

1. GİRİŞ

Poliaminler (PA); putresin (Put), spermidin (Spd) ve spermin (Spm) canlı organizmaların hücrelerinde bulunan küçük, polikasyonik moleküllerdir. PA'ler kovalent bağlarla çeşitli makromoleküllere bağlanarak normal hücrelerin gelişimi ve fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gerekli olan birçok hücresel olayda etkilerini gösterirler (Wallace ve ark., 2003).

Prostat, Spm içeriği yönünden en zengin dokudur ve PA düzeyi prostat kanserinde oldukça yükselir. PA'lerin prostatik dokunun gelişimindeki önemli rolleri, prostat dokusunda bu moleküllerin metabolik enzimleriyle birlikte araştırılmasının prostat kanserinin teşhis ve tedavisinde çok büyük yararlar sağlayabileceğini düşündürmektedir (Schipper ve ark., 2000). Prostat kanserinin yüksek görülme sıklığı ve tedavisindeki kısıtlı olanaklar, yeni terapötik modellerin gerekliliğini ortaya koymaktadır. PA'lerin hücre büyümesinde oynadığı kritik rollerin anlaşılması, bazı PA inhibitörlerinin keşfine yol açmış ve hücre içi PA metabolizmasının hücre döngüsüyle yakından alakalı olduğu saptanmıştır.

Sikline bağımlı kinazlar (CDK) fonksiyonlarını, hücre döngüsü sırasında siklinlere bağlanarak gösterirler. Hücre döngüsü boyunca enzim aktiviteleri ile meydana gelen PA biyosentezindeki değişimler G1/S ve S/G2 geçişlerinde meydana gelir (Oredsson, 2003). Purin türevleri olan sikline bağımlı kinazlar (CDK), çeşitli tipteki prostat kanserlerinin kemoterapisinde yeni araçlar olarak yarar sağlayabilirler.

Strnad ve arkadaşları (1994), bitki hormonlarından sitokininlerle ilgili çalışmalarında antimitotik ve antitümör aktivitesine sahip olan CDK inhibitörlerini (CDKI) keşfetmişlerdir. Aynı araştırmacılar son yıllarda yaptıkları çalışmalarda, bohemini (BOH) adını verdikleri yüksek spesifikiteye sahip yeni bir CDK inhibitörünü sentezlemişlerdir (Kovarova ve ark., 2000).

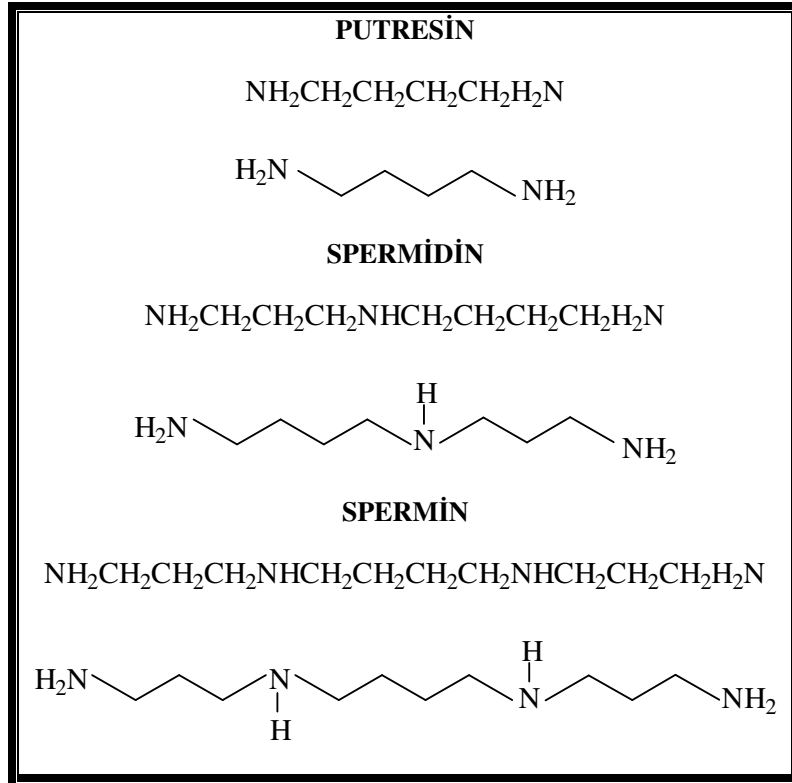
Bu çalışmanın amacı yeni sentezlenen BOH'in metastaz yapma eğilimi az (AT-2) ve metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında hücre büyümesine ve PA düzeyine olan etkisinin tayin edilmesi ve bu maddenin prostat kanserindeki terapötik potansiyelini ortaya koyabilmektir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. POLİAMİNLER

2.1.1. Poliaminlerin Yapı ve Özellikleri

Doğada ve özellikle memeli hücrelerinde üç tip doğal poliamin (PA) tanımlanmıştır. Bunlardan spermidin (Spd) bir triamin, spermin (Spm) bir tetraamin ve her ikisinin de öncü maddesi olan putresin (Put) bir diamindir (Şekil 2.1). Put bir diamin olduğu halde genellikle PA grubu içine katılır. Bu alifatik aminler düşük molekül ağırlıklı, basit kimyasal yapıya sahip, suda eriyebilen ve fizyolojik pH da her bir azot atomunda pozitif yük taşıyan alifatik moleküllerdir (Morgan, 1999).



Şekil 2.1: Poliaminlerin kimyasal yapıları (Morgan, 1998).

Günümüzde Spm olarak bilinen PA, ilk defa 1678 yılında Anthon Van Leeuwenhoek tarafından insan semeninde kristalize halde tanımlanmıştır. PA'lerin hücresel komponentlerle olan spesifik etkileşimleri ve metabolizmadaki kesin fonksiyonları halen tam olarak anlayamamıştır. Fakat yapılan çalışmalar, PA'lerin tüm hücre tiplerinde büyüme ve bölünme için gerekli olan polikatyonik bileşikler olduklarını göstermiştir. Put ve Spd hemen her organizmada bulunur. Buna karşın Spm prokaryotlarda daha az yaygındır (Davis ve ark.,1992; Thomas ve Thomas, 2001)

Hücre içi PA havuzunun büyüklüğü ve dengesi çok sıkı sınırlar içerisinde korunmaktadır. PA düzeyindeki azalma hücre büyümesini engellerken, PA'lerin aşırı artışı da hücreler için toksik bir durumdur. Bu nedenle, hücreler hızlı ve hassas bir şekilde PA havuzunu kontrol eden gelişmiş bir düzenleyici mekanizmaya sahiplerdir. Bu şekilde hücreler ihtiyaçlarına göre yeni PA'ler sentezleyebilir ya da herbir PA'i birbirine dönüştürebilirler (Schipper, 2000).

Hücreler PA'lerden yoksun bırakıldıklarında gelişimleri ve bölünmeleri durur, ancak bu durum genellikle hücrelerin ölümü ile sonuçlanmaz (Balasundaram ve ark., 1991; Balasundaram ve ark., 1993). Hızlı çoğalan hücrelerde hormonlar veya büyüme faktörleri ile meydana gelen uyarılma, hücre içi PA düzeyinin oldukça yükselmesine neden olur. Genellikle Spd ve Spm hücrede milimolar konsantrasyonlarda bulunduğu halde, Put düzeyi daha düşüktür (Morgan, 1990; Watanabe ve ark., 1991; Igarashi ve Kashiwagi, 2000). Buna rağmen birçok PA, hücre içerisinde negatif yüklü bölgelere ve nükleik asitlere bağlanır.

2.1.2. Poliaminlerin Fonksiyonları

PA'ler hücre büyümesi, apoptoz, hücre farklılaşması, hücre bölünmesi, protein-DNA etkileşimleri, embriyonik gelişim, hücre döngüsü, sinyal iletimi, immunolojik etkileşimler, hücre zarı stabilizasyonu, DNA ve RNA konformasyonel değişimleri ile kanser gibi çok çeşitli alanda fonksiyonlara sahip moleküllerdir.

2.1.2.1. Poliaminlerin Hücresel Fonksiyonları

PA'lerin hücredeki çeşitli negatif yüklü makromoleküllere ve yapılara bağlanma kabiliyetleri olduğu bilinmektedir. Hücrede PA'ler elektrostatik olarak DNA, RNA ve protein gibi negatif yüklü fosfolipidlere bağlanma özelliği gösterirler. PA'ler katyon kanallarında da düzenleyici rollere sahiptir. Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi inorganik katyonlarla PA'lerin yapıları karşılaştırıldığında, PA'lerin inorganik katyonlara göre daha güçlü ve daha spesifik etkileşimlerde yapılandığı gözlenir (Davis ve ark., 1992; Thomas ve Thomas, 2001). Buna ilaveten Spd, nadir bir amino asit olan ve translasyon başlatıcı faktör 5A'nın sentezi için gerekli olan hipusinin öncü maddesidir (Kilpeläinen, 2002). PA'ler ayrıca, embriyonik gelişimde (Kusunoki ve Yasumasu, 1978), hücre devrinde (Alm ve ark., 2000), kanserde (Pegg, 1998; Seiler ve ark., 1998), sinir kimyasında (Seiler, 2000), akciğer (Hoet ve Nemery, 2000) ve bağışıklık sisteminde de (Seiler ve Atanassov, 1994) spesifik rollere sahiptir.

Pozitif yüklü PA'ler negatif yüklü hücresel makromoleküller ile fosfolipidler, proteinler, DNA ve RNA gibi membran yapıları ile elektrostatik olarak ilişki halindedir. Bu etkileşimler PA'lerin gen ekspresyonu, hücre büyümesi, bölünmesi ve farklılaşması gibi önemli hücresel fonksiyonlarda rol oynamasını sağlar (Tabor ve Tabor, 1984; Thomas ve Thomas, 2001). Ayrıca PA'ler ribozomları, membranları ve nükleik asitleri stabilize ederek hücreyi lipid peroksidasyonundan ve serbest radikallerden korur (Drolet ve ark., 1986; Patocka ve Kuehn, 2000). Bunun dışında PA'ler hücre membranında, nörotransmitterlerin salınmasında ve bazı iyon kanallarında Ca^{2+} akışını düzenlerler (Paschen, 1992; Williams, 1997). Apoptoz mekanizmasında da PA'lerin önemli rollere sahip oldukları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Brooks, 1995; Schipper ve ark., 2000).

2.1.2.2. Poliaminlerin DNA ile Etkileşimi

PA'lerin en önemli özelliklerinden biri nükleik asitlere, özellikle DNA'ya bağlanma kabiliyetleridir. PA'ler DNA üzerindeki fosfat gruplarının yüklerini nötralize eder, nükleik asit bazları ile ilişkiye girer ve DNA çift sarmalının oluklarını keser (Feuerstein ve ark., 1990; Feuerstein ve ark., 1991; Tippin ve Sundaralingam, 1997; Deng ve ark., 2000). Bununla beraber DNA'nın erime noktasını (T_m) yükseltirler ve DNA'yı stabilize ederler (Thomas ve Bloomfield, 1984). Spm ve Spd üzerine yapılan immünohistokimyasal çalışmalar, bunların kompakt kromozomlarla ilişkide olduğunu

göstermiştir (Hougaard ve ark., 1987; Sauve ve ark., 1999). Buna karşın hücre döngüsü sırasında kromatin yapısında düzenleyici olmaktan çok stabilize edici özelliindedirler (Laitinen ve ark., 1998).

PA'ler ayrıca DNA'daki konformasyonel değişimlere de neden olurlar. PA'lerin DNA'ya bağlanmaları sonucu sağa dönümlü B-DNA sola dönümlü Z-DNA'ya daha hızlı bir şekilde dönüşür (Thomas ve ark., 1991; Bancroft ve ark., 1994; Hasan ve ark., 1995). Ayrıca PA'lerin DNA sarmalının geniş boşluklarına bağlanarak DNA'nın yapısal değişimlerini kontrol edip, transkripsyonu düzenledikleri saptanmıştır (Feuerstein ve ark., 1986; Feuerstein ve ark., 1989; Rouzina ve Bloomfield, 1998). PA'ler DNA fosfatları üzerindeki negatif yükleri nötralize ederek DNA bükülmelerini tetiklerler. Böylece kıvrılma için gerekli olan enerji gereksinimi azalır ve protein-DNA etkileşimi kolaylaşır. Birçok transkripsyon faktörünün DNA'ya bağlanmasında da PA konsantrasyonunun etkili olduğu gösterilmiştir (Thomas ve Thomas, 1993; Panagiotidis ve ark., 1995; Desiderio ve ark., 1999). PA'ler ayrıca transkripsyon faktörlerinin sentezini düzenleyen sinyal mekanizmalarında da görev alırlar (Wang ve ark., 1993; Wang ve ark., 1999; Peffer ve ark., 2000; Wang ve ark. 2001).

2.1.2.3. Poliaminlerin DNA ve Protein Sentezine Etkileri

Hücreler PA'lerden yoksun bırakıldıklarında ilk etki DNA ve protein sentezinde gözlenir. PA biyosentezi yapamayan kültür hücrelerinde, PA biyosentez inhibitörleri varlığında (Fredlund ve Oredsson, 1996a; Fredlund ve Oredsson, 1996b) veya dış kaynaklı PA yokluğunda (Laitinen ve ark., 1998) hücrelerin DNA replikasyonu zayıflayabilir. PA yoksunluğu uzun süren hücrelerde kromatinler nukleazlarla sindirilmeye karşı oldukça duyarlı (Snyder, 1989; Basu ve ark., 1992; Laitinen ve ark., 1998) ve protein sentezinde ise polizom oluşumu zayıftır (Hölttä ve Hovi, 1985). Bu durum protein sentezinin başlaması veya uzamasındaki azalma ile sonuçlanabilir (Takemoto ve ark., 1983). PA'ler ayrıca mRNA, tRNA ve rRNA'ların sekonder yapılarını etkileyerek protein sentezinin çeşitli aşamalarına etki ederler (Igarashi ve Kashiwagi, 2000). Buna ilaveten, PA'lerin ribozomlara bağlandıkları, ribozomal alt ünitelerin ilişkilerini kolaylaştırdıkları (Kakegawa ve ark., 1986) ve ökaryotik *in vitro* translasyon sistemlerinde translasyonu arttırdıkları bilinmektedir (Igarashi ve ark., 1982).

2.1.2.4. Poliaminlerin Hücre Büyümesine Etkileri

PA'lerdeki tükenme birçok büyüme ile ilişkili genin ekspresyonunda değişiklikler olmasına neden olur. Bununla birlikte, bu moleküler mekanizmanın nasıl düzenlendiği bilinmemektedir. PA eksikliğinde meydana gelen hücre döngüsü tutulması (Nemoto ve ark., 2001; Ray ve ark., 2001) p53'e bağımlı mekanizma sayesinde, sikline bağımlı kinaz inhibitörlerinin (p21^{WAF1/CIP1} ve p27^{KIP1}) indüklemesi sonucu oluşur (Ray ve ark., 1999; Kramer ve ark., 1999; Ray ve ark., 2001). PA yokluğunun hem p53'ü ve hem de mRNA'yı sağlamlaştırdığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2001). PA biyosentez enzimlerinin fazla eksprese edildiği transforme hücrelerde, p27^{KIP1} ekspresyonu oldukça azalır (Ravanko ve ark., 2000). PA eksikliği p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} ve p53'ün yanısıra çeşitli siklinlerin ekspresyonu üzerine de etkilidir. Yapılan bir çalışmada siklin A, B1 ve D1 ekspresyonlarındaki değişimler gösterilmiştir (Thomas ve ark., 1997; Marty ve ark., 2000).

2.1.2.5. Poliaminlerin İyon Kanallarının Modülasyonundaki Roller

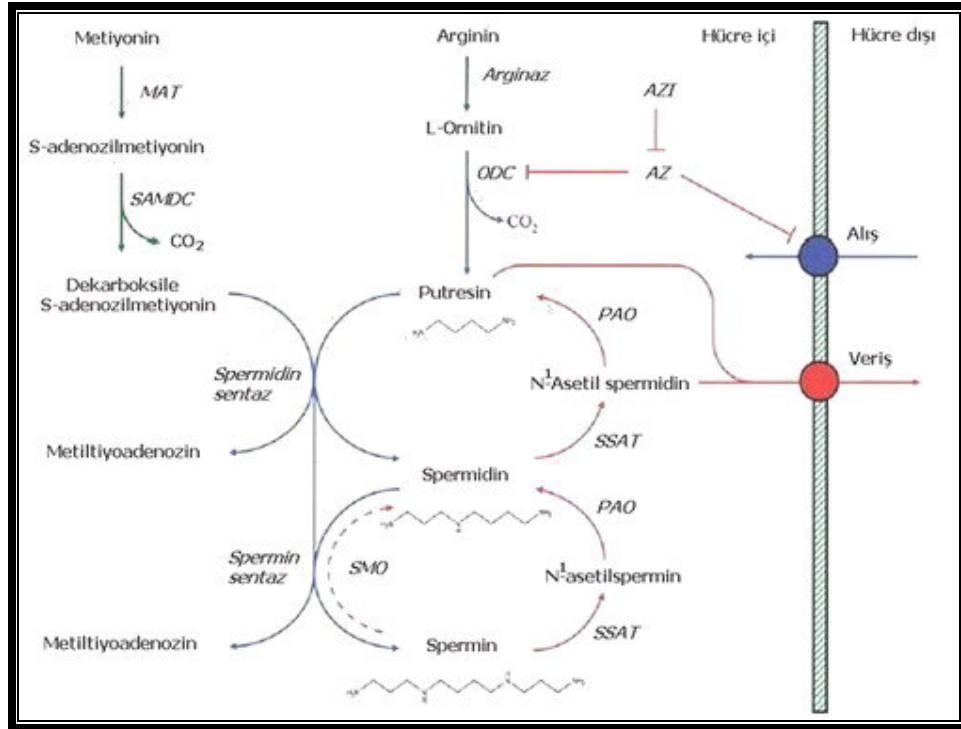
Son on yılda PA'lerin, özellikle Spm'in, bazı iyon kanallarının aktivatörü veya bloke edicileri olarak görev yaptıkları saptanmıştır (Scott ve ark., 1993). PA'ler tarafından bloke edilen katyon kanalları K⁺ kanalları (Fakler ve ark., 1994; Ficker ve ark., 1994; Lopatin ve ark., 1994), nikotinik asetilkolin reseptör kanalları (Haghighi ve Cooper, 1998; Haghighi ve Cooper, 2000), siklik nükleotid-kapılı kanallar, voltaj kapılı Ca²⁺ ve Na⁺ kanallarıdır (Scott ve ark., 1993).

2.1.3. Poliamin Biyosentezi

Memeli hücrelerinde ve mantarlarda PA biyosentezinin ilk evresi, ornitin dekarboksilaz (ODC) enziminin katalizörlüğünde ornitinin Put'e olan dekarboksilasyonudur. Hayvanlarda ornitin plazmada bulunur ve bunun çoğu besinler yoluyla organizma içine alınır. Ornitin ayrıca, üre döngüsünün bir ürünüdür ve bunun bir kısmı PA biyosentezine aktarılır. Buna karşın, tam bir üre döngüsüne sahip olmayan hücrelerde PA üretimi için gerekli olan ornitin, arginaz enzimi sayesinde sağlanır.

Memelilerde ve mantarlarda Put sentezi için sadece bir yol bulunur. Birçok mikroorganizma (Tabor ve Tabor, 1985) ve bitkiler (Slocum ve ark., 1984; Smith, 1985) alternatif bir yol olan agmatin yolunu da kullanırlar. Bu yolda agmatin, arginin dekarboksilaz (ADC) enziminin arginini dekarboksile etmesi sonucu oluşur. Oluşan

agmatin, agmatinaz (agmatin amidinohidrolaz) enzimi ile hidrolizlenerek Put'i meydana getirirken üre açığa çıkar. *Escherichia coli* (*E. coli*) gibi bazı organizmalarda bu iki yol birlikte yürür. Bitkilerde ise agmatin, agmatin iminohidrolaz enzimi ile önce N-karbamoil-putresine, bu da N-karbamoil Put aminohidrolaz enzimi ile Put'e dönüşür. Bu sırada yan ürün olarak CO₂ ve amonyak meydana gelir (Raasch ve ark., 1995) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Poliamin metabolizması. SAMDC (S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz), ODC (ornitin dekarboksilaz), PAO (poliamin oksidaz), SSAT (spermidin/spermin N¹-asetil transferaz), MAT (metiyonin adenziltransferaz) (Wallace ve ark., 2003).

Spd oluşumu, aminopropiltransferaz Spd sentaz enzimi aracılığı ile dekarboksile S-adenozilmetiyoninden (SAM veya AdoMet) bir aminopropil grubunun Put'e eklenmesi ile gerçekleşir. İkinci bir aminopropil grubunun Spd'e eklenmesi, farklı bir aminopropiltransferaz olan Spm sentaz aracılığı ile gerçekleşir. Birçok bakteri ve bazı bitkilerde Spd biyosentezi için aminopropil grubu vericisi L-aspartik-β-semialdehittir. PA biyosentezini düzenleyen ODC ve S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC ya da AdoMetDC) enzimleri ile biyosentez yolunda aktivite gösteren diğer enzimler uygun substrat varlığında faaliyetlerini gösterirler (Morgan, 1998).

2.1.3.1. Ornitin Dekarboksilaz

Ornitin dekarboksilaz (ODC), diğer PA biyosentez yolu enzimlerine kıyasla daha çok üstünde çalışılmış bir enzimdir (Hayashi, 1989; McCann ve Pegg, 1992; Davis ve ark., 1992).

ODC'nin tüm formları iki identik alt üniteden meydana gelir ve enzimin tümü bir dimerdir. Diğer memeli enzimleri ile arasında % 90 oranında özdeşlik saptanmıştır. Buna karşın *E. coli* ve ökaryotik türlerin enzimleri arasında çok küçük benzerlikler bulunmaktadır. Memeli enzimlerinin amino asit dizileri arasındaki benzerlik, bunların yapısal ve katalitik yapılarının da oldukça benzer olduğunu göstermektedir (Tabor ve Tabor, 1985). ODC, aktivitesini yerine getirebilmek için pridoksal 5'-fosfata ihtiyaç duyar (McCann ve Pegg, 1992).

ODC proteini türlere göre farklılık gösteren 10-60 dakikalık yarı ömre sahiptir. Farede ODC'nin karboksil ucunun delesyonu aktiviteyi değiştirmez ancak protein stabilitesini oldukça yükselterek enzimin hızlı bir şekilde yıkılmasını önler. (Ghoda ve ark., 1989; Lu ve ark., 1991). ODC'nin fonksiyonu ornitin dekarboksilasyonunu katalizleyerek bir diamin olan Put'in oluşmasını sağlamaktır. Normal hücrelerde ODC aktivitesi oldukça düşüktür (Pegg ve ark., 1982). ODC aktivitesi büyüme faktörleri, hormonlar, tümör teşvik ediciler ve çeşitli ilaçların etkisiyle yükselir (Russell, 1985; Hayashi, 1989). ODC'nin sentez ve yıkımı hücre içi PA düzeyindeki değişimlerle düzenlenir. Enzim proteininin yıkımı, inhibitör bir protein olan ve PA'lere gereksinim duyan antizimin (AZ) bağlanması sonucu artar (Hayashi, 1995).

2.1.3.1.1. Antizim Proteini ve Fonksiyonu

AZ ilk olarak sıçan hepatoma hücre kültüründe, ODC aktivitesini inhibe eden ve hücreye Put eklenmesinden sonra indüklenen bir protein olarak tanımlanmışlardır (Fong ve ark., 1976). Günümüzde diğer birçok hücre kültüründe AZ'lerin varlığına rastlanmış ve Put'den başka Spd ya da Spm (Heller ve ark., 1976) aracılığı ile de teşvik edilebildikleri ve bu gereksinimin çok daha kuvvetli olduğu saptanmıştır (Matsufuji ve ark., 1995). ODC aktivitesinin inhibisyonuna ek olarak, AZ'lerin ODC'ı indirgenmesi için hedef aldıkları (Murakami ve ark., 1992), hücreye dışarıdan PA alımını (He ve ark., 1994) ve potansiyel olarak hücreden salgılanmalarını (Sakata ve ark., 2000) düzenledikleri gösterilmiştir.

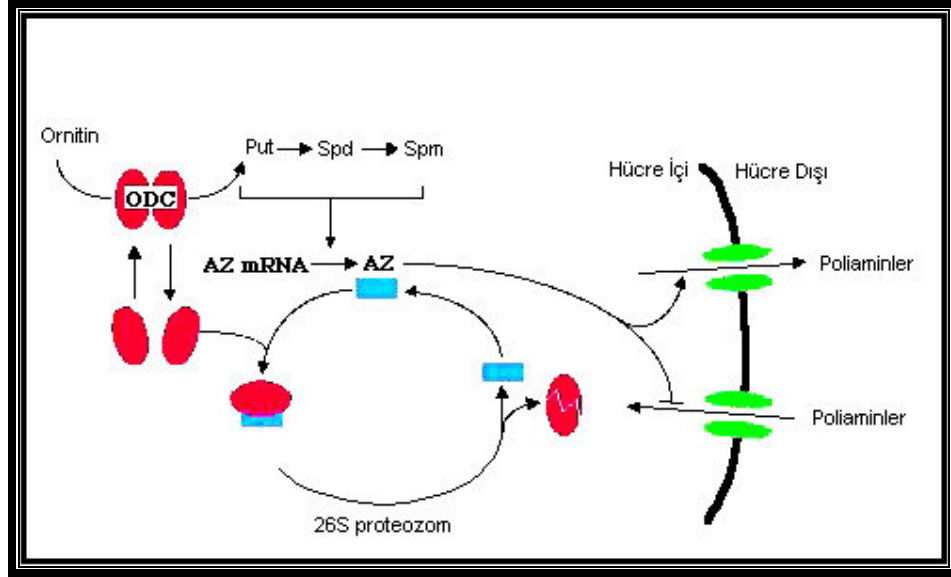
Omurgalı türleri içinde AZ'ler birçok izoforma sahiplerdir. Antizim 1, ODC monomerleri ile oldukça yüksek benzerlik gösterir (Kitani ve Fujisawa, 1984). Antizim 1'in fonksiyonel domainleri ODC'a bağlanmadan, indirgenme için ODC'ın işaretlenmesinden ve PA taşınmasının inhibisyonundan sorumludur. Antizim 1'in karboksiterminal parçası ODC'a bağlanma açısından yeterlidir (Ichiba ve ark., 1994) ve PA taşıma fonksiyonunun inhibisyonu için mutlaka gereklidir (Sakata ve ark., 1997). Antizim 1, hücrel PA düzeyinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. AZ ekspresyonundaki değişimler hücrel fonksiyonlar üzerinde etkili ve fizyolojik öneme sahip olabilir. ODC ve SAMDC'a ek olarak, AZ ekspresyonu da kanserde değişim gösterebilir, azalabilir (Tsuji ve ark., 1998) ya da artabilir (Saverio ve ark., 2000). Artması durumu, yükselen PA konsantrasyonuna normal bir cevap olarak gelişir ve yükselen SSAT aktivitesi ile birlikte PA'lerin toksik olabilecek düzeydeki birikimlerini önler. Diğer taraftan, yüksek PA konsantrasyonu prostat kanseri primer kültürlerinde AZ ekspresyonunu tetikleyebilen metastaz yapma eğilimi az olan hücrelerin büyümelerini baskılar ancak metastaz yapma eğilimi çok olan hücrelerin gelişimi AZ'in teşvikini gerçekleştiremez (Koike ve ark., 1999).

İnsan prostat epitel hücrelerinde AZ fazla eksprese edildiğinde Spd ve Spm düzeyinde önemsiz bir azalma olurken, Put düzeyi üç kat azalır (Scorcioni ve ark., 2001). Bu basit olarak hücre döngüsünün S fazındaki hücrelerin birikimine neden olur (Fredlund ve Oredsson, 1996a; Fredlund ve Oredsson, 1996b).

AZ'ler ve fonksiyonları ile ilgili olarak henüz cevaplanamamış birkaç ilginç soru bulunmaktadır. AZ'lerin sadece PA metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamadığı, daha çok çeşitli büyüme ve hücre döngüsü ile ilişkili olayda düzenleyici olarak görev yaptıkları saptanmıştır (Coffino, 2001b).

AZ'ler ODC'a bağlanarak 26S proteozom aracılığı ile ODC'ın bozulmasını sağlarlar. ODC antizim (OAZ) proteozomal yıkım için ODC'ı hedef alan bir proteindir (Hayashi ve ark., 1996). PA düzeyi az olduğu zaman, fonksiyonel OAZ proteini yapılmaz. Günümüzde OAZ'in PA'ler tarafından etkilenen tek memeli proteini olduğu bilinmektedir. Ayrıca OAZ ekspresyonu, DNA metilasyonunu ve spesifik gen

ekspresyonunu da etkiler (Tsuji ve ark., 2001). Ancak bu olayların meydana gelmesini sağlayan mekanizmalar hakkında kesin bir bilgi yoktur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Poliamin biyosentezinin antizim ile düzenlenmesi (www.p.chiba-u.ac.jp).

Birçok fare ve insan habis tümör hücre hatlarında AZ'in ekspresyonu, PA düzeyinde hızlı bir azalma ile birlikte tümör hücrelerinde hücre ölümünü de teşvik etmiştir. Bazı antizim proteinleri ise mitokondride lokalize olurlar (Mitchell ve ark., 1998). Mitokondride ODC bulunmadığından dolayı bu organelde AZ'in fonksiyonu şaşırtıcı bir durumdur. Mitokondri, apoptozda rol oynayan en önemli organel olarak gösterilmiştir. AZ'in mitokondri aracılığıyla açığa çıkartılması apoptoz sırasında ODC'nin bozunmasını kolaylaştırabilir. Buna ek olarak, apoptozda gözlenen proteolitik aktivite çoğunlukla hücre döngüsü ve hücre sağkalımı için gerekli olan proteinleri etkiler. PA'ler hücre döngüsü kontrolünde kritik bir role sahip olduklarından dolayı, ODC apoptoz ilişkili proteazlar tarafından bozulan bu proteinlerden biri olabilir. Şimdiye kadar ODC'nin apoptoz ilişkili sistein proteazlar (kaspazlar) tarafından proteolize olmasına dair kanıt bulunamamış olsa da, birçok hayvan ODC'ı kaspaz-1 için potansiyel bir yarımla bölgesi içerir. ODC, potansiyel bir kaspaz-1 hedefidir. Schipper ve arkadaşları (2000), *in vitro* çalışmalarda saflaştırılmış kaspaz-1 ve transkribe edilmiş/translasyon olmuş insan ODC'ını kullanarak ODC bozunmasının analiz etmişlerdir, bu koşullar altında kaspaz-1 aktifken ODC bozulmadan kalır.

2.1.3.1.2. Antizim Gen Ailesi

AZ'ler çok eski bir gen ailesinden biçimlenirler. Omurgalı türleri içerisinde birçok izoformları bulunur ve insanda en azından farklı genler tarafından kodlanan ve antizim 1, 2, 3, 4 olarak adlandırılan dört antizim bulunur (Coffino, 2001a) ve bunlar üç ortak özellik paylaşırlar. ODC'nin bağlanması için gerekli olan karboksi terminal parçasında daha güçlü olmak üzere yapısal homoloji gösterirler, ODC ile ilişkide bulunabilirler, onun aktivitesini azaltırlar ve izoformlara bağlı olarak potansiyel olarak ODC'nin yıkımını hızlandırırlar. Sonuçta, AZ'lerin sentezlenmeleri PA'ler yoluyla stimule edilmiş olur.

Antizim 1 ve 2'nin herikisi de ODC'ya bağlanır, onu inhibe eder ve yaklaşık olarak PA alım inhibitörleri gibi etkilidirler. Antizim 2, ODC aktivitesinin geri dönüşümlü bir inhibitörü olarak görev yapmaktadır (Zhu ve ark., 1999). Bu yolla, enzim daha sonra kullanılmak üzere depolanabilir. Antizim 4, ODC'ya bağlanır ve onu aktive eder (Ivanov ve ark., 2000) ancak bunun biyokimyasal özellikleri henüz açığa kavuşturulamamıştır.

2.1.3.1.3. Antizimlerin Düzenlenmesi

AZ biyosentezinin düzenlenmesindeki en önemli faktör, hücresel PA konsantrasyonudur. PA'ler AZ'leri oldukça az görülen bir mekanizma ile teşvik ederler (Matsufuji ve ark., 1995) ve AZ mRNA'sının hızlı ve verimli bir şekilde çalışmasını arttıırırlar (Matsufuji ve ark., 1995; Ivanov ve ark., 1998). PA tüketimi, belirgin bir şekilde antizim 1 geninin transkripsiyonunu azaltır. Yapılan bir çalışmaya göre, AZ ekspresyonunun hücre döngüsüne göre kontrol edildiği gösterilmiştir (Bettuzzi ve ark., 1999).

AZ'lerin düzenlenmesindeki ilginç fakat halen açıklanamamış konulardan biri de, AZ inhibitör proteinleridir. Bu proteinler, AZ ile inaktive olmuş ODC'ı, bir AZ-ODC kompleksi ile ODC'nin yer değiştirmesi suretiyle tekrar aktive ederler (Fujita ve ark., 1982). Bu proteinlerin ODC'ya karşı olan ilgileri AZ'lere göre daha yüksetir (Kitani ve Fujisawa, 1989; Murakami ve ark., 1989). Ancak bu proteinler enzim etkinliği göstermezler. AZ inhibitörlerinin ekspresyonu büyümeye bağımlı gibi gözükmektedir çünkü büyümesi stimule edilmiş fare fibroblastlarında inhibitörün hızlı bir şekilde teşvik edildiği saptanmıştır. Yapılan çalışmalar, bu proteinin ODC'nin ODC-AZ kompleksinden ayrılmasını sağlayan ya da zayıf ODC aktivitesine sahip olduğunu

göstermekte ve AZ'ler tarafından düzenlenen bilinmeyen fonksiyonlara sahip bir protein ya da başka bir AZ olması olasılığını işaret etmektedir.

2.1.3.2. S-adenozilmetiyonin Dekarboksilaz

S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC ya da AdoMetDC), PA biyosentezindeki ikinci önemli enzimdir. Memeli hücrelerinde (Pegg ve McCann, 1992), bitkilerde (Slocum ve ark., 1984; Smith, 1985) ve bütün organizmalarda (Tabor ve Tabor, 1985) Spd ve Spm'in oluşması için gereklidir. SAMDC'nin bütün formları proenzim olarak sentezlenir. Proenzimi kodlayan cDNA klonları *E. coli*, *S. cerevisiae*, insan, sığır, sıçan ve hamster dokularından izole edilmiştir (Pegg ve McCann, 1992). Memelilerde SAMDC proenzim olarak sentez edildiğinde inaktif durumdadır. Daha sonra bu proenzim eşit büyüklükteki α ve β alt ünitelerine bölünür ve böylece enzim aktivite kazanmış olur. SAMDC'nin bilinen tüm formları kovalent bağlı pirüvat içerir. Proenzimin bölünmesinde α -alt ünitesinin amino terminal serini pirüvat prostetik grubuna dönüştür.

SAMDC, Spd ve Spm'in biyosentezi için çok gerekli olan bir enzimdir. S-adenozilmetiyoninin dekarboksilasyonu, bu bileşiği PA biyosentez yoluna sokar ve bir metil verici olarak rol oynamasını sağlar. SAMDC'nin aktif bölgesi, aktivite için gerekli olan bir sistein molekülü içerir. Memeli hücrelerindeki yarı ömrü bir saat veya daha az olan SAMDC'nin yıkılması artan Spm ve Spd konsantrasyonuna bağlı olduğu halde Put konsantrasyonu ile herhangi bir alakası yoktur.

2.1.3.3. Spermidin Sentaz ve Spermin Sentaz

Spermidin sentaz (Spd-sentaz) ve spermin sentaz (Spm-sentaz), ODC ve SAMDC'dan çok daha stabil olan aminopropiltransferazlardır. Bunlar dekarboksile haldeki SAM'den bir aminopropil grubunu Put veya Spd'e transfer ederler. Bu sentazların aktiviteleri ortamda bulunan substratlarının varlığı ile düzenlenir. Bu enzimler PA biyosentezinde herhangi bir düzenleyici role sahip olmadıkları için diğer iki dekarboksilaza göre daha az çalışılmışlardır. Spd-sentaz bakteri (Bowman ve ark., 1973), bitki (Hirasawa ve Suzuki, 1983) ve memelilerden (Pajula ve ark., 1979; Samejima ve Yamanoha, 1982; Yamanoha ve ark., 1984; Raina ve ark., 1984; Kajander ve ark., 1989) izole edilmiştir. Her formun da aynı uzunlukta, identik iki alt ünite içerdiği saptanmıştır. Spm-sentaz sığır (Pajula ve ark., 1979) ve insan dokularından (Kajander ve ark., 1989) izole

edilmiştir. Her iki enzim formunun Spd-sentazda olduğu gibi iki identik alt ünite içerdiği saptanmıştır. Spd-sentaz aktivitesi reaksiyon ürünü olan Spd varlığında, Spm-sentaz aktivitesi ise Spm varlığında inhibe olur.

2.1.4. Poliamin Katabolizması

PA katabolizması, hücresel aktivitenin kontrolünde PA biyosentezine göre düşük etkinliğe sahip olduğundan araştırmacılar tarafından daha az ilgi görmüştür. Bitki, bakteri, mantar ve hayvanlarda PA'ler çeşitli oksidazlar tarafından oksitlenirler. Her bir oksidaz farklı kofaktörlere ihtiyaç duyarlar. Memeli hücrelerinde iki tip PA katabolizma yolu saptanmıştır. Bunlardan ilki, Spm ve Spd'in Put'e dönüştüğü kendi içinde dönüşüm yoludur. Bu yolda ilk basamak, Spm'in iki aminopropil grubundan birinin spermidin/spermin N¹-asetiltransferaz (SSAT) katalizörlüğünde asetilasyonu sonucu N¹-asetilsperminin oluşumudur. Oluşan N¹-asetilspermin, PA oksidaz (PAO) aracılığı ile Spd ve bir aldehit olan 3-asetamidopropanale dönüşür. Spd'in aminopropil grubu ise, spermidin/spermin N¹-asetiltransferaz ile asetile olarak N¹-asetilspermidin oluşmasına neden olur. N¹-asetilspermidin ise daha sonra PAO ile Put ve 3-asetamidopropanale dönüşür. Put, Spd ve Spm'e dönüşebileceği gibi sonradan metabolize de olabilir (Şekil 2.2).

İkinci veya diğer bir deyişle terminal PA katabolizma yolu, bakır içeren amin oksidazlar aracılığı ile primer amino gruplarında gerçekleşen bir oksidasyondur. Bu oksidasyon sonucunda aminoaldehit oluşumu gerçekleşir ancak bunlar tekrar PA'lere dönüşmezler (Şekil 2.2).

2.1.4.1. Spermidin/Spermin-N¹-Asetiltransferaz (Diamin N-Asetiltransferaz)

Spermidin/spermin-N¹-asetil transferaz (SSAT), hücre içi PA katabolizmasının en önemli enzimidir. Enzim, asetil koenzim A'dan bir asetil grubunu Spm veya Spd aminopropil parçasına transferini katalizler (Casero ve Pegg, 1993). Oluşan N¹-asetilspermin veya N¹-asetilspermidin daha sonra hücresel PAO aracılığı ile okside olur. PAO, PA'leri sekonder amino azot bölgelerinden 1-asetilaminopropanal (N-asetil-3-aminopropionaldehit) çıkışının gerçekleşmesi ile böler. PA yıkımının oranı SSAT aktivitesi ile düzenlenir. Bunun sebebi doku PAO aktivitesinin saptanabilecek miktarda hücre içi N¹-asetilspermin veya N¹-asetilspermidin oluşturmada yetersiz olmasıdır.

Normalde hücrede SSAT çok düşük miktarlarda bulunur ve oluşumunu Spd, Spm, hormonlar ve büyüme faktörleri teşvik ederler (Casero ve Pegg, 1993).

2.1.4.2. Poliamin Oksidazlar

PA'ler flavin içeren amin oksidazlar, bakır içeren diamin oksidazlar, Put oksidaz ve PA oksidazlar (PAO) gibi çok çeşitli enzimlerin katalizörlüğünde oksitlenerek aminoaldehitleri oluştururlar. PAO'ları iki büyük gruba ayırmıştır. Birinci gruptaki oksidazlar diamin ve PA'lerin terminal amino grupları üzerinde etkilidirler ve oluşan ürünlerden biri amonyaktır. İkinci gruptaki oksidazlar ise, Spm veya Spd'in aminopropil yarımlarındaki sekonder amino gruplarına etki ederler (Morgan, 1980; Mondavi, 1985; Morgan, 1989).

2.1.4.3. Bakır İçeren Oksidazlar

Sığır plazma diamin oksidazı memeli hücrelerindeki bakıra-bağımlı amin oksidazların prototipi olarak düşünülebilir. Bu enzim Spd ve Spm üzerine etki ederek bir aminoaldehit [N^1 -(4-aminobütıl)-aminopropanal] veya bir dialdehit [NN'-bis(3-propanal)-1,4-diaminobütan], amonyak ve hidrojen peroksit meydana gelmesine neden olur. Bu enzim PA'lerin primer amino gruplarını (Israel ve ark., 1964), Put'i (Isobe ve ark., 1980) ve bazı primer aminleri oksitler.

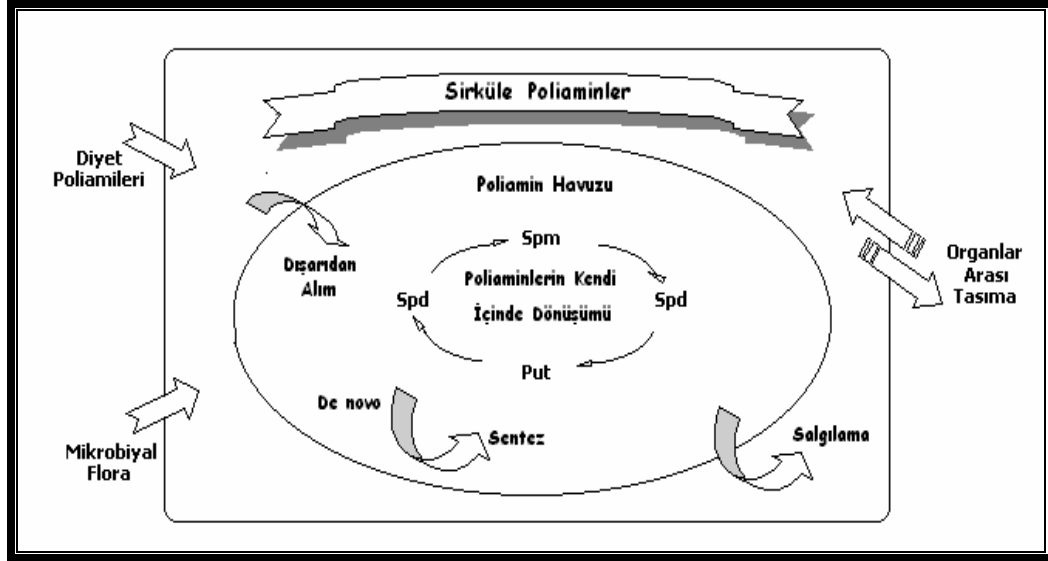
2.1.4.4. Flavin Adenin Dinükleotid (FAD) İçeren Amin Oksidazlar

Peroksizomal ve/veya sitoplazmik FAD içeren enzimler çoğunlukla tüm memeli dokularında bulunurlar (Hölttä, 1977; Seiler ve ark., 1980). Sıçan karaciğerinde bulunan PAO Spm ve Spd'in oksidasyonunu katalizlediği halde Put'in oksidasyonunu katalizlemez (Hölttä, 1977). Bu enzim Spd veya Spm'in sekonder amino gruplarına etki ederek 3-aminopropanal meydana gelmesini sağlar. N1-asetilspermin Spd'e ve N1-asetilspermidin Put'e oksitlenir ve her iki durumda da N-asetil-3-aminopropanal meydana gelir. PAO aktivitesi hemen hemen tüm dokularda yüksektir. FAD içeren PAO ise tüm memeli dokularında ve kültüre edilmiş memeli hücrelerinde bulunur.

2.1.5. Poliamin Homeostasi

Hücre içi PA havuzunun büyüklüğü ve dengesi PA'lerin *de novo* sentezi, kendi içinde dönüşümleri, terminal yıkımları, dışarıdan alınmaları ve salgılama yolu ile korunur. Organların büyümeleri, yenilenmeleri ve metabolizmaları için PA'lere ihtiyaç duymaları nedeni ile vücut PA havuzu da aynı şekilde korunur. Organizma PA'leri

kendi kendine sentez edebilme yeteneğine sahip olsa da, vücut besin veya mikrobiyal floradan sağlanan dış kaynaklı PA'lere de ihtiyaç duyar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Memeli hücrelerinde poliamin homeostazı (Schipper, 2000 den değiştirilerek).

PA'lerin *de novo* sentezi ODC ve SAMDC'in aktivitesi ile meydana gelir. ODC ve SAMDC düzeyi büyüme ve gelişme sırasında oldukça yükselir. Bu durum biyosentez enzimlerinin aktiviteleri, hormonlar, büyüme faktörleri, karsinogenler ve ilaçlar gibi uyarıcılar tarafından hızlı bir şekilde teşvik edilir (Tabor ve Tabor, 1984). Memeli hücrelerinde ODC'in substratı olan ornitin, karaciğerde ve böbrekte argininden sentezlenir. Spm ve Spd sentezinde aminopropil kısımların öncüsü metiyonindir. Metiyonin havuzunun % 20-30 u PA biyosentezi için kullanılır.

PA'ler ve bunların asetile formları hücreler tarafından salgılanabilirler. Bu sirküle haldeki PA'ler ve bunların asetile araçları PA'lere ihtiyaç duyan hücreler tarafından alınıp tekrar kullanılabilirler. Biyolojik sıvılar yoluyla bir hücreden diğerine PA taşınması, taşıyıcı gerektiren bir olaydır. Sirküle PA taşıyıcıları çeşitli proteinler veya hücreler (periferal kan hücreleri) olabilirler. Moulinoux ve arkadaşları (1996), % 95 den fazla sirküle Spd ve Spm'in kırmızı kan hücreleri ile taşındığını ve bu hücrelerdeki PA düzeyinin tümör nakledilmiş hayvanlardaki tümör gelişimi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmadan ve diğer hayvan modelleri üzerinde yapılan

araştırmalardan çıkartılan sonuçlara göre, kırmızı kan hücrelerinin PA düzeyi normal ve kanserli dokuların proliferasyon durumunu yansıtmaktadır.

Organlar arası PA taşınması, sirküle PA'ler aracılığı ile gerçekleştirilir. Bu PA'ler normal ve kanserli dokuların gelişimlerinin desteklenmesinde aracılık ederler. Bu ekstrasellular PA'ler hem hücrenel ve hem de bütün organizma boyutunda büyümenin homeostatik kontrolünde önemli bir role sahiptirler.

2.1.5.1. Besinsel Poliaminler

Farklı yiyeceklerde yapılan sistemik analizler, normal bir diyetin PA miktarının yeterli olduğunu göstermektedir (Bardocz ve ark., 1995; Ralph ve ark., 1999). Tüm bitkisel ve hayvansal besinler farklı miktarlarda PA içermektedirler. Kırmızı et Spm, balık ise Put bakımından zengindir. Sütte Spd dominant PA'dir. Peynirde ise, Put ve Spd oldukça fazladır. Bu verilere göre, yetişkin bir insanın alması gereken günlük PA miktarı yaklaşık olarak 350-500 mol dr. Meme sütünde ve ticari sütte yapılan analizlerde, memeden beslenen bebeklerin daha fazla PA aldıkları görülmüştür (Romain ve ark., 1992).

Besinler temel amino asitler gibi PA'leri de içerirler. Besinlerden karşılanan PA'lerden sadece bir bölümü vücut tarafından kullanılabilir. Radyo aktif işaretili PA'lerle yapılan çalışmalarda, PA'lerin bağırsak tarafından pasif dfzyonla alındığı gösterilmiştir (Hughes ve ark., 1998; Bardocz ve ark., 1999).

Besinsel PA'ler absorbe edilebildikleri gibi, sistemik sirkülasyondan da geçebilirler. Böylelikle vücuttaki bütün dokulara ulaşabilirler ve PA homeostasına katkıda bulunurlar. Yeni doğmuş ve geç bireylerde, büyüme ve gelişme yoğun olduğu için PA ihtiyacı da yüksektir. Yetişkinlerde yara iyileşmesi gibi yoğun hücre bölünmesine gereksinim duyulan dönemlerde PA'ler önemli rollere sahiptirler.

Neoplastik büyümede de, PA'lerin yüksek konsantrasyonları söz konusudur. Çeşitli hayvan tümör modelleri üzerinde yapılan alışmalar, PA içermeyen bir diyetin daha fazla PA tüketime katkıda bulunduğunu ve PA metabolik inhibitörlerinin tümör gelişimini durduğunu göstermiştir (Quemener ve ark., 1994).

2.1.5.2. Mikrobiyal Flora

Gastrointestinal sistemde bulunan bakteriler PA'leri, özellikle Put ve Spd'i sentezlerler (Paulin ve ark., 1983). Gastrointestinal sistemdeki mikrobiyal flora tarafından üretilen PA'lerin vücut PA havuzuna yaptıkları katkılar halen tartışma konusudur. Osborne ve Seidel (1990), Put'in bağırsak bakteriler tarafından sentezlendiklerini göstermişler ayrıca bunların absorbe edildiklerini ve hatta proksimal bağırsağa enterohepatik dolaşım yolu ile taşındıklarını da kanıtlamışlardır.

2.1.6. Poliaminlerin Taşınması

PA taşınma sistemi, hücrelerin PA ihtiyacındaki değişimlere cevap olarak işler. PA'lerin hücre alım mekanizması genellikle besinler ve bağırsak florasından tekrar geri kurtarılmalarını sağlar. Memeli organizmalarında PA'ler bağırsak sisteminden alınır ve idrarla atılır (Quemener ve ark., 1994).

Çoğu hücre az veya çok oranda PA sentezleme yeteneğine sahiptir. Tümör ve hızlı bir şekilde gelişen normal hücreler ilave PA'lere ihtiyaç duyarlar. Hızlı çoğalan hücrelerde PA alımı, dinlenme halindeki hücrelere oranla daha fazladır. Hücre gelişimindeki artış, hem hücre içi biyosentezindeki artışla ve hem de dışarıdan alımla ilişkilidir (Seiler ve Dezeure, 1990; Seiler ve ark., 1996). PA'leri dışarıdan alan hücreler için yiyecekler ile alınan, bağırsak mikroorganizmalarının sentezledikleri veya diğer hücrelerin saldıkları PA'ler kaynak olarak kullanılır (Seiler ve ark., 1996).

Bütün memeli hücreleri aktif PA taşıma sistemine sahiptirler. Birçok hücre PA'leri taşıyıcı ve enerji gerektiren mekanizmalarla dışarıdan alırlar. Bu taşıyıcı sistemin en azından membran potansiyeli ile çalıştığı bilinmektedir (Poulin ve ark., 1998). Put ve Spd taşınması Na^+ a hassas olabilir ancak Na^+ bağımlı değildir. Spm alımı ise, hücre dışı Na^+ daki değişimlerden etkilenmez (Morgan, 1999). Ca^{2+} , Mn^{2+} ve Mg^{2+} gibi iki değerlikli katyonlar Put ve Spd taşınması için gereklidir (Brachet ve ark., 1995). Taşıyıcıların alım işlemine nasıl katkıda buldukları halen tartışmalıdır ve taşıyıcı sayısının hücre tipine göre değişiklik gösterdiği gözlenmiştir.

Çoğu hücre Put, Spd ve Spm için tekli bir taşıyıcıya sahiptir (Seiler ve ark., 1996). Taşıyıcılar için benzerlik Put den Spm'e doğru değişen pozitif yüklerle artar. Bununla

birlikte, hücre başına çoklu taşıyıcı tipleri seyrek bir olay değildir. Örneğin, insan damar endotel hücrelerinde iki taşıyıcı vardır. Bunlardan biri her üç amini taşıma kapasitesine sahipken, diğeri Spm ve Spd tarafından paylaşılır (Morgan, 1992). Bundan başka porsin aortik endotel hücrelerin Put için bir ve diğeri iki PA için de iki adet olmak üzere toplam üç adet taşıyıcıya sahip oldukları kanıtlanmıştır (Bogle ve ark., 1994).

Proteinler ve memeli hücrelerindeki PA taşıma sistemi oluşumları tam olarak bilinmemektedir. Memeli hücrelerinin plazma membranları üzerinde ışığa hassas işaretleme methodları kullanılarak birçok PA-bağlayıcı protein keşfedilmiş ancak bunların PA transferine olan katkıları tam olarak kesinlik kazanmamıştır (Felschow ve ark., 1995; Felschow ve ark., 1997). Yüksek hücre içi PA düzeyi çevreden PA transferini inhibe eder.

Bağırsak mukozası ve alveolar epitel önemli PA transferlerinin gerçekleştiği dokulardır (Hoet ve Nemery, 2000). Bağırsak mukozası enterositleri PA'leri bağırsak lümeninden alır. Buna ek olarak, epitelden gerçekleşen pasif difüzyon da total PA taşınmasına yardımcı olabilir (Milovic ve ark., 2001). Bağırsaktan alınan PA'lerin mukozanın yenilenmesi ve büyümesi için (Osborne ve Seidel 1989; Wang ve ark., 1991) ve ayrıca tümör gelişimine (Sarhan ve ark., 1992) yardım etmede önemli oldukları gösterilmiştir.

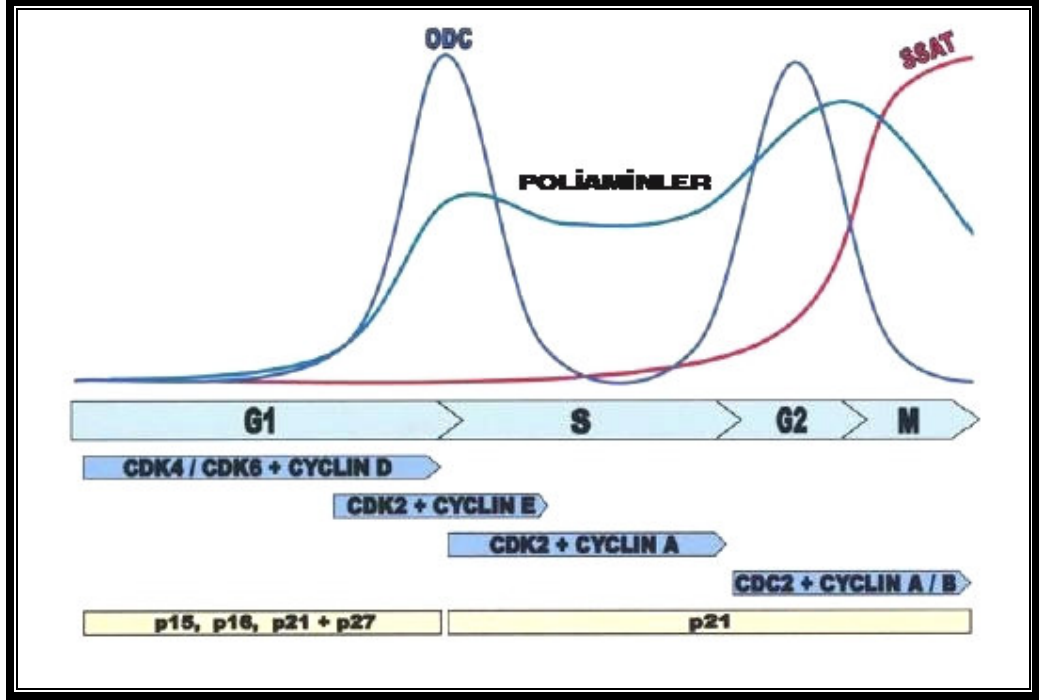
2.2. Poliaminler ve Hücre Devri

Uzun yıllardır yapılan çalışmalarla PA'lerin hücre devri sırasında spesifik rollere sahip oldukları gösterilmiştir (Heby ve ark., 1973; Seidenfeld ve ark., 1981). Yapılan ilk çalışmalarda PA düzeyinin G1 ve S fazlarında arttığı ve PA tüketimine bağlı olarak G1 den S fazına geçişte inhibisyon meydana geldiği gösterilmiştir (Heby ve ark., 1973).

Hücre döngüsünde özellikle PA analoglarının S fazında geciktirmeye neden oldukları gözlenmiştir (Alm ve ark., 2000). Buna göre, hücre döngüsünün çeşitli fazlarında PA'lere ihtiyaç duyulmaktadır. Hücre döngüsü sırasında PA düzeyinin düzenlenmesi ve PA biyosentezinin kesilmesi için hücre döngüsünün durdurulması, PA'lerin hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerle ilişkide oldukları olasılığını yükseltmektedir.

Uzun yıllardan beri, hücre döngüsü sırasında hem ODC ve hem de PA konsantrasyonlarında değişimler meydana geldiği bilinmektedir (Heby, 1981). PA içeriğinin artmasını takiben G1 fazında, G2 fazında ve mitozdan önce ODC'ın artış gösterdiği saptanmıştır (Bettuzzi ve ark., 1999). Bu nedenle hem PA'lerin ve hem de siklin/CDK'ların hücre döngüsü boyunca fazlı değişimler gösterdiği saptanmıştır. Bir görüşe göre, PA'ler siklin yıkımını düzenlerler (Thomas ve Thomas, 2001). Hücre içi PA konsantrasyonunun hücre döngüsünde önemli hücre kontrol noktalarının hem pozitif ve hem de negatif yönde düzenlenmesinde rol oynadığı bulunmuştur. Bu durum, PA konsantrasyonunun döngü boyunca neden kontrol edildiğini de açıklamaktadır (Kramer ve ark., 2001; Oredsson, 2003). ODC'ın ilk olarak G1 fazında ve ikinci olarak da protein sentezinin inhibisyonu sırasında artması, hücrenin S fazına girişi için Put'in gerekli olduğunu göstermektedir (Pyronnet ve ark., 2000).

Hücre döngüsü sırasında ODC ve SAMDC bifazik bir şekilde aktive olurlar. İlk aktivasyon geç G1 de, ikinci aktivasyon ise S/G2 geçişinde meydana gelir. ODC aktivasyonu G1/S geçişi ile birlikte pRB üzerinde siklin D1/CDK4'ün ilk fosforilasyon aktivitesi sonucu olabilir. Pyronnet ve arkadaşları (2000), ODC'ın ikinci aktivasyon pikinin G2/M geçişinde olduğunu bulmuşlardır. CHO hücrelerinde (Chinese hamster ovary) hücre döngüsü sırasında, ODC ve SAMDC aktivitelerinin düzenlenmesinde transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmaların rolü araştırılmış ve her iki enzimin mRNA düzeylerinin hücre döngüsü sırasında iki katına çıktığı ve aynı zamanda enzim aktivitelerinin yarı ömürlerinde artış meydana geldiği görülmüştür (Fredlund ve ark., 1995). ODC mRNA düzeyinin iki katına çıkması, enzim aktivitesinin iki katına çıkması ile birlikte S fazının sonunda meydana geldiği saptanmıştır. Aynı şekilde, SAMDC mRNA düzeyinin iki katına çıkması SAMDC aktivitesinin ikiye katlandığı G1/S geçişi sırasında, ikinci artışın ise S/G2 geçişi esnasında meydana geldiği görülmüştür (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Poliamin metabolizmasının hücre devri proteinleri ile ilişkisi. Hücre devrinin G1/S ve G2 fazlarında hem poliamin ve hem de ornitin dekarboksilaz (ODC) konsantrasyonunda artış meydana gelir. (SSAT) düzeyindeki değişimler ise M fazında gözlenir. Siklinlerin ve sikline bağımlı kinazların (CDK) ekspresyonlarındaki değişimler ve çeşitli CDK inhibitörleri hücre devrinin her bir fazına spesifiktir (Wallace ve ark., 2003).

CDK inhibitörleri (CDKI) olarak adlandırılan bir grup molekül, siklin-CDK kompleksinin aktivitesini bloke ederek hücre döngüsü ilerlemesini durdururlar (Tsihlias ve ark., 1999; Pestell ve ark., 1999). Hücre döngüsü proteinlerinin sentezini, yıkımını ve aktivasyonunu değiştiren sinyal iletim olayları hücre döngüsüne ya yardım eder ya da onu inhibe ederler. PA'lerin hücre büyümesi ve hücre döngüsündeki kritik rolleri siklinler, CDK'lar ve CDKI'ler ile PA'ler arasındaki etkileşimin tanımlanmasını gerektirmektedir.

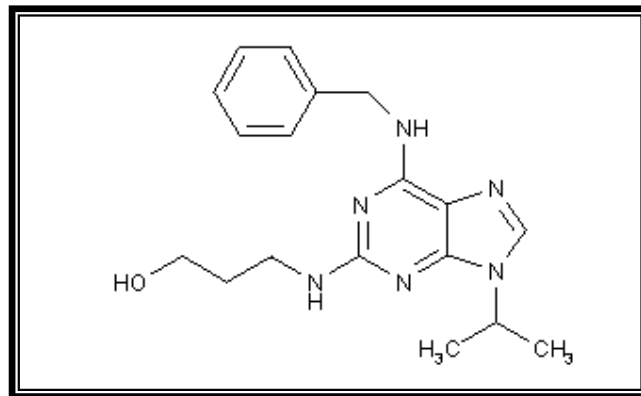
2.2.1. Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörleri

Doğal CDK inhibitörleri (CDKI), CDK'ların enzimatik aktivitelerini düzenlemede önemli rollere sahiptirler. Bu proteinler siklin-CDK kompleksine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe eder ve hücrenin hücre döngüsüne girişini engellerler. P16^{INK4} (Cdk4/siklin D1-D3 inhibitörü) (Nobori ve ark., 1994) ve p21^{CIP1, SDI1, WAF1} (genel CDK inhibitörleri) (Noda ve ark., 1994) gibi doğal CDKI'lerin tümör baskılayıcıları oldukları

saptanmıştır. Ayrıca bu doğal inhibitörler butirolakton, flavopridol, olomisin, roskovitin, purvalanol ve indirubin gibi farklı tipte küçük sentetik inhibitör molekülleri kısmen taklit edilebilmektedir (Meijer ve ark., 1999; Sielecki ve ark., 2000). Doğal CDKI ailesi ve/veya CDKI transkripsiyonunu kontrol eden genlerin (p53) kanser hücrelerinde en sık mutasyona uğramış proteinlerin üyeleri oldukları saptanmış ve kanser tedavisinde bunların biyolojik aktivitelerini taklit eden sentetik moleküller giderek ilgi çeken adaylar haline gelmişlerdir. Yapılan son çalışmalarda sentetik CDK inhibitörlerinin çoğalmaya ket vurucu aktiviteleri *in vivo* olarak gösterilmiş ve araştırmacılar tarafından bunların yeni anti-kanser ajanlar olarak kullanılabilecekleri saptanmıştır.

Vesely ve arkadaşları (1994), bir bitki hormonu grubu olan sitokininlerle yaptıkları çalışmalarda, CDK1, CDK2 ve CDK5 kinazların spesifik inhibitörü olan olomisini (OC) sentezlemişlerdir. OC, hücreleri G1/S ve G2/M sınırında durdurma kapasitesine sahiptir.

Aynı araştırmacılar son yıllarda, OC den daha spesifik ve daha etkili yeni bir grup CDKI grubunu sentezlemişlerdir (Kovarova ve ark., 2000). Bu grubun bir üyesi olan bohemini (BOH), bir CDK1/siklin B inhibitörüdür (Şekil 2.6). BOH *in vitro* ve *in vivo* şartlar altında birçok tümör hücre hattında güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 2.6: Boheminin kimyasal yapısı.

2.3. APOPTOZ

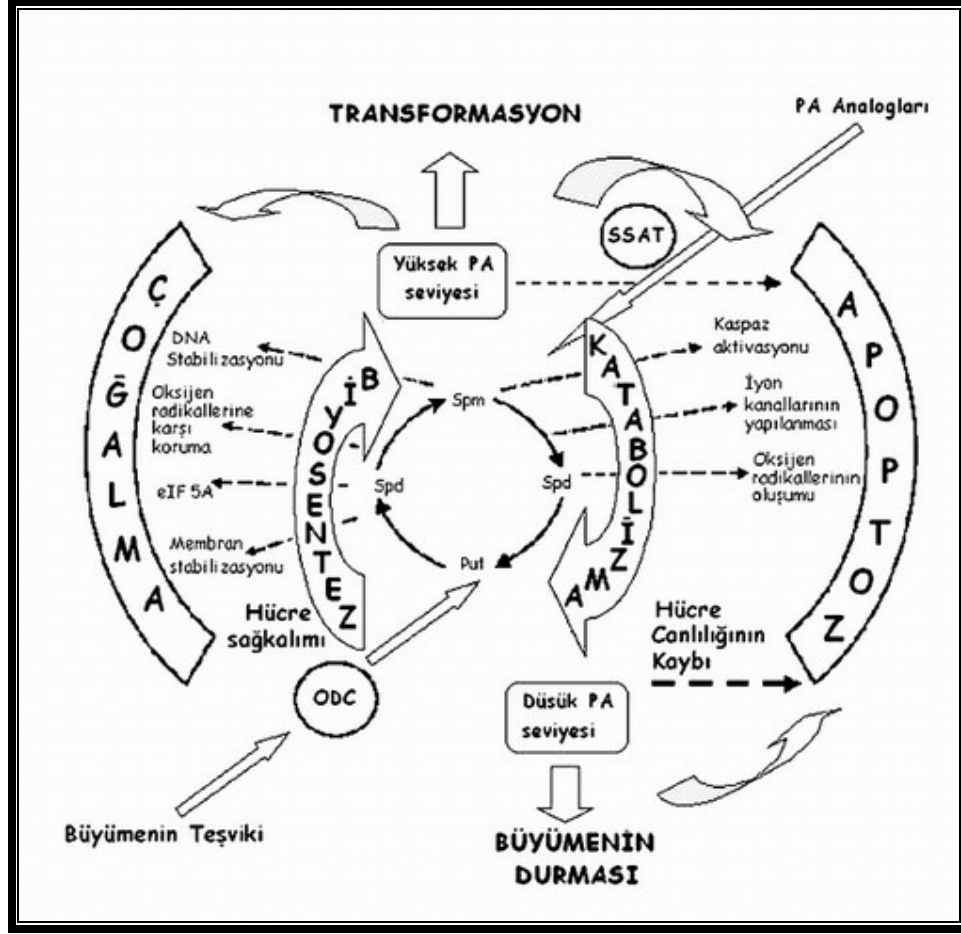
Programlı hücre ölümü (apoptoz) ve hücre büyümesi bir bütünün iki parçasıdır. Her ikisini de düzenleyen biyolojik yollar kısmen birbirleriyle kesişirler ve bazı hücre tiplerinde hücre çoğalmasını tetikleyen bir sinyal veya fizyolojik durum diğer hücrelerde ya da olaylarda apoptotik hücre ölümüne yol açabilir. Bu nedenle, PA'lerin hücre büyümesine ek olarak apoptozun düzenlenmesinde rol oynamaları şaşırtıcı bir durum değildir. Paradoksal olarak PA'lerin apoptozda destekleyici ya da koruyucu ajanlar olarak görev yapabildikleri görülmüştür (Schipper ve ark., 2000).

Ökaryotik hücreler, hücre sel intiharı gerçekleştiren ve apoptoz olarak bilinen genetik bir programa sahiptir. Apoptoz, gelişim sırasında programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen, hücre veya dokuların ortadan kaldırılması, genetik olarak zarar görmüş hücrelerin yok edilmesi ve T lenfositlerin seçimi sırasında rol oynar. Nekrozdan farklı olarak apoptoz, inflamator bir cevaba eşlik etmez.

2.3.1. Poliaminler ve Apoptotik Hücre Ölümü

PA'lerin apoptozla olan ilişkisini açıklayan bir çok literatür bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda ODC aktivitesindeki ya da PA'lerin düzeyindeki değişimlerin birçok hücre sisteminde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bunun dışında, apoptotik hücre ölümü sürecinde PA enzim inhibitörleri ya da analoglarının kullanılması ile PA homeostasisının engellenmesi sonucu meydana gelen etkiler, PA'lerin apoptotik hücre ölümünün kontrolünde önemli faktörler oldukları fikrini güçlendirmektedir.

PA düzeyindeki, özellikle Spd ve Spm düzeyindeki azalma apoptoz olayında sık rastlanan bir durumdur (Manchester ve ark., 1993; Tome ve ark., 1997; Penning ve ark., 1998; Moffatt ve ark., 2000; Nitta ve ark., 2001). PA'lerin tüketimi, p53/p21/p27 hücre döngüsü düzenleyici yollarının etkilenmesi ile apoptoza ya da hücre döngüsü tutulmasına sebep olabilir (Kramer ve ark., 1999; Ray ve ark., 1999; Li ve ark., 1999). Bunun dışında PA'ler iyon taşınmasının düzenlenmesinde, hücre membranları ve kromatin yapısı gibi önemli hücre sel komponentlerin stabilizasyonunda oldukça etkili rollere sahip olduklarından düzeylerindeki azalma hücre sel yapıların stabilitelelerinin bozulmasına, hücre bütünlüğünün kaybolmasına ve sonuçta hücre ölümünün meydana gelmesine sebep olur (Schipper ve ark., 2000) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Apoptoza aracılık eden poliamin düzeyi ve bunu düzenleyen yollar (Schipper, 2000).

Apoptozda PA'lerin rolleri ile ilgili genel sonuçları belirlemek zor olduğundan, PA'lerin apoptoza karşı korumada olduğu gibi apoptozu teşvik etmeye ve hassaslaştırmaya da katkıda buldukları düşünülmektedir (Schipper, 2000).

PA'lerin apoptozdaki rolleri halen kesinlik kazanamadığı halde, bu çok yüklü moleküllerin düşük düzeyleri gibi, yüksek düzeylerinin de bunların hücrel etkileşimlerini önlediği saptanmıştır. PA'lerin uygunsuz faaliyetleri hücre döngüsünü etkiler ve programlanmış hücre ölümüne yol açar. Benzer bir yolla, PA analogları da PA'lerin fonksiyonel hücrel bölgelerini engelleyerek apoptozu teşvik edebilir.

Gerçekte PA düzeyleri apoptotik süreç sırasında azalır. İlk ODC aktivitesinin indüksiyonundan ve Put üretiminin ardından PA'lerin azalması çeşitli çalışmalarda

gösterilmiştir. PA düzeylerindeki bu azalma, ODC'ın yıkımından, PA'lerin transglutaminaz aracılığıyla proteinlere dahil edilmesinden, PA katabolizması ve PA'lerin dışarı atılımından dolayı olabilir. Tüm bu işlemler aktif veya pasif olarak apoptotik hücre ölümünün yerine getirilmesine katkıda bulunabilirler.

PA'lerin çok düşük düzeylerinin bile apoptozu bir iki nedenden ötürü çok iyi bir şekilde destekleyebileceği düşünülmektedir:

- PA tüketimi, hücre döngüsünün durdurulması veya p53/p21/Rb gibi hücre döngüsü düzenleyicilerini etkileyerek apoptozu meydana getirebilir (Kramer ve ark., 1998).
- PA'ler iyon taşınmasının düzenlenmesinde ve hücre membranları, kromatin yapısı gibi önemli hücresel komponentlerin stabilizasyonunda rol alırlar. Bu nedenle, PA düzeyindeki azalma, bu hücresel yapıların stabilizasyonunun azalmasına neden olur ve hücre bütünlüğünün bozulması sonucunda hücre ölümü indüklenmiş olur. Çeşitli çalışmalarda, dışarıdan ilave edilen PA'lerin hücreyi hücre ölümüne karşı korudukları ve bu da PA'lerin hücre canlılığı ve sağkalımı için gerekli olduklarını göstermektedir.

PA üretimine neden olan çeşitli faktörler ve PA'lerin hücresel fizyolojide sergiledikleri çoklu faktörler PA'lerin hücre çoğalması kadar hücre ölümünde de önemli hücresel düzenleyiciler olduklarını ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalar sayesinde PA'lerin, bir hücrenin büyümesinde, farklılaşmasında, sağkalımında ya da ölümünde son kararı verecek olan kontrol mekanizmasının bir parçası olduğu biraz daha açıklanmaktadır.

PA'lerin hücre kinetiğindeki davranışlarının öneminin anlaşılması ile, kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde kemoterapötik ajanlar olarak potansiyel önem taşımaları kaçınılmazdır.

2.3.2. Poliaminlerin Sitotoksik Etkileri

Yapılan araştırmalarda PA'lerin çeşitli koşullar altında hücreler üzerinde toksik etkilere sahip oldukları saptanmıştır (Allen ve ark., 1979; Gahl ve Pitot, 1979). Bununla birlikte yüksek PA konsantrasyonlarının hücre büyümesine karşı zararlı olduğu ve apoptotik (Tome ve ark., 1994; Tobias ve Kahana 1995; Poulin ve ark., 1995; Xie ve ark., 1997) hücre ölümünü tetikleyebileceği gösterilmiştir (He ve ark., 1993; Poulin ve ark., 1993). Serum amin oksidaz veya hücre içi FAD-bağımlı PA oksidazlar ile Spd ve Spm'in oksidasyonu, apoptozun kuvvetli tetikleyicileri olan hidrojen peroksit ve aminoaldehitlerin meydana gelmesine neden olur (Parchment ve Pierce, 1989; Ha ve ark., 1997). Bununla birlikte PA'lerin oksidasyon olmadan da apoptozu tetikleyebildikleri saptanmıştır (Brunton ve ark., 1991; Alhonen ve ark., 2000). Ancak hücrede hangi mekanizmanın asıl role sahip olduğu halen bilinmemektedir.

PA'ler bakımından zengin kültür besiyerinde yetiştirilen ya da zengin hücre içi PA konsantrasyona sahip hücreler için PA'ler hücreler üzerinde toksik etki yapabilirler. Spd ve Spm'in *in vitro* sitotoksitesi yıllar önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Gahl ve Pitot, 1979; Allen ve ark., 1979). Eğer besiyerinde geviş getiren hayvanların serumu kullanılmışsa, PA'lerin kültür hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri gözlenebilir (Allen ve ark., 1979) ve bu durum bakır içeren bir amin oksidaz inhibitörü olan aminoguanidin kullanılarak ortadan kaldırılabilir. Daha sonraki çalışmalarda bu tip sitotoksitenin, geviş getiren hayvanlarda fazla miktarda bulunan ve hidrojen peroksit ya da üre gibi hücre için zararlı olan bileşiklerdeki Spd ve Spm'i yıkan serum amin oksidazlara bağlı olduğu gösterilmiştir (Tabor ve Tabor, 1984; Seiler, 1987).

Hücre içi PA birikimi PA katabolizmasını stimüle eder ve sitotoksik metabolitlerin üretimini arttırabilirler. Bu sitotoksik metabolitler detoksifiye edici düzenleyicilerin eksikliğinde hücre ölümüne neden olabilirler. Bu nedenle PA oksidasyonu PAO tarafından katalizlenir ve bunun sonucunda oluşan hidrojen peroksitin apoptotik hücre ölümünü teşvik ettiği belirlenmiştir. Bununla birlikte bazı sıçan dokularındaki PAO'ın *in situ* lokalizasyonu üzerine yapılan çalışmalarda peroksit ve oksijen radikallerini detoksifiye edici enzimler tarafından nötralize edilebildiği saptanmıştır (Van-Den-Munckhof ve ark., 1995).

Yapılan araşırmalarda PA'lerin hem kendilerinin ve hem de oksidatif metabolitlerinin hücreler üzerinde toksik etkiler yaratabildiği belirtilmiştir (Brunton ve ark., 1991). Yapılan diğer çalışmalar ise prostat kanseri hücrelerinde *in vitro* koşullarda mikromolar düzeyde verilen Spm in hücre lizisine sebep olduğunu göstermektedir.

PA'ler ayrıca *in vivo* koşullarda da toksik olabilirler (Seiler, 1991) ancak halen PA'lerin kendilerinin ve/veya metabolitlerinin toksik etki yaratabileceği tartişmalıdır. Smith ve arkadaşları (1995), bir tür prostat kanseri hücre hattına Spm enjekte etmişler ve solid tümör gelişiminin baskılandığını görmüşlerdir. Bunun sonucunda prostatta oldukça fazla miktarda bulunan Spm'in endojen bir prostat kanseri inhibitörü olarak rol oynayabileceği sonucu çıkartılabilir.

2.3.3. ODC'm Apoptozla Olan İlişkisi

Farklı hücre sistemleri ile yapılan çeşitli çalışmalar apoptotik hücre ölümünün tetiklenmesinden sonra ODC aktivitesinin hızlı bir şekilde arttığını göstermiştir (Grassilli ve ark., 1991; Manchester ve ark., 1993; Desidero ve ark., 1995; Penning ve ark., 1998; Lindsay ve Wallace, 1999). ODC bazı durumlarda apoptozun düzenlenmesinde çok aktif bir role sahip olabilir. Bu da *c-myc* proto-onkogeninin fazla ekspresyonu ile apoptozun direkt bir aracısının tetiklenebileceğini işaret etmektedir (Packham ve Cleveland, 1994). Yapılan alışmalarda ODC'm *c-myc*'nin neden olduğu apoptozun bir aracısı olduğu ve *c-myc*'nin transkripsiyon düzeyinde ODC ekspresyonunu düzenlediği saptanmıştır (Bello-Fernandez ve ark., 1993).

ODC inhibitörü olan α -diflorometil ornitin (DFMO), hemen hemen bütün hücre sistemlerinde apoptozu inhibe ettiği tesbit edilmiştir (Ray ve ark., 2000). Bununla birlikte, DFMO tedavisinin diğer bir PA biyosentez enzimi olan SAMDC'ı pozitif yönde regüle ettiği, Put ile Spd düzeylerini azalttığını ancak Spm düzeyini çoğunlukla arttırdığını saptanmıştır. SAMDC inhibitörleri (Satoh ve ark., 1999) ve Spd/Spm analogları (Shah ve ark., 2001) genellikle apoptozu teşvik eder.

Farklı hücresel sistemler kullanılarak yapılan çalışmalarda apoptotik hücre ölümünün tetiklenmesinden sonra ODC aktivitesinde hızlı bir artış olduğu ve apoptozda ODC'm aktif bir rolü olduğu gösterilmiştir. ODC'm apoptozdaki doğrudan rolü Packham ve

Cleveland (1994), tarafından gösterilmiştir. Bu araştırıcılar teşvik edilmiş ODC ekspresyonunun sitokinden yoksun bırakılmış interlökin-3'den (IL-3) bağımsız hücrelerde apoptozu hızlı bir şekilde tetiklediğini ve ayrıca *c-myc*'nin ODC aracılığı ile meydana gelen apoptoz ile farklı mekanizmalarla gerçekteşen hücre çoğalmasını teşvik ettiğini ileri sürmüşlerdir (Packham ve ark., 1996). Bu sonuçlar bize, apoptoz ile hücre çoğalmasının birbirlerine bağılı olduğunu ve apoptotik mekanizmalarla hücre döngüsü mekanizmalarının ortak düzenleyicileri kullandıkları fikrini vermektedir. *c-myc*, siklin D3, p53, pRb ve E2F gibi hücre döngüsü düzenleyicileri apoptozda da aktif olarak rol oynamaktadır (King ve Cidlowski, 1998).

Eğer ODC apoptozda aktif bir rol oynuyorsa, azalmış ODC enzim aktivitesi apoptozun oluşumunu ya da ilerlemesini inhibe etmelidir. Gerçekte, artan ODC yıkımı insan fibroblastlarında apoptozu önlemiştir (Tewari ve ark., 1998). Buna ilaveten ODC aktivitesinin DFMO ile bloke edilmesi hemen hemen bütün sistemlerde apoptozu inhibe eder. DFMO uygulaması ile PA metabolizmasının diğer enzimleri pozitif yönde düzenlendiğı ve Put ile Spd düzeyi DFMO ile azaldığı halde, Spm düzeyi genellikle yükselir.

Yapılan bir çok çalışmada apoptozun erken evresinde ODC'ın arttığı ancak PA düzeyinin genellikle azaldığı gösterilmiştir. ODC'ın görevini yapamaması ve PA düzeyinin artması hücre ölümü sırasında ODC'ın vaktinden önce bozunmasından kaynaklanabilir.

2.3.4. Poliamin Katabolizmasının Apoptozdaki Rolü

Hücre içi PA düzeyinin azaltıldığı diğer mekanizma da PA katabolizma enzimlerinin işlevi ile meydana gelen mekanizmadır. SSAT, çeşitli toksik ajanlar ve diğer stres uyarıcıları ile teşvik edilir (Xiao ve Casero, 1995). Apoptozda SSAT'ın ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır (Desiderio ve ark., 1995; Ha ve ark., 1997). Buna göre, PA katabolizmasının stimülasyonu, hücre ölümünde genel bir hücresel cevaptır.

Apoptozda SSAT ve PAO'ın rolleri HL-60 hücrelerinde araştırılmıştır (Lindsay ve Wallace, 1999). Apoptozun maksimum olduğu anda SSAT ile PAO'ın enzim aktivitelerinin değışmediğı, buna karşın total PA düzeyinin azaldığı ve PA'lerin hücre

dışına atılımında bir artışın meydana geldiği saptanmıştır. Schipper ve arkadaşları (2000), prostat kanseri hücrelerinde apoptoz sırasında SSAT'ın indüklendiğini göstermişlerdir. Bu sonuç PA katabolizmasının apoptozun nekrotik devresi ile alakalı olduğunu göstermektedir.

2.3.5. Apoptoza Karşı Poliaminlerin Koruyucu İşlevleri

Spm biyosentez enzimi olan SAMDC'nin inhibitörleri ile yapılan çalışmalar, Spm'in apoptotik hücre ölümüne karşı hücrel bir dirençte rol aldığını göstermiştir. SAMDC inhibitörleri olan MGBCP veya MGBG'in çeşitli kanser hücre hatlarında apoptozu teşvik edebildikleri saptanmıştır (Satoh ve ark., 1999; Hashimoto ve ark., 1999). Dışarıdan eklenen Spm, MGBCP tarafından uyarılan apoptozu kısmen önlemiştir. MGBCP gibi MGBG'nin de, Burkitt's lenfoma, PC-3 prostat kanseri ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında p53'den bağımsız bir mekanizma yolu ile apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (Davidson ve ark., 1998).

Spm'in koruyucu etkisi tam olarak anlaşılammıştır ancak endonukleaz inhibisyonu, DNA'nın stabilizasyonu (Brooks, 1995; Basu ve ark., 1997) ya da oksidatif strese karşı DNA'nın korunması (Ha ve ark., 1998) gibi değişik mekanizmalar belirlenmiştir.

2.4. KANSER

PA'ler hücre çoğalması için gerekli moleküllerdir ve tümör hücrelerinin gelişimi sırasında, PA düzeyinde ve PA biyosentez enzimlerinin düzenlenmesinde bir artış meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda habis transformasyon için ODC aktivitesine de gereksinim duyulduğu gösterilmiştir (Shantz ve Pegg, 1998).

Prostat adenokarsinomlarında ve akut lenfoblastik lösemisinin teşhisinde eritrosit PA'lerinin ve beyin neoplastik büyümelerinde ODC aktivitesinin markır olarak kullanılabileceği saptanmıştır. Ayrıca SSAT'ın mesane epitelinde güvenilir biyokimyasal markırlar olduğu kanıtlanmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda da PA'lerin servikal malignansiler için potansiyel biyomarkırlar olduğu saptanmıştır (Nishioka ve ark., 1995).

PA biyosentez inhibitörleri ve PA analogları ile yapılan çeşitli çalışmalarda PA homeostasisının engellenmesi ile tümör büyümesinin inhibe edildiği gösterilmiştir. PA biyosentez inhibisyonunun çoğunlukla sitotoksik olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca dış kaynaklı PA'lerin hücreye girişini bloke eden spesifik inhibitörlerin PA metabolizmasında daha etkili terapötik araçlar olabileceği ispatlanmıştır. Bununla birlikte diyet ile PA havuzunun manipule edilmesi kemoterapi ve kanserden korunma konusunda ayrı bir öneme sahiptir.

2.4.1. Poliamine Bağımlı Gen Ekspresyonunun Mekanizması

PA'ler karsinogenezde pek çok olaya etki ederler. Yüksek PA düzeyi, hücre çoğalması ve tümör metastazını etkileyen genlerin ekspresyonlarında meydana gelen artışla, apoptozda ise azalma ile ilişkilidir (Babbar ve ark., 2003; Ignatenko, 2004). Bir çok araştırma, artan PA düzeyinin apoptoza neden olabileceğini göstermiştir (Erez ve ark., 2002). Gerçekte PA'lerin teşvik ettiği apoptoz, hücre içi PA düzeyinin normalin üzerinde yükseldiği durumlarda ve PA homeostasisının düzenlenmesindeki hasarların sonucunda meydana gelir.

PA'ler, normal dokuların hasarına ya da tümör gelişimine karşılık olan kan damarlarının gelişimi (angiogenez) için gereklidir. PA sentezinin inhibisyonunun çeşitli mide ülser (Brzozowski ve ark., 1995) ve tümör (Takahashi ve ark., 2000) modellerinde angiogenezi bloke ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, PA metabolizmasının kolon tümör hücre gelişiminde arginine bağımlı etkilere de yardım ettiği saptanmıştır (Takigawa, 1990). Arginin, arginaz enzimi ile üre ya da ornitine metabolize olur. ODC ise nitrik oksit (NO) ile nitrozilasyon yoluyla inaktive edilebilir (Bauer ve ark., 2001). Arginin ve katabolitleri, arginaz enziminin inhibisyonu ile hücre gelişimini durdurabilirler (Buga ve ark., 1998). Tahminen, arginazın inhibisyonu hem ornitin üretimini baskılayarak ve hem de ODC'ı inhibe eden NO üretimini destekleyerek PA üretimini önlemektedir.

Son yıllarda PA'lerin hem transkripsiyonel ve hem de post-transkripsiyonel yollarla spesifik gen ekspresyonunu etkiledikleri gösterilmiştir ve cDNA mikroarray teknolojileri ile kanser hücrelerinde PA ile düzenlenen genler tanımlanmaya başlanmıştır. ODC ve ODC'ın diamin ürünü Put, hücre davranışlarını etkileyen birçok hücresele olaya katılmaktadırlar. PA'lere ya da PA'lerin diamin öncüsü olan Put'e gereksinim duyan gen ekspresyonunu etkileyen birkaç spesifik mekanizma tanımlanmıştır. Spd'in ökaryotik translasyon inhibisyon faktör 5A'nın (eIF5A) post-translasyonel değişikliği için gerekli olduğunu kanıtlamışlardır (Park ve ark., 1997). Sonraki çalışmalarda, eIF5A'nın *S. cerevisiae* karşılığının bu mayada mutlaka gerekli bir gen olduğu (Schnier ve ark., 1991) ancak, genel protein sentezi için gerekmediği (Kang ve Hershey, 1994) gösterilmiştir.

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, insan kolon kanseri hücrelerinde DFMO uygulanmasının tight junction ve gap junction oluşumunu kodlayan birçok geni baskıladığı saptanmıştır. Tight junction proteinlerinin tümör baskılayıcılar olarak görev yaptıkları (Itoh ve Bissell, 2003), gap junction proteinlerinin ise karsinogenezde hücre iletişiminde rol oynadıkları düşünülmektedir (Trosko, 2003).

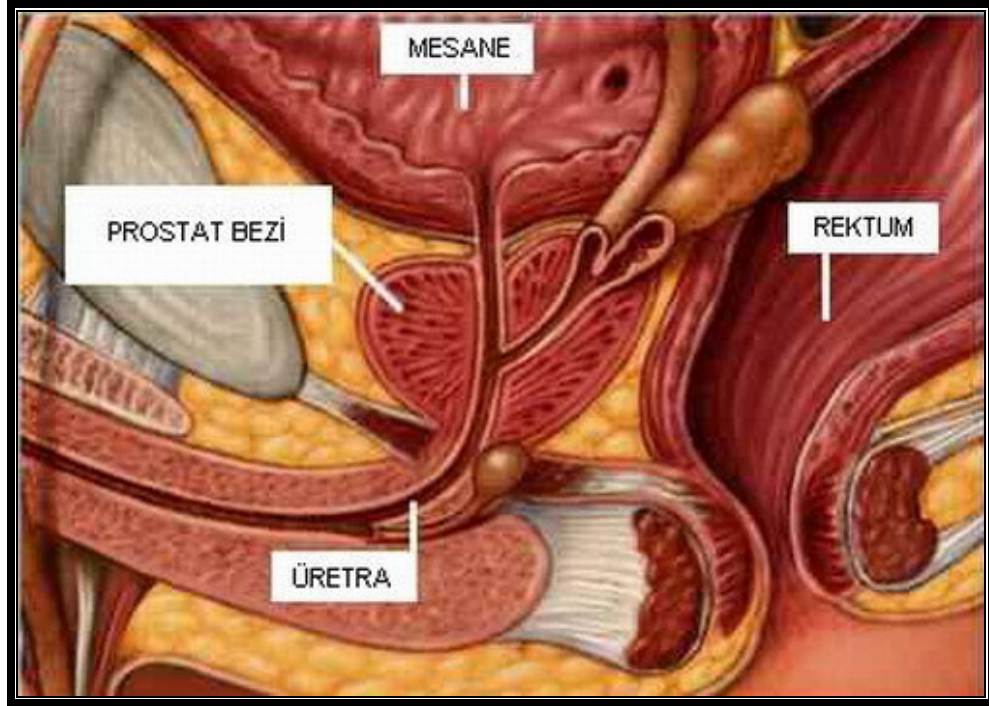
Bunun dışında PA'ler, apoptoz ve çoğalma gibi diğer kanser ilişkili fonksiyonlara da katkıda bulunurlar. Çok uzun zamandan beri PA düzeyinde meydana gelen artışın, hücre çoğalması ile alakalı olduğu bilinmekte ve son yapılan genetik çalışmalarda da bu

moleküllerin hem normal hem de neoplastik gelişimde önemli rollere sahip oldukları gösterilmiştir (Pegg, 2003).

2.5. POLİAMİNLER VE PROSTAT KANSERİ

2.5.1. Prostat Bezi ve Prostat Kanserinin Genel Görünüşü

Prostat kestane büyüklüğünde, leğen kemiğinin (pelvis) içinde, mesanenin çıkışında yer alan ve üretrayı çevreleyen bir bezdir (Şekil 2.8). Doğumda çok küçük olan bu bez, puberteden sonra erkeklik hormonu olan testosteronun miktarının yükselmesiyle birlikte büyür ve 20 cc lik bir hacime ulaşır. Diğer organlara göre küçük olmasına karşın, orta yaşlı erkeklerde muhtemel hastalıkların kaynağı olarak çok büyük bir önem taşımaktadır.



Şekil 2.8: Prostat bezi (www.aboutcancer.com).

Prostat bezi semenin sıvılaştırıcı maddesini üretir. Testislerde üretilen spermier prostatın arkasındaki seminal vesiküllerde depolanır. Burada sperm, jöle kıvamında bir ortam içerisindedir. Ejekulasyon sırasında prostat ve seminal vesiküllerin kasılması ile bunların içerikleri karışır. Prostat sıvısı yüksek oranda prostat spesifik antijen (PSA)

olarak bilinen maddeyi içerir. Bu madde önceden jelatinimsi halde bulunan sperm karışımını sıvılaştırır ve spermin yumurtayı döllemesi için serbestçe hareket etmesine yardımcı olur.

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücre büyümesini kontrol eden genlerde meydana gelen ileri derecedeki hatalardan kaynaklanır. Normalde hücreler vücut gerekli gördüğü zaman bölünürler ve bu işlem sıkı bir genetik kontrol içerisinde gerçekleşir. Bu genetik kontrol kaybolduğunda hücreler düzensiz bir şekilde bölünmeye başlar ve tümör oluşumuna doğru giderler. Oluşan bu tümörler habis veya selim olabilirler. Tümörün habis olması onun invazyon kapasitesine bağlıdır. Tümörün etrafını saran sağlıklı dokulara karşı olan invazyon kapasitesi nedeni ile kanser prostat etrafındaki bölgelere de yayılabilir. Tümör çok daha ilerlediği zaman metastaz olarak bilinen bir yolla daha uzak bölgelere de yayılabilir. Kanser hücreleri prostat tümöründen kopabilir ve kan ya da lenfatik sisteme girerek vücudun diğer bölgelerine (lenf nodülleri veya kemik gibi) transfer edilirler. Bu şekilde de çok daha tehlikeli olan sekonder tümörlerin gelişimleri başlar.

Prostat kanseri için en büyük risk faktörü yaş ile artmaktadır. 40 yaşın üzerindeki erkeklerde prostat kanseri oldukça sık rastlanan bir hastalıktır. Prostat kanseri için yaştan sonra gelen ikinci önemli risk faktörü aile geçmişidir. Göğüs kanseri gibi prostat kanserinde de bir erkeğin babasında, dedesinde veya amcasında geçmişte prostat kanseri görülmüş olması o erkek için prostat kanseri gelişimi riskini yükseltir (Kirby, 2002).

Eğer erken teşhis edilirse prostat kanserli hastaların % 90 ı cerrahi müdahale ile tedavi edilebilir. Bu nedenle günümüzde erken teşhisin önemi artmıştır. Ancak günümüzde, ne yazık ki ilerleyen prostat kanseri büyümesinde yüksek riske sahip hastaların teşhis edilebilmesi için gereken markırlar eksiktir.

Androjenler prostatın yapılanması ve fonksiyonlarını yerine getirebilmesi, ayrıca prostat hiperplazisi ve prostat kanserinin gelişimi için gereklidir. Erkeklerin büyük bir çoğunluğunda, hastalık daha prostat dışında yayılım göstermeden teşhis edilir. Bu hastalar er geç androjen eksiklik terapisine (cerrahi ya da medikal kastrasyon ile) ihtiyaç duyarlar. Androjen eksikliği, androjene bağımlı prostat kanseri hücrelerinde apoptoz

aktivitesini arttırır (Kyprianou ve ark., 1990) ancak ne yazık ki bu terapi az oranda tedavi edicidir. Androjen eksikliğinin başarısız olmasındaki başlıca sebep her bir hastanın kanser hücrelerinin hem androjene bağımlı ve hem de androjene bağımlı olmayan prostat kanseri hücrelerini iğermesi yani heterojen olmasıdır. Bu nedenle, androjene bağımlı olmayan prostat kanseri hücrelerinde terapi, kanser hücrelerini tamamen ortadan kaldırmak açısından gereklidir (Lepor ve ark., 1982).

2.5.2. Prostat Kanseri ve Poliamin

Prostat gibi erkek üreme organları Spm ve Spd bakımından oldukça zengindirler ve PA'ler de bu doku ve organların gelişiminde önemli rollere sahiptirler. Prostat hiperplazisi ve prostat kanserinde hücre PA düzeyi oldukça yükselir (Dunzerdorfer, 1985).

Günümüzde prostat ve prostatik salgılar PA'lerin fonksiyonlarını anlamamız açısından önemli rollere sahiptirler. İnsan ve sıçan prostatındaki epitel hücreler oldukça fazla miktarda PA üretirler. Sıçan prostat dokusu Spd, insan prostat dokusu ise Spm bakımından oldukça zengindir. PA'ler hücre çoğalması ve farklılaşması için vazgeçilmez olup, kanser terapisi için hedef olarak önemleri giderek artmaktadır. *İn vivo* ve *in vitro* olarak yapılan birçok çalışmada, PA homeostasisinin engellenmesinin prostat kanseri hücre hatlarının büyümesi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Prostat kanseri hücrelerinin PA metabolik enzim inhibitörleri ya da PA analogları ile tedavisi hücre büyümesinde durmayı ya da apoptotik hücre ölümünü teşvik eder. Herr ve Kleinert (1984a), sıçanlarda PA biyosentez inhibisyonunun prostatik tümör gelişimini azalttığını saptamışlardır.

Prostat dokusunda androjenler PA biyosentezini düzenlerler. Sıçan prostatında da Put ve Spd düzeyleri androjenler tarafından düzenlenir. Sıçanlarda prostatın kastrasyon sonucu gerilemesi ve testosteron ilavesi ile tekrar büyümesi üzerine yapılan çalışmalarda, prostatik PA'lerin androjen kontrolünde oldukları gösterilmiştir (Fjosne ve ark., 1990). Kastrasyon sonrası azalan Spm düzeyi, androjenin tekrar uygulanması ile tekrar normal haline geri döner. Sıçan prostatında androjenden sorumlu genin Spd sentazı kodladığı saptanmıştır. Prostatik epitel hücrelerinin kastrasyon ile meydana gelen apoptozda ODC aktivitesi ve PA düzeyi azalırken, SSAT aktivitesi artar. Androjen ilavesi ile prostatın

yeniden iyileştirilmesi ODC aktivitesinin artması ve PA konsantrasyonunun normal düzeye tekrardan çıkartılması ile aynı zamana rastlar (Wang ve ark., 1997).

Androjenler ile artan ODC aktivitesi ve ekspresyonu özellikle prostat epitel hücrelerinde yüksektir (Crozat ve ark., 1992a). ODC aktivitesinin DFMO ile inhibisyonu, prostat gelişimi sırasında bezin büyüklüğünü azaltır, kastre sıçanlarda prostatın testosteron ile tekrar büyümesini yavaşlatır ve prostatın insülin benzeri büyüme faktörü 1'in (IGF-1) arttırdığı büyümeyi inhibe eder (Torrington ve ark., 1997).

ODC insan prostatik sıvılarında, seminal plazmada ve spermde bulunmaktadır (Mohan ve ark., 1999). Prostatta ODC ve PA'lerin fonksiyonlarının hücresel çoğalma ve sekresyon aktivitesi ile ilişkili olduğu açıktır. Prostatik epitelin fonksiyonel sekresyonunun sürdürülmesinde Spm'in etkili olduğu varsayılmaktadır.

Seminal PA'lerin fonksiyonel önemi halen belirsizdir. Proton magnetik rezonans spektroskopisi (HMRS) ile yapılan çalışmalarda, insan prostatik sıvılarında Spm'in oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu saptanmıştır (Lynch ve Nicholson, 1997). Spm, akrozomun baş ve orta bölgelerinde lokalize olmuştur. Spm, sperm hücresinin fertilizasyon yeteneğini kazanmasında ve akrozom reaksiyonunun meydana gelmesinde görevlidir (Rubinstein ve Breitbart, 1994). Seminal PA'ler üriner sistemde bakteriyel gelişimi önlemek gibi farklı fonksiyonlara da sahiptir (Romijn ve ark., 1990). PA'lerin prostat büyümesi ve farklılaşmasındaki önemleri, araştırmaları prostat kanserinde ODC/PA sisteminin klinik ilişkisini değerlendirmek üzere yönlendirmektedir.

PA'ler hücre çoğalması için gereklidir. Tümör hücre gelişiminde PA havuzunun ve PA biyosentez enzimlerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, ODC'in bir protoonkogen olduğu varsayılmaktadır (Shantz ve ark., 1998). Bu nedenle, prostat dokusunda PA'lerin ve metabolik enzimlerinin görüntülenmesi prostat kanserinin teşhis ve tedavisinde çok önemli potansiyel hedefler olmuştur.

2.5.3. ODC ve Prostat Tümör Büyümesi

Sıçan prostat Dunning tümörleri üzerine yapılan çalışmalar, ODC aktivitesinin hızlı büyüyen alt kültürlerde oldukça yüksek olduğunu göstermiştir (Heston ve ark., 1982). Schipper ve arkadaşları (2000), yaptıkları çalışmalarda dört farklı insan prostatik hücre hattında (PC-3, TSU-pr1, DU-145 ve JCA-1) PA homeostasını araştırmışlar ve PC-3 ile TSU-pr1 hücrelerinin yüksek malignansi derecesine sahip olduklarını saptamışlardır. Özellikle bu habis hücre hatları, daha yüksek PA ve ODC düzeyine, düşük SSAT aktivitesine sahiptirler.

2.5.4. Sirküle Poliaminler ve Prostat Kanseri

PA'ler ya da PA'lerin asetile formları hücreler tarafından da salgılanabilirler. Bu sirküle PA'ler ve bunların asetile formları PA'lere ihtiyaç duyan hücreler tarafından alınıp tekrar kullanılabilirler. PA'lerin bir hücreden diğerine vücut sıvıları ile taşınması, anti-PA antikorları veya lipoproteinler gibi proteinler ya da periferik kan hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Moulinoux ve arkadaşlarına (1996), göre sirküle Spd ve Spm'in % 95 den fazlası kırmızı kan hücreleri ile taşınır. Bu hayvan deneylerinde ve hastalarda yapılan çalışmalarda, kırmızı kan hücrelerinin taşıdığı PA düzeyinin normal dokuların ve prostat kanseri gibi tümörlerin çoğalma durumunu yansıttığı saptanmıştır (Moulinoux ve ark., 1996).

2.5.5. Prostat Kanserinin Kemoterapisinde Poliamin Homeostası

Prostatik hücre gelişimi ve prostatik fonksiyon için PA'ler oldukça önemlidirler. Bu nedenle PA homeostasının engellenmesi prostat kanserinin kemoterapisi için umut verici bir hedef olabilir.

DFMO veya MGBG gibi bazı bileşikler PA biyosentez enzimlerinin etkisini inhibe edebilir. Bu bileşikler *in vitro* da tümör hücre gelişimini baskılayabildikleri halde anti-kanser ajanlar olarak *in vivo* koşullarda başarılı olamamışlardır (Marton ve Pegg, 1995). Bu bileşiklerin spesifite ve etkilerindeki yetersizliğin yanında, PA homeostası ile ilişkili PA biyosentez enzimlerinin hızlı bir şekilde yıkılması, inhibe olmayan PA enzimlerindeki artış, dışarıdan PA alınmasının artması ve tek bir inhibitörün üç tip PA'yi tüketmemesinden dolayı hücre içi PA havuzunun geriye dönmesi gibi diğer faktörler de bu durumdan sorumlu olabilirler.

Çeşitli PA analogları PA sentezini negatif yönde, PA katabolizmasını pozitif yönde düzenlerler ve biyosentez inhibitörleri ile karşılaştırıldıklarında doğal PA'lerde büyük bir tüketim meydana getirirler. Hem biyosentez inhibitörleri ve hem de PA analogları prostat kanser hücrelerine karşı potansiyel antitümör ajanlar olarak değerlendirilmektedirler.

2.6. POLİAMİN BİYOSENTEZ İNHİBİTÖRLERİ

DFMO, en çok çalışılmış ODC inhibitörüdür ve normalde Put ile Spd havuzunda tüketime sebep olurlar. PC-3 hücrelerinin DFMO ile kültüre edilmelerinden 24 saat sonra Put düzeyinde, 4 gün sonra ise Spd düzeyinde % 80-90 oranında bir azalma olduğu gözlenmiştir (Romijn, 1991). Prostat hiperplazisi ve neoplazisi için ameliyat olmuş hastalarda düşük dozda DFMO uygulaması, hastaların prostatlarındaki Put miktarında azalmaya neden olmuştur. Buna karşın, benzer hastalarda uygulanan DFMO tedavisi tüm PA havuzunda azalmaya sebep olmuştur (Meyskens ve ark., 1999).

Yapılan çalışmalarda, kültüre alınmış prostat kanseri hücrelerinde DFMO'in hücre büyümesi üzerine olan etkileri anlaşılmıştır (Heston ve ark., 1982). PC-3, PC-82 ve LNCaP hücrelerinde DFMO ile büyüme inhibisyonunun, PA ve bunların asetile türevlerinin dışarıdan eklenmesi ile tersine dönebildiği gözlenmiştir (Romijn ve ark., 1991). Büyüme üzerinde bu PA aracılığıyla meydana gelen geri dönüşün, prostat kanser hücrelerinin büyümelerinde Spd'in anahtar bir PA olabileceğini göstermiştir (Dunzendorfer ve ark., 1984).

SAMDC inhibitörü olan MGBG ile DFMO in birlikte uygulanması, Dunning R-3327G ve PC 82, PC 93 insan prostat kanseri hücre hatlarında DFMO'in *in vivo* anti-tümör etkilerinin arttığı saptanmış ancak bu iki inhibitörün kombine şekilde klinikte kullanılması bazı prostat kanserli hastalarda başarılı sonuçlar vermemiştir (Herr ve Kleinert, 1984b). ODC'in karsinogenezde oynadığı önemli rolün anlaşılması, DFMO'in olası kimyasal önleyici ajanlar olarak geliştirilmesindeki ilgiyi arttırmaktadır (Meyskens ve ark., 1999).

Son yıllarda geliştirilen ve bir SAMDC inhibitörü olan CGP-48664'ün ise birçok tümör modelinde etkili bir antitümör ajan olduğu kaydedilmiştir (Regenass ve ark., 1994). Yapılan çalışmalarda PC-3, LNCaP ve DU-145 hücrelerinin bu maddeye karşı hassas oldukları ve CGP-48664 ün hücre büyümesi üzerinde ve SAMDC aktivitesi üzerinde % 50 oranında inhibisyona, ODC aktivitesi üzerinde ise 3 kat yükselmeye sebep olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, Put havuzunda önemli ölçüde bir artış, Spm ve Spd düzeylerinde ise en az % 50 oranında azalma meydana geldiği belirlenmiştir.

Çeşitli hayvan tümör modellerinde ve bazı insan epidemiolojik çalışmalarında çay polifenollerinin kemoterapik aktiviteleri gösterilmiştir. Gupta ve arkadaşları (1999), LNCaP hücreleri ve sıçan ventral prostatının testosteron nedenli büyümesinde yeşil çay polifenollerinin ODC aktivitesini inhibe ettiklerini bulmuşlardır.

2.7. POLİAMİN ANALOGLARI

Günümüzde en çok ilgi çeken konu, tümör hücreleri için toksik ancak normal hücreler için toksik olmayan, sentetik, yapısal PA analoglarıdır (Kramer, 1996). Bu bileşikler PA biyosentez ve alımını engelleyip PA katabolizmasını hızlandırarak PA homeostasında rol oynarlar ve hücre sağkalımı için PA düzeyini yeterli miktarda tutarlar. Bununla birlikte, analogların sitotoksitesinin PA homeostasındaki rollerinden çok, hücre içi birikimleriyle daha iyi işbirliği içinde olduğu görülmüştür.

Son yıllarda PA'lerin yapısal analoglarının antineoplastik ajanlar olarak görev yapabildikleri gösterilmiştir. PA analogları geçici olarak hücre çoğalması için gerekli olan doğal PA'lerin yerine geçerek biyosentez enzimlerini negatif yönde düzenlerler, hücre içi PA düzeyini düşürürler ve hücre büyümesini inhibe ederler. Bu zamana kadar sentez edilen analoglar içerisinde hücre gelişiminin inhibisyonunda en çok Spm'in bis(etil) analoglarının etkili olduğu saptanmıştır. Bu bileşiklerin hücre büyümesinin durdurulması üzerine olan etkileri büyük ve küçük hücreli akciğer kanserleri, fare ve insan melanoma hücre hatları, insan prostat kanseri, insan kolon kanseri, insan beyin tümör hücre hatları, meme kanserleri ve mesane hücre hatlarında gösterilmiştir (Marton ve Pegg, 1995). Hücreler ODC ve SAMDC aktivitelerinde inhibisyon, doğal PA

havuzlarındaki tüketim ve SSAT aktivitelerinde artış meydana getirerek bu bileşiklere cevap oluştururlar.

Son yıllarda, bazı analogların sitotoksitesilerini apoptotik hücre ölümünü tetikleyerek gerçekleştirdikleri görülmüştür. İnsan meme ve akciğer kanseri hücrelerinin alkali PA analogları olan BESpm (N¹,N¹²-bis(etil)spermin) ve CPENSpm (N¹-etil-N¹¹-[(siklopropil)-metil]-4,8-diaza-andekan) muamelesi sonucu hücrelerde DNA fragmentasyonunun görüldüğü ve apoptozun meydana geldiği saptanmıştır. Diğer bir analog olan CHENSpm (N¹-etil-N¹¹-[(sikloheptil)-metil]-4,8-diaza-andekan) nin ise NCIH157 hücrelerinde sitokrom c'nin serbest kaldığı, mitokondriyal membran potansiyelinin azaldığı, kaspaz-3 aktivasyonunun olduğu, DNA ve nuklear fragmentasyon meydana gelerek apoptozun arttığı ve ayrıca G2M evresinde tutulmanın meydana geldiği saptanmıştır. Bir proto-onkogen olan *bcl-2*'nin fazla ekspresyonu, sitokrom c'nin serbestlenmesini kaspaz-3 aktivasyonunu tamamen durdurur. En yaygın Spm analogu olan BIS (1,12-diaziridinil-4,9-diazadodekan) in PC-3 ve DU-145 insan prostat kanseri hücre hatlarında apoptozu uyardığı saptanmıştır (Eiseman ve ark., 1998).

Prostat kanseri hücre modelleri üzerinde yapılan bazı çalışmalar, PA analoglarının sitotoksitesini açık bir apoptoz meydana getirmeksizin göstermiştir. BE-4-4-4-4 (1,9-bis(etilamino)-5,10,15-triazanodekan) ve BENSpm (bis(etil)norspermin veya BE-3-3-3 veya DENSPm), AT-3.1, AT-6, DU-145 prostat kanseri hücrelerinde *in vitro* koşullarda çalışılmıştır. (Zagaja ve ark., 1998) ve her iki analogun da apoptotik yolu aktive etmeden sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Mi ve arkadaşları (1998), LNCap, DU-145 ve PC-3 hücrelerinde BE-3-3-3'ün büyüme üzerine olan etkilerini araştırmışlar ve analoglar ile hücre büyümesi grafiği baz alınarak apoptoza ait herhangi bir kanıt bulamamışlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda BENSpm'in JCA-1, TSU-pr1, PC-3 ve DU-145 hücrelerine olan etkisi araştırılmış ve hem *in vitro* ve hem de *in vivo* koşullarda tümör gelişimini engellediği ancak apoptozu uyarmadığı gösterilmiştir (Schipper ve ark, 2000).

PA analogları PA homeostasını kontrol eden düzenleyici mekanizmaları araştırmak üzere geliştirilmişlerdir. Bu bileşikler biyosentez enzimlerini negatif yönde düzenler, hücre içi PA havuzunu tktir ve hücre büyümesini inhibe ederler. *n vitro* ve *in vivo* alışmalar, PA analoglarının birçok insan solid tümör modellerinde önemli anti-tümör aktivitelere sahip olduklarını göstermektedir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 : Poliamin analogları (Schipper ve ark., 2000).

Poliamin analog	Hedef	Apoptoz	öneren kişiler
BE-3-3-3	Poliamin homeostası ve fonksiyonları	Azalma	(Schipper ve ark., 1995)
BE-3-4-3, CPENSpm	Poliamin homeostası ve fonksiyonları	Teşvik	(McCloskey ve ark., 1996)
BE-3-3-3, BE-3-4-3, BE-3-7-3, BE-4-4-4, BE-4-4-4-4	Poliamin homeostası ve fonksiyonları	Teşvik	(Hu ve Pegg, 1997)
BE-3-3-3, BE-3-4-3	Poliamin homeostası ve fonksiyonları	Teşvik	(Kramer ve ark., 1997)
BE-3-3-3	Poliamin homeostası ve fonksiyonları	Artma	(Penning ve ark., 1998)
BIS	Poliamin homeostası ve fonksiyonları	Teşvik	(Eiseman ve ark., 1998)

BE-3-3-3, N¹,N¹¹-bis(etil)norspermin; BE-3-4-3, N¹,N¹²-bis(etil)spermin; BE-3-7-3, N,N¹-bis[3-(etilamino)-propil-1,7-heptan diamin]; BE-4-4-4-4, 3,8,13,18,tetra azaeikozan; BE-4-4-4-4, 1,19-bis(etilamino)-5,10,15-triazanoadekan; BIS, 1,12-diaziridinil-4,9-diazadodekan

Sistemik Put prostat bezinden alınır ve bu alım DFMO aracılığı ile hızlandırılır. Bu nedenle Put analogları özellikle DFMO ile birlikte uygulandıklarında kemoterapötik potansiyele sahip olabilirler. AZP test edilen ilk analogdur ve PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde büyümeyi inhibe ettikleri saptanmıştır. Ayrıca bu maddenin DFMO ile birlikte uygulanması büyüme üzerindeki bu inhibitör etkiyi daha da arttırır (Heston ve ark., 1987).

Spm'in bis(etil) analogları ve daha küçük boyuttaki Spd'lerin hücre büyümesinde oldukça etkili inhibitörler oldukları saptanmıştır (Kramer, 1996). Günümüzde bu analogların bazıları (BE-3-3-3 v.b) klinik olarak kullanılmaktadır. BE-3-3-3, çeşitli sıçan ve insan prostat kanseri hücre hatlarında test edilmiştir (McCloskey ve ark., 2000).

BE-3-3-3 ile yapılan çalışmalar, analogların hücre içi birikimini ve PA biyosentezinin negatif yönde düzenlenmesi, SSAT'ın artması ve PA düzeyinde azalma gibi çeşitli düzenleyici cevapların oluştuğunu göstermiştir. Çoğunlukla hücre büyümesinin inhibisyonu ile SSAT'ın artması arasında pozitif yönde bir korelasyon vardır (Mi ve ark., 1998).

BE-3-3-3 ile karşılaştırıldığında BE-4-4-4-4, kültüre edilmiş DU-145, Tsu-Pr-1 ve DuPro-1 hücrelerinin büyümelerini inhibe etmede çok daha etkilidir (Zagaja ve ark., 1998) (Tablo 2.1). Jeffers ve arkadaşları (1997), yaptıkları bir çalışmada diğer bir analog olan BE-3-7-3'ün diğer iki analog gibi DU-145, LNCaP ve PC-3 hücrelerinde *in vitro* olarak büyümeyi inhibe ettiğini saptamışlardır. BE-4-4-4-4 ayrıca *in vivo* olarak da çalışılmış, tümör gelişiminin inhibe olduğu, Spd ve Spm düzeylerinin azaldığı saptanmıştır. *In vivo* şartlarda PA tüketimindeki eksikliğin nedeni bağırsak sisteminden PA'lerin geri alınması ile açıklanabilir, bu veri, PA analoglarının hücre büyümesinde rol aldıklarını desteklemektedir.

Diğer PA analogları, CPE-3-3-3 ve CHE-3-3-3'ün etkileri, DU-145, LNCaP ve PC-3 hücrelerinde araştırılmış ve her iki analogun da hücre büyümesini inhibe ettikleri saptanmıştır (McCloskey ve ark., 2000). CPE-3-3-3, önemli ölçüde hücre içi Spd ve Spm düzeylerinde azalmaya neden olur ve SSAT aktivitesini tetikler. Bununla birlikte, her iki analogun SAMDC aktivitesine herhangi bir etkisi saptanmamıştır.

Son zamanlarda yeni bir Spm analogu, BIS, keşfedilmiş, hem *in vitro* ve hem de *in vivo* şartlarda DU-145 ve PC-3 hücrelerinin büyümesi üzerinde test edilmiştir (Eiseman ve ark., 1998). Yapılan *in vitro* deneylerde BIS'in, prostat kanseri hücrelerinde doza bağlı olarak sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

2.7.1. Poliamin Analoglarının Mekanizması

PA analoglarının mekanizma şekilleri tam olarak anlaşılamamış olsa da, fonksiyonların yerine gelmesini engelleyen hücre solunumu ve kromatin ile etkileşimin inhibisyonunun analoglar için muhtemel mekanizmalar olabileceği saptanmıştır. Doğrudan ya da dolaylı olarak hücrelerin kimyasallara karşı olan hassasiyeti ile ilişkili olan SSAT'ın artması potansiyel kemoterapötik yararlar saha sahiptir. SSAT artması ile hücre büyümesinin

inhibisyonu mekanizmaları üzerine yapılan bir çok çalışmada, salgılama ya da katabolizmadaki artışın hücre içi PA havuzunu hızlı bir şekilde tüketebileceği ve PA asetilasyonunun PA'lerin pozitif yüklerini azaltarak DNA gibi negatif yüklü makromoleküllere bağlanma yeteneklerini zayıflatabileceği saptanmıştır (McCloskey ve ark., 2000).

Bazı araştırma grupları hücre ölüm mekanizmalarının PA analoglarını teşvik ettiklerini ve bazı analogların sitotoksitelerinin bunların apoptotik hücre ölümünü tetikleme yeteneklerine bağlı olduğunu saptamışlardır. İnsan meme ve akciğer kanseri hücre hatlarında, BE-3-4-3 ve CPE-3-3-3'ün DNA fragmentasyonu ile apoptozu meydana getirdiği kaydedilmiştir (McCloskey ve ark., 1995). CPE-3-3-3 ve CHE-3-3-3'ün ise prostat kanseri hücrelerinde apoptozun etkili tetikleyicileri oldukları bulunmuştur (McCloskey ve ark., 2000). Ayrıca BIS'in yine insan prostat kanseri hücre hatlarında apoptozu teşvik ettikleri saptanmıştır (Eiseman ve ark., 1998).

Yapılan bir çok çalışmada B-4-4-4 ve BE-3-3-3'ün LNCaP hücrelerinde apoptoz meydana getirmeden sitotoksik etki gösterdikleri bulunmuştur. Ayrıca uzun süreli BE-3-3-3 uygulanmış LNCaP hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün uyarıldığı saptanmıştır (McCloskey ve ark., 2000).

3. AMAÇ

Bu araştırmanın ilk amacı, Palacky Üniversitesi laboratuvarlarında Strnad ve arkadaşları tarafından yeni sentezlenen hücre devrinin kontrolünde en önemli moleküllerden biri olan sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü bohemininin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) ve metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında hücre çoğalmasına etkilerini belirledikten sonra total protein düzeyine etkilerini saptamaktır.

Çalışmanın ikinci amacı ise, elde edilen verilere dayanılarak yukarıda belirtilen sıçan prostat kanseri hücre hatlarında poliaminlerin tanı ve tedavi amaçlı biyomarkırlar olarak kullanılabilirliklerini ortaya koyabilmektir.

Araştırmanın üçüncü aşamasında öncelikle birinci ve ikinci evrede elde edilen verilerden yola çıkılarak PA biyosentezinin anahtar enzimi ODC'ın mRNA ekspresyon düzeyini belirlemektir. Daha önce de belirtildiği gibi apoptozun kanser ve PA metabolizmasında önemli rolüne dayanarak proapoptotik Bax proteininin ekspresyon düzeylerini saptamak bu çalışmanın bir diğer amacını teşkil etmektedir. Böylelikle farklı metastatik özellik gösteren prostat kanseri hücre hatlarında PA'lerin biyomarkır olabilirliklerini ortaya koyarken aynı zamanda bu veriyi apoptotik parametre Bax tayini ile güçlendirmek istendi.

4. MALZEME VE YÖNTEM

4.1. ARAŞTIRMA MATERYALİ

Bu çalışmada materyal olarak metastaz yapma eğilimi az (AT-2) ve metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları Imperial College of Science, Technology and Medicine, Department of Biological Sciences-Londra'dan temin edildi.

4.2. ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Araştırma, 4 grup şeklinde yürütüldü. 1. ve 3. gruptaki hücreler aromatik bir sitokin analogu ve CDK inhibitörü olan 15 μ M BOH ilave edilmiş besi yeri (L-glutaminli RPMI 1640) ile, 2. ve 4. gruptaki hücreler ise kontrol grubu olarak sadece besiyeri ile muamele edildiler. Araştırma düzeni Tablo 4.1 de özetlenmiştir.

Tablo 4.1: Araştırma düzeni.

Gruplar	Uygulama	Uygulanan çözelti	Uygulama Süresi (saat)
AT-2 BOH (Grup 1)	Bohemin	RPMI 1640 + 15 μ M BOH	24, 48, 72
AT-2 Kontrol (Grup 2)	-	RPMI 1640 + DMSO	24, 48, 72
MAT-Lylu BOH (Grup 3)	Bohemin	RPMI 1640 + 15 μ M BOH	24, 48, 72
MAT-Lylu Kontrol (Grup 4)	-	RPMI 1640 + DMSO	24, 48, 72

4.2.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Yöntemler

4.2.1.1. Hücre Serilerinin Açılması

Kuru buz içerisinde özel donma besiyerinde getirilen hücreler 37 C°'de 5 dakika boyunca CO₂ li etüvde tutularak hızlı çözme prosedürü uygulandı. Çözülmüş hücreler daha sonra aseptik koşullar altında steril santrifüj tüplerine alındı, üzerlerine 1-2 ml taze besiyeri eklendi. Hücreler santrifüj tüplerine aktarıldı ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi ve supernatant atıldı. Bu şekilde, hücre kaybına uğranmaması amacı ile hücre içerisindeki suyun donma sırasında kristalize olmasını engelleyen DMSO hücrelerden uzaklaştırılmış oldu.

4.2.1.2. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Kültür ortamı olarak kullanılan besiyeri, L-glutaminli RPMI 1640 (Biological Industries), % 5 FCS (Biological Industries) ve % 1 penisilin/streptomisin (Biological Industries) ilave edilerek steril kabin içerisinde hazırlandı.

BOH'in etkili konsantrasyonunun belirlenmesi için hücreler 12 kuyucuklu kültür kaplarında 10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde 1 ml'lik kültür ortamına ekildi, % 5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlanmış etüvde 24 saat inkübe edildi. Ekimi takip eden ilk 24 saatin sonunda 1. ve 3. gruptaki hücrelerin kültür ortamlarına milipor filtreden süzülerek steril edilmiş BOH çözeltisi, kültür ortamının son konsantrasyonu 10, 15, 20, 30 µM olacak şekilde ilave edildi. Bütün deney grupları 24, 48 ve 72 saat boyunca, % 5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlanmış etüvde inkübe edildiler.

Diğer deneylerin kurulması sırasında hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarında 10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde 3 ml'lik kültür ortamına ekildi, % 5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlanmış etüvde 24 saat inkübe edildi. Ekimi takip eden ilk 24 saatin sonunda 1. ve 3. gruptaki hücrelerin kültür ortamlarına DMSO içerisinde çözünmüş ve milipor filtreden süzülerek steril edilmiş olan BOH çözeltisi, kültür ortamının son konsantrasyonu 15 µM olacak şekilde ilave edildi. Bütün deney grupları, 24 ve 48 saat boyunca, % 5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlanmış etüvde inkübe edildiler.

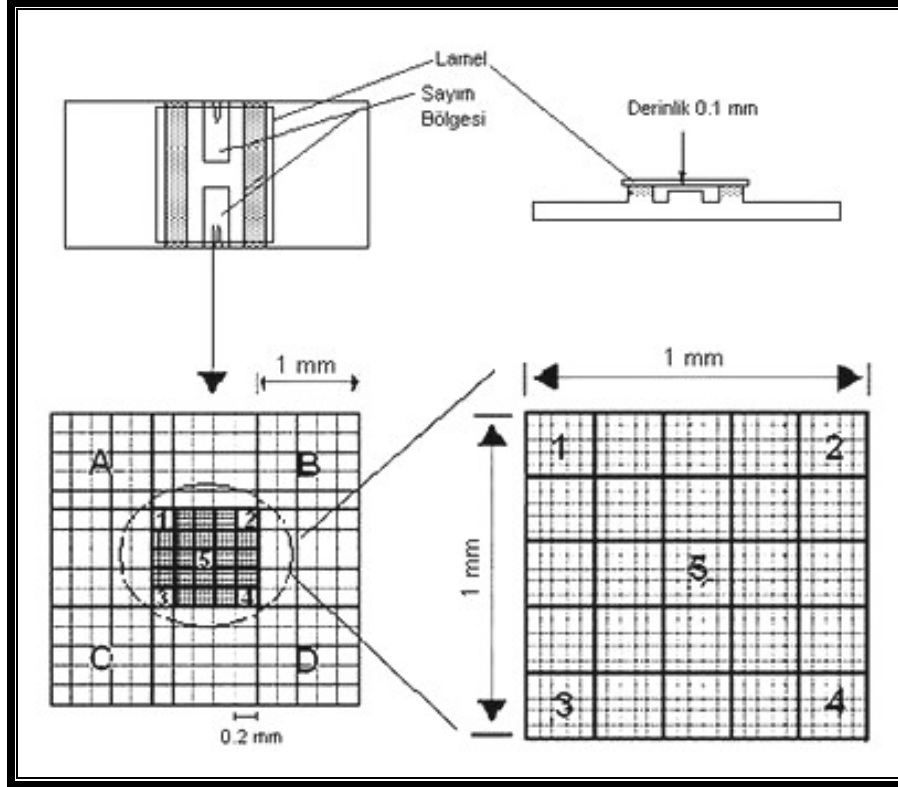
4.2.1.3. Hücrelerin Kaldırılması

Herbir gruptaki inkübasyon süresi dolmuş olan hücrelerden, steril koşullar altında, kültür ortamları uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa daha önceden 37 C°'lik su banyosunda ısıtılmış tripsin-EDTA (Biological Industries) dan 3-4 ml eklendi ve hücrelerin kalkması için tüm kültür kapları 37 C°'lik etüvde 3 dakika boyunca inkübe edildi. Süre dolduktan sonra hücrelerin zarar görmesini önlemek amacıyla, herbir kuyucuğa tripsin-EDTA aktivitesini durdurmak üzere 1-2 ml taze besiyeri eklendi ve tüm hücrelerin kalkması sağlandı. Hücre süspansiyonları steril falkonlar içerisine alındı ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifujlendi. Pelletler üzerine 1 er ml taze besi yeri konularak hücreler sayım işlemi için hazır hale getirildi.

4.2.2. Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Eppendorf tüp içerisinde 100 µl hücre süspansiyonu üzerine 100 µl % 0.4 Tripan Blue (Sigma) eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra pastör pipeti yardımı ile süspansiyon çözeltiden bir miktar hemositometrenin kanallarına aktarıldı. Hemositometrenin üzeri lamel ile kapatıldı. Şekil 4.1'de görülen 1, 2, 3, 4, 5 numaralı bölgeler üzerindeki tüm hücreler sayıldı. Bir bölgedeki hücre sayısını bulmak için bulunan sayının ortalaması alınıp, 25 ile çarpıldı. 25 kareden oluşan bölgenin hacmi 10^4 mm^3 olduğu için toplam hücre sayısı 10^4 ile çarpıldı (Şekil 4.1).

Hücre sayısı (1 ml için) = Toplam hücre sayısı x Sulandırma Faktörü x 10⁴



Şekil 4.1: Hemositometre (www.ruf.rice.edu).

Ölü olan hücreler zarlarında meydana gelen porlar sayesinde Trypan Blue boyar maddesini emdiler ve dolayısı ile lacivert-mavi renkli hücreler olarak görüldüler. Sonuçta ölü ve canlı tüm hücrelerin sayısı belirlendi ve canlı hücrelerin sayısı ile oranlanarak canlı hücre yüzdesi bulundu.

Canlı Hücre Yüzdesi = (Canlı Hücre Sayısı/Toplam Hücre Sayısı) x 100

4.2.3. Poliamin Miktar Tayini

4.2.3.1. Hücre Ekstraksiyonu

10⁶/ml hücre, pH 7.4 fosfat tamponu (PBS) ile iki kere yıkandı. Pellet üzerine 100 µl % 50 trikloroasetik asit (TCA) eklendi ve eşit sürelerde karıştırılarak hücrelerin iyice parçalanmaları sağlandı. 11 000 rpm'de, 4 C°'de, 30 dakika santrifüj edilerek protein ve hücre atıklarının dibe çökmeleri sağlandı. Üst sıvı yeni Eppendorf tüplere alındı ve üzerlerine 50 µl, 1 mM internal standart (1,7-diaminoheptan-DAH) eklenerek -20 C°'de saklandı (Morgan, 1998).

4.2.3.2. Poliamin Standartlarının Hazırlanması

Standart olarak 1 mM Put, 1 mM Spd, 1 mM Spm ve her üç PA'in karışımı olarak hazırlanan karışım çözeltisi kullanıldı. Kör olarak 0.01 N HCl ve DAH standartı için 1 mM DAH hazırlandı. Herbir PA standartı, 50 µl (50 nmol) PA, 50 µl DAH ve 450 µl 0.01 N HCl ile hazırlandı (Morgan, 1998).

4.2.3.3. Benzoilasyon İşlemi

Hücre ekstraksiyonu sonucu elde edilen üst sıvılardan ve hazırlanan standartlardan 500 µl cam tüplere aktarıldı. Her tüpe 1000 µl, 2 N NaOH ve 10 µl benzoil klorid (BC) eklendikten sonra tüplerin ağızları sıkıca kapatılarak 10 saniye süreyle karıştırıldı. 20 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra her bir tüpe 2 ml doymuş NaCl eklendikten sonra iki kere daha 10'ar saniye karıştırıldı. Örneklerin üzerine 2 ml dietileter eklendi ve tekrar 10 saniye karıştırıldı. Tüpler fazların ayrılması için 2 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Üst kısımdaki, içerisinde PA'lerin bulunduğu dietileter fraksiyonundan alttaki faza değmeden 500 µl alınarak yeni Eppendorf tüplere aktarıldı. Tüplerin kapakları açık bırakılarak dietileterin buharlaşması sağlandı ve daha sonra tüplerin ağızları kapatılarak -20 C°'de HPLC analizine kadar saklandı (Morgan, 1998).

4.2.3.4. HPLC Kolonunun Standardizasyonu

HPLC kolonu (Macherey-Nagel GmbH) nucleosil 100-5 C18, partikül büyüklüğü 5 µm, uzunluğu 250 mm, çapı 4.6 µm özelliklerine sahip olacak şekilde seçilmiştir. HPLC detektörü (Waters 486 Tunable Absorbance Detector) 254 nm'ye ayarlandı ve akış hızı 1 ml/dakikaya gelene kadar hareketli faz olan gazı çıkartılmış metanol-su karışımından (60:40) geçirildi. Sapma değeri 0.1 absorbans birimi olarak kabul edildi. Herbir PA standartı için 10, 20 ve 50 µl, pik noktalarının belirlenmesi için enjekte edildi. Her

kromatogram 25 dakika yürütüldü. Son pikten sonra hareketli faz pompalanarak kolonun dengesi sağlandı. Herbir standartın çıkış zamanı ve alanı kaydedildi (Morgan 1998).

4.2.3.5. HPLC Analizi

Her bir analiz için çalışma standardı enjekte edildi. Örnekler 100 µl mobil fazda çözündürüldü. Kromatogramın güvenilirliği kontrol edildikten sonra örneklerden 10-25-50 µl olacak şekilde ilk örnek enjekte edilerek en uygun sonucun alındığı hacim tespit edildi. Her 5 örnekte bir standart karışım yürütüldü. Çalışma bittikten sonra kolonun temizlenmesi için mobil faz bütün gece pompalandı. Her bir grup için üç farklı örnek hazırlandı ve her örnek için de ikişer ölçüm yapıldı (Morgan, 1998).

4.2.4. Total Protein Miktar Tayini

4.2.4.1. Hücre Ekstraksiyonu

Besiyerleri, 3 dakika boyunca 1500 rpm'de santrifüj edilmek suretiyle uzaklaştırılmış olan 10^6 /ml hücre, pH 7,4 PBS ile üç kere yıkandı. Pellet üzerine 1 ml ekstraksiyon tamponu (Tablo 4.2) eklendi ve eşit sürelerde karıştırılarak hücrelerin iyice parçalanmaları sağlandı. 11 000 rpm'de, 4 C°'de, 30 dakika santrifüj edilerek protein ve hücre atıklarının dibe çökmeleri sağlandı. Üst sıvı yeni Eppendorf tüplere alındı ve -20 C°'de saklandı (Haidar ve ark., 1997).

Tablo 4.2: Total protein miktar tayini için hücre ekstraksiyon tamponu (Haidar ve ark., 1997).

Maddenin adı	Konsantrasyon
Tris HCl	20 mM, pH 7.2
NaCl	0.1 mM
PMSF	1 mM
Triton X-100	% 0.1
Aprotinin	% 0.1
Leupeptin	% 0.1
Pepsitanin	% 0.1
Distile su	100 ml

4.2.4.2. Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Protein içeriğinin belirlenebilmesi için Bradford'un (1976) keşfettiği ve kendi ismiyle anılan Bradford total protein tayini yöntemi kullanılmıştır. Standart eğri olarak BSA'dan (1 mg/ml) 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4 ve 1.6 ml lik hacimler, örneklerden ise 0.5 ml alındı ve pH 6 PBS ile 2 ml'ye tamamlandı. Kör olarak 0.5 ml ekstraksiyon tamponu kullanıldı. Her tüpe 1.5 ml Bradford ayırıcı (Tablo 4.3) eklenip iyice karıştırıldı. 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra 595 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Standart eğriden yararlanılarak absorbans değerlerine karşılık gelen protein miktarları belirlendi. Her bir grup için üç farklı örnek hazırlandı ve her örnek için ikişer ölçüm yapıldı.

Tablo 4.3: Bradford ayırıcı (Bradford, 1976).

Maddenin adı	Miktarı
Coumassie Brilliant Blue	25 mg
Etil alkol (% 95 lik)	12.5 ml
H ₃ PO ₄ (% 85 lik)	25 ml
Distile su	212.5 ml

4.2.5. RNA Analizi

4.2.5.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Hücreler 25 cm² lik filtrelili kültür kaplarına 2x10⁷ hücre/kültür kabı olacak şekilde 5 ml'lik kültür ortamına ekildi, % 5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlanmış etüvde 24 saat boyunca inkübe edildi. Ekimi takip eden ilk 24 saatin sonunda 2. ve 4. gruptaki hücrelerin (Tablo 4.1) kültür ortamlarına DMSO içerisinde çözülmüş ve milipor filtreden süzülerek steril edilmiş olan BOH çözeltisi, kültür ortamının son konsantrasyonu 15 µM olacak şekilde ilave edildi. Bütün deney grupları, 48 saat süre ile, % 5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlanmış etüvde inkübe edildiler, kontrol gruplarına ise sadece DMSO eklendi.

4.2.5.2. RNA İzolasyonu

Herbir kültür kabındaki besiyeri hücreler üzerinden uzaklaştırıldı. Her kültür kabı içerisine az miktarda PBS konularak üç kere yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından, hücreler üzerine 1 ml PBS eklendi ve kazıyıcı yardımı ile yüzeyden kazınarak elde edilen hücre süspansiyonları Eppendorf tüplere aktarıldı. 3000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildikten sonra pellet üzerine 500 µl, soğuk lizis tamponu (Tablo 4.4) eklendi ve hücreler buz üzerinde 5 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonu ardışık hücreler sonikatörde, 6 devirde 20 saniye boyunca parçalandılar. 2 dakika, 4 C°'de santrifüj edildikten sonra tüplerdeki üst sıvı 4 µl, % 20 lik SDS içeren temiz Eppendorf tüplere alındı ve iyice karıştırıldı. Üzerlerine 2.5 µl, 20 mg/ml proteinaz K eklenerek 15 dakika boyunca 37 C°'de inkübe edildi. İnkübasyonu takiben herbir tüpe 400 µl, 25:24:1 oranında fenol/kloroform/izoamil alkol karışımı eklendi ve en az 1 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde karıştırıldı. Oda sıcaklığında, 8 dakika süresince, 6000 rpm'de santrifüj edildikten sonra tüplerdeki sulu üst kısım yeni Eppendorf tüplere aktarıldı ve üzerlerine 400 µl, 25:24:1 oranında fenol/kloroform/izoamil alkol karışımı eklenerek ekstraksiyon işlemi tekrarlandı. Üst kısım yeni Eppendorf tüplere aktarıldı ve üzerine 400 µl, 24:1 oranında kloroform/izoamil alkol karışımı eklenerek 15-30 saniye boyunca karıştırıldı. 1 dakika boyunca, oda sıcaklığında, 6000 rpm'de santrifüj edildikten sonra sulu üst kısımlar temiz Eppendorf tüplere aktarıldı. Herbir tüpe 40 µl, 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ve 1 ml % 100 lük etil alkol eklendi. Tüpler alt üst edilerek karıştırıldı ve 15-30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildiler. İnkübasyon sonucunda 11 000 rpm'de, 4 C°'de santrifüj edilerek RNA elde edildi. Pellet üzerine 1 ml, % 75 lik etil alkol/ % 25 lik 0.1 M sodyum asetat (pH 5.2) karışımı eklendi ve 11 000 rpm'de, 20 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırılarak herbir tüpteki RNA 100 µl DEPC'li suda süspansiyon edildi. RNA örnekleri kullanılacağı zamana kadar -20 C°'ye ayarlı derin dondurucuda saklandı (Coligan ve ark., 1997).

Tablo 4.4: Lizis tamponu (Coligan ve ark., 1997).

Kimyasalın adı	Miktarı
Tris.Cl	50 mM, pH 8.0
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
Nonidet P-40	% 0.5 (v/v)
DEPC li su	100 ml

4.2.5.3. RNA Miktar Tayini ve Hesaplanması

Herbir RNA örneğinden 10 µl alınarak 1 ml DEPC'li su ile sulandırıldıktan sonra spektrofotometrede, 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri okundu (Coligan ve ark., 1997).

4.2.5.4. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Bu işlem için Qiagen firmasının One Step RT-PZR Kiti kullanıldı. Herbir PZR tüpüne buz üzerinde önce 13 µl master karışımı kondu (Tablo 4.5). Daha sonra tüplere *ODC* veya *Bax*'ın hem 1 µl yukarı ve hem de 1 µl aşağı oligonükleotid primerleri eklendi. Son olarak 48 saat süresince 15 µM BOH uygulanmış (uygulama) ve 15 µM BOH uygulanmamış (kontrol) kültür hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinden 5 µl, negatif kontrol olarak RNase'dan arındırılmış su ve pozitif kontrol olarak da GADPH eklendi. Tüpler iyice karıştırılıp santrifüj edildikten sonra önceden programlanmış (Tablo 4.6) olan ve PZR reaksiyonlarının gerçekleşeceği PZR cihazına yerleştirildi (Mimori ve ark., 1997).

Tablo 4.5: RT-PZR master karışımı (Mimori ve ark., 1997).

Kimyasalın adı	Son konsantrasyonu	Miktarı/tüp
RNAse dan arındırılmış su	-	8 µl
PZR tampon (5X)	1X	4 µl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (10 mM)	400 µM	0.5 µl
Enzim karışımı (Taq polimeraz + reverse transkriptaz)	5-10 U/reaksiyon	0.5 µl

Tablo 4.6: PZR aleti sıcaklık bilgileri.

İlk sıcaklık	50 C°	30 dakika
Amplifikasyon	95 C°	15 dakika
1. adım	94 C°	1 dakika
2. adım	54 C°	1 dakika
3. adım	72 C°	1 dakika
Devir sayısı	25	

4.2.5.5. Elektroforez İşlemi

Kullanılacak jelin büyüklüğüne göre tartılan agaroz (% 0,2 lik) Tris-asetat tamponu (TAE) (Tablo 4.7) içerisinde mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözdürüldü. Elle tutulabilecek sıcaklığa (50 C°) düştüğünde 0.5 µg/ml etidyum bromür ilave edildi ve jel tepsisine döküldü. Cepleri oluşturacak olan tarak yerleştirilerek jelin donması bekledi. Jel donduktan sonra tarak dikkatli bir şekilde alındı ve jel elektroforez tankına geçirildi. PZR örnekleri ve DNA markırın üzerlerine 1/6 hacimde olacak şekilde yükleme tamponu (Tablo 4.8) eklendi. Tüm sıvı mikropipet yardımı ile jeldeki kuyucuklara yüklendi. 5 V/cm olacak şekilde akım geçirildi. Sürenin sonunda jel, transilüminatör üzerine alındı ve ~ 304 nm dalga boyundaki UV ışığı altında incelendi (Sambrook ve ark., 1989).

Tablo: 4.7: TAE tamponu pH 8.0, (50x/litre) (Sambrook ve ark., 1989).

Kimyasalın adı	Miktarı
Trizma-Base	242 g
Glasiyal asetik asit	57.1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml

Tablo 4.8: DNA yükleme tamponu (Sambrook ve ark., 1989).

Kimyasalın adı	Miktarı
Üre	4 M
EDTA	0.025 M
Sukroz	% 60
Bromofenol mavisi	% 0.025
Ksilen	% 0.025

4.3. KÜLTÜRDEKİ HÜCRELERİN FOTOĞRAFLARININ ÇEKİLMESİ

6 kuyucuklu kültür kaplarında 10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 3 ml'lik kültür ortamına ekilip, % 5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlanmış etüvde ilk 24 saatlik inkübasyonları tamamlanmış olan hücrelerden 1. ve 3. gruptakilerin (Tablo 4.1) kültür ortamlarına DMSO içerisinde çözülmüş ve milipor filtreden süzülerek steril edilmiş olan BOH çözeltisi, kültür ortamının son konsantrasyonu 15 µM olacak şekilde ilave edildi. Bütün deney grupları, 24 ve 48 saat boyunca, % 5 CO₂ ve 37 C°'ye ayarlanmış etüvde tekrar inkübe edildiler.

Uygulama süreleri dolmuş olan hücrelerin fotoğrafları invert mikroskop altında Flex Vision TFV-300 kamera ile çekildi.

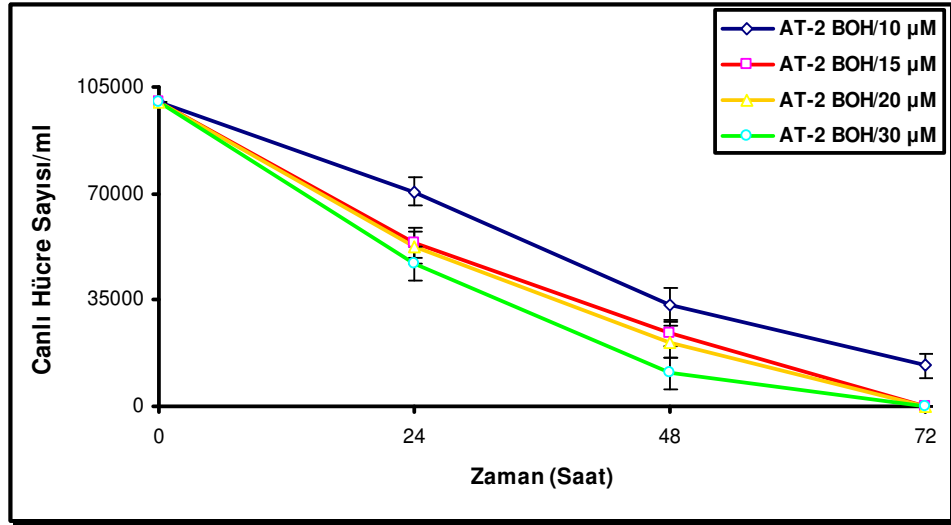
5. BULGULAR

5.1. BOHEMİNİN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ

Bu araştırmanın ilk amacı BOH uygulanmış ve BOH uygulanmamış (kontrol) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) ve metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında BOH'in hücre çoğalmasına etkilerini araştırmaktır. Bu amaca yönelik olarak önce BOH'in farklı konsantrasyonlarının prostat kanseri hücre hatlarında zamana bağlı olarak hücre canlılığına etkisi araştırıldı. Yapılan çalışma sonucunda AT-2 sıçan prostat kanseri hücre hatlarında ekimden 24 saat sonra 10 μ M BOH uygulanması sonucunda hücrelerin canlılığında kontrole oranla 24. saatte % 78; 48. saatte % 94 ve 72. saatte % 98 azalma olduğu saptanmıştır. Aynı hücrelere ekimden 24 saat sonra 15 μ M BOH uygulaması sonucunda hücrelerin canlılığında kontrole kıyasla 24. saatte % 83; 48. saatte % 96 ve 72. saatte % 100 ket vuru meydana geldiği belirlendi. Ekimden 24 saat sonra 20 μ M BOH uygulaması ise 24. saatte hücrelerin canlılığında kontrole oranla % 84; 48. saatte % 96 ve 72. saatte ise % 100 azalmaya sebep olmuştur. 30 μ M BOH uygulaması ise kontrole kıyasla hücrelerin canlılığında 20 μ M BOH uygulaması ile hemen hemen aynı oranda inhibisyon meydana getirmiştir (Tablo 5.1) (Şekil 5.1).

Tablo 5.1: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin zamana göre değişimi. BOH konsantrasyonları: 10, 15, 20 ve 30 μM .

Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Canlı Hücre Sayısı/ml
AT-2 10 μM BOH	24 saat	70425 \pm 4621
AT-2 10 μM BOH	48 saat	33280 \pm 5496
AT-2 10 μM BOH	72 saat	13532 \pm 4047
AT-2 15 μM BOH	24 saat	53690 \pm 5033
AT-2 15 μM BOH	48 saat	24105 \pm 4326
AT-2 15 μM BOH	72 saat	00000 \pm 0000
AT-2 20 μM BOH	24 saat	52250 \pm 5040
AT-2 20 μM BOH	48 saat	21270 \pm 5189
AT-2 20 μM BOH	72 saat	00000 \pm 0000
AT-2 30 μM BOH	24 saat	46930 \pm 5842
AT-2 30 μM BOH	48 saat	10910 \pm 5074
AT-2 30 μM BOH	72 saat	00000 \pm 0000

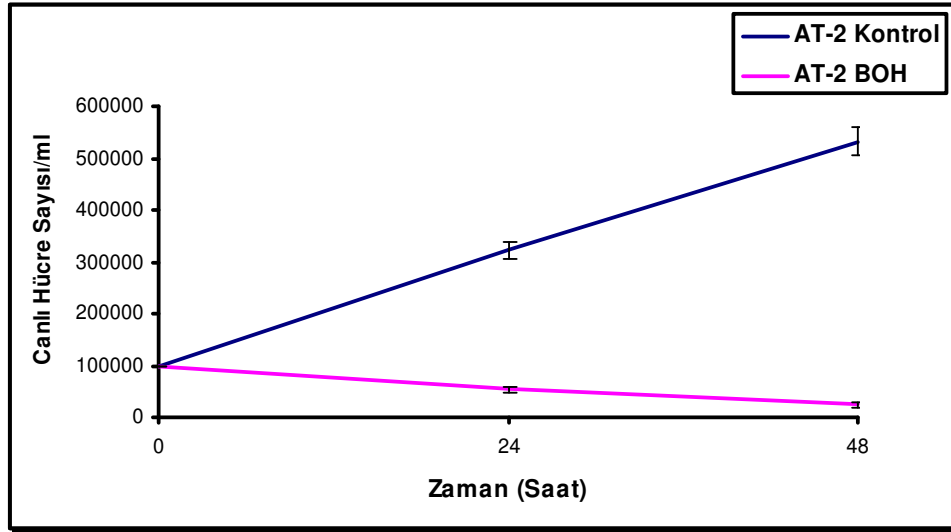


Şekil 5.1: Boheminin (BOH) farklı konsantrasyonlarının metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin zamana bağlı olarak değişimi. BOH konsantrasyonları: 10, 15, 20 ve 30 μM .

AT-2 sıçan prostat kanseri hücre hatlarında ekimden sonraki 24. saatte uygulanan farklı konsantrasyonlardaki BOH'in canlılığa etkisinin 24., 48. ve 72. saatlerdeki etkileri göz önüne alındığında, BOH'in 15 μM 'dan daha yüksek konsantrasyonlarının toksik etki yaratabileceği düşünülerek BOH için denenen ve etkin bulunan sınır konsantrasyon olarak 15 μM 'ın bu araştırmada kullanılmasına karar verildi (Tablo 5.2) (Şekil 5.2). Ayrıca BOH'in 48. ve 72. saat uygulamalarında bir fark olmadığı saptanarak, bu araştırmada 72. saat uygulamasının yapılmaması da ayrıca kararlaştırıldı.

Tablo 5.2: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin zamana göre değişimi. BOH konsantrasyonu: 15 μM ; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı.

Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Canlı Hücre Sayısı/ml
AT-2 Kontrol	24 saat	322655 \pm 15394
AT-2 BOH	24 saat	53690 \pm 5033
AT-2 Kontrol	48 saat	532370 \pm 27768
AT-2 BOH	48 saat	24105 \pm 4326

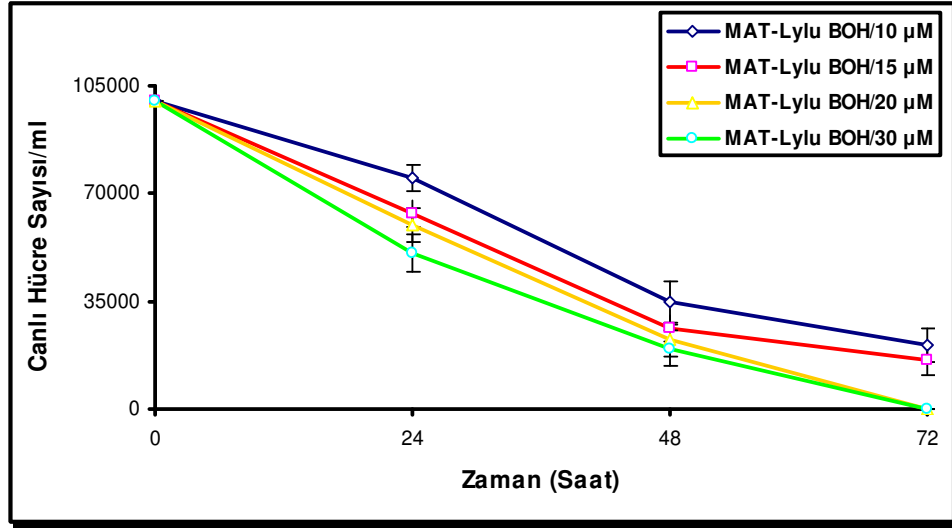


Şekil 5.2: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin zamana bağlı olarak değişimi. BOH konsantrasyonu: 15 μM ; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı ($p < 0,0005$).

MAT-Lyly sıçan prostat kanseri hücre hatlarında ekimden 24 saat sonra 10 μ M BOH uygulanması sonucunda hücrelerin canlılığında kontrole kıyasla 24. saatte % 79, 48. saatte % 95 ve 72. saatte % 97 oranında ket vuru saptanmıştır. Aynı hücelere ekimden 24 saat sonra 15 μ M BOH uygulanmasının ardından hücrelerin canlılığında kontrole kıyasla 24. saatte % 82, 48. saatte % 96 ve 72. saatte % 98 inhibisyon olduğu belirlenmiştir. Ekimden sonra 20 μ M BOH uygulaması ise 24. saatte hücrelerin canlılığında kontrole oranla % 83, 48. saatte % 96 ve 72. saatte % 100 azalmalara sebep olmuştur. 30 μ M BOH uygulamasının da hücrelerin canlılığında kontrole kıyasla 20 μ M BOH uygulaması ile aynı oranda azalma meydana getirdiği belirlenmiştir (Tablo 5.3) (Şekil 5.3).

Tablo 5.3: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lyly) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin zamana göre değişimi. BOH konsantrasyonları: 10, 15, 20 ve 30 μ M.

Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Canlı Hücre Sayısı/ml
MAT-Lyly 10 μ M BOH	24 saat	75130 \pm 4318
MAT-Lyly 10 μ M BOH	48 saat	34565 \pm 7015
MAT-Lyly 10 μ M BOH	72 saat	20706 \pm 5643
MAT-Lyly 15 μ M BOH	24 saat	63530 \pm 4435
MAT-Lyly 15 μ M BOH	48 saat	26150 \pm 4148
MAT-Lyly 15 μ M BOH	72 saat	15930 \pm 5214
MAT-Lyly 20 μ M BOH	24 saat	59870 \pm 5481
MAT-Lyly 20 μ M BOH	48 saat	22780 \pm 5388
MAT-Lyly 20 μ M BOH	72 saat	00000 \pm 0000
MAT-Lyly 30 μ M BOH	24 saat	50810 \pm 6172
MAT-Lyly 30 μ M BOH	48 saat	19825 \pm 5894
MAT-Lyly 30 μ M BOH	72 saat	00000 \pm 0000

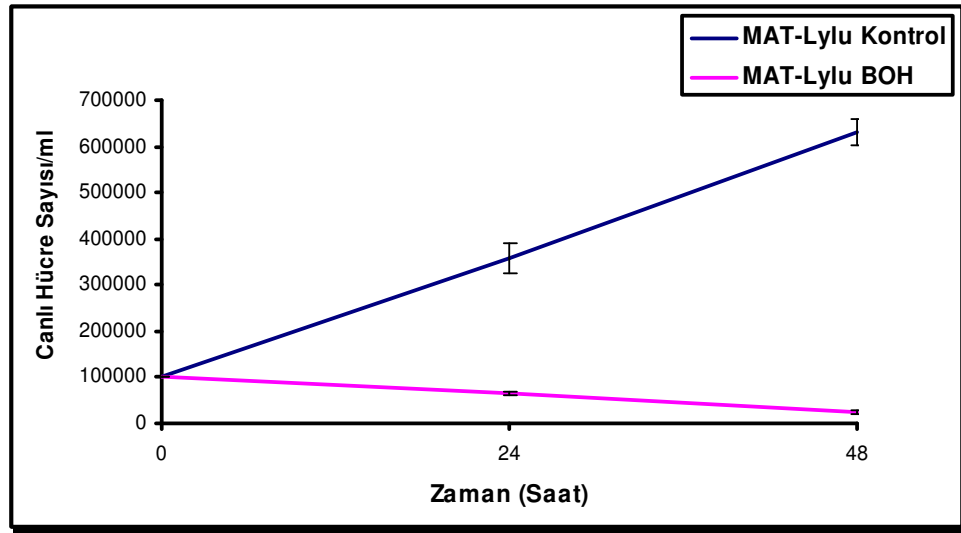


Şekil 5.3: Boheminin (BOH) farklı konsantrasyonlarının metastaz yapma eğilimi çok (MAT-LyLu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin zamana bağlı olarak değişimi. BOH konsantrasyonları: 10, 15, 20 ve 30 μM .

Metastaz yapma eğilimi çok, MAT-LyLu sıçan prostat kanseri hücre hatlarında ekimden sonraki 24. saatte uygulanan farklı konsantrasyonlardaki BOH'in canlılığa etkisi 24., 48. ve 72. saatlerde göz önüne alındığında, BOH'in 15 μM 'dan daha yüksek konsantrasyonlarının toksik etki yaratmasından dolayı BOH için sınır konsantrasyon olarak 15 μM kullanılmasına karar verildi (Tablo 5.4) (Şekil 5.4). AT-2 prostat kanseri hücre hattında olduğu gibi MAT-LyLu sıçan prostat kanseri hücre hatlarında da BOH'in 48. ve 72. saat uygulamalarında bir fark olmadığı saptanmış ve bu araştırmada 72. saat uygulamasının yapılmaması kararlaştırılmıştır.

Tablo 5.4: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin zamana göre değişimi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı.

Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Canlı Hücre Sayısı/ml
MAT-Lylu Kontrol	24 saat	357417 \pm 32435
MAT-Lylu BOH	24 saat	63530 \pm 4435
MAT-Lylu Kontrol	48 saat	632110 \pm 28116
MAT-Lylu BOH	48 saat	26150 \pm 4148



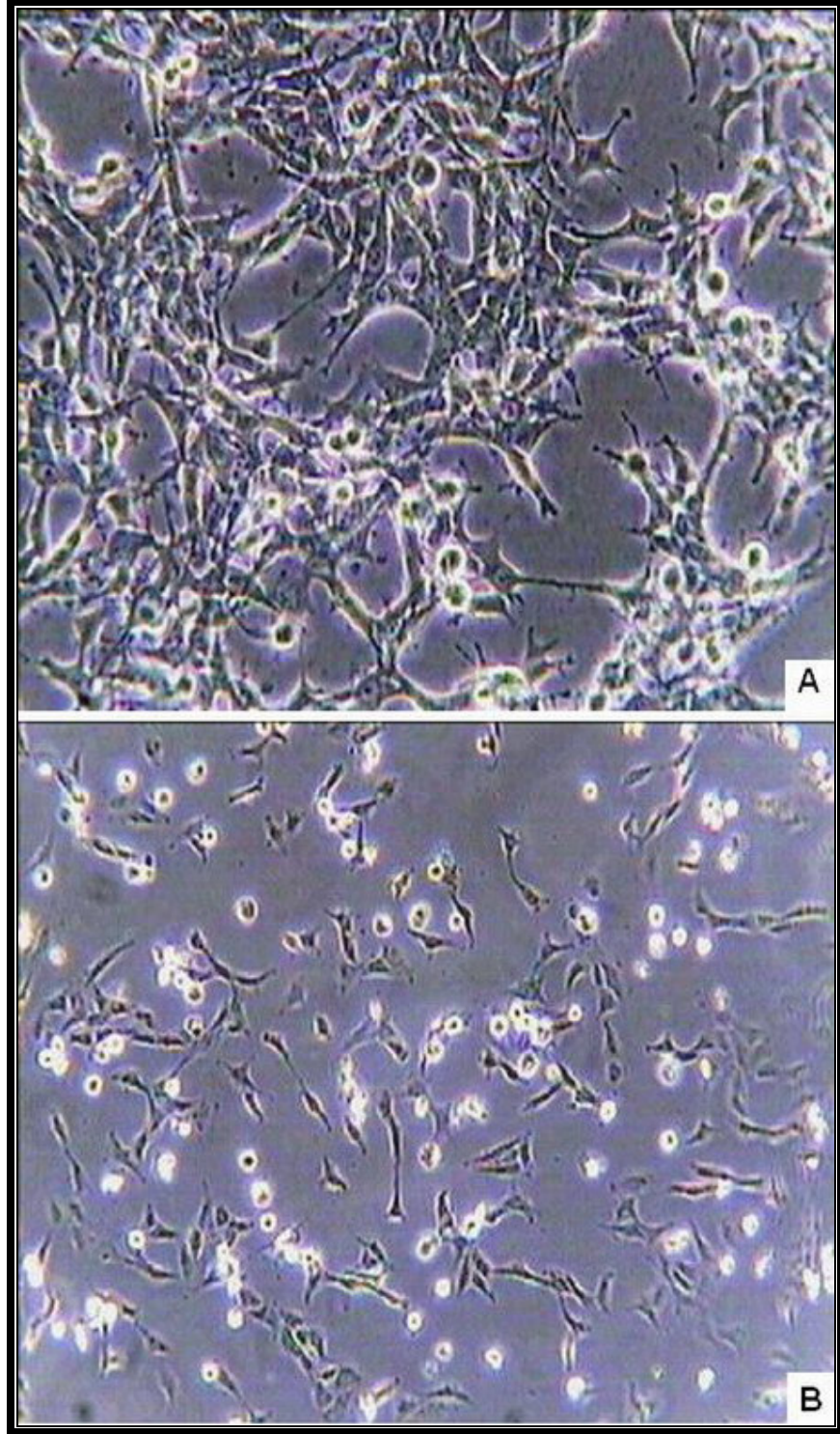
Şekil 5.4: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin zamana bağlı olarak değişimi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı ($p < 0,0005$).

Sonuç olarak, 15 μ M BOH uygulandıktan sonra ki ilk 24. saatte hem AT-2 ve hem de MAT-Lylu sıçan prostat kanseri hücre hatlarının canlılığında kontrole oranla % 82-83 oranında azalma olduğu belirlenmiştir. BOH uygulamasından sonra ki 48. saatte ise AT-2 hücrelerinin canlılığı kontrol ile kıyaslandığında % 95-96 oranında ket vuru saptanmıştır. 72. saatte ise hem AT-2 ve hem de MAT-Lylu sıçan prostat kanseri hücrelerinde kontrole oranla % 100 azalma gözlenmiştir.

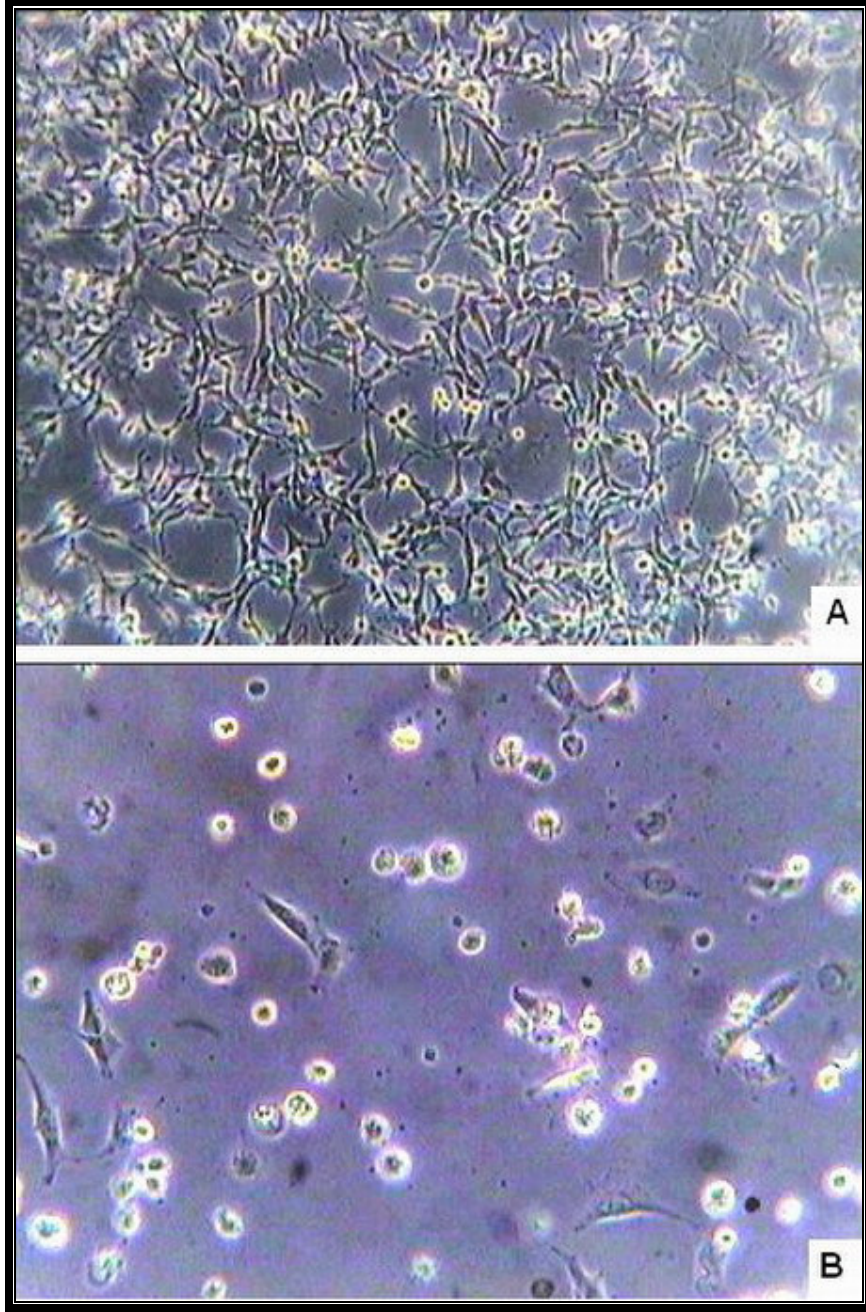
5.2. BOHEMİNİN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİNİN MİKROSKOBİK İNCELENMESİ

Bu araştırmanın ilk amacı olan BOH'in hücre çoğalmasına etkilerinin incelenmesi sırasında, BOH uygulanmış ve BOH uygulanmamış (kontrol) AT-2 ve MAT-Lylyu sıçan prostat kanseri hücre hatlarında BOH'in etkilerinin belirlenmesinden sonra mikroskopik saptamalar gerçekleştirilmiştir.

Metastaz yapma eğilimi az, AT-2 sıçan prostat kanseri hücre hatlarında, ekimden sonraki 24. saatte hücrelerin şekillerinin epitel-benzeri ve poligonal olduğu gözlenmiştir. Bu hücreler kültür kabına oldukça yayılmış olup, tüm hücrelerin kültür kabının tabanına yapıştığı saptanmıştır (Şekil 5.5 A). Hücrelere ekimden sonraki 24. saatte, 24 saat 15 µM BOH uygulaması sonucunda hücrelerin şekillerinde herhangi bir değişiklik olmadığı, ancak yayılma derecelerini kaybettikleri saptanmıştır (Şekil 5.5 B). Ekimden 48 saat sonra BOH uygulanmamış hücrelerin şekilleri incelendiğinde, poligonal hücrelerin hafif küreselleştiği ve yayılarak kültür kabının tüm tabanını kapladıkları görülmüştür (Şekil 5.6 A). Ekimden 24 saat sonra 15 µM BOH uygulanmış ve 48 saat bu uygulamaya maruz bırakılmış hücrelerde ise, hücrelerin neredeyse tamamının şeklinin küreselleştiği, kültür kabının yüzeyine yapışma oranlarında ve sayılarında da dikkate değer bir azalma meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 5.6 B).

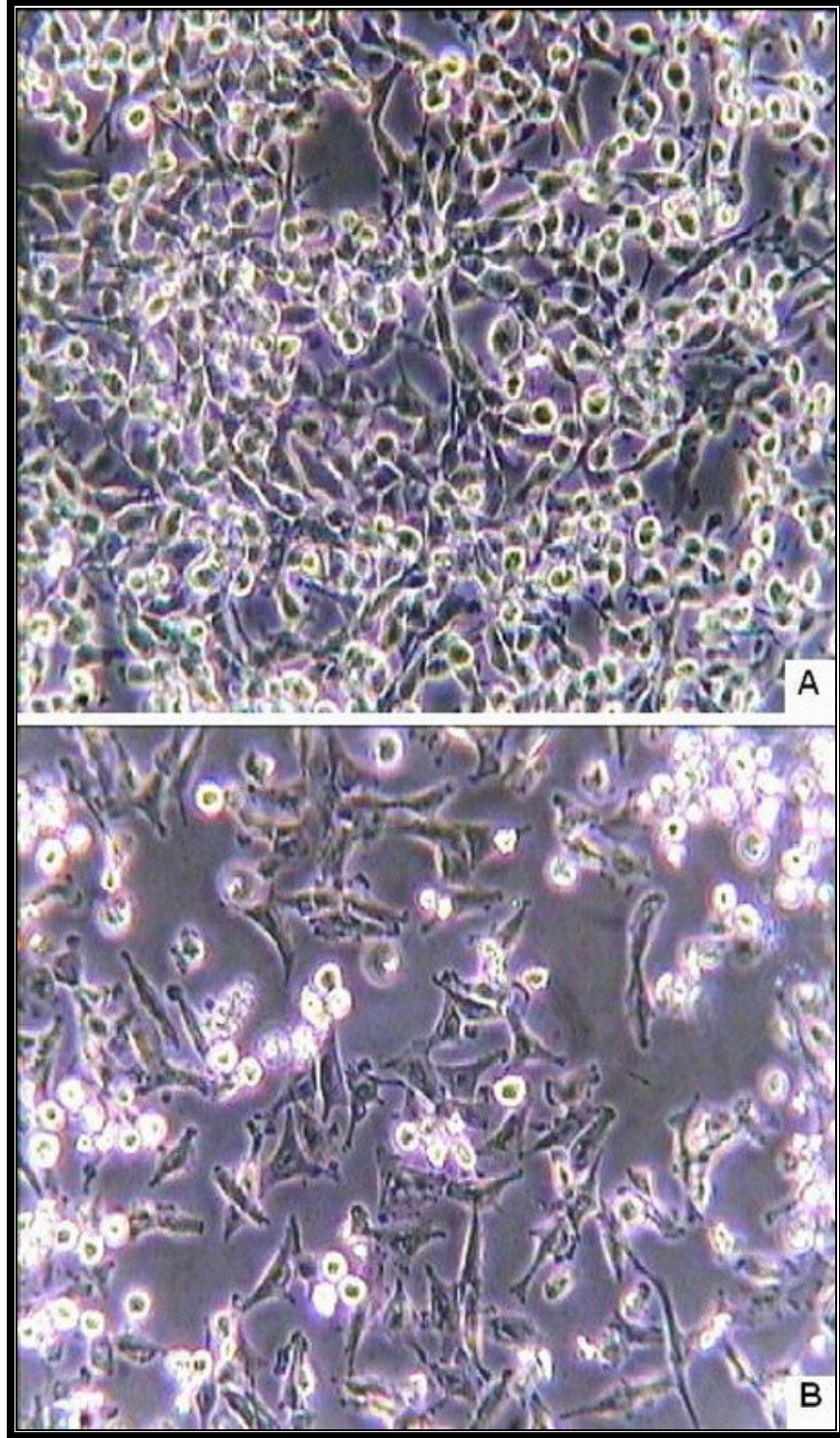


Şekil 5.5: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin mikroskoik olarak belirlenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; BOH uygulaması: Ekimden sonraki 24. saat; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hatları; **A**: AT-2 kontrol (x40); **B**: BOH uygulanmış AT-2 hücre hattı (x20).

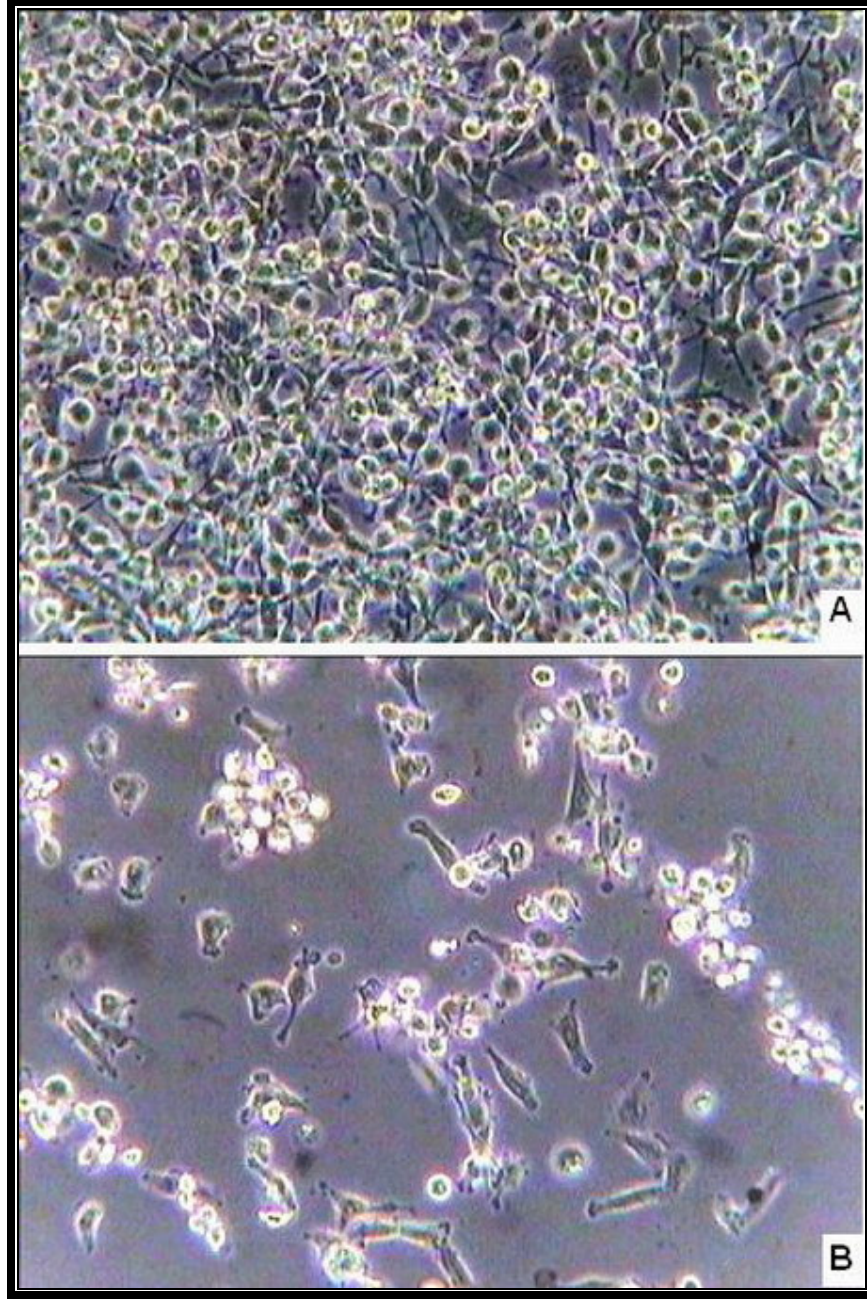


Şekil 5.6: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin mikroskoik olarak belirlenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; BOH uygulaması: Ekimden sonraki 48. saat; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hatları; **A**: AT-2 kontrol (x20); **B**: BOH uygulanmış AT-2 hücre hattı (x40).

Metastaz yapma eğilimi çok, MAT-Lyly sıçan prostat kanseri hücre hatlarında, ekimden sonraki 24. saatte hücrelerin şekillerinin poligonal olduğu gözlenmiştir. Bu hücreler kültür kabına oldukça yayılmış olup, tüm hücreler kültür kabının tabanına yapışmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.7 A). Hücrelere ekimden sonraki 24. saatte, 24 saat 15 μ M BOH uygulaması sonucunda hücrelerin yayılma derecelerini ve kültür kabının tabanına yapışma özelliklerini kaybettikleri saptanmıştır (Şekil 5.7 B). Ekimden 48 saat sonra BOH uygulanmamış hücrelerin şekilleri incelendiğinde, poligonal hücrelerin daha da yayılarak kültür kabının tüm tabanını kapladıkları gözlenmiştir (Şekil 5.8 A). Ekimden 24 saat sonra 15 μ M BOH uygulanmış ve 48 saat bu uygulamaya maruz bırakılmış hücrelerde ise, hücrelerin hemen hemen tamamının şeklinin küreselleştiği, kültür kabının yüzeyine yapışma oranlarında ve sayılarında da önemli ölçüde bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.8 B).

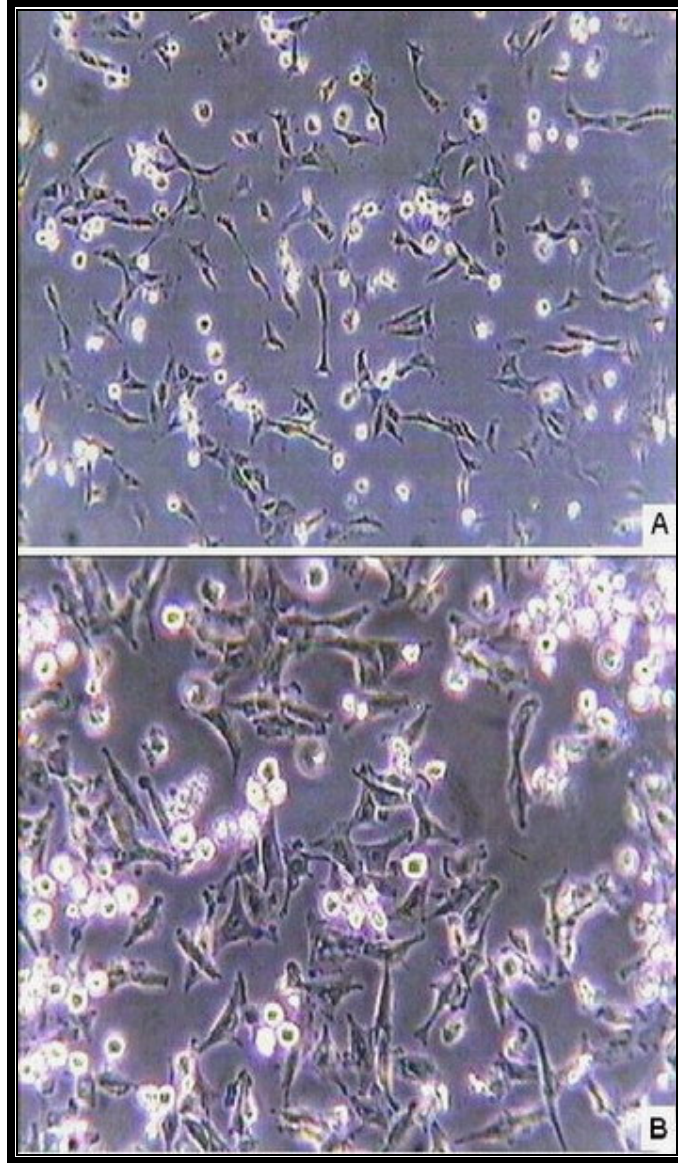


Şekil 5.7: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin mikroskopik olarak belirlenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; BOH uygulaması: Ekimden sonraki 24. saat; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hatları; **A**: MAT-Lylu kontrol (x40); **B**: BOH uygulanmış MAT-Lylu hücre hattı (x40).

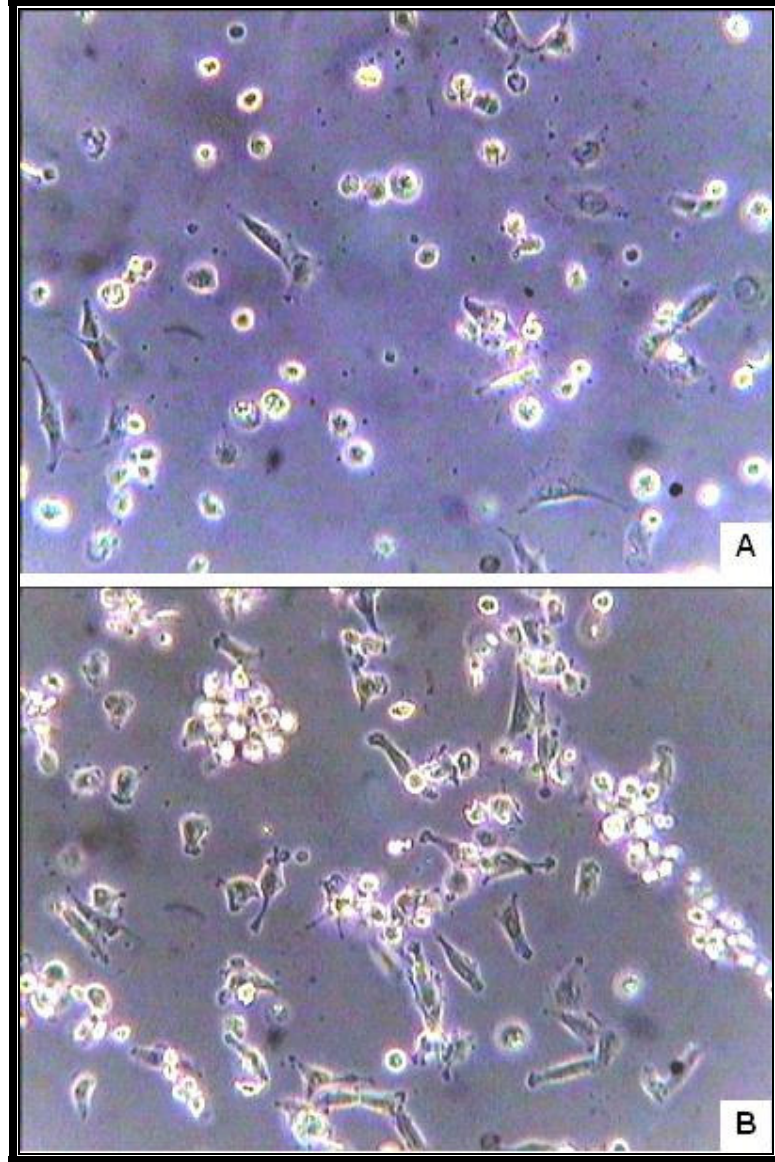


Şekil 5.8: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin mikroskopik olarak belirlenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; BOH uygulaması: Ekimden sonraki 48. saat; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hatları; **A**: MAT-Lylu kontrol (x40); **B**: BOH uygulanmış MAT-Lylu hücre hattı (x40).

Sonuç olarak, metastaz yapma eğilimi az ve çok sıçan prostat kanseri hücre hatlarının BOH etkisindeki mikroskobik görünüşleri karşılaştırıldığında 15 μ M BOH uygulaması sonucunda hem 24. (Şekil 5.9 A ve B) ve hem de 48. (Şekil 5.10 A ve B) saatlerde MAT-Lyly sıçan prostat kanseri hücrelerinin AT-2 sıçan prostat kanseri hücrelerine göre BOH'e karşı daha dirençli oldukları belirlenmiştir (Şekil 5.9 A ve B).



Şekil 5.9: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) ve metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lyly) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin mikroskobik olarak belirlenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; BOH uygulaması: Ekimden sonraki 24. saat; **A**: BOH uygulanmış AT-2 hücre hattı (x20); **B**: BOH uygulanmış MAT-Lyly hücre hattı (x40).



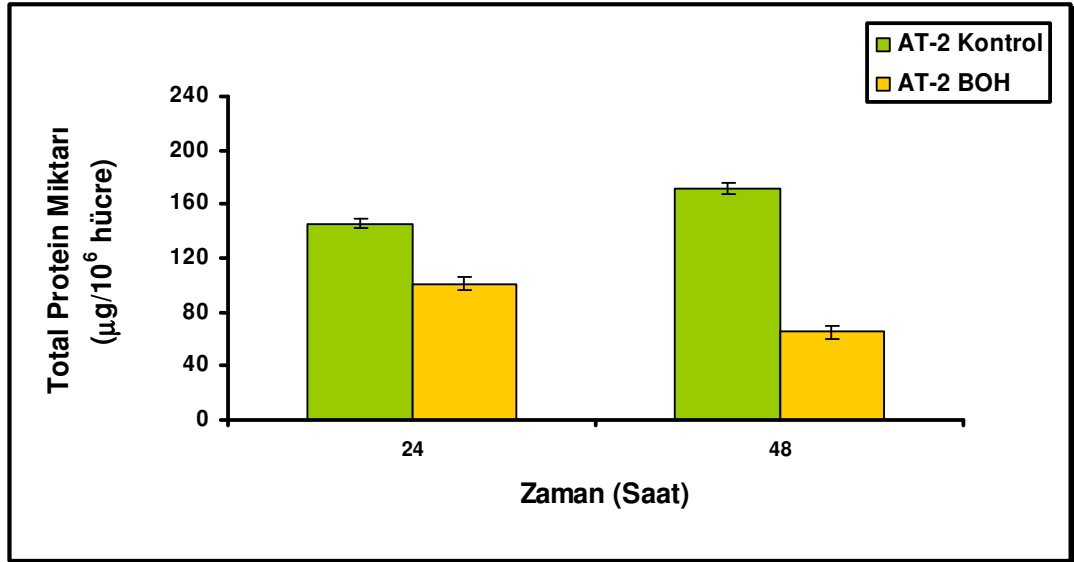
Şekil 5.10: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) ve metastaz yapma eğilimi çok (MAT-LyLu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında canlılığa etkisinin mikroskobik olarak belirlenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 µM; BOH uygulaması: Ekimden sonraki 48. saat; **A:** BOH uygulanmış AT-2 hücre hattı (x40); **B:** BOH uygulanmış MAT-LyLu hücre hattı (x40).

5.3. BOHEMİNİN TOTAL PROTEİN MİKTARINA ETKİSİ

AT-2 ve MAT-Lyly sıçan prostat kanseri hücre hatlarında 15 μM BOH'in hücre içi total protein miktarına etkileri incelendiğinde AT-2 sıçan prostat kanseri hücre hatlarında 24 saat BOH uygulanması sonucunda kontrole kıyasla % 30, 48 saat sonunda ise % 59 oranında ket vuru meydana geldiği saptanmıştır. 24. ve 48. saatlerdeki AT-2 sıçan prostat kanseri hücre hatlarının kontrol grupları kendi aralarında kıyaslandıklarında % 14 oranında artış meydana gelirken, BOH uygulanmış hücre hatları arasında % 35 oranında azalma olduğu saptanmıştır. (Tablo 5.5) (Şekil 5.11).

Tablo 5.5: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında total protein miktarına etkisinin zamana bağlı incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μM ; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı.

Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Total Protein Miktarı ($\mu\text{g}/10^6$ hücre)
AT-2 Kontrol	24 saat	145,8 \pm 5,11
AT-2 BOH	24 saat	100,84 \pm 3,15
AT-2 Kontrol	48 saat	171,02 \pm 4,89
AT-2 BOH	48 saat	65,49 \pm 4,24

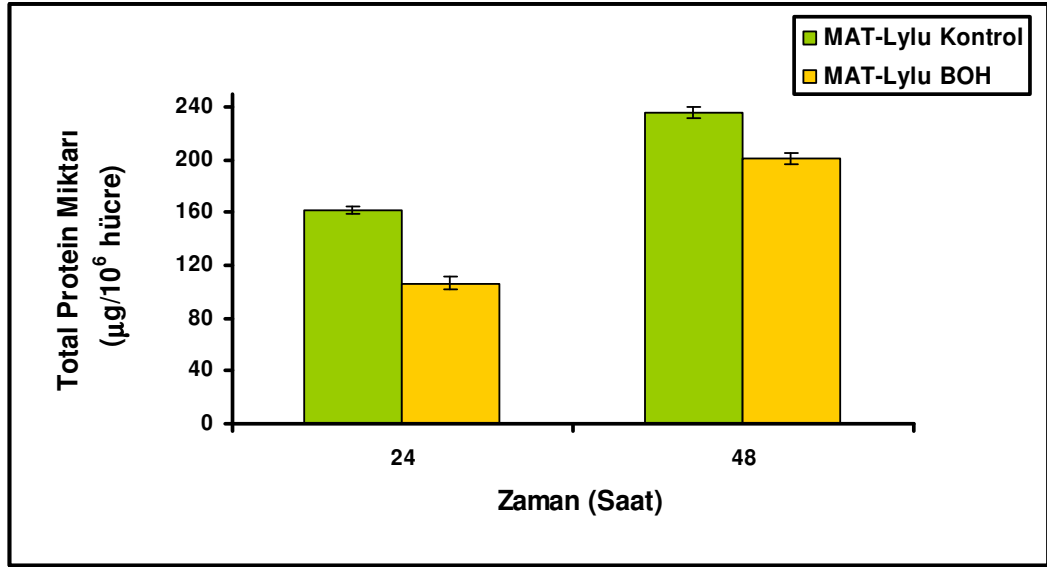


Şekil 5.11: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında total protein miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μM ; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı ($p < 0,0005$).

MAT-Lylu sıçan prostat kanseri hücre hatlarında ise 15 μM BOH'in, uygulandıktan sonraki ilk 24 saatte total protein miktarında 1,5 ve 48. saatte 1,8 kez ket vuru meydana getirdiği belirlenmiştir. 24. ve 48. saatlerdeki MAT-Lylu sıçan prostat kanseri hücre hatlarının kontrol grupları kendi aralarında kıyaslandıklarında % 31, BOH uygulanmış hücre hatları kendi aralarında kıyaslandıklarında ise % 46 oranında artma olduğu saptanmıştır (Tablo 5.6) (Şekil 5.12). Bu durumda protein inhibisyonu açısından MAT-Lylu hücrelerinin BOH'e karşı AT-2 hücre hatlarına göre biraz daha dirençli oldukları ortaya çıkmaktadır.

Tablo 5.6: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında total protein miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μM ; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı.

Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Total Protein Miktarı ($\mu\text{g}/10^6$ hücre)
MAT-Lylu Kontrol	24 saat	161,8 \pm 4,31
MAT-Lylu BOH	24 saat	106,78 \pm 2,99
MAT-Lylu Kontrol	48 saat	236,02 \pm 3,76
MAT-Lylu BOH	48 saat	201,13 \pm 4,55



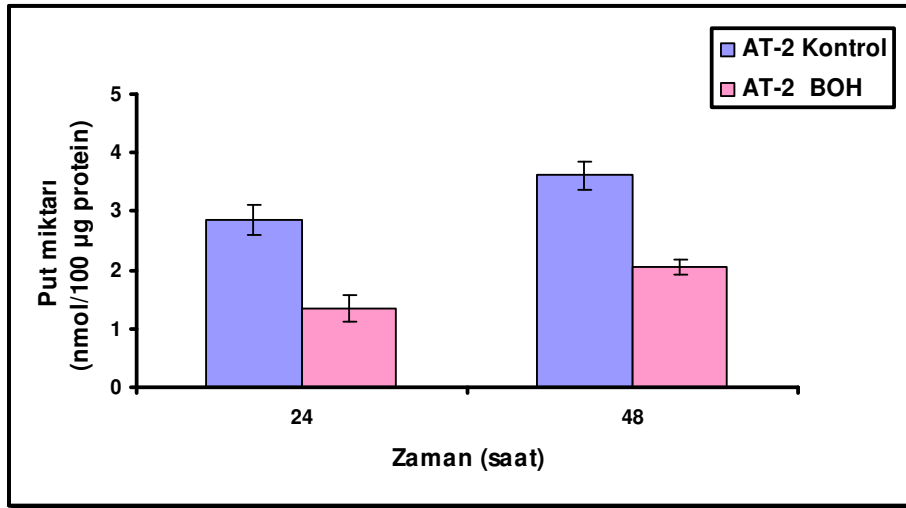
Şekil 5.12: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında total protein miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μM ; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı ($p < 0,0025$).

5.4. BOHEMİNİN POLİAMİN MİKTARINA ETKİSİ

Bu araştırmanın bir diğer amacı olan BOH'in metastaz yapma eğilimi az (AT-2) ve metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında PA miktarlarına etkisinin incelenmesidir. AT-2 sıçan prostat kanseri hücrelerinde 15 μ M BOH, uygulandıktan sonraki ilk 24 saatte Put miktarında kontrole oranla % 53 ve 48. saatte ise % 44 azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca BOH uygulanmamış kontrol gruplarının hücre içi Put düzeyleri kendi aralarında kıyaslandığında 48. saatteki hücrelerin 24. saatteki hücrelere oranla % 20 daha fazla Put içeriğine sahip oldukları görülmüştür (Tablo 5.7) (Şekil 5.13). Bu durumda Put'in BOH uygulamasına AT-2 hücre hatlarında ket vuruya neden olmadığı ortaya çıkmış olmaktadır.

Tablo 5.7: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında putresin miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı.

Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Putresin Miktarı (nmol/100 μ g protein)
AT-2 Kontrol	24 saat	2,9 \pm 0,3
AT-2 BOH	24 saat	1,4 \pm 0,2
AT-2 Kontrol	48 saat	3,6 \pm 0,3
AT-2 BOH	48 saat	2,0 \pm 0,1

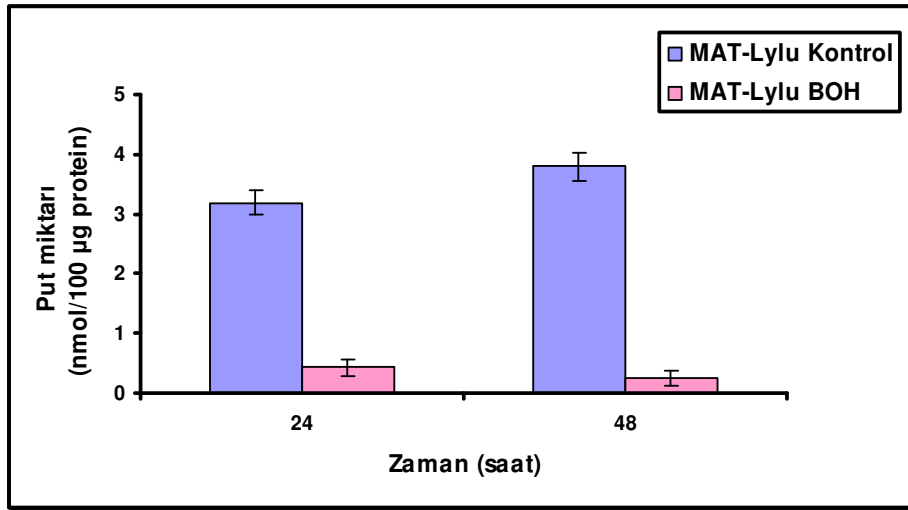


Şekil 5.13: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında putresin (Put) miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı ($p < 0,0005$).

Metastaz yapma eğilimi çok, MAT-Lylü sıçan prostat kanseri hücrelerinde ise 15 μ M BOH'in uygulandıktan sonraki ilk 24 saatte diamin Put miktarına kontrole kıyasla % 87 ve 48. saatte % 93 oranında ket vuru meydana getirdiği saptanmıştır (Tablo 5.8) (Şekil 5.14).

Tablo 5.8: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylü) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında putresin miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı.

Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Putresin Miktarı (nmol/100 μ g protein)
MAT-Lylü Kontrol	24 saat	3,2 \pm 0,2
MAT-Lylü BOH	24 saat	0,4 \pm 0,1
MAT-Lylü Kontrol	48 saat	3,8 \pm 0,2
MAT-Lylü BOH	48 saat	0,3 \pm 0,1

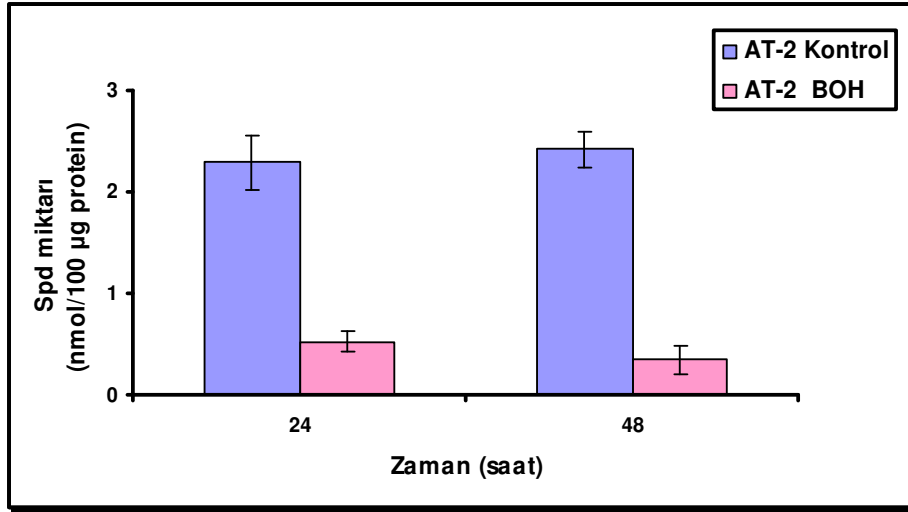


Şekil 5.14: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylü) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında putresin (Put) miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı ($p < 0,0005$).

Metastaz yapma eğilimi az, AT-2 sıçan prostat kanseri hücre hatlarında ekimden sonraki 24. saatte 15 μ M BOH'in uygulandıktan sonraki ilk 24 saatte triamin Spd miktarını kontrole oranla % 77 ve 48. saatte % 89 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Tablo 5.9) (Şekil 5.15).

Tablo 5.9: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında spermidin miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı.

Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Spermidin Miktarı (nmol/100 μ g protein)
AT-2 Kontrol	24 saat	2,3 \pm 0,3
AT-2 BOH	24 saat	0,5 \pm 0,1
AT-2 Kontrol	48 saat	2,4 \pm 0,1
AT-2 BOH	48 saat	0,3 \pm 0,1

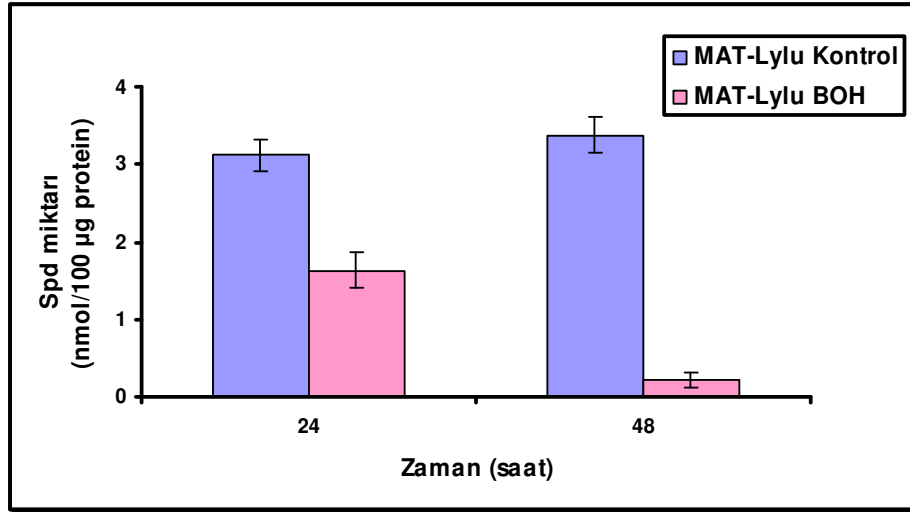


Şekil 5.15: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında spermidin (Spd) miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı ($p < 0,0005$).

MAT-Lylu sıçan prostat kanseri hücre hatlarında ise 15 μ M BOH'in uygulandıktan sonraki 24. saatte Spd miktarında kontrole oranla % 47 ve sonra ki 48 saatte % 94 oranında ket vuru meydana getirdiği tespit edilmiştir (Tablo 5.10) (Şekil 5.16).

Tablo 5.10: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında spermidin miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı.

Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Spermidin Miktarı (nmol/100 μ g protein)
MAT-Lylu Kontrol	24 saat	3,1 \pm 0,2
MAT-Lylu BOH	24 saat	1,6 \pm 0,2
MAT-Lylu Kontrol	48 saat	3,4 \pm 0,2
MAT-Lylu BOH	48 saat	0,2 \pm 0,1

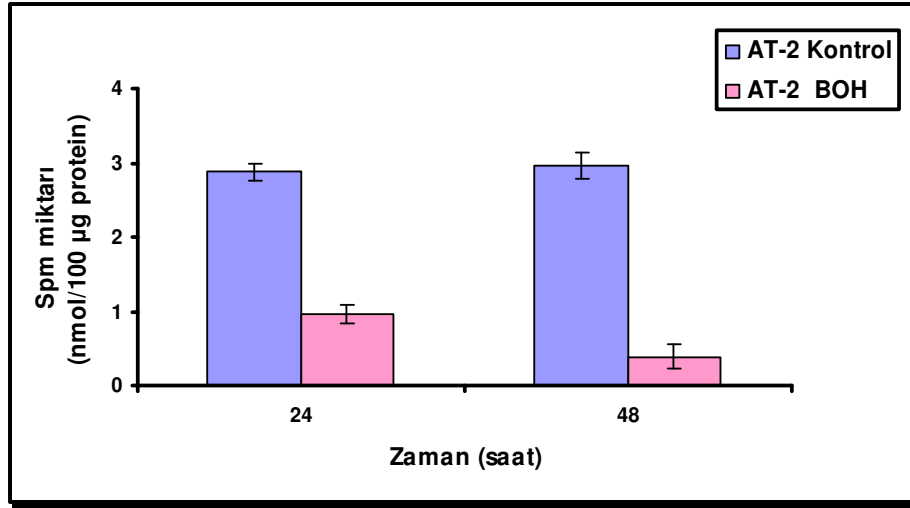


Şekil 5.16: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında spermidin (Spd) miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı ($p < 0,0005$).

AT-2 sıçan prostat kanseri hücre hatlarında 24 saat süre ile uygulanan 15 μ M BOH'in, Spm miktarını % 66 ve 48 saat süre ile uygulanan BOH'in ise % 87 oranında azalttığı belirlenmiştir (Tablo 5.11) (Şekil 5.17).

Tablo 5.11: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında spermin miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı.

Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Spermin Miktarı (nmol/100 μ g protein)
AT-2 Kontrol	24 saat	3,0 \pm 0,1
AT-2 BOH	24 saat	1,0 \pm 0,1
AT-2 Kontrol	48 saat	2,9 \pm 0,1
AT-2 BOH	48 saat	0,4 \pm 0,1

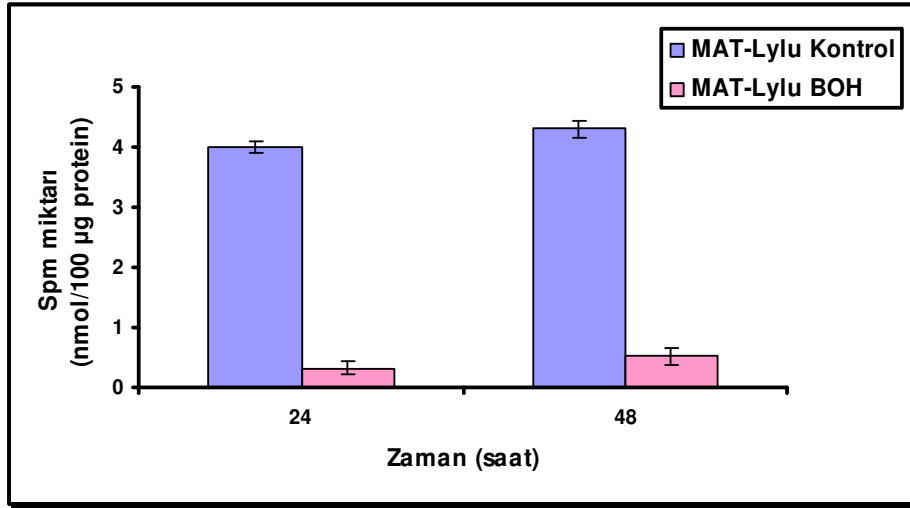


Şekil 5.17: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında spermin (Spm) miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı ($p < 0,0005$).

Metastaz yapma eğilimi çok, MAT-Lylü sıçan prostat kanseri hücre hatlarının Spm miktarında ise 15 µM BOH uygulamasının 24. saatte kontrole kıyasla % 92, 48. saatte ise % 88 oranında azalma meydana getirdiği belirlenmiştir (Tablo 5.12) (Şekil 5.18).

Tablo 5.12: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylü) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında spermin miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 µM; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı.

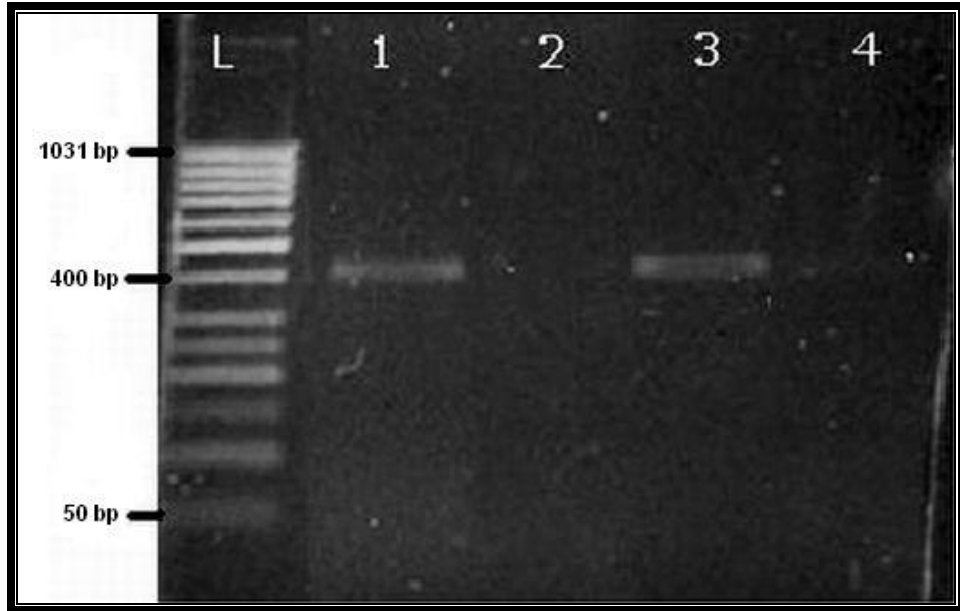
Hücre Hattı ve Uygulama	Uygulama Süresi	Spermin Miktarı (nmol/100 µg protein)
MAT-Lylü Kontrol	24 saat	4,0 ± 0,1
MAT-Lylü BOH	24 saat	0,3 ± 0,1
MAT-Lylü Kontrol	48 saat	4,3 ± 0,1
MAT-Lylü BOH	48 saat	0,5 ± 0,1



Şekil 5.18: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylü) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında spermidin (Spd) miktarına etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi. BOH konsantrasyonu: 15 µM; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı (p<0,0005).

5.5. BOHEMİNİN ODC mRNA EKSPRESYONUNA ETKİSİ

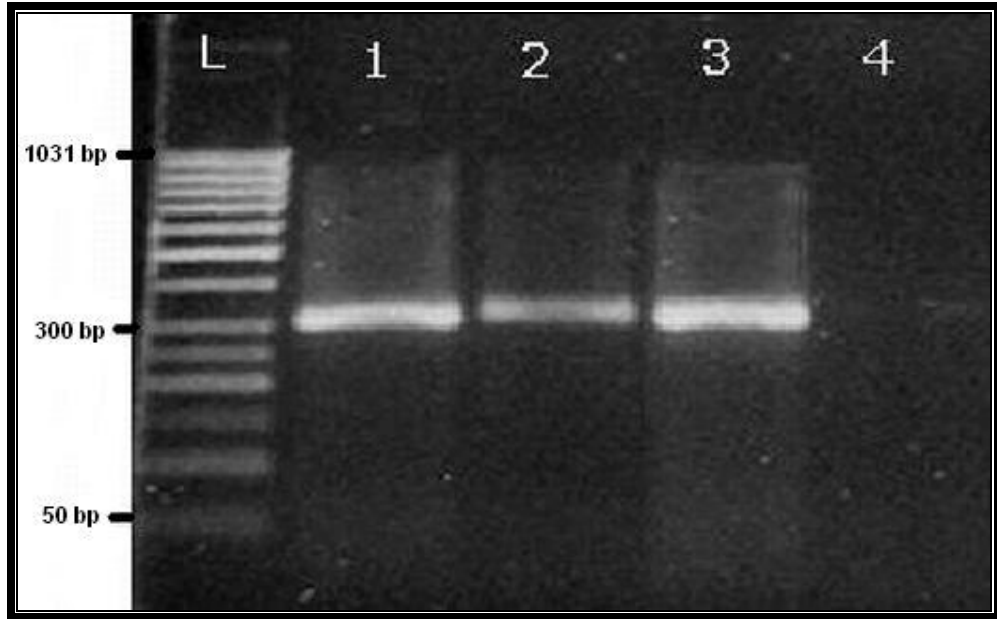
15 μ M BOH'in PA biyosentezinin en önemli anahtar enzimi olan ve ornitinin Put'e dönüşmesini sağlayan ODC'in mRNA ekspresyonuna etkisinin metastaz yapma eğilimi az (AT-2) ve metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında incelenmesi çalışmanın diğer bir amacını teşkil etmektedir. Bu amaçla daha önce BOH'in tüm PA düzeylerinde yaklaşık % 90 dolaylarında ket vurucu etki gösterdiği 48. saat uygulaması araştırmanın bu bölümünde ODC mRNA ekspresyon düzeyini belirlemek için seçildi. Yapılan araştırma sonucunda, BOH uygulamasının 48. saatinde, her iki hücre hattında da ODC mRNA ekspresyonunda ket vuru meydana geldiği, buna karşın BOH uygulanmamış kontrol gruplarında ODC-mRNA ekspresyonlarının meydana geldiği açık bir şekilde tespit edilmiştir (Şekil 5.19).



Şekil 5.19: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) ve metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında ODC mRNA ekspresyonuna etkisi. BOH konsantrasyonu: 15 μ M; BOH uygulaması: Ekimden sonraki 48. saat; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı (L: 50 bp DNA ladder, 1: AT-2 kontrol, 2: BOH uygulanmış AT-2 hücre hattı, 3: MAT-Lylu kontrol, 4: BOH uygulanmış MAT-Lylu hücre hattı).

5.6. BOHEMİNİN Bax mRNA EKSPRESYONUNA ETKİSİ

Bu araştırmanın diğ er bir amacı, giriş kısmında da belirtildiğ i gibi sikline bağımlı kinaz inhibitörü BOH'in AT-2 ve MAT-Lylü sıç an prostat kanseri hücre hatlarında ket vurucu etkisinin moleküler mekanizmasını ortaya koyabilmektir. Bu amaca yönelik olarak BOH'in proapoptotik Bax proteininin ekspresyon düzeyine etkisi araştırıldı. Yapılan RT-PZR çalışması sonucunda 15 µM BOH'in uygulandıktan sonraki 48. saatte Bax ekspresyon düzeyi metastaz yapma eğilimi çok, MAT-Lylü sıç an prostat kanseri hücre hatlarında baskıladığ ı, buna karş ın BOH uygulanmış metastaz yapma eğilimi az, AT-2 sıç an prostat kanseri hücre hattında ve BOH uygulanmamış her iki kontrol grubunda Bax ekspresyonu meydana geldiğ i tespit edilmiştir (Ş ekil 5.20).



Ş ekil 5.20: Boheminin (BOH) metastaz yapma eğilimi az (AT-2) ve metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylü) sıç an prostat kanseri hücre hatlarında Bax mRNA ekspresyonuna etkisi. BOH konsantrasyonu: 15 µM; BOH uygulaması: Ekimden sonraki 48. saat; Kontrol: BOH uygulanmamış hücre hattı (L: 50 bp DNA ladder, 1: AT-2 kontrol, 2: BOH uygulanmış AT-2 hücre hattı, 3: MAT-Lylü kontrol, 4: BOH uygulanmış MAT-Lylü hücre hattı).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Prostat kanseri erkekler arasında en sık rastlanan kanser türü olup, batılı ülkelerin istatistiksel çalışmalarına göre kansere bağlı erkek ölümlerinde ikinci sırayı almaktadır. Prostat kanserinin teşhisinde mevcut olan metodlar tümörün davranışlarını önceden belirlemede yetersiz kalmaktadır. Yayılmış prostat kanserinin standart tedavilerinde iyileşme oranı çok düşüktür. Prostat spesifik antijeni (PSA), prostat spesifik membran antijeni (PSMA) ve insan kallikrein ailesi gen ürünlerinin (proPSA, c-PSA, fPSA) saptanması hastalığın tanısı ve gelişimini açıklamada yetersiz kalmaktadır. Biyomarkır olarak kabul edilen biyokimyasal ve moleküler analizler sonucunda beklenen iyi bir tanı, hastalığın detaylı takibi ve uygulanan sitotoksik ajanların etkilerinin gözlenmesidir. Bu nedenle bilinen diğer epitel kökenli kanser tipleri için geçerli olan biyomarkırlar prostat kanseri için yeterli değildir. Özellikle kötü gelişime sahip prostat kanser hücrelerini ayırt edecek ve bunlar üzerinde inhibitör etkisi yapacak yeni moleküllerin keşfine ihtiyaç duyulmaktadır (Schipper, 2000). Erken evrede teşhis edilen, prostat kanserli hastaların % 80-85 i ameliyat ile iyileştirilebilmektedir. Metastaz yapmış ileri evre prostat kanseri vakalarında, anti-androjen tedavisinin bir süreliğine olumlu yanıt vermesine karşın uzun süreli tedavi ile hücrelerin ya anti-androjene karşı hassasiyetlerini kaybettikleri ya da anti-androjen tedaviye cevap veren tüm prostat hücre tiplerinin ölmesi ve yerine sadece anti-androjene cevap vermeyen tiplerin kalması ile hastalığın agresif bir şekilde ilerleyerek hastanın ölümü gerçekleşmektedir. Bu nedenle, prostat kanserinin erken teşhisi günümüzde oldukça önem kazanmış bir konu haline almıştır. 1500 kişinin prostat örneklerinden elde edilen RNA mikroarray çalışmaları ile yapılan bir araştırmada *Ezh2*, *Amacr* gibi genlerin ileri evre metastatik prostat kanseri için yüksek oranda eksprese edildikleri saptanmış olsa da bu biyomarkırlar henüz PSA gibi kabul görmemişlerdir. Bu nedenle, hastalığın önceden gelişimini belirleyecek, uygulanan tedaviye olan cevabı görüntüleyebilecek ve hastalığın gelişimini takip edebilecek kapasitede biyomarkırlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Diğer taraftan Put, Spd ve Spm olarak bilinen doğal PA'ler alifatik aminler olup hücre büyümesi, farklılaşması ve tümör gelişiminde çok önemli rollere sahiptir. 17. yüzyılda Anthon Van Leeuwenhoek, insan semeninde Spm'in varlığını kanıtlayan ilk araştırmacı olmuştur. Bundan sonraki 200 yıl boyunca da PA'lerin kimyasal yapıları üzerine yapılan çalışmalar sayesinde semen içerisinde PA'lerin biyokimyasal etki mekanizmaları detaylı olarak araştırılmıştır (Schipper, 2000). Bu nedenle prostat bezi ve PA metabolizması arasındaki ilişkiyi göstermek üzere yapılan çalışmalar da önem kazanmaktadır. Özellikle kanserli hastalarda Put, Spd, Spm ya da total PA miktarının (serbest ve asetile formları) kan ve idrar örneklerinde sağlıklı kişilere göre daha yüksek konsantrasyonlarda oldukları saptanmıştır (Bergeron ve ark., 1998). Cipolla ve arkadaşları (1992), benign prostat hiperplazisi (BPH), lokalize prostat kanseri ve yayılmış prostat kanseri hastalarında kan eritrositlerinde PA düzeylerini araştırmışlar ve değişik evreler ile PA düzeyleri arasında bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. İnsan ve sıçan prostat bezindeki epitel hücreleri çok fazla oranda PA üreten hücrelerdir. PA'ler hücre çoğalması ve farklılaşması için çok önemli faktörlerdir. Cipolla ve arkadaşları (2002), yapmış oldukları bir çalışmada, PA'den yoksun olan diyet menülerini değişik tipte prostat kanseri hastalarına uygulamışlar ve yüksek olan PSA değerlerini bu diyet ile stabilize etmeyi başarmışlardır. Günümüze kadar yapılmış olan yayınlar PA'lerin prostat hücrelerinin normal ve kanser karakterdeki gelişimleri üzerindeki rollerini oldukça iyi açıklamaktadır. Örneğin Srinath ve arkadaşları (2002), prostat hücre hatlarının prostat kökenli olmayan diğer hücre hatlarına göre daha fazla radyoaktif PA alabildiğini göstermişlerdir. Bu çalışma ve benzerleri PA'lerin pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi kanserin izlenmesi için önemli tekniklerde kullanılabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, PA metabolizmasının prostat kanseri açısından çözümlenmesi gittikçe önem kazanmaktadır. Schipper ve arkadaşları (2000), prostat kanseri hücrelerinin çoğalması için PA biyosentezinin özellikle de Put ve Spd düzeylerinin artması gerektiğini belirtmişlerdir. Ayrıca prostat bezinin Spm gibi salgı ürünleri ile dolu geniş bir epitel hücre hacmine sahip olduğunu ve dolayısıyla hücre organizasyonlarındaki değişimler sonucunda bu ürünlerin miktarında da değişiklikler olabileceğini göstermişlerdir. Kastrasyona uğramış farelerde DFMO ile ODC aktivitesinin indirgenmesi sonucunda, prostat asini hücrelerinde azalma ve testosterona bağlı prostat büyümesinin engellendiği gösterilmiştir. Spd ve Spm konsantrasyonunun prostat bezinde diğer organlara göre daha yoğun olması nedeni ile DFMO ve diğer PA

inhibitörleri ile yapılan çalışmalardan çarpıcı sonuçlar elde edilmektedir. DFMO'in ODC aktivitesi ve tümör büyümesini prostat kanserinde inhibe ettiği Heston ve arkadaşları (1982) tarafından gösterilmiştir. ODC indirgeyici faktörler içeren yeşil çay tüketiminin fazla olduğu beslenme alışkanlığına sahip Japon epidemiyolojik çalışmalarında prostat kanserinin çok nadir olması bir diğer çalışma konusu olarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile gösterilmiştir (Ahmad ve ark., 1997; Paschka ve ark., 1998; Gupta ve ark., 1999). Ancak DFMO'in sitotoksik etkilerinin engellenememesi nedeni ile PA analogları gibi diğer inhibitör maddeler üzerine yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. Buna rağmen Loprinzi ve arkadaşları (1996), 35 hasta üzerinde günde 0,125-1,0 gr DFMO uygulaması ile sitotoksikite deneylerine devam eden araştırmacılar arasında yer almaktadırlar.

Yapılan diğer çalışmalarda uygulanan kemoterapötik maddeler için hücresel cevapların önemli oldukları vurgulanmıştır. Örneğin, hücre SSAT aktivitesi, PA biyosentezinin çeşitli nedenler ile negatif regülasyonu, doğal PA kaynaklarının azalması (PA içermeyen diyet veya gastrointestinal sistemde antibiyotik kullanımı ile bakteri florasının uzaklaştırılması) uygulanan kemoterapötik maddeye duyarlılığı arttırmaktadır. Androjene bağımsız DU145 hücrelerine PA analogu DENSp_m uygulanması sonucunda hücrelerin androjene hassas LNCap hücrelerinden daha fazla kemoterapötik maddeye cevap verdikleri gözlenmiştir (McCloskey ve ark., 1996; Ha ve ark., 1998).

Prostat kanseri için PA metabolizması ile ilgili yapılacak denemelerden önce hücrelerin genel genomik karakteristiğinin gösterilmesi önem kazanmıştır. Dolayısıyla hücrelerdeki anti-apoptotik ve apoptotik proteinlerin ekspresyonları, androjen reseptör mutasyonları ve bunların miktarları, çeşitli polimorfizmlerin sitotoksik ajan uygulanmadan önce biliniyor olması, sitotoksik ajana karşı geliştirilen cevabın anlaşılması için önemlidir.

Tümör gelişiminin belirleyici unsuru hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengeye dayanmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinin başarılı bir şekilde meydana getirilmesi ya çoğalma hızının azaltılmasına, ya da hücre ölüm oranının artırılmasına bağlıdır. Standart sitotoksik kemoterapilerde hücre çoğalma oranı aktif olarak çoğalan

hücrelerin sayılarının azaltılması ile düşürülür. Ne yazık ki, prostat kanseri hücrelerinin çoğu aktif olarak çoğalan hücreler değildir ve bu nedenle standart sitotoksik kemoterapiye karşı dirençlidirler (Berges ve ark., 1995). Yayılmış prostat kanserinin standart tedavisi (androjenin kesilmesi gibi) prostat kanser hücrelerindeki hücre ölümünü artırma amaçlı yapılmaktadır. Bununla birlikte androjenin uzun süreli kesilmesi hastaların hem androjene bağımlı hem de androjene bağımlı olmayan prostat kanseri hücrelerine sahip olmalarından dolayı başarılı sonuçlar verememiştir (Isaacs ve ark., 1987).

Yapılan çeşitli çalışmalarda prostat kanserinin PA metabolik enzim inhibitörleri ya da PA analogları ile olan ilişkisi ve yapılan tedavilerin ne kadar hücre büyümesine ket vurduğu ya da apoptozu nasıl etkilediği gösterilmektedir. Dolayısıyla bu çalışmalar PA'lerin prostat kanserinde önemli birer biyomarkır ve prostat kanserinin kemoterapisinde umut verici birer hedef olarak kullanılabilirliklerini ortaya koymaktadır (Schipper, 2000). PA biyosentez enzimlerini inhibe ederek PA homeostasını kontrol eden ve PA analogları olarak adlandırılan birçok bileşik bulunmaktadır. Ancak bu bileşikler *in vitro* olarak tümör hücre gelişimini baskılayabildikleri halde, sitotoksik olmalarından dolayı *in vivo* koşullarda başarılı birer anti-kanser ajanı olamamışlardır. Bu nedenle prostat kanserinin tedavisinde yeni terapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Günümüzde kanser hücrelerinin normal bölünme ve apoptoz için gerekli olan genlerinde değişikliklere uğradıkları gösterilmiştir. Hücre döngüsü enzimlerinin bağlı olduğu bir grup serin-treonin protein kinazlar sikline bağımlı kinazlar (CDK) olarak bilinirler ve düzenleyici alt üniteleri olan siklinlere bağlanırlar. Doğal CDK inhibitörleri siklin-CDK komplekslerine bağlanarak bunların aktivitelerini inhibe ederler ve böylece hücre döngüsü bloke edilmiş olur. Sitokinlerle yapılan çalışmalar sırasında *cdk1* gen ailesinin spesifik inhibitörleri keşfedilmiştir. Bunlardan ilk sentezlenen olomisin (6-benzilamino-2-(2-hidroksietilamino)-9-metilpürin) (OC) hücreleri G1/S ve G2/M sınırında durdurma yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır. OC'in ayrıca *in vitro* koşullarda tümör hücrelerinde apoptozu uyardığı ve *in vivo* koşullarda çeşitli tümör modellerinde etkili olduğu saptanmıştır (Vesely ve ark., 1994). Bu araştırmacılar ayrıca roskovitin ve BOH gibi diğer CDK inhibitörleri de sentezlemişler ve bu maddelerin

birçok insan kanser hücre hatlarında hücre canlılığında ket vurucu etkiye sahip olduklarını göstermişlerdir.

Bu araştırmanın ilk amacı giriş kısmında da belirtildiği gibi CDK inhibitörü BOH'in farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisini incelemektir. Standart sitotoksik doz olarak seçilen 15 μ M BOH'in 24 saat süre ile uygulanmasının metastaz yapma eğilimi az (AT-2) sıçan prostat kanseri hücre hatlarının hücre canlılığında % 83 ve metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lyly) sıçan prostat kanseri hücre hatlarının hücre canlılığında % 82 oranında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. 48 saatlik BOH uygulaması sonucunda ise AT-2 ve MAT-Lyly hücre hatlarının her ikisinde de hücre canlılığının % 96 oranında ket vuruya uğradığı belirlenmiştir.

Bu sonuçlara korele sonuçlar Mad'arova ve arkadaşlarının (2002), OC ve BOH'in büyüme ve canlılık üzerinde etkili bir inhibitör olduğunu gösterdikleri araştırmalarında elde edilmiştir. Bu çalışmada androjene hassas olan LNCap hücrelerinde 100 μ M OC ve 30 μ M BOH'in hücre büyümesi üzerinde %50 oranında inhibisyona neden olduğunu, buna karşın androjene hassasiyeti olan DU145 hücrelerinde 200 μ M OC ve 80 μ M BOH'in % 50 oranında azalmaya sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmada, zamana bağlı yapılan doz denemesi sonucunda 24 saatlik kültürlerde, hücrelerde OC için istatistiksel oranda anlamlı sonuç saptanamazken BOH için inhibisyon düzeyinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. 24 saatlik BOH uygulaması DU145 hücrelerinde tüm uygulanan dozlarda (10-160 μ M) aynı oranda inhibisyona neden olurken (yaklaşık % 20), LNCap hücrelerinde 60 μ M BOH uygulaması sonucunda yaklaşık % 50 oranında azalma tespit edilmektedir. İnsan hücreleri ile yapılan bu çalışmada BOH'in sitotoksikite değeri oldukça yüksek konsantrasyon değerlerinde saptanmıştır. Sıçan hücrelerinde ise BOH'in inhibe edici değeri bu çalışmada çok daha düşüktür. Bu durumda BOH'in değişik hücre hatlarında doz denemelerinin devam etmesi ve mümkün olan en düşük sitotoksik değerlerin etkin bir şekilde kullanımı yararlı olacaktır.

Ayrıca Kovarova ve arkadaşları (2002), tarafından BOH uygulanan lösemi hücre hattı CEM ve akciğer kanseri hücre hattı A549 üzerinde yapılan proteomik çalışmalarda, BOH in total protein düzeyinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada ise,

metastaz yapma eğilimi az ve metastaz yapma eğilimi çok sıçan prostat kanseri hücrelerine 15 µM BOH uygulanması sonucunda AT-2 ve MAT-Lylü hücrelerinin total protein miktarları üzerinde uygulamadan 24 saat sonra yaklaşık olarak % 30 ve % 59 oranında azalma olduğu belirlenmiştir. 48 saatlik uygulama sonucunda ise, kontrole kıyasla AT-2 hücrelerinde % 43, MAT-Lylü hücrelerinde ise % 14 oranında ket vuru tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalara göre, PA biyosentez inhibitörleri ve PA analogları hücre bölünmesinde asinkronizasyona neden olmaktadır. Hücresel PA içeriğinde meydana gelen azalma büyüme inhibisyonunu ortaya koymaktadır ve bu durum eksojen PA eklenmesi ile eski haline geri dönebilmektedir. PA eksikliği nedeni ile hücre devrinin durması esnasında PA'lerin hücre siklusunun değişik kısımlarında etkili olduğu gösterilmiştir (Kramer ve ark., 1999; Kramer ve ark., 2001). PA eksikliği çoğunlukla hücrelerin G1 fazında durmasına neden olmaktadır. Halen bu mekanizmanın moleküler temeli çözümlenememiştir. MALME-3M melanoma hücre hattında, N¹,N¹¹-dietilnorspermin tarafından teşvik edilen tümör baskılayıcı gen *p53*, ve iki tane doğal CDK inhibitörü olan *p21* ve *p27* hücrelerin G1 fazında kalmalarına neden olmaktadır. N¹,N¹¹-dietilnorspermin aynı zamanda siklin D1, CDK2, siklin E, E2F-1 ve CDK inhibitörü *p27* ekspresyonu artırıcı bir etken olarak meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. Siklin A ve PA düzeyleri arasındaki ilişki ise halen birçok kanser hücre hattı için araştırılmaktadır (Oredsson, 2003). Nilsson ve arkadaşları (2005), ODC aşırı ekspresyonunun *myc* ile artan CDK baskılanmasını ortadan kaldırdığı ve hücrelerin ODC aşırı ekspresyonunu CDK inhibitörlerine karşı duyarlı hale getirdiğini göstermiştir. Bu nedenle *Odc*, kritik *myc* transkripsiyonun hedefi olup, hücre döngüsünde kontrol noktalarını tümörigeneze karşı etkin olarak korumaktadır.

Bu çalışmada ise metastaz yapma eğilimi az, AT-2 sıçan prostat kanseri hücre hatlarında 24 saat 15 µM BOH'in hücre içi Put düzeyi üzerinde 2 kat, buna karşın metastaz yapma eğilimi çok, MAT-Lylü sıçan prostat kanseri hücre hatlarında ise 7 kat ve 48 saat sonunda 12 kat ket vuruya neden olduğu görülmüştür. Hücrelerin Spd düzeyleri incelendiğinde, BOH'in 24. saatte MAT-Lylü hücrelerine kıyasla AT-2 hücrelerinde inhibisyon açısından daha fazla etkili olduğu, buna karşın 48. saat BOH uygulamasının her iki hücre hattında da yaklaşık % 90 oranında azalmaya neden olduğu

saptanmıştır. Diğer taraftan, 24 saat süresi ile BOH uygulanmış AT-2 hücre hatlarının Spm düzeylerinde MAT-Lyly hücrelerine göre daha az oranda azalma meydana gelmişken, 48. saatin sonunda heriki hücre hattının Spm düzeylerinde aynı oranda azalma olduğu saptanmıştır.

Schipper ve arkadaşları (2000), sıçan prostat kanserinde androjenin etkisi üzerine yapmış oldukları çalışmalarda, ODC'in androjen kontrolünde çalıştığını göstermişlerdir. Yani, ODC mRNA transkript oluşumu androjenler tarafından teşvik edilmektedir. Bu nedenle, prostat bezinde yüksek PA miktarının tespit edildiği düşünülmektedir. Çeşitli fare türlerinde yapılan çalışmalarda, ODC promoter bölgesinde androjenden sorumlu elementlerin (ARE) androjen reseptörüne (AR) bağlandıklarını göstermişlerdir (Croizat ve ark. 1992b). AR'nün bulunduğu hücrelerde yapılan *in vitro* çalışmalarda çevresel faktörlerin anti-androjenik etkileşimlerinin ODC seviyesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. AR ekspresyon seviyesi ODC ile sıkı bir korelasyona sahiptir. Dolayısıyla, ODC androjenite için bir markır olarak kabul edilmektedir (Svechnikov ve ark., 2000; Nelleman ve ark., 2005).

Metastaz yapmış prostat kanserli sıçanlarda yapılan kastrasyon sonucunda androjen miktarının azaldığı ve kanserde gerileme olduğu gözlenmiştir. Anti-androjen ortamın prostat kanseri için tedavi seçeneği olması buna bağlıdır. Kastrasyon ile prostat hücrelerinde apoptoz oranının arttığı, ODC aktivitesi ve PA seviyelerinde düşüş meydana geldiği, buna karşın SSAT aktivitesinde pozitif yönde artış olduğu saptanmıştır (Fjosne ve ark, 1990; Fjosne ve ark,1992).

ODC, PA sentezinin düzenleyici enzimlerinden biridir ve ornitin PA'lerin öncüsü olan Put'e dönüşmesini katalizler. ODC ekspresyonu kanser hücrelerinde pozitif yönde düzenlenir. Böylece birçok tümör çeşidinde ODC ve buna bağlı olarak da PA düzeyi artar. Yapılan çalışmalarda, hücre transformasyonu sırasında onkogen ekspresyonları ile ODC'in aşırı ekspresyonunun pozitif yönde korelasyon gösterdikleri saptanmıştır (Shantz ve Pegg, 1998). Saverio ve arkadaşları (2000), ODC transkripsiyonunun kanserli hücrelerde normal hücrelere oranla çok daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. ODC-mRNA ve ODC aktivitesinin androjenler aracılığıyla arttığı ve özellikle prostat epitel hücrelerinde ODC ekspresyonu arttığı belirlenmiştir (Croizat ve ark., 1992b;

Fjosne ve ark., 1992). ODC aktivitesinin DFMO ile inhibe edilmesi sonucunda prostat bezinin büyüklüğü azalmaktadır. Kastre edilmiş sıçanlarda testosteronun kesilmesi ile prostat büyümesi yavaşlamasının, ODC aktivitesinin azalışı ile yakından ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Bununla birlikte insülin benzeri büyüme faktörü 1'in (IGF-1) arttırdığı prostat gelişimi de inhibe olmaktadır. Eğer ODC apoptozda aktif bir rol oynuyorsa, ODC enzim aktivitesindeki azalma apoptozun meydana gelmesini inhibe ediyor olmalıdır. ODC aktivitesinin DFMO ile inhibe olması sonucunda hemen hemen her sistemde apoptozu da inhibe ettiği saptanmıştır (Penning ve ark., 1998).

Bu çalışmada, BOH'in hem metastaz yapma eğilimi az (AT-2) ve hem de metastaz yapma eğilimi çok (MAT-Lylu) sıçan prostat kanseri hücre hatlarında ODC mRNA ekspresyonunu baskıladığı saptanmıştır. ODC mRNA seviyesindeki azalma, hücre ölümleri ve PA seviyeleri ile korelasyonu göstermektedir.

Belirli kanser türlerinde mutasyona uğramış veya negatif yönde düzenlenmiş *Bax* geni belirlenmiştir. Bu genin çalışmaması sonucunda farelerde tümör gelişimi artmaktadır. *Bax* apoptozu teşvik eden pro-apoptotik bir genidir. *Bax*'ın aşırı ekspresyonu apoptotik hücre ölümünü hızlandırır. *Bax* doğrudan mitokondriyi aktive eder, sitokrom c'nin serbestlenmesini ve diğer mitokondriyal olayları (mitokondri membran potansiyelinin kırılması) ve pro-apoptotik faktörlerin serbestlenmesini tetikler. Klinik veriler, pro-apoptotik homolog kayıplarının özellikle anti-kanser terapiye dirençle uyumlu olduğunu göstermiştir. Pro-apoptotik *Bax*'ın kaybı tüm kanserlerde değilse bile bazı kanserlere seçici bir şekilde direnç kazandırmaktadır. Bu durumda tüm kanser terapilerinin değil ama bazılarının *Bax*'a bağımlı hücre ölümüne dayandığı ortaya çıkmış olmaktadır. Kanserde *Bax*'ın inaktive olması *Bcl-2*'nin hedef ajan olduğunu göstermektedir. *p53* birçok kolon kanserinde mutasyona uğradığından ve *Bax* ekspresyonu *p53* tarafından uyarıldığı için pro-apoptotik *Bcl-2* ailesi üyesi *Bax*'ı kodlayan gen, insan kolon kanserlerinde hasarlıdır. Verilere göre, *Bax* normal olarak kolondaki tümörleri baskılamaktadır. Meme kanserinde *Bax* ekspresyonu sitotoksik ilaç terapisine karşı hassasiyeti artırmaktadır ve *Bax* ekspresyonundaki azalmanın kemoterapiye olan zayıf cevap ile ilişkide olduğu saptanmıştır (Sturm ve ark., 2005). *Bcl-2*'nin aşırı ekspresyonunun prostat kanseri hücrelerini apoptozdan koruduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. *Bcl-2* gen ailesi prostat kanserinin gelişiminde rol oynamaktadır ve anti-

kanser tedavisine karşı dayanıklıdır. Bu durum dikkate alındığında androjen reseptör-pozitif tümörler ve *Bax* ekspresyonu arasındaki önemli ilişki de gösterilmiştir (Amirghofran ve ark., 2004). İnsan prostat kanseri hücre hatları, LNCap, DU-145 ve PC3 ile yapılan moleküler profil analizlerinde, hormona duyarlı olan DU-145 hücrelerinde *Bcl-2* normal seviyelerde ekspresyona sahipken, bir diğer hormona duyarlı PC3 hücrelerinde aşırı ekspresyona sahiptir. LNCap ise hormon direncine sahip bir hücre hattı olup, *Bcl-2* aşırı ekspresyonuna sahiptir (Martel ve ark., 2003). Anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin birbirlerine oranlarının, tedavi öncesinde belirlenmesinin, tedaviye verilebilecek cevabı önceden belirleyebileceği yönünde çalışmalar mevcuttur. Özellikle, *Bcl-2/Bax* ekspresyon oranı prostat kanseri tedavi aşamasında hastalığın gelişimini görüntüleme amaçlı önerilen biyomarkırlardan birisidir (Mackey ve ark., 1998). Bu çalışma da, *Bcl-2/Bax* ekspresyon oranı fazla olan kişilerde radyoterapiye cevap azdır. Ayrıca *Bcl-2* antisens tedavisi ile diğer sitotoksik ajanların uygulanması tedaviye direncin indirgenmesi için bir alternatif olarak düşünülmektedir (Gleave ve ark., 1999). BOH uygulanan metastaz yapma eğilimi az ve çok sıçan prostat kanseri hücre hatlarında *Bax* mRNA miktarındaki azalış, diğer çalışmalarla çelişkilidir. Sitotoksik ajan uygulandığında pro-apoptotik gen miktarında artış beklenmesine karşın, BOH uygulaması sonucunda AT-2 ve MAT-Lyly hücrelerinde *Bax* cDNA miktarında azalma tespit edilmiştir. Ancak yapılan insan prostat kanseri ile ilgili çalışmalarda *Bcl-2* ve *Bax*'ın ekspresyonunun kanser hücrelerinin gelişim düzeyi ve evresi ile düzensizliğe uğradığı da belirtilmektedir (Norris ve ark., 2001). Ancak diğer sitotoksik tedavilerde olduğu gibi BOH uygulanan hücrelerde *Bax* mRNA seviyesinde azalma gözlenmemiştir. Bu nedenle bu hücreler için hücre ölümleri için başka bir yolağın etkin olduğu düşünülebilir. Dolayısıyla, BOH'in apoptoz ile ilişkisi diğer apoptotik ve anti-apoptotik genlerin veya proteinlerin araştırılması ile kesinlik kazanabilecektir.

Bu araştırmada elde edilen verilerin Bax proteini dışındaki apoptotik parametrelerle desteklenmesi, bu çalışmanın devamında amaçlanmaktadır. Böylelikle bu araştırma da ortaya konan bulgular, farklı bakış açıları ile de desteklenmiş olacaktır.

Sonuç olarak, bu araştırmada prostat kanseri hücrelerinde yeni jenerasyon bir sitotoksik ajan olan BOH tedavisine moleküler cevabın potansiyel biyomarkırı olarak, yüksek oranda bulunan PA'lerin kullanılabilirleri gösterilmek istenmiştir. Yapılan bu araştırmanın prostat kanserinin teşhis ve tedavisinde çalışabilecek diğer poliamin metabolizması ile ilgili çalışmalara yeni bir basamak oluşturması mit edilmektedir.

KAYNAKLAR

Ahmad N, Feyes DK ve Nieminen AL. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 89: 1881-1886, 1997.

Alhonen L, Parkkinen JJ, Keinänen T, Sinervirta R, Herzig KH ve Jänne J. Activation of polyamine catabolism in transgenic rats induces acute pancreatitis. *Proc Natl Acad Sci.* 97(15): 8290-8295, 2000.

Allen JC, Smith CJ, Hussain JI, Thomas JM ve Gaugas JM. Inhibition of lymphocyte proliferation by polyamines requires ruminant-plasma polyamine oxidase. *Eur J Biochem.* 102: 153-158, 1979.

Alm K, Berntsson PS, Kramer DL, Porter CW ve Oredsson SM. Treatment of cells with the polyamine analog N1,N11-diethylnorspermine retards S phase progression within one cell cycle. *Eur J Biochem.* 267: 4157-4164, 2000.

Amirghofran Z, Monabati A ve Gholijian N. Androgen receptor expression in relation to apoptosis and the expression of cell cycle related proteins in prostate cancer. *Pathol Oncol Res.* 10(1): 37-41, 2004.

Babbar N, Ignatenko NA, Casero RA ve Gerner EW. Cyclooxygenase-independent induction of apoptosis by sulindac sulfone is mediated by polyamines in colon cancer. *J Biol Chem.* 278: 47762-47775, 2003.

Balasundaram D, Tabor CW ve Tabor H. Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 88(13): 5872-5876, 1991.

Balasundaram D, Tabor CW ve Tabor H. Oxygen toxicity in a polyamine-depleted spe2 delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 90(10): 4693-4697, 1993.

Bancroft D, Williams LD, Rich A ve Egli M. The low-temperature crystal structure of the pure-spermine form of Z-DNA. *Biochemistry*. 33: 1073-1086, 1994.

Bardocz S, Duguid TJ, Brown DS, Grant G, Pusztai A, White A, Ralph A. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br J Nutr*. 73: 819-828, 1995.

Bardocz S, Grant G, Hughes EL, Brown DS, Pusztai A. Uptake, inter-organ distribution and metabolism of dietary polyamines in the rat. In: *Polyamines in Health and Nutrition*. Bardocz S., White A. (Eds.) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers 241-258, 1999.

Basu HS, Sturkenboom MC, Delcros JG, Csokan PP, Szollosi J, Feuerstein BG ve Marton LJ. Effect of polyamine depletion on chromatin structure in U-87 MG Human brain tumour cells. *Biochem J*. 282(Pt 3): 723-727, 1992.

Basu HS, Smirnov IV, Peng HF, Tiffany K, Jackson V. Effects of spermine and its cytotoxic analogs on nucleosome formation on topologically stressed DNA *in vitro*. *Eur J Biochem*. 243: 247-258, 1997.

Bauer PM, Buga GM, Fukuto JM, Pegg AE ve Ignarro LJ. Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *J Biol Chem*. 276: 34458-34464, 2001.

Bello-Fernandez C, Packham G ve Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of *c-myc*. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 90(16): 7804-7808, 1993.

Bergeron RJ, Wiegand J, Weimar WR ve Snyder PS. Polyamine analogue antiarrhythmics *Pharmacol Res*. 38(5): 367-380, 1998.

Berges RR, Vukanovik J, Epstein JI, CarMichel M, Cisek L, Johnson DE, Veltri RW, Walsh PC ve Isaacs JT. Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res.* 1: 473-480, 1995.

Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, Pinna C, Roncaglia R, Boraldi F, Tiozzo R, Sharrard M. ve Corti A. Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett.* 446: 18-22, 1999.

Bogle RG, Mann, GE, Pearson JD ve Morgan DM. Endothelial polyamine uptake: Selective stimulation by L-arginine deprivation or polyamine depletion. *Am J Physiol.* 266(3 Pt 1): C776-783, 1994.

Bowman WH, Tabor CW ve Tabor H. Spermidine biosynthesis. Purification and properties of polyamine transferase from *Eschericia coli*. *J Bio Chem.* 248: 2480-86, 1973.

Brachet P, Debbabi H. ve Tome D. Transport and steady-state accumulation of putrescine in brush-border membrane vesicles of rabbit small intestine. *Am J Physiol.* 269: G754-762, 1995.

Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254, 1976.

Brooks WH. Polyamine involvement in the cell cycle, apoptosis, and autoimmunity. *Med Hypotheses.* 44: 331-338, 1995.

Brunton VG, Grant MH, Wallace HM. Mechanisms of spermine toxicity in baby-hamster kidney (BHK) cells. The role of amine oxidases and oxidative stress. *Biochem J.* 280:193-198, 1991.

Brzozowski T, Konturek SJ, Drozdowicz D, Dembinski A ve Stachura J. Healing of chronic gastric ulcerations by L-arginine. Role of nitric oxide, prostaglandins, gastrin and polyamines. *Digestion*. 56: 463–471, 1995.

Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Fukuto JM ve Ignarro LJ. N-hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *Am J Physiol*. 275: R1256-R1264, 1998.

Casero RA, Pegg AE. Spermidine/spermine N¹-acetyltransferase-the turning point in polyamine metabolism. *FASEB Journal*. 7: 653-61, 1993.

Cipolla B, Guille F ve Quemener B. The diagnostic value of erythrocyte polyamines (EPA) in prostatic adenocarcinoma (PA): apropos of 100 patients. *Prog Urol*. 2: 50-57, 1992.

Cipolla B, Guille F ve Moulinoux J. Polyamine reduced diet in metastatic hormone-refractory prostate cancer (HRPC) patients. *Nuclear Med Biol*. 29(4): 497-503, 2002.

Coffino P. Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimie*. 83(3-4): 319-323, 2001a.

Coffino P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(3): 188-194, 2001b.

Coligan AM, Kruisbeek DH, Margulies EM, Shevach W, Strober JE. *Current Protocols*. John Wiley & Sons. Cahpter 10, Section V, Unit 10, 1997.

Crozat A, Palvimo JJ, Julkunen M, Janne OA. Comparison of androgen regulation of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression in rodent kidney and accessory sex organs. *Endocrinology*. 130: 1131-1144, 1992a.

Crozat P, Bouchon D, Lustrac A, Aniel F, Jin Y, Adde R, Vernet G, Etienne B ve Launois H. Cryogenic behavior of ultrashort gate AlGaAs/GaAs and pseudomorphic AlGaAs/InGaAs/GaAs HEMT's. *Microelectronic Engineering*. 19 (1-4): 861-864, 1992b.

Davidson K, Petit T, Izbicka E, Koester S, Von-Hoff DD. Mitoguazone induces apoptosis via a p53-independent mechanism. *Anticancer Drugs*. 9: 635-640, 1998.

Davis RH, Morris DR ve Coffino P. Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxylase. *Microbiological Reviews*. 56: 280-90, 1992.

Deng H, Bloomfield VA, Benevides JM ve Thomas GJ. Structural basis of polyamine-DNA recognition: Spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by raman spectroscopy. *Nucleic Acids Res*. 28(17): 3379-3385, 2000.

Desiderio MA, Grassilli E, Bellesia E, Salomoni P, Franceschi C. Involvement of ornithine decarboxylase and polyamines in glucocorticoid-induced apoptosis of rat thymocytes. *Cell Growth Differ*. 6: 505-513, 1995.

Desiderio MA, Dansi P, Tacchini L ve Bernelli-Zazzera A. Influence of polyamines on DNA binding of heat shock and activator protein 1 transcription factors induced by heat shock. *FEBS Lett*. 455(1-2): 149-153, 1999.

Drolet G, Dumbroff EB, Legge RL, Thompson JE. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*. 25: 367-371, 1986.

Dunzendorfer U, Releya N, Whitmore WF, Fogh J, Balis ME. Some effects of inhibitors of polyamine biosynthesis on experimental prostatic cancer. *Drug Res*. 34: 36-39, 1984.

Eiseman JL, Rogers FA, Guo Y, Kauffman J, Sentz DL, Klinger MF, Callery PS, Kyprianou N. Tumor targeted apoptosis by a novel spermine analogue, 1,12-diaziridinyl-4,9-diazadodecane, results in therapeutic efficacy and enhanced radiosensitivity of human prostate cancer. *Cancer Res.* 58: 4864-4870, 1998.

Erez O, Goldstaub D, Friedman J ve Kahana C. Putrescine activates oxidative stress dependent apoptotic death in ornithine decarboxylase overproducing mouse myeloma cells. *Exp Cell Res.* 281: 148-156, 2002.

Fakler B, Brandle U, Bond C, Glowatzki E, Koenig C, Adelman J, Zenner HP ve Ruppertsberg JP. A structural determinant of differential sensitivity of cloned inwardrectifier K⁺ channels to intracellular spermine. *FEBS Lett.* 356: 199-203, 1994.

Felschow DM, Macdiarmid J, Bardos T, Wu R, Woster PM ve Porter CW. Photoaffinity labeling of a cell surface polyamine binding protein. *J Biol Chem.* 270(48): 28705-28711, 1995.

Felschow DM, Mi Z, Stanek J, Frei J. ve Porter CW. Selective labelling of cell-surface polyamine-binding proteins on leukaemic and solid-tumour cell types using a new polyamine photoprobe. *Biochem J.* 328(Pt 3): 889-895, 1997.

Feuerstein BG, Pattabiraman N ve Marton LJ. Spermien-DNA interactions: A theoretical study. *Proc Natl Acad Sci.* 83: 5948-5952, 1986.

Feuerstein BG, Pattabiraman N ve Marton LJ. Molecular dynamics of spermine-DNA interactions: Sequence specificity and DNA bending for a simple ligand. *Nucleic Acids Res.* 17(17): 6883-6892, 1989.

Feuerstein BG, Pattabiraman N. Molecular mechanics of the interaction of spermine with DNA: DNA bending as a result of ligand binding. *Nucleic Acids Res.* 1271-1282, 1990.

Feuerstein BG, Williams LD, Basu HS ve Marton LJ. Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions. *J Cell Biochem.* 46(1): 37-47, 1991.

Ficker E, Tagliatela M, Wible BA, Henley CM ve Brown AM. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science.* 266: 1068-1072, 1994.

Fjosne HE, Ostensen MA, Haarstad H, Sunde A. Androgen regulation of polyamine synthesis in seminal vesicle and in different lobes of the rat prostate. *Prostate.* 17: 1-11, 1990.

Fjosne HE, Strand H, Sunde A. Dose-dependent induction of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase activity by testosterone in the accessory sex organs of male rats. *Prostat.* 21: 239-245, 1992.

Fong WF, Heller JS ve Canellakis ES. The appearance of an ornithine decarboxylase inhibitory protein upon addition of putrescine to cell cultures. *Biochim Biophys Acta.* 428: 456-465, 1976.

Fredlund JO, Johansson MC, Dahlberg E ve Oredsson SM. Ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase expression during the cell cycle of chinese hamster ovary cells. *Exp Cell Res.* 216: 86-92, 1995.

Fredlund JO ve Oredsson SM. Impairment of DNA replication within one cell cycle after seeding of cells in the presence of a polyamine-biosynthesis inhibitor. *Eur J Biochem.* 237(3): 539-544, 1996a.

Fredlund JO ve Oredsson SM. Normal G1/S transition and prolonged S phase within one cell cycle after seeding cells in the presence of an ornithine decarboxylase inhibitor. *Cell Prolif.* 29(8): 457-466, 1996b.

Fujita K, Murakami Y ve Hayashi SA. Macromolecular inhibitor of the antizyme to ornithine decarboxylase. *Biochem J.* 204: 647-652, 1982.

Gahl WA ve Pitot HC. Putrescine-oxidase activity in adult bovine serum and fetal bovine serum. *In Vitro*. 15: 252-257, 1979.

Ghoda L, Van Daalen Wetters T, Macrae M. Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science*. 243: 1493-95, 1989.

Gleave ME, Miyake H, Goldie J, Nelson C ve Tolcher A. Targeting *Bcl-2* gene to delay androgen-independent progression and enhance chemosensitivity in prostate cancer using antisense *Bcl-2* oligodeoxynucleotides. *Urology*. 54 (6): 36-46, 1999.

Grassilli E, Bettuzzi S, Monti D, Ingletti MC, Franceschi C ve Corti A. Studies on the relationship between cell proliferation and cell death: Opposite patterns of SGP-2 and ornithine decarboxylase mRNA accumulation in PHA-stimulated human lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 180(1): 59-63, 1991.

Gupta S, Ahmad N, Mohan RR, Husain MM, Mukhtar H. Prostate cancer chemoprevention by green tea: *in vitro* and *in vivo* inhibition of testosterone-mediated induction of ornithine decarboxylase. *Cancer Res*. 59: 2115-2120, 1999.

Ha HC, Woster PM, Yager JD, Casero RAJ. The role of polyamine catabolism in polyamine analogue induced programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci*. 94: 11557-11562, 1997.

Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RAJ. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci*. 95: 11140-11145, 1998.

Haghighi AP ve Cooper E. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors are blocked by intracellular spermine in a voltage-dependent manner. *J Neurosci*. 18(11): 4050-4062, 1998.

Haghighi AP ve Cooper E. A molecular link between inward rectification and calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci.* 20: 529-541, 2000.

Haidar MA, El-Hajj H, Bueso-Ramos CE, Manshoury T, Glassman A, Keating MJ ve Albitar M. Expression profile of MDM-2 proteins in chronic lymphocytic leukemia and their clinical relevance. *Am J Hematol.* 54: 189-195, 1997.

Hasan R, Alam MK ve Ali R. Polyamine induced Z-conformation of native calf thymus DNA. *FEBS Lett.* 368(1): 27-30, 1995.

Hashimoto Y, Hibasami H, Tamaki S, Kamei A, Ikoma J, Kaito M, Imoto I, Watanabe S, Nakashima K, Adachi Y. Induction of apoptotic cell death in human hepatocellular carcinoma SK-HEP-1 cells by a polyamine synthesis inhibitor, methylglyoxal bis(cyclopentylamidino)hydrazone. *Anticancer Drugs.* 10: 323-327, 1999.

Hayashi S. (ED) *Ornithine Decarboxylase: Biology, Enzymology, and Molecular Genetics.* Pergamon Press, Oxford and New York, 1989.

Hayashi S. Antizyme-dependent degradation of ornithine decarboxylase. *Essays in Biochemistry.* 30: 37-47, 1995.

Hayashi T, Matsufuji S ve Hayashi S. Characterization of the human antizyme gene. *Gene.* 203(2): 131-139, 1996.

He Y, Kashiwagi K, Fukuchi J, Terao K, Shirahata A ve Igarashi K. Correlation between the inhibition of cell growth by accumulated polyamines and the decrease of magnesium and ATP. *Eur J Biochem.* 217(1): 89-96, 1993.

He Y, Suzuki T, Kashiwagi K ve Igarashi K. Antizyme delays the restoration by spermine of growth of polyamine-deficient cells through its negative regulation of polyamine transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 203(1): 608-614, 1994.

Heby O, Sarna GP, Marton LJ, Omine M, Perry S ve Russell DH. Polyamine content of AKR leukemic cells in relation to the cell cycle. *Cancer Res.* 33: 2959-2964, 1973.

Heby O. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation.* 19: 1-20, 1981.

Heller JS, Fong WF ve Canellakis ES. Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc Natl Acad Sci.* 73: 1858-1862, 1976.

Herr HW ve Kleinert EL. Antigrowth effect of polyamine biosynthesis inhibitors on the dunning R 3327-G prostatic tumor. *Prostate.* 5: 439-444, 1984a.

Herr HW ve Kleinert EL, Conti PS, Burchenal JH, Whitmore WFJ. Effects of alpha-difluoromethylornithine and methylglyoxal bis(guanylhydrazone) on the growth of experimental renal adenocarcinoma in mice. *Cancer Res.* 44: 4382-4385, 1984b.

Heston WD, Kadmon D ve Lazan DW. Copenhagen rat prostatic tumor ornithine decarboxylase activity (ODC) and the effect of the ODC inhibitor alpha-difluoromethylornithine. *Prostate.* 3: 383-389, 1982.

Heston WD, Yang CR, Pliner L, Russo P, Covey DF. Cytotoxic activity of a polyamine analogue, monoaziridinylputrescine, against the PC-3 human prostatic carcinoma cell line. *Cancer Res.* 47: 3627-3631, 1987.

Hirasawa E ve Suzuki Y. Biosynthesis of spermidine in maize seedlings. *Phytochemistry.* 22: 103-106, 1983.

Hoet PH ve Nemery B. Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 278(3): L417-433, 2000.

Hougaard DM, Fujiwara K ve Larsson LI. Immunocytochemical localization of polyamines in normal and neoplastic cells. comparisons to the formaldehyde-fluorescamine and o-phthalaldehyde methods. *Histochem J.* 19(12): 643-650, 1987.

Hölttä E. Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: purification and properties of polyamine oxidase. *Biochemistry.* 16: 91-100, 1977.

Hölttä E ve Hovi T. Polyamine depletion results in impairment of polyribosome formation and protein synthesis before onset of DNA synthesis in mitogen-activated human lymphocytes. *Eur J Biochem.* 152(1): 229-237, 1985.

Hu RH ve Pegg AE. Rapid induction of apoptosis by deregulated uptake of polyamine analogues. *Biochem J.* 328: 307-316, 1997.

Hughes EL, Grant G, Pusztai A, Bardocz S. Uptake and inter-organ distribution of dietary polyamines in the rat. *Biochem Soc Trans.* 26: S369, 1998.

Ichiba T, Matsufuji S, Miyazaki Y, Murakami Y, Tanaka K, Ichihara A ve Hayashi S. Functional regions of ornithine decarboxylase antizyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 200(3): 1721-1727, 1994.

Igarashi K, Hashimoto S, Miyake A, Kashiwagi K, Hirose S. Increase of fidelity of polypeptide synthesis by spermine in eukaryotic cell-free systems. *Eur J Biochem.* 128: 597-604, 1982.

Igarashi K ve Kashiwagi K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 271: 559-564, 2000.

Ignatenko NA. The chemopreventive agent α -difluoromethylornithine blocks K-Ras dependent tumor formation and specific gene expression in Caco-2 Cells. *Mol Carcinog.* 39: 221-233, 2004

Isaacs JT, Schulze H ve Coffey DS. Development of androgen resistance in prostatic cancer. *Prog. Clin Biol Res.* 243A: 21-31, 1987.

Isobe K, Tani Y, Yamada H ve Hirommi K. Determination of polyamines with immobilised beef plasma amine oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry.* 44: 615-19, 1980.

Israel M, Rosenfield JS ve Modest EJ. Analogs of spermine and spermidine. synthesis of polymethylene-polyamines by reduction and cyanoethylated A,W-alkylenediamines. *J Medicinal Chem.* 7: 710-16, 1964.

Itoh M ve Bissell MJ. The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 8: 449-462, 2003.

Ivanov IP, Gesteland RF ve Atkins JF. A second mammalian antizyme: conservation of programmed ribosomal frameshifting. *Genomics.* 52(2): 119-129, 1998.

Ivanov IP, Rohrwasser A, Terreros DA, Gesteland RF ve Atkins JF. Discovery of a spermatogenesis stage-specific ornithine decarboxylase antizyme: antizyme 3. *Proc Natl Acad Sci.* 97(9): 4808-4813, 2000.

Jeffers L, Church D, Basu H, Marton L, Wilding G. Effects of the polyamine analogues BE-4-4-4-4, BE-3-7-3, and BE-3-3-3 on the proliferation of three prostate cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 40:172-179, 1997.

Kajander EO, Kauppinen LI, Pajula RL. Purification and partial characterization of human polyamine synthases. *Biochem J.* 259: 879-86, 1989.

Takegawa T, Hirose S, Kashiwagi K, Igarashi K. Effect of polyamines on *in vitro* reconstitution of ribosomal subunits. *Eur J Biochem.* 158: 265-269, 1986.

Kang HA ve Hershey JW. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 269: 3934–3940, 1994.

Kilpeläinen P. *Ornithine Decarboxylase Expression and Regulation In Rat Brain and In Transgenic Mice*, Oulu University Press, 2002.

King KL ve Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 60: 601-617, 1998.

Kirby RS. *The Prostate: Small Gland Big Problem*. Prostate Research Campaign. UK, 2002.

Kitani T ve Fujisawa H. Purification and some properties of a protein inhibitor (antizyme) of ornithine decarboxylase from rat liver. *J Biol Chem*. 259(16): 10036-10040, 1984.

Kitani T ve Fujisawa H. Purification and characterization of antizyme inhibitor of ornithine decarboxylase from rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 991(1): 44-49, 1989.

Koike C, Chao DT ve Zetter BR. Sensitivity to polyamine-induced growth arrest correlates with antizyme induction in prostate carcinoma cells. *Cancer Res*. 59(24): 6109-6112, 1999.

Kovarova H, Hajduch M, Korinkova G, Halada P, Stanislava K, Gouldsworthy A, Zhelev N. ve Strnad M. Proteomics approach in classifying the biochemical basis of the anticancer activity of the new olomoucine-derived synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor, Bohemine. *Electrophoresis*. 21: 3757-37-64, 2000.

Kovarova H, Halada P, Man P, Dzubak P ve Hajduch M. Application of proteomics in the search for novel proteins associated with the anti-cancer effect of the synthetic cyclin-dependent kinases inhibitor, bohemine. *Technol Cancer Res Treat*. 1(4): 247-56, 2002.

Kramer DL. Polyamine inhibitors and analogs. In: Nishioka K (Ed) *Polyamines in Cancer: Basic Mechanisms and Clinical Approaches*. Austin, RG Landis, 151-189, 1996.

Kramer DL, Fogel PM, Diegelman P, Cooley JM, Bernacki RJ, McManis JS, Bergeron RJ, Porter CW. Effects of novel spermine analogues on cell cycle progression and apoptosis in MALME-3M human melanoma cells. *Cancer Res.* 57: 5521-5527, 1997.

Kramer DL, Vujcic S, Diegelman P, White C, Black JD, Porter CW. Polyamine analogue-mediated cell cycle responses in human melanoma cells involves the p53, p21, Rb regulatory pathway. *Biochem Soc Trans.* 26:609-614, 1998.

Kramer, DL, Vujcic S, Diegelman P, Alderfer J, Miller JT, Black JD, Bergeron RJ ve Porter CW. Polyamine analogue induction of the p53-p21waf1/CIP1-Rb pathway and G1 arrest in human melanoma cells. *Cancer Res.* 59(6): 1278-1286, 1999.

Kramer DL, Chang BD, Chen Y, Diegelman P, Alm K, Black AR, Roninson IB ve Porter CW. Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G1 arrest associated with induction of p21waf1/CIP1/SDI1, changes in the expression of p21-regulated genes, and a senescence-like phenotype. *Cancer Res.* 61: 7754–7762, 2001.

Kusunoki S ve Yasumasu I. Inhibitory effect of α -hydrazinoornithine on egg cleavage in sea urchin eggs. *Dev Biol.* 67: 336-345, 1978.

Kyprianou N, English HF, Isaacs JT. Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Res.* 50: 3748-3753, 1990.

Laitinen J, Stenius K, Eloranta TO ve Hölttä E. Polyamines may regulate S-phase progression but not the dynamic changes of chromatin during the cell cycle. *J Cell Biochem.* 68(2): 200-212, 1998.

Lepor H, Ross A, Walsh PC. The influence of hormonal therapy on survival of men with advanced prostatic cancer. *J Urol.* 128: 335-340, 1982.

Li L, Li J, Rao JN, Li M, Bass BL ve Wang, JY. Inhibition of polyamine synthesis induces p53 gene expression but not apoptosis. *Am J Physiol.* 276(4 Pt 1): C946-954, 1999.

Li L, Rao JN, Guo X, Liu L, Santora R, Bass BL ve Wang JY. Polyamine depletion stabilizes p53 resulting in inhibition of normal intestinal epithelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281: C941-953, 2001.

Lindsay GS ve Wallace HM. Changes in polyamine catabolism in HL-60 human promyelogenous leukaemic cells in response to etoposide-induced apoptosis. *Biochem J.* 337(Pt1): 83-87, 1999.

Lopatin AN, Makhina EN ve Nichols CG. Potassium channels block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature.* 372: 366-369, 1994.

Loprinzi CL, Messing EM ve O'Fallon JR. Toxicity evaluation of difluoromethylornithine: doses for chemoprevention trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5: 371-374, 1996.

Lu L, Stanley BA ve Pegg AE. Identification of residues in ornithine decarboxylase essential for enzymic activity and for rapid protein turnover. *Biochem J.* 277: 671-75, 1991.

Lynch MJ, Nicholson JK. Proton MRS of human prostatic fluid: correlations between citrate, spermine and myo-inositol levels and changes with disease. *Prostate.* 30: 248-255, 1997.

Mackey TJ, Borkowski A, Amin P, Jacobs SC ve Kyprianou N. *BCL-2/BAX* ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology.* 52(6): 1085-1090, 1998.

Mad'arova J, Lukesova M, Hlobilkova A, Strnad M, Vojtesek B, Lenobel R, Hajduch M, Murray PG, Perera S ve Kolar Z. Synthetic inhibitors of CDKs induce different responses in androgen sensitive and androgen insensitive prostatic cancer cell lines. *Mol Pathol.* 55(4): 227-234, 2002.

Manchester KM, Heston WD ve Donner DB. Tumour necrosis factor-induced cytotoxicity is accompanied by intracellular mitogenic signals in ME-180 human cervical carcinoma cells. *Biochem J.* 290: 185-190, 1993.

Martel CL, Gumerlock PH, Meyers FJ ve Lara PN. Current strategies in the management of hormone refractory prostate cancer. *Cancer Treat Rev.* 29(3): 171-187, 2003.

Marton LJ ve Pegg AE. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35: 55-91, 1995.

Marty C, Mori G, Sabini L ve Rivarola V. Effects of alpha-difluoromethylornithine on the cyclin a expression in hep-2 cells. *Biocell.* 24(1): 49-52, 2000.

Matsufuji S, Matsufuji T, Miyazaki Y, Murakami Y, Atkins JF, Gesteland RF ve Hayashi S. Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell.* 80(1): 51-60, 1995.

McCann PP ve Pegg AE. Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacology and Therapeutics.* 54: 195-215, 1992.

McCloskey DE, Casero RAJ, Woster PM, Davidson NE. Induction of programmed cell death in human breast cancer cells by an unsymmetrically alkylated polyamine analogue. *Cancer Res.* 55: 3233-3236, 1995.

McCloskey DE, Yang J, Woster PM, Davidson NE ve Casero RAJ. Polyamine analogue induction of programmed cell death in human lung tumor cells. *Clin Cancer Res.* 2: 441-446, 1996.

McCloskey DE, Woster PM, Casero RAJ ve Davidson NE. Effects of the polyamine analogues N1-ethyl-N11-((cyclopropyl)methyl)-4,8-diazaundecane and N1-ethyl-11-((cycloheptyl)methyl)-4,8-diazaundecane in human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* 6: 17-23, 2000.

Meijer L, Leclerc S ve Leost M. Properties and potential-applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Pharmacol Ther.* 82: 279-284, 1999.

Meyskens FLJ ve Gerner EW. Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clin Cancer Res.* 5: 945-951, 1999.

Mi Z, Kramer DL, Miller JT, Bergeron RJ, Bernacki R ve Porter CW. Human prostatic carcinoma cell lines display altered regulation of polyamine transport in response to polyamine analogs and inhibitors. *Prostate.* 34:51-60, 1998.

Milovic V, Faust D, Turchanowa L, Stein J ve Caspary WF. Permeability characteristics of polyamines across intestinal epithelium using the caco-2 monolayer system: comparison between transepithelial flux and mitogen-stimulated uptake into epithelial cells. *Nutrition.* 17: 462-466, 2001.

Mimori K, Mori M, Sihraishi T, Tanaka S, Haraguchi M, Ueo H, Shirasaka C ve Akiyoshi T. Expression of ornithine decarboxylase mRNA and *c-myc* mRNA in breast tumours. *Int J Oncology.* 12: 597-601, 1997.

Mitchell JL, Judd GG, Bareyal-Leyser A ve Ling SY. Feedback repression of polyamine transport is mediated by antizyme in mammalian tissue-culture cells. *Biochem J.* 299(Pt 1): 19-22, 1998.

Moffatt J, Hashimoto M, Kojima A, Kennedy DO, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H ve Matsui-Yuasa I. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation. *Carcinogenesis.* 21(12): 2151-2157, 2000.

Mohan RR, Challa A, Gupta S, Bostwick DG, Ahmad N, Agarwal R, Marengo SR, Amini SB, Paras F, MacLennan GT, Resnick MI, Mukhtar H. Overexpression of ornithine decarboxylase in prostate cancer and prostatic fluid in humans. *Clin Cancer Res.* 5: 143-147, 1999.

Mondavi B. (Ed) *Structure and Functions of Amine Oxidases*, CRC Press, Boca Raton. 1985.

Morgan DML. Polyamine oxidases. *Polyamines in Biomedical Research* (ed J. M. Gaugas), Wiley & Sons, Chichester, 285-302, 1980.

Morgan DML. Polyamine oxidases and oxidised polyamines. *The Physiology of Polyamines*, Volume 1, (eds U. Bachrach ve Y.M. Heimer), CRC Press, Boca Raton, 203-29, 1989.

Morgan DML. Polyamines and cellular regulation: Perspectives. *Biochem Soc Trans.* 18: 1080-1084, 1990.

Morgan DM. Uptake of polyamines by human endothelial cells. characterization and lack of effect of agonists of endothelial function. *Biochem J.* 286(Pt 2): 413-417, 1992.

Morgan DML. *Methods in Molecular Biology: Polyamine Protocols*. Humana Press. Volume 79: 4, 1998.

Morgan DM. Polyamines. An Overview. *Mol Biotechnol.* 11(3): 229-250, 1999.

Moulinoux JP, Quemener V, Delcros JG, Cipolla B. Circulating polyamines as biological markers for cancer. In: *Polyamines in Cancer: Basic Mechanisms and Clinical Approaches*. Nishioka K ve Austin RG (Ed), 233-249, 1996.

Murakami Y, Matsufuji S, Nishiyama M ve Hayashi S. Properties and fluctuations *in vivo* of rat liver antizyme inhibitor. *Biochem J.* 259(3): 839-845, 1989.

Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K ve Ichihara A. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*. 60(6404): 597-599, 1992.

Nelleman C, Dalgaard M, Holst B, Bonefeld EC ve Vinggaard AM. Gene expression changes in rat prostate after activation or blocking of the androgen and estrogen receptor. *Mol Cell Endocrin*. 237 (1-2): 25-35, 2005.

Nemoto T, Kamei S, Seyama Y ve Kubota S. p53 independent G(1) arrest induced by DI alpha-difluoromethylornithine. *Biochem Biophys Res Commun*. 280(3): 848-854, 2001.

Nilsson JA, Keller UB, Baudino TA, Yang C, Norton S, Old JA, Nilsson LM, Neale G, Kramer DL, Porter CW ve Cleveland JL. Targeting ornithine decarboxylase in *Myc*-induced lymphomagenesis prevents tumor formation. *Cancer Cell*, 7 (5): 433-444, 2005.

Nishioka K, Melgarejo AB, Lyon RR ve Mitchell MF. Polyamines as biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia. *J Cell Biochem Suppl*. 23: 87-95, 1995.

Nitta T, Igarashi K, Yamashita A, Yamamoto M ve Yamamoto N. Involvement of polyamines in b cell receptor-mediated apoptosis: spermine functions as a negative modulator. *Exp Cell Res*. 265(1): 174-183, 2001.

Nobori T, M Iura K, Lois A, Takabayashi K ve Carson DA. Deletion of the cyclin-dependent kinase-4, inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 368: 753-756, 1994.

Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM ve Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res*. 211: 90-98, 1994.

Norris JS, Hyer ML, Voelkel-Jhonson C, Lowe SL, Rubinchic S ve Dong J-Y. The use of fas ligand, TRAIL and *Bax* in gene therapy of prostate cancer. *Cur Gene Thera.* 1: 123-136, 2001.

Oredsson SM. Polyamine dependence of normal cell-cycle progression. *Biochem Soc Trans.* 31: 366-370, 2003.

Osborne DL ve Seidel ER. Microflora-derived polyamines modulate obstruction-induced colonic mucosal hypertrophy. *Am J Physiol.* 256: G1049-1057, 1989.

Osborne DL ve Seidel ER. Gastrointestinal luminal polyamines: cellular accumulation and enterohepatic circulation. *Am J Physiol.* 258: G576-G584, 1990.

Packham G ve Cleveland JL. Ornithine decarboxylase is a mediator of *c-myc*-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 14(9): 5741-5747, 1994.

Packham G, Porter CW ve Cleveland JL. *c-myc* induces apoptosis and cell cycle progression by separable, yet overlapping, pathways. *Oncogene.* 13: 461-469, 1996.

Pajula RL, Raina A ve Eloranta T. Polyamine synthesis in mammalian tissues: isolation and characterization of spermine synthase from bovine brain. *Eu J Biochem.* 101: 619-26, 1979.

Panagiotidis CA, Artandi S, Calame K ve Silverstein SJ. Polyamines alter sequence specific DNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 23(10): 1800-1809, 1995.

Parchment RE ve Pierce GB. Polyamine oxidation, programmed cell death, and regulation of melanoma in the murine embryonic limb. *Cancer Res.* 49(23): 6680-6686, 1989.

Park MH, Lee YB ve Joe YA. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signals.* 6: 115-123, 1997.

Paschen, W. Polyamine metabolism in reversible cerebral ischemia. *Cereb Brain Metab Rev.* 4: 59-88, 1992.

Paschka AG, Butler R ve Young CY. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (1)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett.* 130: 1-7, 1998.

Patocka J ve Kuehn GD. Natural polyamines and their biological consequence in mammals. *Acta Medica.* 43: 19-24, 2000.

Paulin L, Vehmaanpera J, Nykanen I, Poso H. GTP-Insensitive ornithine decarboxylase in acetobacteria able to synthesize spermine. *Biochem Biophys Res Commun.* 114: 779-784, 1983.

Peffer LM, Yang CH, Peffer SR, Murti A, McCormack SA ve Johnson LR. Inhibition of ornithine decarboxylase induces STAT3 tyrosine phosphorylation and DNA binding in IEC-6 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 278(2): C331-335, 2000.

Pegg AE, Seely JE ve Pösö H. Polyamine biosynthesis and interconversion in rodent tissues. *Federation Proceedings.* 41: 3065-72, 1982.

Pegg AE ve McCann PP. S-adenosylmethionine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacology and Therapeutics.* 56: 359-77, 1992.

Pegg AE. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res.* 48: 759-774, 1998.

Pegg AE. Transgenic mouse models for studies of the role of polyamines in normal, hypertrophic and neoplastic growth. *Biochem Soc Trans.* 31: 356-360, 2003.

Penning LC, Schipper RG, Vercammen D, Verhofstad AA, Denecker T, Beyaert R ve Vandenabeele P. Sensitization of TNF-induced apoptosis with polyamine synthesis inhibitors in different human and murine tumour cell lines. *Cytokine.* 10(6): 423-431, 1998.

Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ ve Arnold A. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev.* 20: 501-534, 1999.

Poulin R, Coward JK, Lakanen JR Ve Pegg AE. Enhancement of the spermidine uptake system and lethal effects of spermidine overaccumulation in ornithine decarboxylase overproducing L1210 cells under hyposmotic stress. *J Biol Chem.* 268(7): 4690-4698, 1993.

Poulin R, Pelletier G ve Pegg AE. Induction of apoptosis by excessive polyamine accumulation in ornithine decarboxylase-overproducing L1210 cells. *Biochem J.* 311 (Pt 3): 723-727, 1995.

Poulin R, Zhao C, Verma S, Charest-Gaudreault R ve Audette M. Dependence of mammalian putrescine and spermidine transport on plasma-membrane potential: identification of an amiloride binding site on the putrescine carrier. *Biochem J.* 330(Pt 3): 1283-1291, 1998.

Pyronnet S, Pradayrol L. ve Sonenberg N. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell.* 5: 607-616, 2000.

Quemener V, Blanchard Y, Chamaillard L, Havouis R, Cipolla B, Moulinoux JP. Polyamine deprivation: a new tool in cancer treatment. *Anticancer Res.* 14: 443-448, 1994.

Raasch W, Regunathan S, Li G ve Reis DJ. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. *Life Sciences.* 56: 2319-2330, 1995.

Raina A, Hyvonen T, Eloranta T. Polyamine synthesis in mammalian tissues. isolation and characterization of spermidine synthase from bovine brain. *Biochemical Journal.* 219: 991-1000, 1984.

Ralph A, Englyst K ve Bardocz S. Polyamine Content in The Human Diet. In: *Polyamine in Health and Nutrition*. Bardocz S, White A, (Ed) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 123-137, 1999.

Ravanko K, Järvinen K, Paasinen-Sohns A ve Hölttä E. Loss of p27Kip1 from cyclin E/cyclin-dependent kinase (CDK) 2 but not from cyclin D1/CDK4 complexes in cells transformed by polyamine biosynthetic enzymes. *Cancer Res.* 60(18): 5244-5253, 2000.

Ray RM, Zimmerman BJ, McCormack SA, Patel TB ve Johnson LR. Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21(Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells. *Am J Physiol.* 276(3 Pt 1): C684-691, 1999.

Ray RM, Viar MJ, Yuan Q ve Johnson LR. Polyamine depletion delays apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 278(3): C480-489, 2000.

Ray RM, McCormack SA ve Johnson LR. Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and caco-2 cells by different mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281: G37-G43, 2001.

Regenass U, Mett H, Stanek J, Mueller M, Kramer D ve Porter CW. CGP 48664, a new s-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor with broad spectrum antiproliferative and antitumor activity. *Cancer Res.* 54: 3210-3217, 1994.

Romain N, Dandrifosse G, Jeusette F, Forget P. Polyamine concentration in rat milk and food, human milk, and infant formulas. *Pediatr Res.* 32: 58-63, 1992.

Romijn JC. Polyamines and transglutaminase actions. *Andrologia.* 22 Suppl, 1: 83-91, 1990.

Romijn JC. Polyamine requirement of prostate cancer cell proliferation. In: *Molecular and Cellular Biology Of Prostate Cancer*. Karr JP, Coffey DS, Smith RG and Tindall DJ (Ed). New York, Plenum Press. 103-114, 1991.

Rouzina I ve Bloomfield VA. DNA bending by small, mobile multivalent cations. *Biophys J.* 74: 3152-3164, 1998.

Rubinstein S ve Breitbart H. Cellular localization of polyamines: cytochemical and ultrastructural methods providing new clues to polyamine function in ram spermatozoa. *Biol Cell.* 81: 177-183, 1994.

Russel DH. Ornithine decarboxylase: a key enzyme in normal and neoplastic growth. *Drug Met Rev.* 16: 1-88, 1985.

Sakata K, Fukuchi-Shimogori T, Kashiwagi K ve Igarashi K. Identification of regulatory region of antizyme necessary for the negative regulation of polyamine transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 238(2): 415-419, 1997.

Sakata K, Kashiwagi K ve Igarashi K. Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme. *Biochem J.* 347 (1): 297-303, 2000.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Samejima K ve Yamanoha B. Purification of spermidine synthase from rat ventral prostate by affinity chromatography on immobilised s-adenosyl(5')-3-thiopropylamine. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 216: 213-22, 1982.

Sarhan S, Knodgen B ve Seiler N. Polyamine deprivation, malnutrition and tumor growth. *Anticancer Res.* 12(2): 457-466, 1992.

Satoh N, Hibasami H, Mori K, Kaneko H, Wakabayashi H, Hirata K, Sonoda J, Nakashima K ve Uchida A. Growth inhibition of human osteosarcoma huo9 cells by methylglyoxal bis(cyclopentylamidino)hydrazone) *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Rep.* 6: 627-630, 1999.

Sauve DM, Anderson HJ, Ray JM, James WM ve Roberge M. Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH₂-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J Cell Biol.* 145: 225-235, 1999.

Saverio B, Pierpaola D, Serenella A, Cesare C, Bruno M, Auro T ve Arnaldo C. Tumor progression is accompanied by significant changes in the levels of expression of polyamine metabolism regulatory genes and clusterin (sulfated glycoprotein 2) in human prostate cancer specimens. *Cancer Res.* 60: 28-34, 2000.

Schipper RG, Otten AE, Lange WP, Schalken JA ve Verhostad AJJ. Polyamine metabolism and programmed cell death in prostatic cancer sells. *Urol Res.* 23: 249-253, 1995.

Schipper R. *Polyamine Metabolism in Prostate Cancer*, Ponsen & Looijen bv, Wageningen, ISBN 90-9013975-3, 2000.

Schipper RG, Penning LC ve Verhofstad AAJ. Review: involvement of polyamines in apoptosis facts and controversies: effectors or protectors? *Seminars in Cancer Biology.* 10(1): 55-68, 2000.

Schnier J, Schwelberger HG, Smit-Mcbride Z, Kang HA ve Hershey JW. Translation initiation factor 5a and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 11: 3105-3114, 1991.

Scorcioni F, Corti A, Davalli P, Astancolle S ve Bettuzzi S. Manipulation of the expression of regulatory genes of polyamine metabolism results in specific alterations of the cell-cycle progression. *Biochem J.* 354(1): 217-223, 2001.

Scott RH, Sutton KG ve Dolphin AC. Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends Neurosci.* 16: 153-160, 1993.

Seidenfeld J, Gray JW ve Marton LJ. Depletion of 9L rat brain tumor cell polyamine content by treatment with D,L- α -difluoromethylornithine inhibits proliferation and the G1 to S transition. *Exp Cell Res.* 131: 209-216, 1981.

Seiler N, Bolkenius FN, Knodgen B. Polyamine oxidase in rat tissues. *Biochimica Biophysica Acta.* 615: 480-488, 1980.

Seiler N. Functions of polyamine acetylation. *Can J Physiol Pharmacol.* 65: 2024-2035, 1987.

Seiler N ve Dezeure N. Polyamine transport in mammalian cells. *Int J Biochem.* 22: 211-218, 1990.

Seiler N. Pharmacological properties of the natural polyamines and their depletion by biosynthesis inhibitors as a therapeutic approach. *Prog Drug Res.* 37: 107-159, 1991.

Seiler N ve Atanassov CL. The natural polyamines and the immune system. *Prog Drug Res.* 43: 87-141, 1994.

Seiler N, Delcros JG ve Moulinoux JP. Polyamine transport in mammalian cells. An. Update. *Int J Biochem Cell Biol.* 28(8): 843-861, 1996.

Seiler N, Atanassov CL ve Raul F. Polyamine metabolism as target for cancer chemoprevention. *Int J Oncol.* 13: 993-1006, 1998.

Seiler N. Oxidation of polyamines and brain injury. *Neurochem Res.* 25: 471-490, 2000.

Shah N, Thomas TJ, Lewis JS, Klinge CM, Shirahata A, Gelinis C ve Thomas T. Regulation of estrogenic and nuclear factor kappa b functions by polyamines and their role in polyamine analog-induced apoptosis of breast cancer cells. *Oncogene.* 20(14): 1715-1729, 2001.

Shantz LM ve Pegg AE. Ornithine decarboxylase induction in transformation by H-Ras and RhoA. *Cancer Res.* 58: 2748-2753, 1998.

Sielecki TM, Boylan JF, Benfield PA ve Trainor GL. Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation. *J Med Chem.* 43: 1-18, 2000.

Slocum RD, Kaur-Sawhney R ve Galston A. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 235: 283-303, 1984.

Smith TA. Polyamines. *Ann Rev Plant Physiol.* 36: 117-143, 1985.

Smith RC, Litwin MS, Lu Y ve Zetter BR. Identification of an endogenous inhibitor of prostatic carcinoma cell growth. *Nat Med.* 1: 1040-1045, 1995.

Snyder RD. Polyamine depletion is associated with altered chromatin structure in HeLa cells. *Biochem J.* 260(3): 697-704, 1989.

Srinath P, McQuarrie SA, Suresh MR. Comparative uptake of polyamines by prostate and non-prostate cancer cell lines. *Nuclear Medicine and Biology.* 29(4): 497-503, 2002.

Strnad M, Hanus J, Peters W ve Beck E. Ortho-topolin-9-glucoside, a new aromatic cytokinin from *Populus x canadensis* cv. *Robusta* leaves. *Phytochemistry.* 37: 1059-1062, 1994.

Sturm P, Cheng ZL, Chen PCY ve Poo AN. Focal length calibration from two views: method and analysis of singular cases. *Computer Vision and Image Understanding.* 99(1): 58-95, 2005.

Svechnikov K, Ritzén EM ve Holst M. Androgen and estrogen stimulation of ornithine decarboxylase activity in mouse kidney. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 75(4-5): 329-333, 2000.

Tabor CW ve Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem.* 53: 749-90, 1984.

Tabor CW ve Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev.* 49: 81-99, 1985.

Takahashi Y, Mai M ve Nishioka K. α -Difluoromethylornithine induces apoptosis as well as anti-angiogenesis in the inhibition of tumor growth and metastasis in a human gastric cancer *Model Int J Cancer.* 85: 243-247, 2000.

Takemoto T, Nagamatsu Y ve Oka T. The study of spermidine-stimulated polypeptide synthesis in cell-free translation of mrna from lactating mouse mammary gland. *Biochem Biophys Acta.* 740: 73-79, 1983.

Takigawa, M.: Tumor angiogenesis ve polyamines: α -difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits B16 melanoma-induced angiogenesis *in ovo* and the proliferation of vascular endothelial cells *in vitro*. *Cancer Res.* 50: 4131-4138, 1990.

Tewari M, Hamid QA, Tuncay OC ve Tewari DS. Antizyme prevents ornithine decarboxylase-mediated cell death in human fibroblasts. *Oral Oncol.* 34: 538-542, 1998.

Thomas TJ ve Bloomfield VA. Ionic and structural effects on the thermal helix-coil transition of DNA complexed with natural and synthetic polyamines. *Biopolymers.* 23: 1295-1306, 1984.

Thomas TJ, Gunnia UB ve Thomas T. Polyamine-induced B-DNA to Z-DNA conformational transition of a plasmid DNA with (dG-dC)_n insert. *J Biol Chem.* 266(10): 6137-6141, 1991.

Thomas TJ ve Thomas TJ. Structural specificity of polyamines in modulating the binding of estrogen receptor to potential Z-DNA forming sequences. *J Recept Res.* 13(8): 1115-1133, 1993.

Thomas TJ, Shah N, Faaland CA, Gallo MA, Yurkow E ve Satyaswaroop PG. Antitumor effects of a bis(benzyl)spermine analog on MCF-7 breast cancer cells in culture and in nude mice xenografts. *Oncol Rep.* 4: 5-13, 1997.

Thomas TJ ve Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanism and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci.* 58: 244-258, 2001.

Tippin DB ve Sundaralingam M. Nine Polymorphic crystal structures of d(CCGGGCCCCGG), d(CCGGGCCm5CGG), d(Cm5CGGGCCm5CGG) and d(CCGGGCC(Br)5CGG) in three different conformations: effects of spermine binding and methylation on the bending and condensation of A-DNA. *J Mol Biol.* 267: 1171-1185, 1997.

Tobias KE, Kahana C. exposure to ornithine results in excessive accumulation of putrescine and apoptotic cell death in ornithine decarboxylase overproducing mouse myeloma cells. *Cell Growth Differ.* 6: 1279-1285, 1995.

Tome ME, Fiser SM ve Gerner EW. Consequences of aberrant ornithine decarboxylase regulation in rat hepatoma cells. *J Cell Physiol.* 158(2): 237-244, 1994.

Tome ME, Fiser SM, Payne CM ve Gerner EW. Excess putrescine accumulation inhibits the formation of modified eukaryotic initiation factor 5a (eif-5a) and induces apoptosis. *Biochem J.* 328: 847-854, 1997.

Torring N, Vinter JL, Pedersen SB, Sorensen FB, Flyvbjerg A ve Nexø E. Systemic administration of insulin-like growth factor I (IGF-1) causes growth of the rat prostate. *J Urol.*, 158: 222-227, 1997.

Trosko JE. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 36: 43-48, 2003.

Tsihlias J, Kapusta L ve Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med.* 50: 401-423, 1999.

Tsuji T, Todd R, Meyer C, McBride J, Liao PH, Huang MF, Chou MY, Donoff RB ve Wong DT. Reduction of ornithine decarboxylase antizyme (ODC-AZ) level in the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Oncogene*, 16(26): 3379-3385, 1998.

Tsuji T, Usui S, Aida T, Tachikawa T, Hu GF, Sasaki A, Matsumura T, Todd R ve Wong DT. Induction of epithelial differentiation and DNA demethylation in hamster malignant oral keratinocyte by ornithine decarboxylase antizyme. *Oncogene*. 20(1): 24-33, 2001.

Van-Den-Munckhof RJ, Denyn M, Tigchelaar GW, Schipper RG, Verhofstad AAJ, Van-Noorden CJ, Frederiks WM. In situ substrate specificity and ultrastructural localization of polyamine oxidase activity in unfixed rat tissues. *J Histochem Cytochem*. 43: 1155-1162, 1995.

Vesely J, Havlicek L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato J, Detivaud L, Leclerc S. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem*. 224: 771-786, 1994.

Wallace HM, Fraser A ve Hughes A. Review article: a perspective of polyamine metabolism. *Biochem J*. 376: 1-14, 2003.

Wang JY, McCormack SA, Viar MJ ve Johnson LR. Stimulation of proximal small intestinal mucosal growth by luminal polyamines. *Am J Physiol*. 261(3): G504-511, 1991.

Wang JY, McCormack SA, Viar MJ, Wang H, Tzen CY, Scott RE ve Johnson LR. Decreased Expression of protooncogenes *c-fos*, *c-myc*, and *c-jun* following polyamine depletion in IEC-6 cells. *Am J Physiol*. 265(2 Pt 1): G331-338, 1993.

Wang Z, Tufts R, Haleem R ve Cai X. Genes regulated by androgen in the rat ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci*. 94: 12999-13004, 1997.

Wang Y, Devereux W, Stewart TM ve Casero RA. Cloning and characterization of human polyamine-modulated factor-1, a transcriptional cofactor that regulates the transcription of the spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase gene. *J Biol Chem.* 274(31): 22095-22101, 1999.

Wang Y, Devereux W, Woster PM ve Casero RA. Cloning and characterization of the mouse polyamine-modulated factor-1 (MPMF-1) gene: an alternatively spliced homologue of the human transcription factor. *Biochem J.* 359: 387-392, 2001.

Watanabe S, Kusama-Eguchi K, Kobayashi H ve Igarashi K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem.* 266(31): 20803-20809, 1991.

Williams K. Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. *Cell Signal.* 9: 1-13, 1997.

Xiao L ve Casero RAJ. Regulation of spermidine/spermine N1-acetyltransferase. In: *Polyamines: Regulation and Molecular Interaction*. Casero RAJ (Ed), RG Landis, Austin. 77-99, 1995.

Xie X, Tome ME ve Gerner EW. Loss of intracellular putrescine pool-size regulation induces apoptosis. *Exp Cell Res.* 230(2): 386-392, 1997.

Yamanoha B, Samejima K, Nakajima T. Differences between homogenous spermidine synthase isolated from rat pig liver. *J Biochem.* 96: 1273-81, 1984.

Zagaja GP, Shrivastav M, Fleig MJ, Marton LJ, Rinker SC ve Dolan ME. Effects of polyamine analogues on prostatic adenocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Chemother Pharmacol.* 41: 505-512, 1998.

Zhu C, Lang DW ve Coffino P. Antizyme2 is a negative regulator of ornithine decarboxylase and polyamine transport. *J Biol Chem.* 274(37): 26425-26430, 1999.