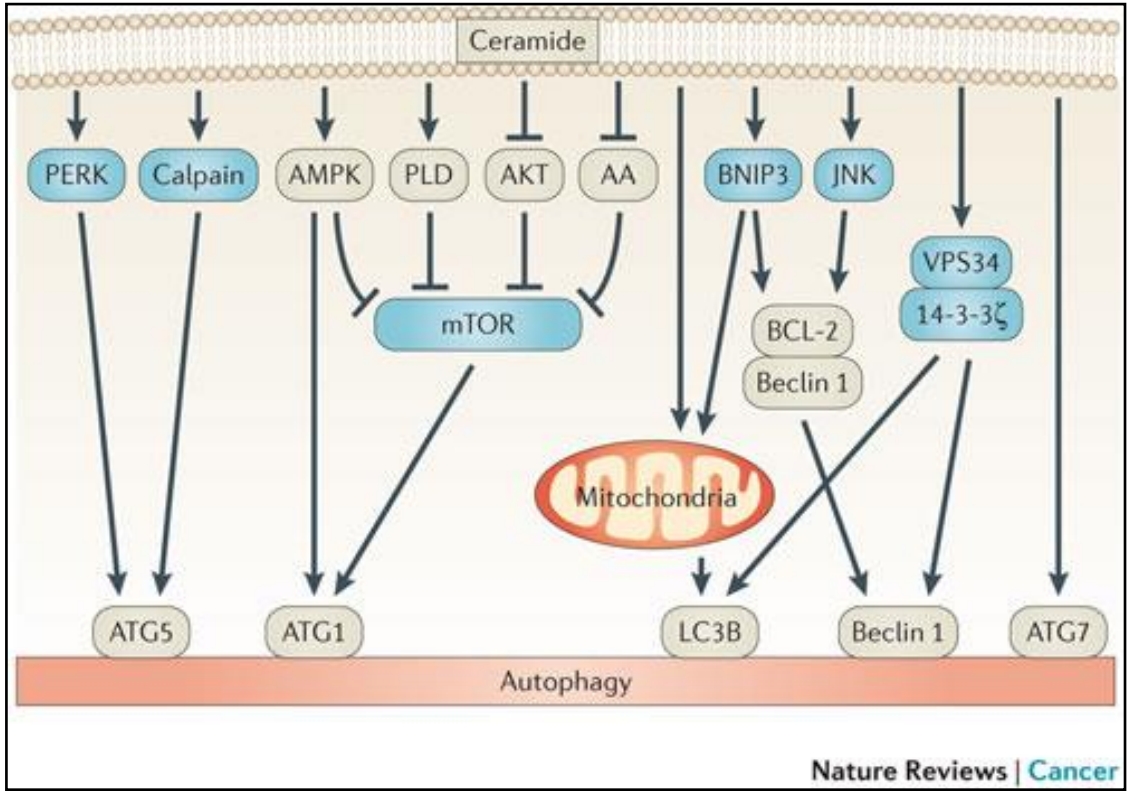
Sfingomiyelinin azalmış ve tam olmayan sindirimi ve absorpsiyonu sonucunda çok miktarda sfingomiyelin ve onun ürünü seramid kolon lümenine gelmektedir. Bunlar alkale sfingomiyelinaz ve seramidaz ile parçalandıktan sonra hücre içine girmekte ve intrasellüler seramid ve sfingoizin düzeylerini yükseltmektedirler. Kolonik intrasellüler seramid aynı zamanda membrana bağlı sfingomiyelinden de üretilebilmektedir. Seramid ve sfingoizin protein fosforilasyonu düzeyini değiştirmekte ve nükleusa sinyal göndererek hücre çoğalmasını inhibe ederken, apoptosisi uyarılmaktadırlar. Seramidin intrasellüler protein fosforilasyon düzeyini ayarlamak için protein kinaz C (PKC) ailesine ait bir izoenzim olan PKC ζ 'yı aktive eder. PKC ζ 'da transkripsiyonal faktör NF-KB'yı aktive ederek hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptosisini kontrol eder (Kıyıcı M, 2006)



Şekil 2.7. Sfingoizin kinaz 1 (SK1) in ERK2 tarafından fosforlanması, sfingoizinin hücre membranına translokasyonuna neden olması. Fosforlanan sfingoizin kinaz 1, hücre membranının da sfingoizini sfingoizin-1-fosfata dönüştürür. Kısaltmalar (Sfingoizin 1-fosfat (S1P), Sfingoizin (Sph)) (Pyne, 2010)

Diyetle alınan sfingomiyelin sfingomiyelinazın substratıdır ve kolon kanseri oluşmasına inhibitör etki göstermektedir. İntestinal mukozal membran sfingolipidlerden zengin

olduğundan ve enterositler çok hızlı farklılaşmaya uğradığından dolayı, alkalin sfingomiyelinazın enterosit çoğalma ve farklılaşmasında önemli olduğu ileri sürülmektedir. Alkalin sfingomiyelinazın intestinal karsinogenez üzerinde inhibitör etkisi vardır. Örneğin, alkalin sfingomiyelinaz seviyelerinin çok yüksek olduğu ince barsakta kanser insidansı çok azdır (Kıyıcı M, 2006).



Şekil 2.8.Seramidin indüklediği otofajik cevap. Kısaltmalar (Aminoasit (AA), AMP aktive edici protein kinaz (AMPK), Fosfolipaz D (PLD), Vakuol protein sorting (VPS34)) (Morad, 2013)

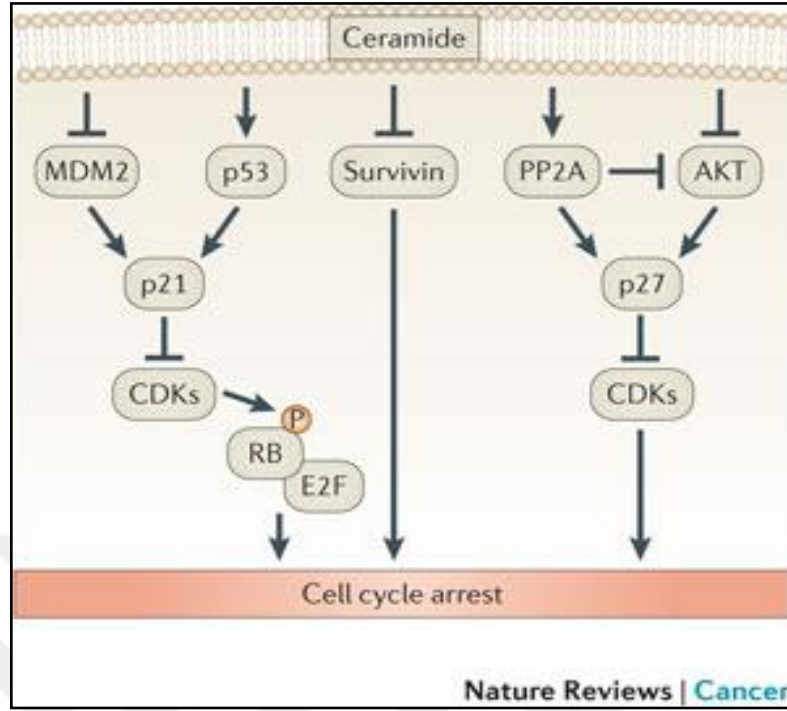
Seramid, hücre büyümesini engeller, strese cevabı ve apoptozisi indükler. Nötral sfingomiyelaz (N-SMase) pathway ya da *de novo* olarak seramid sentezini, p53 ve reaktif oksijen ürünleri ile indüklenmektedir. Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, bazen *de novo* seramid sentezi ile yönetilir. Seramidin neden olduğu apoptozun intrinsek mitokondriyal yolu esas olarak kaspazlar ve BCL-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenir. Mitokondride üretilen reaktif oksijen ürünleri indüklemesi ile nötr

sfingomiyelinaz tarafından seramid üretimini arttırmaktadır. Mitokondride üretilen seramid, protein fosfataz 1 (PP1) ve protein fosfataz PP2A'yı aktive ederek apoptoza neden olabilmektedir. PP2A anti-apoptotik proteinleri inhibe eder, PP1 ise pro-apoptotik proteinleri aktifleştirmektedir. Lizozomlarda asit sfingomiyelaz enzimiyle üretilen seramid, lizozomlarda, katepsin D'yi aktive ederek apoptozise neden olabilmektedir (Pyne, 2010; Morad,2013 Ogretmen, 2004).

Seramid hücrede otofajiyi de indüklemektedir. Seramidin otofajiyi indüklemesi esas olarak pre-otofagozom oluşumundan sorumlu otofaj mediatörlerinden beclin 1 ve LC3B etki ederek olmaktadır. Seramid, otofajik mediatörler üzerine etkisini mTOR, JNK, PRKR benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), BNIP3, kalpain gibi ara molekülleri hedefleyerek gösterir (Morad, 2013).

Seramid, seramidaz ile sfingozine metabolize olur. Sfingozin, protein kinase C inhibisyonuna neden olur ve apoptozisi indükler. Seramid ve sfingozinin büyüme inhibitörü ve pro-apoptotik etkilerinin aksine, sfingozinden sfingozin kinaz ile fosforilasyonu sonucu oluşan Sfingozin-1-fosfat, seramid kaynaklı apoptozu inhibe eder. Sfingozin-1-fosfatın hücre içi konsantrasyonu düşüktür. Hücre içi Sfingozin-1-fosfat seviyesi, sfingozin kinazlar tarafından yapım, Sfingozin-1-fosfat liyaz ve Sfingozin-1-fosfat fosfatazlar tarafından yıkımı arasındaki denge ile korunmaktadır (Pyne, 2010; Morad,2013).

Literatürde, kanserin sfingolipitler, sfingozin ve seramidle olan ilişkisinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan farklı çalışmalarda, seramidin veya seramid metabolitlerinin kanser hücrelerinde strese bağlı apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Çeşitli apoptotik uyarılar, duyarlı kanser hücrelerinde seramid seviyesinin artışına neden olurken; dirençli kanser hücrelerinde hücre içi seramid seviyesinde artış olmamıştır (Ogretmen, 2004).



Şekil 2.9. Seramidin hücre döngüsü durdurması. *Kısaltmalar (Siklin bağımlı kinaz (CDK), Fosforilasyon (P), Protein fosfataz 2A (PP2A)) (Morad, 2013)*

Kanser hücreleri SL analoglarının varlığında kaspaz aktivasyonunu ve apoptozu tetiklendiği tespit edilmiştir. SL'lerin kaspaz aktivasyonunu muhtemelen sitokrom c salımı gibi mitokondriyal olayları ile olduğu düşünülmektedir. Seramid metabolizmasının seramid birikimine neden olan farmakolojik veya epigenetik stratejilerle modülasyonu kaspaz aktivasyonuna ve kanser hücrelerinin apoptozisine neden olmaktadır. Seramid içeriğinin azalması, apoptoza karşı kanser hücresi dirençli duruma getirebilmektedir (Ségui, 2006).

Sfingolipid metabolizmasıyla hem antiproliferatif hem de proliferatif moleküllerin üretilmektedir. Bu nedenle, yapılan çalışmalar sonucunda sfingolipitlerin kanseri gelişimini engelleyebildiği gibi kansere de yol açabileceğini göstermiştir. SM, kolon kanseri hastalarının lenf nodlarında pozitif lenf nodlarında negatif lenf nodlarına oranla daha yüksek seviyelerde saptanmıştır. Hastalıklı dokulardaki SM'deki artışı, seramid seviyelerinin insan kolon kanserinden %50 oranında azaldığı için SM'nin inhibe edilmiş bir hidrolizi nedeniyle olduğu düşünülmektedir (Duan, 2005).

Yapılan çalışmalarda Sfingokinaz 1 in kanser hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edildiği saptanmıştır (Li J, 2008; Li W, 2009).Başka bir çalışmada ise Sfingozin kinaz 1 ve sfingozin 1 fosfat ilaca direnç geliştirmede önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir. Kanser tedavisinde kanser hücreleri kemoterapinin indüklediği apoptozis ile yok edilmeye çalışılmaktadır. Prostat kanserinde ise sfingozin 1 kinazın ilaca bağlı apoptozisi regüle ettiği tespit edilmiştir (Pchejetski, 2005). Sfingokinaz 1 ile yapılan başka bir çalışmada sfingokinaz 1 aktivite düzeyinin, kanser hücrelerinin kemoterapötik direnci ve hormona dirençli davranışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pyne, 2010). Kolon kanserlerinde, sfingokinaz 1 indüksiyonunun neovaskülarizasyon ve inflamasyona yol açan S1P birikimine neden olduğu düşünülmektedir. Sfingozin-1-fosfat seviyeleri kolon kanserlerinde ve lösemilerde yüksek olduğu saptanmıştır (Ogretmen, 2004).

Sfingokinaz 1, aktivitesi ile pankreas kanser hücrelerinin ilaç direnci arasında korelasyon saptanmıştır. Sfingokinaz 1, aktivitesi arttıkça ilaç direnci artmaktadır (Guillemet-Guibert J, 2009).Sfingozin-1-fosfatı parçalayan sfingozin liyaz enziminin ekspresyonu ve enzimatik aktivitesinin tümör grade ile ilişkili olduğu ve kanserli olmayan dokulara göre kanserli dokularda sfingolizazın down regüle olduğu tespit edilmiştir (Brizuela L, 2012).

Yapılan çalışmalarda, göğüs kanseri hücrelerinde, seramidi glukosilseramide dönüştüren glukosilseramid sentaz enziminin etkisiyle hücre içinde seramidin azaltılması ilaç direncinin gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir (Ogretmen, 2004).

Hücre döngüsünün kontrolsüz kalması kontrolsüz çoğalmaya bunun sonucu olarak da kanser gelişimine neden olmaktadır. Seramid, hücre döngüsünün kontrol edilmesinde rolü bulunmaktadır. Seramid, hücrenin G1 ve G2 fazında tutulu kalmasına neden olmaktadır (Morad, 2013).

Kolorektal kanser dokusunda, normal dokulara göre, her üç sfingomiyelinaz (alkalen, nötral ve asidik) aktivitesinde de azalma olduğu bildirilmiştir. En belirgin azalma alkalen sfingomiyelinazda olmakta ve tümör dokusunda aktivitesi yaklaşık %75 kadar (asidik sfingomiyelinazın 2 katı) düşmektedir. Alkalen sfingomiyelinaz aktivitesinde

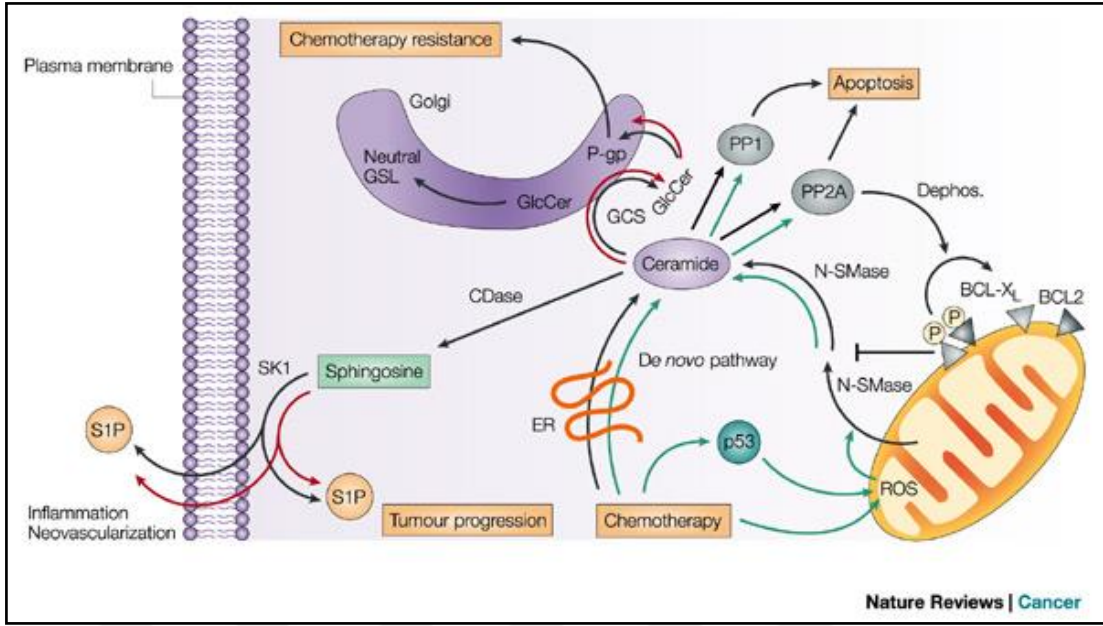
azalma malign dönüşümün erken safhasında görülmekte ve henüz adenom seviyesinde iken aktivitede azalma %50'ler seviyesinde olmaktadır. Familial adenomatöz polipozis (FAP) hastalarında alkalen sfingomiyelinaz aktivitesinde %90 düşüş tespit edilmiştir. FAP'da görülen APC geni mutasyonu ile alkalen sfingomiyelinaz down-regülasyonu arasında ilişki olmadığı da son zamanlarda ortaya konmuştur. Ancak adenomdan karsinoma ilerleyen yolda apoptosise karşı sürekli artan bir direnç olduğu bilinmektedir ve alkalen sfingomiyelinazın aktivitesindeki defektin buna neden olduğu U937 insan monosit-benzeri hücrelerinde gösterilmiştir (Kıyıcı, 2006)

Asidik seramidaz enziminin Murine L929 fibrosarkoma hücre hattında yüksek düzeyde eksprese edildiği ve TNF indüklü apoptozun inhibe olduğu yapılan çalışma sonucu saptanmıştır (Strelow A, 2000).

Sfingozin kinaz 1 insan Jurkat T lösemisinde yüksek düzeyde eksprese edildiği tespit edilmiştir (Olivera A, 1999). Başka bir çalışmada, sfingozin kinaz 1 insan HL-60 lösemisinde yüksek düzeyde eksprese edilmekte olduğu ve antikanser ilacına bağlı apoptozun inhibe olduğu gösterilmiştir (Bonhoure E, 2006).

2014 yılında Czubowicz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 24 saat C2-seramide maruz kalan SH-SY5Y (insan neuroblastoma hücre hattı) hücrelerinin, serbest radikallerin seviyesini arttığı ve konsantrasyona bağlı bir şekilde nöronal hücre ölümüne neden olduğu gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada C2-seramidin, PI3-K / Akt yolunu etkisizleştirerek hücre ölümüne yol açtığını tespit edilmiştir (Czubowicz ve ark, 2014).

2000 yılında Green ve 1998 yılında Mathias ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda ise seramidin antikanser ilaçları, ısı şoku, ultraviyole ve gama ışınması, tümör nekroz faktörü ve büyüme faktörü çekilmesi gibi çeşitli stres uyaranlarından sonra arttığını saptanmıştır (Green, 2000; Mathias ve ark. 1998).



Şekil 2.10 Kemoterapötik ajanlar ve radyoterapi ile tedavi edilen kanser hücresinde seramid düzeyindeki değişimler. Seramid seviyesindeki artış yeşil oklar ile gösterilmiştir. Tümörlerde saptanan sfingolipid sağ kalım, tümörejenik ve kemoterapi direnç yolları kırmızı oklarla gösterilmektedir. *Kısaltmalar* (Nötral sfingomiyelaz (N-SMase), Reaktif oksijen ürünleri (ROS), Sfingozin-1-fosfat (S1P), Sfingozin kinaz 1 (SK1), Glukozil seramid sentaz (GCS), Glukozil seramid (GlcCer), P-glikoprotein (P-gp), Seramidaz (CDase), Endoplazmik retikulum (ER), Protein fosfataz (PP1), Protein fosfataz 2A (PP2A), Glikosfingolipit (GSL)) (Ogretmen, 2004)

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre hatları ve hücre kültürü

Bu çalışma için C6 (Sıçan Glioma Hücresi), OV2008 (İnsan Serviks Kanseri), HT29 (İnsan Kolorektal Adenokarsinom Hücresi) ve CCD-18Co (İnsan Sağlıklı Kolon Fibroblast Hücresi) hücre hatları kullanılmıştır. Kullanılan bu hücre hatları Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ercan ÇAÇAN Kanser Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir.

Antikanser etkisi çalışılan seramid ve sfingomiyelin DMSO ve etil alkol içerisinde çözüldü. Çalışmada seramid ve sfingomiyelinin farklı dozları kullanılarak hücre hatları üzerine olan sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Kullanılan hücre hatlarının genel özellikler aşağıdaki çizelge 3.1 de belirtilmiştir.

	<i>C6</i>	<i>OV2008</i>	<i>CCD-18Co</i>	<i>HT29</i>
<i>Organizma</i>	<i>Rattus norvegicus</i> , rat	<i>Homo sapiens</i> , İnsan	<i>Homo sapiens</i> , İnsan	<i>Homo sapiens</i> , İnsan
<i>Elde edildiği doku</i>	Beyin	Over	Kolon	Kolon
<i>Hücre tipi</i>	Glial hücre		Fibroblast	Epitel
<i>Elde edildiği kişinin yaşı</i>	-	66	2.5 Aylık	44
<i>Cinsiyeti/Etnik köken</i>	Erkek	Kadın	Kadın	Kadın (Kafkas)
<i>Çoğalma özelliği</i>	Flask yüzeyine yapışarak	Flask yüzeyine yapışarak	Flask yüzeyine yapışarak	Flask yüzeyine yapışarak
<i>Hastalık</i>	Glioma	İnsan papilloma virüsü ilişkili servikal skuamöz hücre karsinomu	Sağlıklı	Kolorektal adenokarsinom
<i>Besiyeri</i>	DMEM	RPMI-1640	Eagle's Minimum Essential Medium	DMEM
<i>Kültür koşulları</i>	%5 CO ₂ , 37°C	%5 CO ₂ , 37°C	%5 CO ₂ , 37°C	%5 CO ₂ , 37°C
<i>Besi yeri yenileme süresi</i>	Haftada 2-3 kere		2-3 günde bir	Haftada 2-3 kere
<i>Dondurma medyumunu</i>	%95 kültür medyumunu, %5 DMSO	%95 kültür medyumunu, %5 DMSO	%95 kültür medyumunu, %5 DMSO	%95 kültür medyumunu, %5 DMSO
<i>Depolama sıcaklığı</i>	Sıvı Nitrojen	Sıvı Nitrojen	Sıvı Nitrojen	Sıvı Nitrojen
<i>Biyogüvenlik düzeyi</i>	1		1	1
<i>Ek Özellik</i>		Sisplatin dirençli		
<i>Onkogen</i>				myc+; ras+; myb+; fos+; sis+; p53+; abl-; ros-; src-

Çizelge 3.1 Hücre hatlarının genel özellikleri (<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/>, <https://web.expasy.org/cellosaurus/>)

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallar, cam ve plastik malzemeler ve cihazlar çizelge 3.2 de gösterilmiştir.

<i>Kimyasallar</i>	<i>Firma</i>
DMSO	Amresco
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	
Etil alkol	Isolab
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biological Industries
MEM	Sigma
RPMI	Sigma
Tripan blue	
Tripsin	Biological Industries
Asetik asit	
TCA	
TRIS BASE	
SRB	Sigma
Seramid	Sigma
Sfingomiyelin	Sigma
<i>Cam ve Plastik Malzemeler</i>	
15 ml ve 50 ml kapaklı falkon tüp	
96'lık Kuyucuklu plak (Well Plate)	
Beher	
Eppendorf	
Vakum Filtre	
Hemositometre	
Hücre kültürü uyumlu flask (25 cm ² /75 cm ²)	
Lam-Lamel	
Mikropipet (8 kanallı)	
Mikropipetler (0,5-1 µl, 1-5 µl, 5-10 µl, 10-200 µl, 5-50 µl, 20-200 µl)	
pastör pipeti	
Tek kullanımlık dereceli serolojik pipet	
<i>Cihazlar</i>	
CO ₂ 'li Hücre Kültür İnkübatörü	
Deiyonize Su Cihazı	
Derin Dondurucu	
Vorteks	
Elektrikli Puar	
Hassas Terazi	
Hücre Kültürü Kabini (Laminar Flow)	
İnvert Işık Mikroskobu	
Manyetik Karıştırıcı	
Multiplak Okuyucu Spektrofotometre	
Otoklav	
pH Ölçer	
Santrifüj	

Çizelge 3.2 Deneyde kullanılan kimyasallar, cam ve plastik malzemeler ve cihazların listesi

3.2. Metot

3.2.1. Hücre inkübasyon koşulları

HT29 (insan Kolorektal adenokarsinom) ve C6 (rat glioma) hücre hattı için %10 Fötal Sığır Serum (FBS), 200 mM L-glutamin, 100U/ml penisilin, 200 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) besiyerinde %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş ortamda 37°C'de steril şartlarda kültüre edildi. Üç günde bir kültür besiyerleri tazelenildi. Yeterli sayıya ulaşan hücreler ile deneye başlandı. (<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-38.aspx>, <http://www.interlab.com.tr/tr-tr/sigma-aldrich/hucre-kulturu-besi-ortami-2>, <https://www.wikizeroo.org/index.php?q=aHR0cHM6Ly9lbi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvRWFnbGUnc19taW5pbWFsX2Vzc2VudGlhbF9tZWVudW0>)

OV2008 (İnsan papilloma virüsü ilişkili servikal skuamöz hücre karsinomu) hücre hattı için %10 Fötal Sığır Serum (FBS), 2 mM L-glutamin, 100U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş ortamda 37°C'de steril şartlarda kültüre edildi. Üç günde bir kültür besiyerleri tazelenildi. Yeterli sayıya ulaşan hücreler ile deneye başlandı. (https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0473, <http://www.interlab.com.tr/tr-tr/sigma-aldrich/hucre-kulturu-besi-ortami-2>, <https://www.wikizeroo.org/index.php?q=aHR0cHM6Ly9lbi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvRWFnbGUnc19taW5pbWFsX2Vzc2VudGlhbF9tZWVudW0>)

CCD-18Co (insan sağlıklı fibroblast hücresi) hücre hattı için 13 esansiyel aminoasit, 8 vitamin (B₁ vitamini, B₂ vitamini, B₃ vitamini, B₅ vitamini, B₆ vitamini, folik asit, kolin, inositol) ve 6 çeşit tuz (kalsiyum klorid, potasyum klorid, magnezyum sülfat, sodyum klorid, sodyum fosfat, sodyum bikarbonat) içeren Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) besiyerinde %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş ortamda 37°C'de steril şartlarda kültüre edildi. Üç günde bir kültür besiyerleri tazelenildi. Yeterli sayıya ulaşan hücreler ile deneye başlandı. (https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_2379, http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1459.aspx?geo_country=tr, <http://www.interlab.com.tr/tr-tr/sigma-aldrich/hucre-kulturu-besi-ortami-2>)

[2,https://www.wikizeroo.org/index.php?q=aHR0cHM6Ly9Ibi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvRWFnbGUnc19taW5pbWFsX2Vzc2VudGlhbF9tZWVpdW0](https://www.wikizeroo.org/index.php?q=aHR0cHM6Ly9Ibi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvRWFnbGUnc19taW5pbWFsX2Vzc2VudGlhbF9tZWVpdW0))

3.2.2. Seramid ve sfingomiyelinin dozlarının hazırlanması

Hücre hatları üzerindeki etkisini araştırılan seramid molekülü iki farklı çözücü (DMSO ve Etil alkol) içerisinde çözüldü.

Çözücü olarak DMSO' nun kullanıldığı seramid dozları şu şekilde hazırlandı:Seramid, dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma) içerisinde çözüldükten sonra besi yerleri içinde dilüe edilerek (RPMI-1640, DMEM, EMEM) seramidin 10, 40, 60, 100, 120, 125 μ M dozları hazırlandı. Çözücü olarak kullandığımız DMSO besi yerleri ile dilüe edilerek hazırlandı.

Çözücü olarak etilalkolün kullanıldığı seramid dozların şu şekilde hazırlandı:Seramid, etilalkol içerisinde çözüldükten sonra besi yerleri içinde dilüe edilerek (RPMI-1640, DMEM, EMEM) seramidin 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,40, 0,50 μ M dozları hazırlandı. Çözücü olarak kullandığımız etilalkol besi yerleri ile dilüe edilerek hazırlandı.

Hücre hatları üzerindeki etkisi araştırılan diğer molekül sfingomiyelin DMSO ve etil alkol içerisinde çözüldü.

Çözücü olarak DMSO' nun kullanıldığı sfingomiyelin dozların şu şekilde hazırlandı:Sfingomiyelin DMSO (Sigma) içerisinde çözüldükten sonra besi yerleri içinde dilüe edilerek (RPMI-1640, DMEM, EMEM) sfingomiyelinin 0,0125, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 μ M dozları hazırlandı. Çözücü olarak kullandığımız DMSO besi yerleri ile dilüe edilerek hazırlandı.

Çözücü olarak etilalkolün kullanıldığı sfingomiyelin dozları şu şekilde hazırlandı:Sfingomiyelin, etilalkol içerisinde çözüldükten sonra besi yerleri içinde dilüe edilerek (RPMI-1640, DMEM, EMEM) sfingomiyelin 0,0125, 0,025, 0,05, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 μ M dozları hazırlandı. Çözücü olarak kullandığımız etilalkol besi yerleri ile dilüe hazırlandı.

3.2.3. SRB testi

Bu çalışmada hücre total proteinlerinin (hücrede sentezlenen total protein miktarı toplam hücre sayısı ile doğru orantılıdır) tespitine dayalı olarak hücre miktarının belirlenmesini sağlayan sülforodamin B (SRB) testi kullanılarak hücre proliferasyonu değerlendirilmiştir.

SRB testi, 1990 yılında Skehan ve ark. tarafından geliştirilen hücre proliferasyonunu gösteren sitotoksosite yöntemidir. SRB, aminoksanten yapısında parlak pembe renkli bir boyadır. Yöntemin esası, SRB'nin sitokiyometrik olarak hafif asidik koşullarda temel aminoasit rezidülerine bağlanmasına dayanır. Böylece boyanmış hücrelerden elde edilen boya miktarı ile doğrudan total protein miktarı ve bu şekilde hücre sayısı hakkında bilgi veren kolorimetrik bir yöntemdir (Skehan P ve ark,1990). SRB testinin diğer sitotoksosite testlerine göre nispeten daha ucuz ve kolay uygulanması nedeniyle sık tercih edilen bir test olmasına neden olmaktadır.

SRB'nin hazırlanışı: kristal formdaki SRB, %1 asetik asit içerisinde çözülerek %4 lük SRB çözeltisi hazırlandı.

SRB Testinin Uygulanması:96 well plate her bir kuyucukta eşit sayıda hücre olacak (7.500) şekilde ekimi yapılan hücreler,24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda hücrelere test edilecek maddeler (kontrol grubu hariç)belli konsantrasyonlarda uygulanmışve test maddeleriyle 72 saat inkübe edilmiştir. 72 saatlik inkübasyonun ardından SRB testine geçilmiştir. Her bir kuyucuğa 100 µL trikloroasetik asit (CCl₃COOH, TCA) eklenerek 4⁰C de 90 dakika inkübe edilen kuyucuklar 3 kez 300 µL dd H₂O(çift distile su) ile yıkanıp 50⁰C de 30 dakika kurutulmuştur. Hücreler 100 µL SRB boyası ile 25⁰C de 30 dakika muamele edildikten sonra 300 µL %1 lik asetik asit (CH₃COOH) ile 3 kez yıkanarak 50⁰C de 30 dakika kurutulmuştur. Tüm kuyucuklara 200 µL 10 mM Tris Base çözeltisi eklendikten sonra 25⁰C 30 dk inkübe edilmiş ve bir mikropilaya okuyucuda 492 nm dalga boyundaki absorban değerleri kaydedilmiştir. Okunan değerler, her bir kuyucuktaki ilaç uygulanan hücrelerin absorbanı x 100 / kontrol hücrelerinin absorbanı formülüne göre canlı hücre yüzdesine çevrilmiştir (Ökten S ve ark, 2017).

3.2.4. İstatiksel metot

Seramid ve sfingomiyelinin IC50 değerlerinin hesaplanması için regresyon analizi kullanılmıştır. Hesaplama işlemlerinde excel programından faydalanılmıştır.

İstatistikte regresyon analizi değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemede kullanılan yaygın bir yöntemdir. Regresyon analizi, veri çizelgesine tam olarak uyan bağımlı değişkenin bağımsız değişkenle arasındaki ilişkinin matematiksel bir fonksiyonu bulunamadığı durumlarda veri çizelgesine en çok uyan fonksiyonu belirlemeyi sağlamaktadır.

Determinasyon katsayısı (R^2), regresyon modelinin gerçeği ne derece yansıtabildiğinin bir ltüdür. Determinasyon katsayısı korelasyon katsayısının karesine eşit olup 0 ve 1 değerleri arasında bulunmaktadır. Regresyon doğrusunun başarı durumu arttıa determinasyon katsayısı değeri 1'e yaklaşmaktadır.

Seramid ve sfingomiyelinin hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkilerinin istatistiksel olarak anlamlılığını analiz edilmek için graphpad prism uygulamasından yararlanılmıştır. Veriler, Graphpad prism uygulaması kullanılarak pearson korelasyon analizi ve t testi ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Seramid ve sfingomiyelinin hücre canlılığına olan etkisini araştırdığımız çalışmada, seramid ve sfingomiyelin iki farklı çözücünde hazırlandı. Çözücülerin seramid ve sfingomiyelinin etkinliğini değiştirip değiştirmediği incelendi. DMSO ve etanol çözücülerle seramid ve sfingomiyelinin farklı konsantrasyonlarının hücre proliferasyonuna etkisi SRB testi ile değerlendirilmiştir. Seramid ve sfingomiyelin tedavisi uygulanmış C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılık seviyeleri, SRB testinde elde edilen absorbans değerlerine göre ilaç uygulaması yapılmayan kontrol grubu C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının SRB testinde elde edilen absorbans değerleriyle kıyaslanması sonucu hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler çizelgelerde gösterilmiştir. IC50 konsantrasyonları (hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon) regresyon analizi ile hesaplanmıştır, hesaplanan değerler çizelge 4.5 de gösterilmiştir.

4.1. Seramidin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

DMSO içerisinde çözünen seramidin hücre canlılığı üzerine etkisi dört farklı hücre hattında 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 100 μ M, 120 μ M konsantrasyonlarda incelenmiştir. Seramidin düşük konsantrasyonların da (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) OV2008 ve HT29 hücre hatlarında kontrolle kıyaslandığında canlılık oranlarında artış gözlenmiştir (Şekil 4.1-c). CCD-18Co hücre hattın da ise seramidin 5 μ M konsantrasyonun da canlılığı en fazla artış gösteren hücre hattı olmuştur ancak OV2008 ve HT29 hücre hattının aksine CCD-18Co hücre hattın da 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonlarında canlılık oranları kontrole göre azalmaya başlamıştır (Şekil 4.1-d). C6 hücre hattın da düşük konsantrasyonlardan (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) itibaren canlılık oranlarında azalma gözlenmiştir (Şekil 4.1-a). Seramid 40 μ M konsantrasyonda uygulandığında ise dört hücre hattında da belirgin bir canlılıkta azalma tespit edilmiştir. 60 μ M konsantrasyondan itibaren ise konsantrasyon artışıyla beraber 40 μ M göre canlılık oranları tekrar artmaya başladığı tespit edilmiştir. Canlılık oranları en fazla azaltan konsantrasyon (CCD-18Co (125 μ M) hücre hattı hariç) 40 μ M olurken

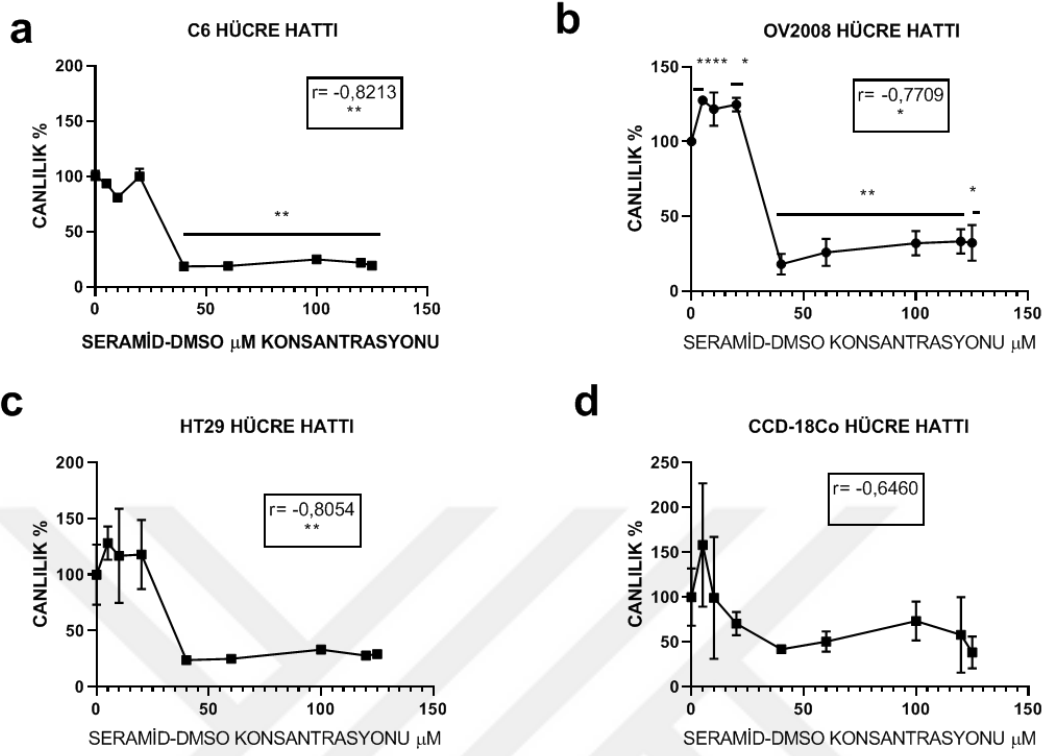
canlılığın en fazla artırılacak konsantrasyon ise 5 μM (C6 hücre hattı hariç) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1). 40 μM konsantrasyondaki seramid uygulanan konsantrasyonlar arasında C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılık oranlarını ortalama %50 nin (sırasıyla 18.6; 17.92; 23.77; 41.83 (çizelge 4.1) altına inmesini sağlayan en düşük konsantrasyon olduğu gözlenmiştir.

Veriler istatistiksel olarak incelendiğinde ise pearson korelasyon testine göre CCD-18Co hücre hattı hariç seramid konsantrasyonu ile canlılık oranı arasında anlamlı derecede ters korelasyon bulunduğu saptanırken yapılan t testine göre ise C6 ve OV2008 hücre hatlarında yüksek konsantrasyondaki hücre ölüm oranları kontrol grubuna göre anlamlı olduğu bulunmuştur (Şekil 4.1).

DMSO içerisinde çözünen seramidin regresyon analizi ile hesaplanan IC50 konsantrasyonları çizelge 4.5 de belirtilmiştir. IC50 konsantrasyonlarına göre DMSO içerisinde çözdüğümüz seramide en hassas hücre hattı C6 (32.7 μM) olurken en dirençli hücre hattı CCD-18Co (56.91 μM) hücre hattı olmuştur. OV2008 ve HT29 hücre hatlarına seramidin etkisi benzer şekilde saptanmıştır ve IC50 değerleri yaklaşık olarak 42 μM olarak hesaplanmıştır.

<i>DOZLAR</i>	<i>C6</i>	<i>OV 2008</i>	<i>HT 29</i>	<i>CCD-18Co</i>
<i>KONTROL</i>	100 \pm 3.61	100 \pm	100 \pm 19.06	100 \pm 22.62
<i>Seramid 5 μM</i>	93.53 \pm 0.16	127.60 \pm 0.76	128.01 \pm 1.54	157.96 \pm 48.60
<i>Seramid 10 μM</i>	80.86 \pm 2.69	121.72 \pm 7.86	116.78 \pm 2.74	98.99 \pm 48.08
<i>Seramid 20 μM</i>	99.95 \pm 4.91	124.72 \pm 3.23	117.88 \pm 1.87	70.39 \pm 9.16
<i>Seramid 40 μM</i>	18.60 \pm 1.54	17.92 \pm 4.89	23.77 \pm 1.35	41.83 \pm 2.18
<i>Seramid 60 μM</i>	18.89 \pm 0.31	25.75 \pm 6.42	24.97 \pm 1.46	50.22 \pm 8.08
<i>Seramid 100 μM</i>	24.89 \pm 0.56	31.88 \pm 5.76	33.12 \pm 1.83	73.32 \pm 15.36
<i>Seramid 120 μM</i>	21.90 \pm 1.49	33.24 \pm 5.82	27.69 \pm 2.76	57.82 \pm 29.74
<i>Seramid 125 μM</i>	19.23 \pm 0.04	32.14 \pm 8.44	29.07 \pm 1.38	38.21 \pm 12.48

Çizelge 4.1 Farklı dozlardaki DMSO içerisinde çözülmüş seramidin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.1 Farklı dozlardaki DMSO içerisinde çözülmüş seramidin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisinin grafiksel gösterimi. Kontrol grubunun canlılık oranı % 100 olarak kabul edilmiştir.

Etanol içerisinde çözünen seramidin hücre canlılığı üzerine etkisi 4 farklı hücre hattında 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.15 μ M, 0.2 μ M, 0.25 μ M, 0.3 μ M, 0.4 μ M konsantrasyonlarda, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarında ek olarak 0.5 μ M konsantrasyonunda incelenmiştir. Seramidin düşük konsantrasyonların da (0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.15 μ M) 4 hücre hattında da kontrole kıyasla canlılık oranlarında artış gözlenmiştir (Şekil 4.2). 0.2 μ M konsantrasyonda ise CCD-18Co hücre hattı hariç diğer hücre hatlarında canlılık oranı kontrole oranla yüksek kalmaya devam etmiştir. Seramidin 0.25 μ M konsantrasyonundan itibaren canlılık oranları tüm hücre hatlarında azalmaya başladı ve konsantrasyon artışıyla canlılık oranları CCD-18Co hücre hattı hariç düşmeye devam ettiği görülmüştür. Uygulanan seramid konsantrasyonlarında canlılık seviyesi OV2008 hücre hattı hariç %50 altına indiği gözlenmiştir. Uygulanan seramid konsantrasyonlarında canlılığın %50 nin altına indiği değer C6 hücre hattı için 0.4 μ M, HT29 hücre hattı için 0.5 μ M ve CCD-18Co hücre hattı için 0.3 μ M olduğu tespit

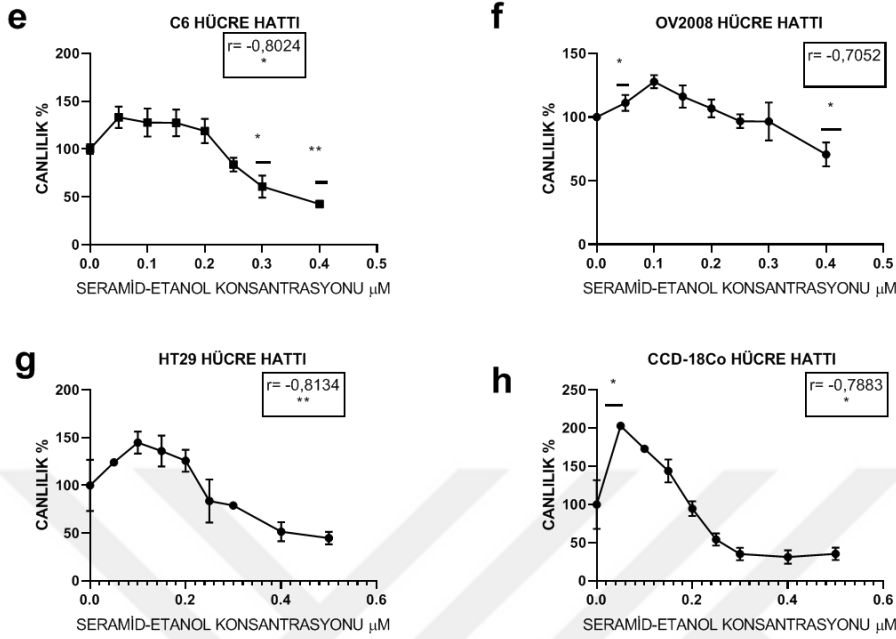
edilmiştir. Canlılık oranlarını en fazla arttıran konsantrasyon C6 ve CCD-18Co hücre hatları için 0.05 μM olurken, OV2008 ve HT29 hücre hatları için 0.1 μM olmuştur. Canlılık seviyesi fazla artış gösteren hücre hattı 0,05 μM konsantrasyonda canlılık oranı %202.7 çıkan CCD-18Co hücre hattı olurken, canlılığı en az artan hücre hattı ise 0,1 μM konsantrasyonda canlılığı %127.76 ulaşan OV2008 hücre hattı olmuştur (çizelge 4.2).

<i>DOZLAR</i>	<i>C6</i>	<i>OV 2008</i>	<i>HT 29</i>	<i>CCD-18Co</i>
<i>KONTROL</i>	100 \pm 3.61	100 \pm 0.35	100 \pm 19.06	100 \pm 22.62
<i>Seramid 0,05 μm</i>	133.33 \pm 7.93	111.19 \pm 4.45	124.04 \pm 1.88	202.71 \pm 2.73
<i>Seramid 0,10 μm</i>	127.68 \pm 10.43	127.77 \pm 3.68	144.75 \pm 8.09	172.87 \pm 0.44
<i>Seramid 0,15 μm</i>	127.34 \pm 9.97	116.23 \pm 6.18	135.94 \pm 11.47	143.77 \pm 10.61
<i>Seramid 0,20 μm</i>	118.92 \pm 8.99	106.75 \pm 4.98	125.73 \pm 8.09	94.39 \pm 6.77
<i>Seramid 0,25 μm</i>	83.2 \pm 5.07	96.79 \pm 3.80	83.53 \pm 16.00	54.07 \pm 5.57
<i>Seramid 0,30 μm</i>	60.80 \pm 8.11	96.61 \pm 10.54	79.00 \pm 1.40	35.08 \pm 5.72
<i>Seramid 0,40 μm</i>	42.37 \pm 1.52	70.70 \pm 6.64	51.44 \pm 7.12	31.13 \pm 6,4
<i>Seramid 0,50 μm</i>	-	-	44.70 \pm 4.66	35.22 \pm 5.74

Çizelge 4.2 Farklı dozlardaki etanol içerisinde çözülmüş seramidin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi. Kontrol grubunun canlılık oranı % 100 olarak kabul edilmiştir.

Pearson korelasyon testine göre OV2008 hücre hattı hariç seramid konsantrasyonu ile canlılık oranı arasında anlamlı derecede ters korelasyon bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca yapılan t testine göre C6 ve OV2008 hücre hatlarında yüksek konsantrasyondaki hücre ölüm oranları kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.2).

Etanol içerisinde çözünen seramidin regresyon analizi ile hesaplanan IC50 konsantrasyonları çizelgede belirtilmiştir. IC50 konsantrasyonlarına göre etanol içerisinde çözdüğümüz seramide en hassas hücre hattı CCD-18Co(0,33 μM) olurken en az dirençli hücre hatları OV2008 (0,45 μM) ve HT29 (0,45 μM) hücre hatları olmuştur.



Şekil 4.2 Farklı dozlardaki etanol içerisinde çözülmüş seramidin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisinin grafiksel gösterimi. Kontrol grubunun canlılık oranı % 100 olarak kabul edilmiştir

4.2. Sfingomiyelinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

DMSO içerisinde çözünen sfingomiyelinin hücre canlılığı üzerine etkisi 4 farklı hücre hattında (C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co) 0,0125 µM, 0,025 µM, 0,05 µM, 0,075 µM, 0,1 µM, 0,15 µM, 0,2 µM, 0,25 µM konsantrasyonlarda incelenmiştir. Sfingomiyelinin düşük konsantrasyonların da (0,0125µM, 0,025µM, 0,05µM) OV2008 ve HT29 hücre hatlarında kontrole kıyasla canlılık seviyelerinde artış gözlenmiştir. C6 hücre hattında sadece 0,025 µM konsantrasyonda kontrole göre canlılık oranı artarken diğer konsantrasyonlarda canlılık azalmaktadır. CCD-18Co hücre hattın da ise sfingomiyelinin sadece 0,0125µM konsantrasyonun da canlılık oranı artarken diğer konsantrasyonlarda canlılık oranı azalmaktadır. Sfingomiyelin ile hücre canlılığı en fazla artan 0,0125 µM konsantrasyonda %163,36 canlılığa ulaşan HT29 hücre hattı olurken sfingomiyelin ile canlılığı en az artan hücre hattı C6 (%115) ve CCD-18Co (%115,15) hücre hatları olmuştur. Sfingomiyelinin hücre hatlarına uygulanan konsantrasyonlardan canlılık oranını %50 nin altına indiren konsantrasyonlar C6 ve OV2008 hücre hatları

için 0,15µM, HT29 hücre hattı için 0,1 µM, CCD-18Co hücre hattı için ise 0,075 µM olduğu saptanmıştır. Uygulanan sfingomiyelin konsantrasyonlarında canlılık oranı en fazla azalan hücre hattı 0,2 µM konsantrasyonda canlılığı ortalama %5,04 düşen OV2008 hücre hattı olurken canlılığı en az azalan hücre hattı 0,25 µM konsantrasyonda canlılığı ortalama %23,33 düşen CCD-18Co hücre hattı olmuştur (çizelge 4.3).

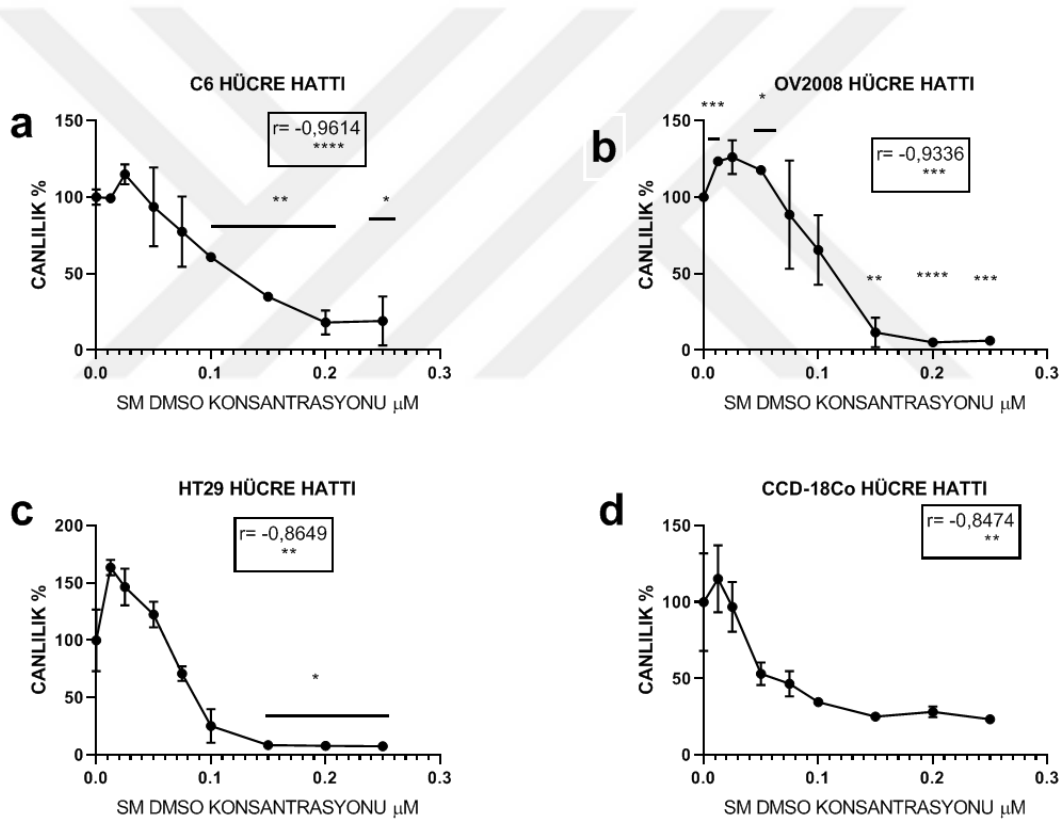
<i>DOZLAR</i>	<i>C6</i>	<i>OV 2008</i>	<i>HT 29</i>	<i>CCD-18Co</i>
<i>KONTROL</i>	100 ±3,61	100 ±0,35	100 ±19,06	100 ±22,62
<i>Sfingomiyelin 0,0125 µm</i>	99,31 ± 0,64	123,41 ± 0,43	163,36 ± 4,80	115,15 ± 15,52
<i>Sfingomiyelin 0,0250 µm</i>	115,00 ± 4,62	126,19 ± 7,75	146,38 ± 11,38	96,84 ± 11,53
<i>Sfingomiyelin 0,0500 µm</i>	93,70 ± 18,21	117,66 ± 2,00	122,37 ± 7,88	53,12 ± 5,27
<i>Sfingomiyelin 0,0750 µm</i>	77,42 ± 16,24	88,55 ± 25,05	70,84 ± 4,50	46,57 ± 5,86
<i>Sfingomiyelin 0,1000 µm</i>	60,80 ± 0,34	65,49 ± 16,12	25,21 ± 10,40	34,52 ± 1,11
<i>Sfingomiyelin 0,1500 µm</i>	34,97 ± 1,00	11,52 ± 6,86	8,66 ± 0,70	25,05 ± 1,25
<i>Sfingomiyelin 0,2000 µm</i>	18,07 ± 5,56	5,04 ± 0,73	7,84 ± 0,31	28,20 ± 2,53
<i>Sfingomiyelin 0,2500 µm</i>	19,11 ± 11,38	6,15 ± 1,58	7,55 ± 0	23,33 ± 0,59

Çizelge 4.3 Farklı dozlardaki DMSO içerisinde çözülmüş sfingomiyelinin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi. Kontrol grubunun canlılık oranı % 100 olarak kabul edilmiştir.

Pearson korelasyon testine göre tüm hücre hatlarında sfingomiyelin konsantrasyonu ile canlılık oranı arasında anlamlı derecede ters korelasyon bulunduğu saptanmıştır. C6 ve OV2008 korelasyon oranı diğer iki hücre hattından yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca yapılan t testine göre CCD-18Co hücre hattı hariç yüksek konsantrasyondaki hücre ölüm oranları kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. OV2008 hücre hattında anlamlılığın diğer hücre hatlarına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. OV2008 hücre

hattında 0,2 μM konsantrasyonda anlamlılık en yüksek seviyeye çıktığı saptanmıştır (Şekil 4.3).

DMSO içerisinde çözünen sfingomiyelinin regresyon analizi ile hesaplanan IC50 konsantrasyonları çizelge 4.5 de belirtilmiştir. IC50 konsantrasyonlarına göre DMSO içerisinde çözdüğümüz sfingomiyeline en hassas hücre hattı CCD-18Co (0,07 μM) olurken en dirençli hücre hattı C6 (0,11 μM) hücre hattı olmuştur. OV2008 ve HT29 hücre hatlarında sfingomiyelinin etkisi benzer şekilde saptanmıştır ve IC50 değerleri yaklaşık olarak 0,08 μM olarak hesaplanmıştır (çizelge 4.5).



Şekil 4.4 Farklı dozlardaki DMSO içerisinde çözülmüş sfingomiyelinin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisinin grafiksel gösterimi. Kontrol grubunun canlılık oranı % 100 olarak kabul edilmiştir.

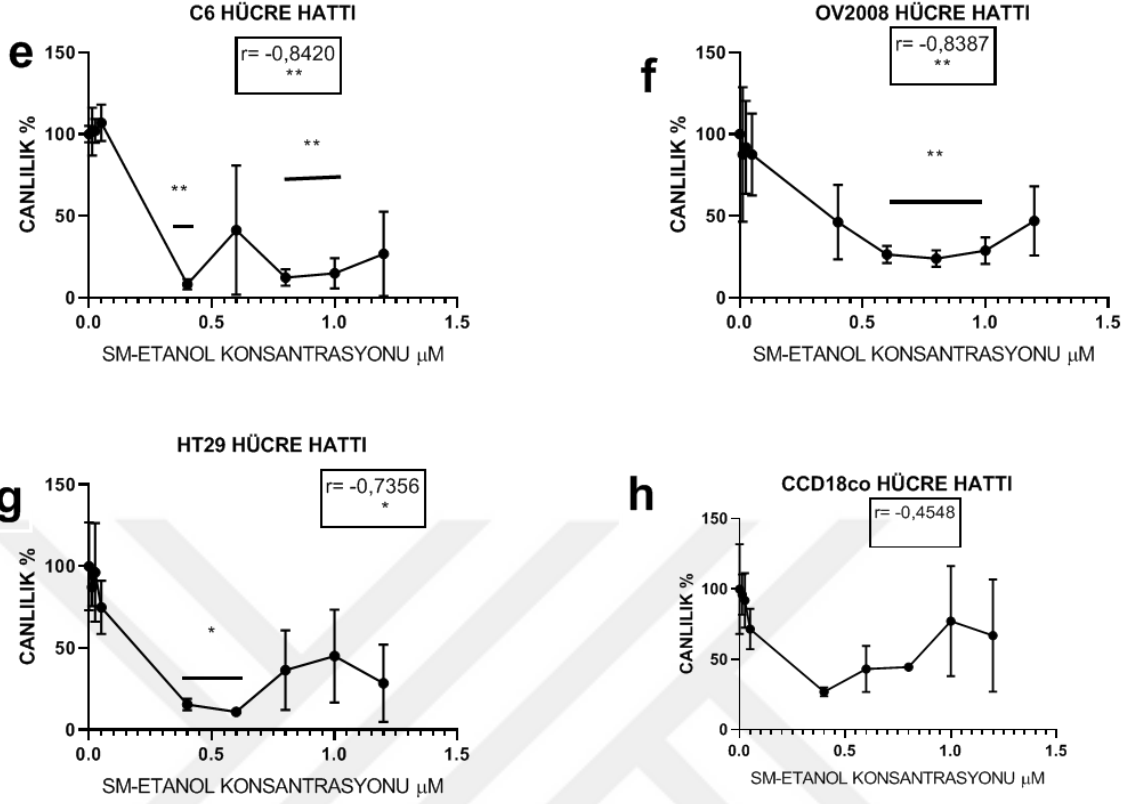
Etanol içerisinde çözünen sfingomiyelinin hücre canlılığı üzerine etkisi 4 farklı hücre hattında (C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co) 0,0125 μM , 0,025 μM , 0,050 μM , 0,4 μM , 0,6 μM , 0,8 μM , 1,0 μM ve 1,2 μM konsantrasyonlarda incelenmiştir.

Sfingomiyelinin düşük konsantrasyonların da (0,0125 μ M, 0,025 μ M, 0,5 μ M) C6 hücre hattında kontrole kıyasla canlılık oranlarında artış meydana gelirken diğer üç hücre hattında canlılık oranını artıran sfingomiyelin konsantrasyonu gözlenmemiştir (Şekil 4.4). C6 hücre hattında canlılık oranını en fazla arttıran sfingomiyelin konsantrasyonu 0,05 μ M olarak gözlenmiştir. Sfingomiyelinin canlılığı en fazla azaltan konsantrasyon C6 ve CCD-18Co hücre hattı için 0,4 μ m olurken OV2008 ve HT29 hücre hattı için 0,6 μ m olarak saptanmıştır. C6 hücre hattı, 0,4 μ m sfingomiyelin ile canlılığı %8,17 düşerek canlılığı en fazla azalan hücre hattı olurken CCD-18Co hücre hattı sfingomiyelin tedavisi ile en az canlılığı düşen hücre hattı olmuştur (çizelge 4.4). CCD-18Co hücre hattı, 0,4 μ m sfingomiyelin ile en fazla %26,9 a kadar canlılık oranında düşme olmuştur. OV2008 hücre hattı 0.6 μ m sfingomiyelin ile %11,25 canlılık oranına aynı konsantrasyonda HT29 hücre hattı %10.97 canlılık oranına kadar azalmıştır.

<i>DOZLAR</i>	<i>C6</i>	<i>OV 2008</i>	<i>HT 29</i>	<i>CCD-18Co</i>
<i>KONTROL</i>	100 \pm 3,61	100 \pm 0,35	100 \pm 19,06	100 \pm 22,62
<i>Sfingomiyelin 0,0125 μm</i>	101,62 \pm 10,40	87,51 \pm 29,11	87,14 \pm 8,23	96,08 \pm 10,08
<i>Sfingomiyelin 0,0250 μm</i>	102,09 \pm 5,12	91,90 \pm 20,07	96,14 \pm 21,35	91,91 \pm 13,74
<i>Sfingomiyelin 0,0500 μm</i>	106,88 \pm 7,94	87,61 \pm 17,71	74,82 \pm 11,52	71,54 \pm 10,18
<i>Sfingomiyelin 0,400 μm</i>	8,17 \pm 2,25	46,15 \pm 16,12	15,48 \pm 2,48	26,90 \pm 2,26
<i>Sfingomiyelin 0,600 μm</i>	41,25 \pm 27,98	26,47 \pm 3,77	10,97 \pm 0,92	43,14 \pm 11,60
<i>Sfingomiyelin 0,800 μm</i>	12,32 \pm 3,53	23,90 \pm 3,59	36,47 \pm 17,27	44,59 \pm 1,58
<i>Sfingomiyelin 1,0000 μm</i>	14,90 \pm 6,60	28,86 \pm 5,80	45,12 \pm 20,10	77,16 \pm 27,68
<i>Sfingomiyelin 1,2000 μm</i>	26,87 \pm 18,27	46,98 \pm 14,97	28,41 \pm 16,76	66,97 \pm 28,20

Çizelge 4.4 Farklı dozlardaki etanol içerisinde çözülmüş sfingomiyelinin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir.

Etanol içerisinde çözünen sfingomiyelinin regresyon analizi ile hesaplanan IC50 konsantrasyonları çizelgede belirtilmiştir. IC50 konsantrasyonlarına göre etanol içerisinde çözdüğümüz sfingomiyeline en hassas hücre hattı C6 ve HT29 hücre hatları (0.25 μ M) olurken en az etkilenen hücre hattı CCD-18Co (0.45 μ M) olmuştur. OV2008 hücre hattının IC50 değeri ise 0.28 μ M olmuştur (çizelge 4.5).



Şekil 4.4 Farklı dozlardaki etanol içerisinde çözülmüş sfingomiyelinin C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co hücre hatlarının canlılığına etkisinin grafiksel gösterimi. Kontrol grubunun canlılık oranı % 100 olarak kabul edilmiştir.

Sfingomiyelinin etanol uygulamasının istatistiksel analizine göre, doz artışı ile canlılık oranları arasında CCD18Co hücre hattı hariç anlamlı derecede ters korelasyon saptanmıştır. Ayrıca CCD18Co hücre hattı hariç diğer üç hücre hattında canlılık oranlarını kontrole kıyasla anlamlı derecede azaltan konsantrasyonlar gözlenmiştir. En yüksek anlamlılık OV2008 ve C6 hücre hattında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4)

Sfingomiyelinin etanol ve DMSO içerisinde çözülerek uygulanması ile elde edilen sonuçlara göre sfingomiyelin DMSO içerisinde çözülerek uygulandığında IC50 değeri, sağlıklı hücre hattı olan CCD-18Co hücre hattı ile kanser hücre hatları olan OV2008, HT29 ve C6 hücre hatları arasında farklılık tespit edilemezken etanol içerisinde çözülerek uygulandığında kanser hücrelerinin canlılığını %50 oranında azaltan 0.25-0.28 µM konsantrasyonlarında CCD-18Co hücre hattının canlılığı %50 azaltmadan

kanserli hücre hatlarının canlılığını %50 oranında azaltan konsantrasyon hesaplanabilmiştir. Bu değer Sfingomiyelin etanol içerisinde çözülerek uygulanmasında ise CCD-18Co hücre hattında etanol içerisinde çözülerek uygulandığında DMSO ya göre IC50 değeri daha yüksek olarak tespit edilmiştir

	<i>DMSO İçerisinde</i> <i>Çözünmüş</i> <i>Seramid</i>	<i>Etanol İçerisinde</i> <i>Çözünmüş</i> <i>Seramid</i>	<i>DMSO İçerisinde</i> <i>Çözünmüş</i> <i>Sfingomiyelin</i>	<i>Etanol İçerisinde</i> <i>Çözünmüş</i> <i>Sfingomiyelin</i>
<i>C6</i>	32,70µM	0,36µM	0,11µM	0,25µM
<i>OV2008</i>	41,69µM	0,45µM	0,08µM	0,28µM
<i>HT29</i>	42,16µM	0,45µM	0,08µM	0,25µM
<i>CCD-18Co</i>	56,91µM	0,33µM	0,07µM	0,48µM

Çizelge 4.5 Seramid ve Sfingomiyelinin dört farklı hücre hattındaki IC50 değerleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biz bu çalışma ile seramid ve sfingomiyelinin hücre canlılığına etkisini 4 farklı hücre hattında (C6, OV2008, HT29 ve CCD-18Co) ve 2 farklı çözücü (etanol, DMSO) içerisinde çözüldürülerek araştırdık.

Düşük konsantrasyondaki seramidDMSO içerisinde çözülerek uygulandığında HT29 ve CCD-18Co hücre hatların da OV2008 ve C6 hücre hatlarına göre canlılık oranları daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. DMSO içerisinde çözülen seramidin yüksek konsantrasyonlardahücre hatlarına uygulandığında iseOV2008 ve C6 hücre hatlarının HT29 ve CCD-18Cohücre hatlarına göre daha fazla hücre kaybına uğradığı gözlenmiştir.DMSO içerisinde çözülen sfingomiyeline baktığımız da canlılık oranını en fazla azalttığıhücre hattı OV2008 hücrehattı olurken, sfingomiyelin uygulamasının canlılık oranını en az azalttığı hücre hattı ise CCD-18Co hücre hattı olduğu gözlenmiştir.

Seramidin hücre canlılığına etkisi biri sağlıklı hücre hattı (CCD-18Co)diğer üçü ise kanserli hücre hatları (C6, OV2008, HT29) olmak üzere 4 farklı hücre hattında 2 farklı çözücüde (DMSO, etanol) farklı konsantrasyonlarda incelendi. Seramidin her iki çözücü içerisinde çözülerek uygulanması sonucunda da düşük konsantrasyonlar da kontrole kıyasla canlılık oranlarında artış olurken yüksek konsantrasyonlarda canlılık oranları kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir. Seramidin DMSO içerisinde çözülen seramidin DMSO içerisinde çözülerek uygulanmasında 40µM konsantrasyonda kanser hücrelerinin canlılık oranı yaklaşık %76-82 ile en fazla azalırken, bu konsantrasyonda sağlıklı hücre hattı olan CCD-18Co da canlılık oranı yaklaşık %58 azalmaktadır. Seramid 100 µM konsantrasyonda uygulandığında ise canlılık oranı kanser hücreleri için %67-75 oranında azalırken sağlıklı hücre hattında %27 oranında azalmaktadır. Buna göre seramidin DMSO içerisinde çözülerek uygulandığında sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücreleri öldürmek için en iyi konsantrasyonun 100 µM olabileceği söylenebilir.

Seramidi etanol içerisinde çözülerek uyguladığımız konsantrasyonlarda kanser hücrelerinin canlılık oranları en fazla %29-58 oranında azalırken, sağlıklı hücre hattı %69 oranında azalmıştır. Buna göre seramidin etanolde çözünmesi ile hem kanserli

hücrelerde istenilen oranda canlılık oranında azalma olmamış hem de sağlıklı hücre hattında oldukça yüksek oranda canlılıkta azalma tespit edilmiştir.

DMSO içerisinde çözülerek uygulanan seramid ve etanol içerisinde çözülerek uygulanan seramidin IC50 değerleri incelendiğinde kanser hücreleri DMSO içerisinde çözünen seramide daha hassasken sağlıklı hücre hattı daha dirençlidir. Ancak etanol içerisinde çözünen seramid de C6 hücre hattından sonra en hassas hücre hattı sağlıklı hücre hattı olmuştur.

Bu sonuçlara göre seramidin hücre canlılığına olan etkisi çözücüye ve uygulanan konsantrasyona göre değişmektedir. Kanser hücreleri DMSO içerisinde çözülmüş seramide daha hassas olurken sağlıklı hücre hattında olan CCD-18Co daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Buna göre seramidi hücre hatlarının canlılığını azaltmak amacıyla kanser hücrelerine spesifik olarak kullanmak için en uygun tedavinin DMSO içerisinde çözülmüş seramidi 100 µM konsantrasyonda uygulanması olduğu düşünülebilir. Ayrıca seramidi tedavisinin en etkili olacağı hücre hatlarının C6 ve OV2008 hücre hatları olacağı çıkarımı yapılabilir.

Sfingomiyelinin etkisi seramid ile benzer şekilde iki farklı çözücüde (DMSO, etanol) ve biri sağlıklı hücre hattı (CCD-18Co) diğer üçü ise kanserli hücre hatları (C6, OV2008, HT29) olmak üzere 4 farklı hücre hattında farklı konsantrasyonlar da incelendi. Tüm hücre hatları için kontrol grubuna göre en düşük canlılık oranları sfingomiyelin yüksek konsantrasyonda uygulanması sonucu gözlenmiştir. Sfingomiyelinin düşük konsantrasyonlarda uygulanmasında ise, özellikle DMSO da çözülerek uygulandığında, tam tersi etki göstererek canlılık oranlarını arttırmıştır. Sfingomiyelinetanolde çözülmesi ile kanser hücre hatlarını (C6, OV2008, HT29) yaklaşık %89-92 oranında öldürmekte iken, DMSO içerisinde çözülerek uygulandığında %82-95 oranında öldürmektedir. C6 hücre hattı hariç diğer hücre hatlarında sfingomiyelinin DMSO içerisinde çözülmesi sonucu ölüm oranı en yüksek seviyede olmaktadır. DMSO içerisinde çözünen sfingomiyelinin öldürücülük oranı etanol içerisinde çözünen sfingomiyeline göre daha yüksek olsa da sağlıklı hücre hattı olan CCD-18Co 'da yüksek oranda öldürmektedir. Diğer taraftan etanol içerisinde çözülmüş olan sfingomiyelinin öldürücülük oranı DMSO içerisinde çözülmüş sfingomiyelin kadar yüksek olmasa da CCD-18Co hücre hattına daha az zarar vererek kanser hücrelerini öldürmek için

sflngomiyelinin etanol içerisinde çözerek uygulamak kanser hücreleri için daha spesifik bir uygulama yapılmasını sağlayabilir.Etanolde çözölmüş sflngomiyelinin kanser hücre hatlarına en etkili olduğu 0,6 µM konsantrasyonda kanser hücreleri canlılık oranı yaklaşık %87-89 azalırken sağlıklı hücre hattında canlılık oranı %33 azalmıştır. Bu sonuçlara göre sflngomiyelinin kanser hücre hatlarına ve sağlıklı hücre hatlarına olan etkisi özöcöye ve konsantrasyona bağlı olarak değişmektedir. Bizim bu çalışmamıza göre etanolde çözölmüş sflngomiyelini 0,6µM konsantrasyonda uygulanması kanser tedavisi için en ideal konsantrasyon olabileceği düşünölmektedir. Bu konsantrasyonda sflngomiyelinin en etkili olduğu hücre hattı canlılık oranını yaklaşık %89 azaldığı HT29 ve OV2008 hücre hattı olurken, en az etkili olduğu hücre hattı canlılık oranını yaklaşık %87 azaldığı C6 hücre hattı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuca göre sflngomiyelinin etkisi hücre hatları arasında benzer bir oranda etkili olduğu düşünölebilir.

Seramid ve sflngomiyelinin etkisi karşılaştırıldığında her üç kanser hücre hattında da sflngomiyelinin canlılığı azaltma etkisi seramitten daha fazla olmuştur. Ayrıca sflngomiyelin seramide kıyasla sağlıklı hücrelere daha az toksik etki göstermiştir.

Yaptığımız alışma sonucu ortaya çıkan sonuçları destekler nitelikte literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

2003 yılında Fillet M ve ark. tarafından HCT116 (insan Kolorektal karsinomu hücresi) ve OVCAR (insan over adenokarsinom hücresi) hücre hatlarına olan etkisinin araştırıldığı çalışmada en fazla hücre ölümine neden olan konsantrasyonun 100 µM konsantrasyon olduğu tespit edilmiştir.Ji C ve ark. tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada, L3,6 (pankreas kanseri) ve MCF-7 (meme kanseri) hücre hatlarında düşük konsantrasyonlarda (1, 10, 15, 20 µM) seramid uygulaması sonucu canlılık oranını anlamlı bir fark meydana gelmediği tespit edilmiştir (Fillet M ve ark. 2003; Ji C ve ark, 2010)

Benzer şekilde Chang YC ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada, H1299 (akciğer kanseri) hücre hattında düşük konsantrasyonda (10 µM) seramid uygulaması sonucu canlılık oranını anlamlı bir fark meydana gelmezken yüksek konsantrasyonlar (20, 30, 40, 50 µM) anlamlı bir farklılığın olduğu tespit edilmiştir (Chang YC ve ark, 2018)

Selzner M ve ark. tarafından 2001 yılında başka bir çalışmada ise SW403 metastatik insan kolon kanseri) hücre hattında düşük konsantrasyonda (5, 10 μ M) seramid uygulaması sonucu canlılık oranını anlamlı bir fark meydana gelmezken yüksek konsantrasyonlar (40, 50 μ M) anlamlı bir düşüş olduğu tespit edilmiştir (Selzner M ve ark, 2001)

Zhu XF ve ark. tarafından 2003 yılında nazofaringeal karsinom hücre hattı olan CNE2 ile yapılan çalışmada seramidin 6.25, 12.5, 25.0, 50, 100 μ M konsantrasyonlarında uygulanması sonucu canlılık oranlarının sırasıyla %20.8, %40.0, %62.5, %75.8 azaldığı, saptanmıştır. Aynı çalışmada seramidin, CAPP'yi (ceramide-activated protein phosphatase) aktive ettiği ve CAPP'nin Ser473'te Akt'in fosforilasyonu yoluyla Akt'yi etkisizleştirerek, fosforile p27'nin azalmasına ve p27 stabilizasyonunun artmasına neden olduğundan, p27 birikimi gözlemlendi. P27 proteininin birikmesi, G1 fazında nihai hücre döngüsü durması ve hücre çoğalmasının inhibisyonu ile sonuçlandığı saptanmıştır (Zhu XF ve ark, 2003).

2010 yılında yapılan çalışmada B16 melanom hücre hatlarında seramidin 2.5, 12.5, 25, 50 μ M konsantrasyonlarında uygulanması sonucu canlılık oranlarında anlamlı bir azalma olmadığı ancak seramidin curcumin (zerdeçal) ile beraber uygulandığında B16 hücrelerinin anlamlı oranda apoptoza gitmesine neden olduğu tespit edilmiştir (Yu T ve ark, 2010).

Literatürde biz yaptığımız çalışmada 0V2008 ve CCD-18Co hücre hatlarında tespit ettiğimiz şekilde, seramidin bimodal bir etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalarda vardır. Hem spinal motor nöronlarda hem de hipokampal nöronlarda, düşük seramid konsantrasyonlarının (1, 2.5, 5 μ M) olgunlaşmamış hücrelerin sağkalımını ve farklılaşmasını arttırdığı, ancak daha yüksek konsantrasyonların (20 M, 40 μ M) hücre ölümüyle sonuçlandığı belirlenmiştir (Toman RE ve ark, 2002).

Bu çalışma sonucunda *in vitro* koşullarda seramid ve sfingomiyelinin canlılık oranları üzerinde konsantrasyon ve çözücüye bağlı olarak hem pozitif hem de negatif etki edebildiği saptanmıştır. Buna göre kanser tedavisi için seramid ve sfingomiyelin uygulamasında çözücünün önemi ve konsantrasyon seçimine çok dikkat edilmesi gerektiği çıkarımı yapılabilir. Uygun doz ve çözücü içerisinde çözölen seramid ve

sfingomiyelinin kanser tedavisinde uygulanabileceği rahatlıkla ifade edilebilir. Ayrıca sağlıklı hücre hatlarında proliferasyonu arttırmak amacıyla da seramid ve sfingomiyelin kullanılabilceği tespit edilmiştir. Seramid ve sfingomiyelinin kanser hücreleri üzerindeki bu etkilerinin daha iyi anlaşılması için bu moleküllerin hücre sinyal yolları ile ilişkisinin detaylı olarak araştırılmasına ve *in vivo* ortamda deney tekrarlanarak antikanserojen etkilerinin araştırılmasına ihtiyaç vardır.



6. KAYNAKLAR

- Aliustaoğlu M. Temel kanser fizyopatolojisi. Klinik Gelişim Dergisi 2009; 22(3): 46-49
- Aslan G. Tümör immünolojisi. Turk J Immunol 2010; 15(1): 7-13
- Anonim, 2019. Eagle's minimal essential medium. <https://www.wikizeroo.org/index.php?q=aHR0cHM6Ly9lbi53aWtpcGVkaWEu b3JnL3dpa2kvRWFnbGUnc19taW5pbWFsX2Vzc2VudGlhbF9tZWRpdW0> (09.08.2019)
- Anonim, 2019. CCD18-Co. http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1459.aspx?geo_country=tr (09.08.2019)
- Anonim, 2019. HT29 <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-38.aspx> (09.08.2019)
- Anonim, 2019. OV2008 Cells. <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/technical-resources/cell-lines/2/cell-lines-detail-62.html>(09.08.2019)
- Anonim, 2019. Sıklıkla kullanılan hücre kültürü besi ortamları. <http://www.interlab.com.tr/tr-tr/sigma-aldrich/hucre-kulturu-besi-ortami-2> (09.08.2019)
- Bandhuvula P ve Saba JD. Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. Trends Mol Med 2007; 13: 210–217
- Bartke N ve Hannun YA. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. Journal of Lipid Research 2009; 50: S91–S96.
- Bonhoure E, Pchejetski D, Aouali N, Morjani H, Levade T, Kohama T ve Cuvillier O. Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cells by targeting sphingosine kinase-1. Leukemia 2006; 20: 95–102.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre LA, ve Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers In 185 Countries. CA CANCER J CLIN 2018; 68: 394-424
- Brizuela L, Ader I, Mazerolles C, Bocquet M, Malavaud B ve Cuvillier O. First Evidence of Sphingosine 1-Phosphate Lyase Protein Expression and Activity Downregulation in Human Neoplasm: Implication for Resistance to Therapeutics in Prostate Cancer. Mol Cancer Ther 2012; 11(9): 1841-1851
- Chang YC, Fong Y, Tsai EM, Chang YG, Chou HL, Wu CY, Teng YN, Liu TC, Yuan SS, ve Chiu CC. Exogenous C8-Ceramide Induces Apoptosis by Overproduction of ROS and the Switch of Superoxide Dismutases SOD1 to SOD2 in Human Lung Cancer Cells. Int J Mol Sci. 2018; 19(10): 3010
- Çefle K. Kanser genetiği. Klinik Gelişim Dergisi 2009; 22(3): 50-59.
- Dalay N. Kanser Biyolojisi. Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN eds. Klinik Onkoloji İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 2000:48-53.
- Duan RD, Nyberg L ve Nilsson A. Alkaline sphingomyelinase activity in rat gastrointestinal tract: distribution and characteristics. Biochim Biophys Acta. 1995; 1259(1): 49-55.
- Duan RD, Hertervig E, Nyberg L, et al. Distribution of alkaline sphingomyelinase activity in human beings and animals. Tissue and species differences. Dig Dis Sci. 1996; 41(9): 1-6.

- Duan RD. Sphingomyelin hydrolysis in the gut and clinical implications in colorectal tumorigenesis and other gastrointestinal diseases. *Scand J Gastroenterol.* 1998; 33(7): 673-83
- Fillet M. Mechanisms Involved In Exogenous C2- And C6-ceramide-induced Cancer Cell Toxicity. *Biochemical Pharmacology* 65 (10):1633-1642, 2003
- Guillermet-Guibert J, Davenne L, Pchejetski D, Saint-Laurent N, Brizuela L, Guilbeau-Frugier C, Delisle MB, Cuvillier O, Susini C ve Corinne Bousquet C. Targeting the sphingolipid metabolism to defeat pancreatic cancer cell resistance to the chemotherapeutic gemcitabine drug. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(4): 809-820
- Gültekin N, Karaoğlu K ve Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Arch Turk Soc Cardiol* 2008; 36(2): 120-130
- Hajighasemi F, Tajik S. Assessment of Cytotoxicity of Dimethyl Sulfoxide in Human Hematopoietic Tumor Cell Lines *IJBC* 2017; 9(2): 48-53
- İçli F, Akbulut H. Onkolojiye Giriş. İniliçin G, Biberöglü K, Süleymanlar G ve ark. eds. İç Hastalıkları. Güneş Kitapevi; 2005:2007-2014
- Ji C Ve Ark. Exogenous Cell-permeable C6 Ceramide Sensitizes Multiple Cancer Cell Lines To Doxorubicin-induced Apoptosis By Promoting Ampk Activation And Mtorc1 İnhibition *Oncogene* 29: 6557–6568, 2010
- Kıyıcı M. Kolorektal kanser kemoprevansiyonunda ursodeoksikolik asit. *Güncel gastroenteroloji* 2006; 10(1): 53-63
- Koiri RK ve Trigun SK. Dimethyl sulfoxide activates tumor necrosis factor α -p53 mediated apoptosis and down regulates D-fructose- 6-phosphate-2-kinase and lactate dehydrogenase-5 in Dalton's lympho- main vivo. *Leuk Res.* 2011;35:950–956
- Kolter T ve Sandhoff K. Sphingolipids Their Metabolic Pathways and the Pathobiochemistry of Neurodegenerative Diseases. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 1532-1568
- Kunisawa J ve Kiyono H. Immunological Function of Sphingosine 1-Phosphate in the Intestine. *Nutrients* 2012; 4(3):154-66
- Li J, Guan HY, Gong LY, Song LB, Zhang N, Wu J, Yuan J, Zheng YJ, Huang ZS ve Li M. Clinical Significance of Sphingosine Kinase-1 Expression in Human Astrocytomas Progression and Overall Patient Survival. *Clin Cancer Res* 2008;14(21): 6996-7003
- Li W, Yu CP, Xia JT, Zhang L, Weng GX, Zheng HQ, Kong Q, Hu LJ, Zeng MS, Zeng YX, Li M, Li J ve Song LB. Sphingosine Kinase 1 Is Associated with Gastric Cancer Progression and Poor Survival of Patients. *Clin Cancer Res* 2009;15(4): 1393-1399
- Lozano J, Berra E, Municio MM, et al. Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 1994; 269(30): 19200-19202
- Mendis BHLS. Distribution of Lipids in the Human Brain and their Differential Expression in Alzheimer's Disease: A Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS) Study. Doctor of Philosophy in Anatomy, The University of Auckland, 2016
- Mimeault, M. New advances on structural and biological functions of ceramide in apoptotic/necrotic cell death and cancer. *FEBS Letters*, 2002; 530(1-3): 9–16

- Morad SAF ve Cabot MC. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature Reviews Cancer* 2013; 13: 51-65
- Nelson DL ve Cox MM. *Lehninger Biyokimyanın İlkeler*. Palme Yayıncılık. 2005; 363-388
- Nilsson A. Metabolism of sphingomyelin in the intestinal tract of the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1968; 164(3): 575-84.
- Nilsson A. The presence of sphingomyelin and ceramide cleaving enzymes in the small intestinal tract. *Biochim Biophys Acta*. 1969; 176(2): 339-47.
- Nyberg L, Duan RD, Axelson J, et al. Identification of an alkaline sphingomyelinase activity in human bile. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1300(1): 42-8.
- Ogretmen B ve Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4: 604-616
- Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S ve Spiegel S. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival, *J. Cell Biol*. 1999; 147: 545–558.
- Ökten S, Köprülü T, Çakmak O ve Tekin Ş. Structure-Activity Relationship (SAR): The study of antiproliferative activities of brominated 8-hydroxyquinoline and phthalonitrile derivatives on several cancer cell lines. *Sakarya University Journal of Science*. 2017; 21(6): 1300-1306.
- Pchejetski D, Golzio M, Bonhoure E, Calvet C, Doumerc N, Garcia V, Mazerolles C, Rischmann P, Teissie J, Malavaud B ve Cuvillier O. Sphingosine Kinase-1 as a Chemotherapy Sensor in Prostate Adenocarcinoma Cell and Mouse Models. *Cancer Res* 2005; 65(24): 11667-11675
- Pinar R. Assessment of Quality of life in Turkish patients with cancer. *Turkish Journal Of Cancer* 2003; 33(2): 96-101.
- Pyne NJ ve Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2010; 10: 489-503
- Reed SI. Cell Cycle. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA; eds. *Cancer*. 8 th Ed. Philadelphia: Lippicott-Williams&Wilkins; 2008; 79-92
- Ringer DP ve Schnipper LE. Principles of Cancer Biology. In: Lenhard RE, Osteen RT, Gansler T; eds. *Clinical Oncology Atlanta*: American Cancer Society; 2001; 21-35.
- Ryu Y, Takuwa N, Sugimoto N, Sakurada S, Usui S ve Okamoto H et al. Sphingosine-1 phosphate, a platelet-derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2002; 90(3): 325-332.
- Selzner M ve Ark. Induction Of Apoptotic Cell Death And Prevention Of Tumor Growth By Ceramide Analogues In Metastatic Human Colon Cancer. *American Association For Cancer Research* 61(3): 1233-1240, 2001
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S ve Boyd MR. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute* 1990; 82(13): 1107-1112
- Skoura A, ve Hla T. Regulation of vascular physiology and pathology by the S1P2 receptor subtype. *Cardiovasc Res* 2009; 82(2): 221-228.
- Strelow A, Bernardo K, Adam-Klages S, Linke T, Sandhoff K, Kronke M ve Adam D. Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death, *J. Exp. Med*. 2000; 192:601–612.

- Tani M, Ito M ve Igarashi Y. Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cell Signal* 2007; 19(2): 229-237.
- Toman RE, Movsesyan V, Murthy SK, Milstien S, Spiegel S ve Faden AI. Ceramide-Induced Cell Death in Primary Neuronal Cultures: Upregulation of Ceramide Levels During Neuronal Apoptosis. *Journal of Neuroscience Research* 2002; 68:323–330
- Ueda N. Ceramide-Induced Apoptosis in Renal Tubular Cells: A Role of Mitochondria and Sphingosine-1-Phosphate. *J. Mol. Sci.* 2015; 16(3): 5076-5124
- Yu T, Li J ve Sun H. C6 ceramide potentiates curcumin-induced cell death and apoptosis in melanoma cell lines in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 999–1003
- Zhu XF, Liu ZC, Xie BF, Feng GK ve Zeng YX. Ceramide induces cell cycle arrest and upregulates p27kip in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Letters* 2003; 193: 149–154

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şeyma Büse SAĞLAMER
Doğum Tarihi : 14.09.1990
Doğum Yeri : İstanbul / Şişli
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dil : İngilizce
Telefon :05346525804
Faks :
E-Posta :seymabusesaglamer@gmail.com

Eğitim Durumu

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	İstanbul Kültür Üniversitesi	2014
Lise	İstanbul Bahçelievler Dede Korkut Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev