

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

**RADYOTERAPİ İLE EŞZAMANLI
LETROZOL KULLANIMININ
MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA
HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. BURCU DURMAK İŞMAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

**RADYOTERAPİ İLE EŞZAMANLI
LETROZOL KULLANIMININ
MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA
HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. BURCU DURMAK İŞMAN

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. İLNUR BİLKAY GÖRKEN**

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	i
Tablo Listesi.....	vi
Şekil Listesi.....	vii
Resim Listesi	x
Kısaltmalar	xi
Teşekkür.....	xiii
Özet	1
Abstract.....	4
1.GİRİŞ VE AMAÇ	6
2.GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. MEME KANSERİ:	7
2.1.1. İnsidans ve Risk Faktörleri.....	7
2.1.2. Meme kanserinin biyolojisi	8
2.1.3. Nükleer hormon reseptörleri	10
2.1.3.1. Östrojen Reseptörü	11
2.1.3.1.1. Östrojen Reseptörü Alfa.....	12
2.1.3.1.2. Östrojen Reseptörü Beta	13
2.1.3.2. Progesteron Reseptörü	14
2.1.4. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri	15
2.1.5. Meme Radyoterapisi.....	16
2.1.6. Hormonoterapi	17
2.1.7. Östrojen Biyosentezi.....	18
2.2. AROMATAZ İNHİBİTÖRLERİ	20
2.2.1.CYP-19 Geni	20
2.2.2. Aromataz Enzimi	20
2.2.3. Aromataz İnhibitörleri.....	21
2.3. LETROZOL.....	23
2.3.1.Formülü	23
2.3.2.Farmakolojik Özellikleri.....	23
2.3.3.Emilim.....	24
2.3.4.Dağılım	24

2.3.5. Metabolizma	24
2.3.6. Endikasyonları	25
2.4. HÜCRE ÖLÜMÜ	26
2.4.1. Apoptotik Hücre Ölümü	28
2.4.1.1. Apoptotik Hücre Ölümünün Moleküler Mekanizması	30
2.4.1.1.1. İntrensek Yolak	32
2.4.1.1.2. Ekstresek Yolak	34
2.4.1.1.2.1. Fas Sinyal İletimi Yoluyla Apoptoz	35
2.4.1.1.2.2. TNF Sinyal İletimi Yoluyla Apoptoz	35
2.4.1.2. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler	37
2.4.2. Otofaji	38
2.4.2.1. Otofaji ve apoptoz arasındaki hücre düzeyinde bağlantılar	41
2.4.3. Nekrotik Hücre Ölümü	42
2.5. RADYASYON BİYOLOJİSİ	44
2.5.1. Radyasyon Etkisine Bağlı Olaylar	44
2.5.1.1. Radyasyona Bağlı Fizikokimyasal, Kimyasal olaylar ve Subselüler Yanıt	45
2.5.1.2. Radyasyonun Yaptığı Molekül Hasarını Değiştiren Faktörler	46
2.5.1.3. Radyasyona Hücresel Yanıt ve Biyolojik Olaylar	46
2.5.2. Radyasyonun Biyolojik Etki Mekanizması	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM	49
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ AŞAMASINDA KULLANILAN CİHAZ ve KİMYASALLAR	50
3.1.1. Hücre Kültürü Besiyeri Ve Solüsyonlar	50
3.1.2. Hücre Kültürü Aşamasında Kullanılan Cihazlar	51
3.1.3. Hücre kültürü yönteminin temel aşamaları	53

3.2. MCF-7 ve MCF-7 ARO HÜCRELERİNİN KÜLTÜRE EDİLMESİ.....	54
3.2.1. MCF- Hücre Hattı.....	54
3.2.2. MCF-7 aro Hücreleri	56
3.2.3. MCF-7 ve MCF-7 aro Hücrelerinin Dondurulması	57
3.2.4. Dondurulmuş MCF-7 ve MCF-7 aro Hücrelerinin Çözdürülmesi	57
3.2.5. MCF-7 ve MCF-7 aro Hücrelerinin Pasajlanması.....	58
3.2.6. Hücrelerinin Canlılığının Belirlenmesi, Hücre sayılması ve Ekimi	58
3.2.6.1. Hücre Sayılması.....	58
3.2.6.2. Hücre Ekilmesi	61
3.3. DENEY DÜZENİĞİNİN HAZIRLANMASI.....	62
3.3.1. Letrozol'ün Stok Solüsyonu Hazırlanması ve Dilüsyonu	62
3.3.2. Testosteron'un Stok Solüsyonu Hazırlanması ve Dilüsyonu.....	63
3.3.3. Radyoterapi Düzenığının Hazırlanması.....	64
3.4. SİTOTOKSİSİTE DENEYLERİ	67
3.4.1. Apoptozis'in Gösterilmesi.....	67
3.4.1.1. Kaspaz-3	67
3.4.1.1.1. Fluorometric Caspase 3 Assay Kit ile Apoptotik Davranış Ölçümü.....	67
3.4.1.1.1.1. Gereçler	67
3.4.1.1.1.2. AMC Kalibrasyon Grafiğı Hazırlanması	68
3.4.1.1.1.3. Hücre Lizatı hazırlanması	69
3.4.1.1.1.4. Mikroassay methodu ile apoptotik davranışın belirlenmesi	69
3.4.1.2. Annexin-V	70
3.4.1.2.1. Akım Sitometride PI ile boyanan ölü hücrelerin analizi.....	72
3.4.2. Otofajinin Gösterilmesi.....	73
3.4.2.1. Sodyum Dedosil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ve Western Blotlama	73
3.4.2.1.1. Lizat Hazırlama	73
3.4.2.1.2. Protein Konsantrasyonu Ölçülmesi	74
3.4.2.1.3. SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi	75

3.4.2.1.4. Örnek Hazırlaması	77
3.4.2.1.5. Elektroforetik Yürütme.....	78
3.4.2.1.6. Membrana Yarı Kuru Yöntem ile Transfer	78
3.4.2.1.7. Western Blot.....	79
3.4.2.1.8. Deteksiyon	80
3.4.2.1.9. Membranın Strip Edilmesi	80
3.4.2.2. Western Blot Çözeltileri.....	81
4.BULGULAR	
4.1. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Kaspaz-3 Yöntemi İle Belirlenmesi	87
4.2. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Annexin-V Yöntemi İle Belirlenmesi	88
4.3. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Aro Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Kaspaz-3 Yöntemi İle Belirlenmesi.....	98
4.4. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Aro Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Annexin-V Yöntemi İle Belirlenmesi.....	100
4.5. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Aro Hücreleri Üzerindeki Otofajik Etkisinin Western-Blot Tekniği İle Otofajide Rol Alan Beclin Geninin Ekspresyonunun Belirlenmesi ile Gösterilmesi.....	107
4.6. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Aro Hücreleri Üzerindeki Otofajik Etkisinin Western-Blot Tekniği İle Otofajide Rol Alan Beclin Geninin Ekspresyonunun Belirlenmesi ile Gösterilmesi.....	111
5.TARTIŞMA	113
6.KAYNAKLAR	117
7.EK.....	134

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Apoptoz İnhibitörlerinin Sınıflandırması.....	22
Tablo 2: Hücre Ölümü Tipleri.....	28
Tablo 3: AMC Kalibrasyon Grafiği	69
Tablo 4: 96 Gözlü Plate Metodu İle Apoptotik Davranışın Belirlenmesi.....	70
Tablo 5: Ayrıştırıcı Jel Hazırlanması.....	76
Tablo 6: Paketleyici Jel Hazırlanması.....	77
Tablo 7: 10 X Towbin Transfer Tamponu Hazırlanması	78
Tablo 8: MCF-7 Hücre Hattında 1,3 Ve 6 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrası Radyoterapi Uygulamasının Kaspaz Aktivasyonu Üzerine Etkisi.....	87
Tablo 9: MCF-7 Hücre Hattında 3 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Üzerine Etkisinin Annexin V Yöntemi İle İncelenmesi.....	88
Tablo10: MCF-7 Hücre Hattında 3 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Üzerine Etkisinin Annexin V Yöntemi İle İncelenmesi.....	92
Tablo 11: MCF-7 Hücre Hattında 6 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Üzerine Etkisinin Annexin V Yöntemi İle İncelenmesi.....	96
Tablo 12: MCF-7 Aro Hücre Hattında 1 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrası Radyoterapi Uygulamasının Kaspaz Aktivasyonu Üzerine Etkisi.....	99
Tablo 13: MCF-7 Aro Hücre Hattında 1 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Üzerine Etkisinin Annexin V Yöntemi İle İncelenmesi	101

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Steroid Hormonların Etki Mekanizması	11
Şekil 2: Östrojenin Moleküler Etki Mekanizması	14
Şekil 3: Antiöstrojen Tedavinin Moleküler Etki Mekanizması	15
Şekil 4: Östrojenik Aktivite Gösteren Bileşiklerin Kimyasal Yapısı	19
Şekil 5: Östrojen Biosentezi	20
Şekil 6: Aromataz İnhibitörlerinin Kimyasal Yapısı	22
Şekil 7: Apoptoz Oluşum Şeması	29
Şekil 8: Kaspazların Moleküler Sıralanımı	31
Şekil 9: Kaspaz Aktivasyonu	32
Şekil 10: Apoptozda İntrensek Yolak	33
Şekil 11: Bcl-2 Ailesi Üyelerinin Sınıflandırması	34
Şekil 12: Apoptozda Ekstresek Yolak	34
Şekil 13: Tnf α Sinyal Yoluyla Apoptoz	36
Şekil 14: Apoptozda Ekstresek Ve İntrensek Yolak Mekanizması	36
Şekil 15: Apoptoz Sürecindeki Morfolojik Değişiklikler	38
Şekil 16: Otofajik Hücre Ölümü Mekanizmaları	38
Şekil 17: Apoptoz Ve Otofaji	41
Şekil 18: Programlanmış Nekroz Mekanizması	43
Şekil 19: Radyasyonun Direkt Etkisi	45
Şekil 20: Radyasyonun İndirekt Etkisi	45
Şekil 21: Nauber Hemositometresi	60
Şekil 22: 6 Well Plate'e Hücre Ekilmesi	61
Şekil 23: 96 Well Plate'e Hücre Ekilmesi	61
Şekil 24: Radyoterapi Düzenegi	66
Şekil 25: Fosfotidilserin Ve Annexin	71
Şekil 26: FITC-Annexin V Kompleksinin Flow Sitometri İle Gösterilmesi	71
Şekil 26: Sadece Etanole 1Gün Maruz Bırakılmış MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları	89
Şekil 27: Sadece 1000nm Letrozole 1Gün Maruz Bırakılmış MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları	89

Şekil 28: Sadece Etanole 1Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	90
Şekil 29: 1000 Nm Letrozol'e 1Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	90
Şekil 30: Sadece Etanole 1Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	91
Şekil 31: 1000 Nm Letrozol'e 1Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	91
Şekil 32: Sadece Etanole 3 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	93
Şekil 33: 500 Nm Letrozol'e 3 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	93
Şekil 34: Sadece Etanol'e 3 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	94
Şekil 35: 500 Nm Letrozol'e 3 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	94
Şekil 36: Sadece Etanol'e 3 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	95
Şekil 37: 500 Nm Letrozol'e 3 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	95
Şekil 38 A: Sadece Etanol'e B: 500 Nm Letrozol'e 6 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	97
Şekil 39 A: Etanol'e B: 1000 Nm Letrozol'e 6 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları ..	97
Şekil 40 A: Etanol'e B: 1000 Nm Letrozol'e 6 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları	98
Şekil 41 : Herhangi Bir Apoptotik Etken Olmaksızın MCF-7 Aro Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	102
Şekil 42: Sadece Etanol'e 1 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Aro Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	102
Şekil 43: 100nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Aro Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	103

Şekil 44: 500 Nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Aro Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	103
Şekil 45: 1000 Nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Aro Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	104
Şekil 46 A: Sadece Etanol'e B: 100nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	104
Şekil 47 A: 500 Nm Letrozol'e B: 1000 Nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	105
Şekil 48 A: Sadece Etanol'e B: 100nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	105
Şekil 49 A: 500 Nm Letrozol'e B: 1000 Nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları.....	106
Şekil 50: MCF-7 Hücre Hattında 1 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyote- rapinin Üzerine Etkisinin Beclin Ekspresyonu İle Gösterilmesi	108
Şekil 51 : Yüklenen Protenin Miktarının Eşit Olduğunu Doğrulamak İçin Membranın TBP Antikoru İle Strip Edilmesi	109
Şekil 52: MCF-7 Hücre Hattında 3 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyo- terapinin Otofaji Üzerine Etkisinin Beclin Ekspresyonu İle Gösterilmesi	109
Şekil 53 : MCF-7 Hücre Hattında 6 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyote- rapinin Otofaji Üzerine Etkisinin Beclin Ekspresyonu İle Gösterilmesi	110
Şekil 54 : MCF-7 Aro Hücre Hattında 1 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Rad- yoterapinin Otofaji Üzerine Etkisinin Beclin Ekspresyonu İle Gösterilmesi	111

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Laminar Akımlı Kabin.....	52
Resim 2: Co ₂ 'li Etüv.....	52
Resim 3: İverted Mikroskop	52
Resim 4: MCF-7 Hücrelerinin Mikroskopta Görüntüleri	56
Resim 5: Tripan Mavisi İle Canlı Ve Ölü Hücrelerin Boyanması	59
Resim 6: Naubauer Hemositometresi.....	60
Resim 7: 6 Well Plate	61
Resim 8: 96 Well Plate	61
Resim 9: Hücrelerin Labaratuardan Radyoterapi Cihazına Taşınması	64
Resim 10: Radyoterapi Düzeneği.....	65

KISALTMALAR

- ABD:** Amerika Birleşik Devletleri
Aİ: Aromataz İnhibitörü
AIF: Apoptozisi tetikleyen faktör
APAF-1: Apoptozisi aktive eden faktör-1
APO-1 = Fas : Apoptozisi tetikleyen reseptör-1
Atg: Otofaji ile bağlantılı proteinler
Bad: Bcl-2 hücre ölüm antagonisti
Bak: Bcl-2 antagonist/katil
Bax: Bcl-2 ilişkili X protein
Bcl-2: B hücreli lenfoma-2
Bid : Bcl-2 etkileşim bölgesi
Bim: Bcl-2 hücre ölümünün etkileşim mediatörü
CO-60: Kobalt -60
°C : Santigrat derece
CARD: Kaspaz toplama bölgesi
Caspase: Aspartat spesifik sistein proteinaz
DED: Efektör ölüm bölgesi
DIABLO: Düşük pI ile direk olarak IAP bağlayan protein
DNA: Deoksiribo nükleik asit
DKIS: Duktal karsinoma insitu
DHEA: Dehidroepiandrosteron
DMEM : Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumu
DMSO: Dimetil sülfoksit
DISC: Ölüme sebep olan sinyal kompleksi
ER: Östrojen reseptörü
ERE: Östrojen responsive element
EGFR: Epidermal Growth faktör reseptörü
EDTA: Etilen daimin tetra asetik asit
FBS: Fetal dana serumu
FADD: Fas ilişkili ölüm bölgesi

Gy: Gray
HER: Human epidermal growth faktör reseptörü
HRE: Hormon responsive element
IAP : Apoptozis inhibitörü
ICE: İnterlokın-1 beta dönüştürücü enzim
ICAD/CAD: Deoksiribonükleaz inhibitörü / kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz
LHRH: Luteinizan-hormon-releasing hormon
MCF-7 : İnsan meme kanseri hücre hattı
MCF-7 aro: Aromataz geni transfekte edilmiş insan meme kanseri hücre hattı
mM : Milimolar
µM: Mikromolar
MA: Moleküler ağırlığı
nM: Nanomolar
NOXA (Name for damage) : Hasarın ismi
PAS: Preautophagosomal structure
PBS : Fosfat tampon solüsyonu
PR: Progesteron reseptörü
PRE: Progesteron responsive element
PHÖ: Programlı hücre ölümü
PI3F: Fosfotidil inozitol 3-fosfat
PUMA : p53'ün ekspresyonunu arttırdığı apoptozis düzenleyicisi
RNA: Ribo nükleik asit
RIP: Reseptör bağlayıcı protein
SEER: Surveillance Epidemiology and End Results
SERM: Selective estrogen receptor modulator
SMAC/D (SMAC/DIABLO): Mitokondriden türetilen ikinci aktivatör
TNF : Tümör Nekroz Faktör
TNFR: Tümör Nekroz Faktör Reseptör
TRADD : TNFR-1 ilişkili Ölüm Bölgesi
TRAIL : TNF ile ilişkili apoptozise sebep olan ligand
TRADD : Tümör ilişkili ölüm bölgesi

TEŞEKKÜR

Radyasyon Onkolojisi Uzmanlık Eğitimi almam için beni özendiren yol göstericiliği, hayat görüşü ile kendime örnek aldığım ve birikimlerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Munir Kınay'a

Uzmanlık eğitimimin her aşaması ve tez çalışmamda desteğini hep hissettiğim tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. İlknur Bilkay GÖRKEN'e ve Hücre Kültür Laboratuvarında deneysel çalışmalarımda beni yönlendiren, yüreklendiren ve bilgisini esirgemeyen ikinci danışmanım Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç.Dr. Zeynep Sercan'a,

Yetişmemde emekleri olan Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri; Anabilim Dalı başkanı Prof.Dr. Rıza Çetingöz, Prof.Dr. Hilmi Alanyalı, Prof. Dr. Fadime Akman, Doç.Dr. Ayşe Demiral ve Uzman Dr. Oğuz Çetinayak'a,

Tezim için Letrozol ve malzemeleri temin eden Novartis İlaç Firması'na, MCF-7 aro hücrelerini hediye eden Kalifornia Beckman Araştırma Enstitüsü Başkanı Dr. Shiuan Chan'a, MCF-7 hücrelerini hediye eden Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Semra Koçtürk ve Doktora Öğrencisi Birce Akpınar'a, CT-FBS hediye eden Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Ceren KORKMAZ'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteği ve yardımları için Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora Programı öğrencisi Araştırma Görevlisi Biomühendis Dilek GÖKTÜRK'e, Radyasyon fiziği ile ilgili destekleri için Uzm. Zafer Karagüler ve Seray Kurt'a, Akım Sitometri analizleri için Onkoloji Enstitüsü Hematoloji Laboratuvarı'ndan Uzm. Biolog Halil Ateş'e

Bilgisini, sabrını zorladığım ama her zaman bıkmadan bana yardımcı olan Uzm.Dr.Zümre ARICAN ALICIKUŞ'a, moral kaynağım olan ve birlikte olmaktan huzur ve mutluluk duyduğum arkadaşlarım ,Uzm. Dr. Nihal Dağ, Uzm. Dr. Betül ALTAŞ ve Arş. Gör Dr. Işın Arslan'a,

Her zaman desteklerini esirgemeyen Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Bölümü'ndeki, Araştırma Görevlileri, Radyoterapi Teknikerleri ve diğer tüm personel'e,

İyi ve kötü, her anımda yanımda olan ve beni sonuna kadar destekleyen, en kötü anımda beni mutlu edebilen, saygı ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen eşim Burak İŞMAN'a

Beni bu günlere getiren, attığım her adımda arkamda olan, desteklerini esirgemeyen, beni yüreklendiren ve bana inanan çok sevdiğim anne ve babama,
Hayata ve umuda dair bana çok şey öğreten sevgili hastalarım,

TEŞEKKÜR EDERİM

ÖZET

Radyoterapi İle Eşzamanlı Letrozol Kullanımının Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Ölüm Mekanizmaları Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Amaç:

Meme kanseri dünyada üçüncü sıklıkla rastlanan kanserdir ve kadınlarda en sık görülen malignitedir. Kadınlardaki kanser olgularının %37'sinden sorumludur. Meme kanserli hastaların adjuvan endokrin tedavi standartlarında son yıllarda önemli değişiklikler olmuştur. Preklinik ve klinik çalışma sonuçlarına göre hormon reseptör pozitif tümörler moleküler, biyolojik ve klinik farklılıklar göstermektedir. Hormon reseptörü pozitif meme kanserlerinin çoğunda hormonal tedavi kullanımı sağkalım süresini uzatmaktadır. Premenapozal kadınlarda standart endokrin tedavi tamoksifendir. Reseptör pozitif postmenapozal hastalarda ise optimal adjuvan hormonal tedavi, aromataz inhibitörlerini başlangıç tedavisi olarak ya da tamoksifen tedavisi sonrasında kullanılmaktadır. Üçüncü jenerasyon aromataz inhibitörleri ile yapılan çalışmalarla bu ilaçların ne zaman kullanıldığından bağımsız olarak progresyona kadar geçen süre ve hastalısız sağkalım açısından en az tamoksifen kadar etkili ve daha üstün oldukları gösterilmiştir .

Meme kanserinde postoperatif radyoterapi hem yerel bölgesel hastalığı kontrol etmek, yinelemeleri engellemek, hem de sağkalımı arttırmak amacıyla kullanılır. Deneysel ve klinik çalışmalarda tamoksifenin radyoterapi ile kullanımının radyoduyarlaştırıcı etkisi ve radyoterapiye bağlı akciğer fibrozisini arttırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, aromataz inhibitörleriyle eşzamanlı olarak radyoterapi uygulamasının etki ve yan etkileriyle ilgili çok kısıtlı bilgi vardır. Yapılan tek bir deneysel çalışmada letrozolün meme kanseri hücrelerinin radyasyon duyarlılığını arttırdığı ortaya konmuştur.

Bu çalışmanın amacı hücre kültüründe iyonize radyasyon ve letrozolün eşzamanlı kullanımının hücre ölüm mekanizmaları üzerine etkisini incelemektir.

Gereç ve Yöntem:

Meme kanseri hücrelerinde radyoterapi ile eşzamanlı letrozol kullanımının hücre ölüm mekanizmaları üzerine olan etkilerini göstermeyi hedeflediğimiz çalışmamız in vitro koşullarda hücre kültürü yöntemleri kullanılarak yapıldı ve çalışmamızda, model olarak MCF-7 aro meme kanseri hücre hattı ve kontrol grubu olarak da MCF-7 hücreleri kullanıldı.

Letrozol 100 nM, 500 nM ve 1000 nM dozlarında uygulandı. Hücre hatları 1,3 ve 6 gün letrozole maruz bırakılarak, Cobalt-60 kullanılarak, 2 ve 4 Gy dozlarıyla ışınıldı. Deneyler radyoterapi sonrası 24. saatte yapıldı. Apoptotik hücre ölümü, "Fluorometric Caspase 3 Assay Kit" ile apoptotik davranış ölçümü ve "Annexin-V FITC Apoptoz Tespit Kiti" ile akım sitometrede PI ile boyanan ölü hücrelerin analizi ile gösterildi. Hücre hatlarında otofajide rol alan beclin geninin ekspresyonunun protein düzeyinde belirlenmesi için western blot tekniği kullanıldı. MCF-7 hücreleri ile deneyler 3 kez tekrarlandı. MCF-7 aro hücrelerinin elde edilmesinde yaşanan problemler nedeniyle, bu hücre hattıyla deneyler sadece 1 kez yapılabildi.

Bulgular:

MCF-7 hücrelerinde hücre ölüm mekanizması şekillerinden biri olan apoptotik ölümü Kaspaz-3 ve Annexin-V yöntemi ile değerlendirdiğimiz deneylerimizde 1, 3 ve 6 günlük letrozol maruziyeti sonrası artan ilaç ve radyasyon dozlarında; erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. MCF-7 aro hücrelerinde ise Letrozol varlığında hücre ölümünde genel olarak yüksek dozlarda apoptozisde azalma görmekteyiz. Deneyler sonucu gözlenen nekrozdaki azalma, hücre ölümünün nekroza kaydığını göstermektedir.

MCF-7 hücrelerinde 1 günlük belirlenen dozlardaki Letrozol maruziyeti ardından 4 Gy ışınlama sonrası kontrol grubuna göre otofajide bir artış gözlenmektedir. 3 ve 6 günlük Letrozol maruziyeti sonrası ise otofajide hiçbir artış izlenmemektedir.

MCF-7 Aro hücrelerinde her ne kadar tekrarlanması gerekse de Letrozol'ün indüklediği otofajiyi değerlendirdiğimizde genel olarak 2 ve 4 Gy 'de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bir artış gözlenmektedir.

Sonuç:

Elde edilen veriler doğrultusunda Letrozol'ün eşzamanlı kullanımının hormon duyarlı, reseptör pozitif ve aromataz enzimi eksprese eden hücrelerde hücre ölüm mekanizmaları üzerinde olumlu etkisi olduğu söylenebilmekle beraber daha sağlıklı bilgiler verebilmek için devam eden deneylerin sonuçlarına da ihtiyaç vardır. Bu konu ile ilgili yapılmış çok fazla çalışma olmaması nedeniyle bu sonuçlar geliştirilmiş çalışmalarla desteklenmelidir.

Anahtar Kelimeler: MCF-7 hücre hattı, MCF-7 aro hücre hattı, Radyoterapi, Letrozol, Apoptoz ve Otofaji

ABSTRACT

Study of The Effect of Concurrent Use of Letrozole with Radiotherapy to the Cell Death Mechanisms in the Breast Cancer Cell Line

Purpose:

Breast cancer is the third most common cancer worldwide and the most common malignancy in women. It is responsible for 37% of cancer cases in women. Recently, there have been important changes regarding standard adjuvant endocrine therapy in breast cancer patients. According to the results of preclinical and clinical studies, hormone receptor-positive tumors have molecular, biological and clinical differences. Using hormonal treatment prolongs survival for the majority of hormone receptor positive breast cancer

In premenopausal women standard endocrine therapy is tamoxifen; the optimal adjuvant hormonal therapy in ER (+), postmenopausal patients is aromatase inhibitors as initial therapy or after tamoxifen treatment. In the third-generation aromatase inhibitors studies, progression and disease-free survival rates have shown that aromatase inhibitors are at least as effective and are superior to tamoxifen

Postoperative radiotherapy (RT) decreases the risk of locoregional recurrence. RT is also associated with improved survival in high-risk premenopausal and postmenopausal women with breast cancer. Experimental and clinical studies show that concurrent use of tamoxifen sensitizes cells to radiotherapy and increases radiotherapy induced pulmonary fibrosis. Whether letrozole sensitizes breast cancer cells to RT has not been determined with sufficient number of studies. There is a single experimental study of breast cancer cells that revealed increased radiation sensitivity with letrozole. The purpose of this study is to investigate the effect of concurrent use of letrozole with radiotherapy to the cell death mechanisms in the breast cancer cell line.

Materials and methods:

In our study in vitro cell culture methods were used, as a model MCF-7 aro breast cancer cell lines were chosen as model and MCF-7 cells were chosen as the control group.

Letrozole was used with varying doses of 100, 500, 1000 nM, and cell lines were exposed to letrozole for 1, 3 and 6 days; Irradiations were performed using a cobalt-60 source with doses 2 and 4 Gy. Experiments were held 24 hours after radiotherapy. Apoptotic cell death was evaluated with "Fluorometric Caspase 3 Assay Kit"; by measurement of the apoptotic behavior, with "Annexin-V FITC Apoptoz Detection Kit" by showing of dead cells with PI staining in flow analysis. Western blot technique was used for determination Beclin gene expression which has a role in autophagy in cell line. The experiments were repeated three times for MCF-7 cells but experiments with MCF-7 aro cells could be done only one time because of the problems to obtain the cell line.

Results:

In our experiments with MCF-7 cell line, we evaluated caspase-3 and Annexin-V results for 1,3, and 6 day incubation with letrozole. There was no significant difference for early apoptoz, late apoptoz and necrosis. Apoptozis was reduced by increasing radiation doses in MCF-7 aro cells under Letrozol effect. The experimental results of decreasing necrosis showed that there was a trend from necrosis to apoptoz.

Our study showed a increased autophagy in cells which received 4 Gy irradiation and incubated with letrozole for 1 day compared with the control group. There was no difference in cells which received 2-4 Gy irradiation and incubated for 3 and 6 days. Also we found a increased autophagy in MCF-7 Aro cells which received 2 - 4 Gy irradiation and incubated with letrozole for 1 day compared with the control group.

Conclusion:

In accordance with the data obtained, we had positive effect on cell death mechanisms for hormone-sensitive, receptor-positive and aromatase enzyme expressed cells with concurrent use of letrozole. The results of ongoing studies are needed to provide better information. This study must be supported by improved results because there isn't sufficient information for this topic in the literature

Key Words: MCF-7 and MCF-7 aro cell line, Radiotherapy, Letrozole, Apoptoz, Autophagy

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri dünyada üçüncü sıklıkla rastlanan kanserdir ve kadınlarda en sık görülen malignitedir. Kadınlardaki kanser olgularının %37'sinden sorumludur(1).

Meme kanserinin nedenleri arasında çevresel faktörler, çeşitli karsinojenik maddeler ve genetik yapı sayılabilir.

Meme kanserli hastaların adjuvan endokrin tedavi standartlarında son yıllarda önemli değişiklikler olmuştur. Preklinik ve klinik çalışma sonuçlarına göre hormon reseptör pozitif tümörler moleküler, biyolojik ve klinik farklılıklar göstermektedir. Östrojen reseptör (ER) ve progesteron reseptör (PR) varlığının meme kanserli her hastada mutlaka değerlendirilmesi gerekmektedir. Endokrin tedavi % 10'un üstünde pozitiflik varlığında verilir (2). Hormon reseptörü pozitif meme kanserlerinin çoğunda hormonal tedavi kullanımı sağkalım süresini uzatmaktadır. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 60'ında hormon reseptörü pozitiftir.

Premenapozal kadınlarda standart endokrin tedavi tamoksifendir. Tamoksifenin 5 yıl süreyle kullanımı önerilmektedir. Overin baskılanması tamoksifene bir seçenek olarak kabul edilebilir. Premenapozal hastalarda tamoksifen ve LHRH analogları seçilmiş olgularda bir arada kullanılabilir. ER(+) postmenapozal hastalarda optimal adjuvan hormonal tedavi, aromataz inhibitörlerini başlangıç tedavisi olarak ya da tamoksifen tedavisi sonrasında kullanmaktır. Üçüncü jenerasyon aromataz inhibitörleri ile yapılan çalışmalarla bu ilaçların ne zaman kullanıldığından bağımsız olarak progresyona kadar geçen süre ve hastalısız sağkalım açısından en az tamoksifen kadar etkili ve daha üstün oldukları gösterilmiştir (3).

Breast International Group (BIG) 1-98 çalışmasında 5 yıl tamoksifen, 5 yıl letrozol, tamoksifen sonrası letrozol, letrozol sonrası tamoksifen olarak 4 kol karşılaştırılmış ve hastalısız sağkalımda ve uzak yinelemsiz sağkalımda letrozol kollarında avantaj saptanmıştır (4).

MA 17 çalışması, tüm aromataz inhibitörleri çalışmaları içinde nod pozitif hastalarda sağkalım avantajı göstermiştir. Bu çalışmada 5 yıllık tamoksifen tedavisini tamamlayan hastalar 5 yıl letrozol veya plasebo koluna rastgele bölünmüşlerdir. Hastalısız sağkalım letrozol kolunda anlamlı derece daha uzundur (5).

Meme kanserinde postoperatif radyoterapi hem yerel bölgesel hastalığı kontrol etmek, yinelemeleri engellemek, hem de sağkalımı arttırmak amacıyla kullanılır (6,7). Deneysel ve klinik çalışmalarda tamoksifenin radyoterapi ile kullanımının radyoduyarlaştırıcı etkisi ve radyoterapiye bağlı akciğer fibrozisini arttırdığı gösterilmiştir (8,9). Bununla birlikte, aromataz inhibitörleriyle eşzamanlı olarak radyoterapi uygulamasının etki ve yan etkileriyle ilgili çok kısıtlı bilgi vardır. Yapılan tek bir deneysel çalışmada letrozolün meme kanseri hücrelerinin radyasyon duyarlılığını arttırdığı ortaya konmuştur (10).

Bu çalışmada da iyonize radyasyon ve letrozolün eşzamanlı kullanımının hücre ölüm mekanizmaları üzerine etkisi araştırılacaktır.

2-GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİ

2.1.1. İnsidans ve Risk Faktörleri

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen ve ayrıca ikinci en sık ölüme neden olan kanser türüdür (11). Meme kanseri kadınlarda, yeni kanser olgularının %26'sını oluşturur ve %15'lik oranla akciğer kanserinden sonra ikinci sıklıkla ölüm nedenidir (12). Meme kanserlerinin yaklaşık %1'i erkeklerde görülür ve vakaların %90'ında ER pozitifdir(13). İnsidans 2002 yılına kadar artma eğiliminde iken mamografinin tarama yöntemi olarak yaygınlaşması ile azalma eğilim gözlenmeye başlamıştır. Azalma eğilimi, postmenopozal hormon replasman tedavisi kullanımının azalması ile de ilişkili olabilir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) meme kanseri kadınların majör hastalığı olsa da Sürveyans Epidemiyoloji ve Son Sonuçları programında 1988 ve 2001 yılları arasında tanı alan hastalarda sağkalım sonuçlarının pek çok diğer tümöre göre daha iyi olduğu gösterilmiştir(14).

Bütün dünyada insidans, mortalite ve sağ kalımda geniş varyasyonlar bulunmaktadır. Bunun sebebi yaş, etnik kimlik, diyet ve yaşam tarzı gibi altta yatan kompleks faktörlerin bulunmasıdır (11).

Spesifik risk faktörleri hakkındaki bilgilerimizin çoğu, ABD’de yapılmış olan “Nurses’ Health Studies ” ve Birleşik Krallık’ta yapılmış olan “Million Women Study” gibi gelişmiş ülkelerde yapılan geniş çaplı gözlem çalışmalarından çıkarılmıştır.

Meme kanseri riskini artıran faktörler; yaş, kadın cinsiyet, diyet (diyette alkol miktarında artış, artmış meme kanseri, folat miktarında artış ise azalmış meme kanseri riski ile ilişkili bulunmuştur), obezite, ionize edici radyasyona maruziyet (özellikle 20 yaş altında), oral kontraseptif kullanımı, hormon replasman tedavisi, artmış kümülatif ovaryan siklus sayısını belirten erken menarş, geç menopoz, nulliparite, geç yaşta ilk doğum ve aile öyküsü olarak bilimektedir.

2.1.2. Meme kanserinin biyolojisi:

Meme kanseri büyümesi ve gelişmesi karışık birçok hormon ve büyüme faktörü etkisi altında oluşur. Büyüme faktörlerinin bir kısmı meme hücrelerinin kendileri tarafından salınan otokrin etkili faktörlerdir. Östradiol, meme hücresi büyümesine etki eden peptit ve proteinlerle etkileşim içinde olan çok sayıda gen ekspresyonunu düzenler. Bu faktörlerin spesifik reseptörlerine bağlanması etkilerinin ortaya çıkmasını tetikler. Sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonların hücre membranındaki ve içindeki reseptörlerine bağlanması ile ortaya çıkan etkileşim değişik gen gruplarını baskılayan ya da aktiveştiren hücre içi iletişim sisteminin tetiğini çeker. Hormonlar ve onların reseptörleri normal meme dokusunun gelişimini düzenledikleri için, meme dokusundan ortaya çıkan malign hücrelerin bu hormon reseptörlerinin birçoğunu eksprese etmesi ve onların belli derecede hormon duyarlı kalmaları şaşırtıcı olmayacaktır. Östrojen kontrolü altında meme kanseri hücreleri ile östrojenden bağımsız kanser hücrelerinin farklı büyüme ve davranış özellikleri göstermesi söz konusudur (15).

Örneğin, ER pozitif meme kanserlerinde “tumor growth factor-beta” ve “insulin-like growth factor-2” gibi otokrin büyüme faktörleri östrojen tarafından uyarılıp antiöstrojenler tarafından inhibe edilirken, bu faktörlerin sekresyonu ER negatif meme kanserlerinde östrojenden bağımsızdır. Benzer şekilde östrojen bağımlı meme kanserinde “Epidermal Growth Factor Receptor” (EGFR) ekspresyonu %8 iken, hormon reseptör negatif hastalarda bu oran %60'a kadar ulaşmaktadır (16).

Meme kanserinde en çok incelenen ve meme kanseri patogeneğinde hormon reseptörleri ile birlikte en etkin olan EGFR (HER) ailesi olarak bilinen reseptörlerdir. EGFR ailesi 4 adet reseptörden oluşur. Hücre membranında monomer olarak bulunan bu reseptörler HER-1 (EGFR-1), HER-2 (EGFR-2), HER-3 (EGFR-3) ve HER-4 (EGFR-4) olarak isimlendirilir. Transmembran yapıda olan bu reseptörler hücrenin dış yüzeyinde bir ligand bağlayıcı bölüm, bir lipofilik transmembran bölüm ve hücrenin iç yüzeyinde tirozin kinaz içeren bir bölümden (HER-3 hariç) oluşur (17,18). Ligandlar bağlandıklarında reseptörler birbirleriyle homodimer veya heterodimer oluşturarak aktive olurlar. Daha sonra hücre içinde bulunan tirozin kinaz fosforillenir. Bu fosforillenme ile bir dizi ileti yolu çalışmaya başlar. HER-2, kendiliğinden dimerize olup sinyal ileti yolunu uyarabilir (19). EGFR-1, HER-2'ye en sık eşlik eden ikinci reseptördür. EGFR-1 ekspresyon artışı veya amplifikasyonu ER ile ters orantılıdır. EGFR-1 ekspresyonu invaziv duktal karsinomda kötü prognozla ilişkilidir (20).

“Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)” tarafından başlatılan en önemli ileti yolları, fosfotidil inozitol-3 kinaz ve mitojenlerle aktifleşen protein kinaz yollarıdır. Sitozoldeki çeşitli sinyal ileti yolları EGFR yolunu çeşitli basamaklarda uyarabilir veya engelleyebilir. Sonuçta, ilerleyen sinyalin net etkisi, hücre içindeki sinyal ileti yolu arasındaki etkileşime bağlıdır (21). Östrojen, EGFR-1 ve HER-2 yolları bazen kesişerek aditif ya da sinerjik etki gösterebilir. Bazen de EGFR-1 yolunun antiöstrojenik tedaviye direnç oluşturması gibi bu reseptörler üzerinden uygulanan tedavilere direnç oluşturur (22). Diğer yandan bu reseptörlerin herhangi biri diğerlerinin yokluğunda tümör gelişimi, büyümesi, çoğalması ve metastaz sürecini yönetebilir.

Örneğin, “triple” negatif meme kanserlerinde başlıca yol EGFR-1 iken, hormon reseptör pozitif meme kanserlerinde östrojendir. HER-2, hormon reseptör negatif kanserlerin bir kısmında tümör davranışını belirlemektedir (23).

2.1.3. Nükleer Hormon Reseptörleri:

Nükleer reseptörler, steroid hormon reseptörlerini de içine alan çok üyeli bir reseptör grubudur. Reseptörler ligandlarına göre isimlendirilir ve buna uygun şekilde isimleri kısaltılarak kullanılır:

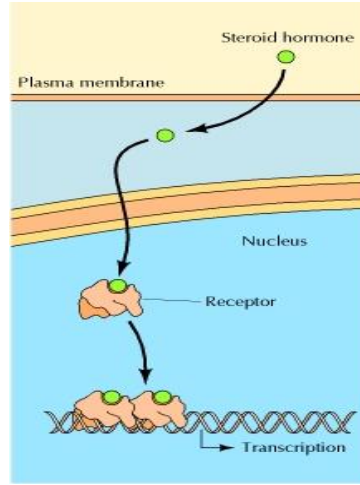
Progesteron Reseptörü PR, Östrojen reseptörü ER.

Bu reseptörler DNA'daki bazı özel dizilere bağlanabilen ve bu yolla transkripsiyonun hızını değiştirebilen “transkripsiyon faktörleri”dir. Reseptörlerin ortak modüler bir yapıları vardır. Her nükleer reseptör A, B, C, D, E, F olarak adlandırılan altı bölgeden oluşur. C bölgesi DNA'ya bağlanmaktan sorumlu olan ve reseptörler arasında en yüksek homoloji gösteren bölgedir. Reseptörün ikinci önemli bölgesi ligandın bağlanmasından sorumlu olan E bölgesidir. Yaklaşık 250 amino asitten oluşan bu bölge benzer ligandları olan reseptörler arasında nispeten yüksek homoloji gösterir. Bu bölge ayrıca ligand-bağımlı transaktivasyondan sorumludur.

Reseptörün agonist liganda bağlı olduğu durumdaki konformasyonu koaktivatör adı verilen bazı proteinlerle kompleks yapmasını sağlar. Koaktivatörlerin intrinsek bir histon asetil transferaz aktivitesi vardır ve bu yolla kromatin yapısındaki histonların asetillenmesi, DNA ile histonlar arasındaki iyonik etkileşimi bozarak kompakt kromatin yapısının gevşeyip çözülmesine sebep olmaktadır. Bu yapı, RNA polimeraz II'nin DNA'ya sıkıca yerleşip transkripsiyonu başlatmasına olanak vermektedir. Reseptöre antagonist bir ligand bağlı olduğunda (bazı reseptörler için herhangi bir ligand bağlı olmadığı durumda bile) ise korepresör adı verilen proteinler reseptörle kompleks yapar. Bu kompleksin içinde histon deasetilaz enzimleri de bulunur. Histon deasetilazların etkisi ile asetil grupları uzaklaştırılan histonlar tekrar pozitif yüklerini kazanır ve DNA ile sıkı etkileşime girerler. Böylece kromatin kompakt hale gelir ve transkripsiyon önlenmiş olur.

Reseptörler DNA üzerinde spesifik dizilere bağlanırlar. Bunlara hormona yanıt elemanı adı verilir (Hormone Responsive Element, HRE). Bunlar da aynı reseptörler gibi isimlendirilirler: PRE, ERE.

Nükleer reseptörlerin farklı ligandlarla, birbirleriyle ve başka proteinlerle etkileşmeleri sonucu çok çeşitli yanıtlar oluşabilmektedir. Yani bir nükleer reseptörün yanıt elemanına bağlanması her zaman yapısal genin transkripsiyonunun artmasıyla sonuçlanmaz. Bazen transkripsiyonun baskılanması da söz konusudur. Bu tip üst düzey kontrol ökaryotlara özgüdür ve hem gelişim-farklılaşma süreci için, hem de farklı dokulara ait hücrelerdeki özgül protein ekspresyonunun sürdürülebilmesi için mutlak gereklidir (24,25).



Şekil 1. Steroid hormonların etki mekanizması

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> NCBI , Bookshelf , The Cell , Cell Regulation, Cell Signaling , Signaling Molecules and Their Receptors)

2.1.3.1. Östrojen Reseptörleri:

Östrojen hormonu meme dokusu gelişiminde ve meme kanseri gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Etkisini iki tip özel reseptör aracılığı ile gösterir (ER α ve ER β). Bu nedenle meme kanserlerinde östrojen hormonu ve reseptörü arasındaki etkileşimi bloke etmek tedavide önemli bir hedeftir (26). Östrojen reseptörleri, nükleer transkripsiyon düzenleyicisi olarak görev yapan geniş bir steroid reseptör ailesinin üyeleridir ve ana görevleri, hedef genlerin ekspresyonlarını düzenlemektir (27).

2.1.3.1.1. Östrojen Reseptörü Alfa

ER alfa, meme kanserlerinde iyi tanımlanmış bağımsız bir risk faktörüdür (28). beşyüzdoksanbeş aminoasitten oluşur. ERalfa, kromozom 6q25.1'de kodlanmaktadır (29). Günümüzde ERekspresyonu, meme tümörlerinde adjuvan endokrin terapi verilip verilmemesini belirleyen bir belirteç olarak kullanılmaktadır (30).

ERalfa, normal meme dokusunda luminal epitel hücrelerinin nükleusunda eksprese edilir ve premenopozal kadınlarda postmenopozal olanlara göre ekspresyonu daha düşüktür (31). Ayrıca normal meme dokusunda ER α pozitif hücreler nonproliferatif hücrelerdir. Normal memede ER α pozitif hücrelerin oranı genel olarak düşükken (%10-20) benign proliferatif hastalıklarda, atipili proliferatif hastalıklarda ve düşük dereceli DKIS'de artış olmaktadır (32). Yüksek grade'li DKIS'de ER α ekspresyonu düşüş göstermektedir. Ayrıca invaziv meme karsinomlarında da grade arttıkça ER α eksprese eden tümörlerin oranı azalmaktadır. Ek olarak tüm meme kanserlerinin %70-80'i ER α eksprese etmekte ve bu tümörlerin luminal hücrelerden geliştiği düşünülmektedir (31).

ER alfa, meme kanserinde tedavi ve önleme amacıyla ilaç geliştirmek için önemli bir hedeftir . Çünkü östrojen hormonu ve ER α arasındaki etkileşim hedef hücrelerde proliferasyon artışına neden olmaktadır. Bu nedenle endokrin tedavinin amacı bu etkileşimi bloke etmektir. Endokrin tedavi hem daha etkin hem de daha az toksik olduğu için avantajlı bir yöntemdir. Ek olarak östrojen ve progesteron reseptörü eksprese eden tümörlerin %69 oranında endokrin tedaviye yanıt veriyor oluşu, ER α 'nın ne kadar önemli bir prognostik belirteç olduğunun kanıtıdır (33).

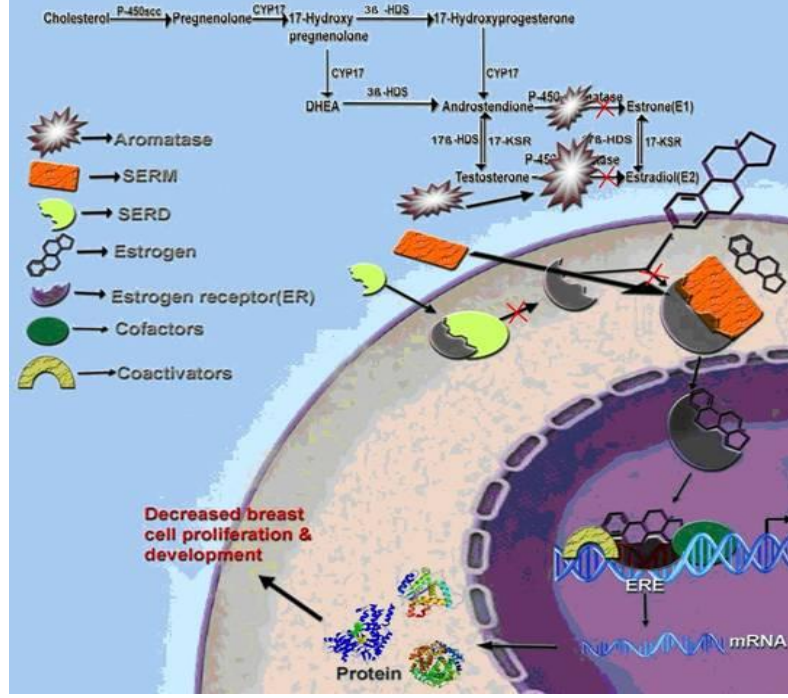
ER alfanın meme kanserlerinde düşük histolojik grade, negatif aksiller lenf nodu tutulumu, PR ekspresyonu ve hastalıksız sağkalım süresi uzunluğu gibi iyi prognoz göstergesi özelliklerle ilişkili olduğu günümüze kadar bir çok çalışmada bildirilmiş ve kanıtlanmıştır (34).

2.1.3.1.2. Östrojen Resptörü Beta

ER beta, 530 aminoasitten oluşan, nükleer reseptör süper ailesi üyesi bir proteindir ve ER β kromozom 14q22-24'te kodlanmaktadır (29). Meme kanserindeki rolü ER α 'nın rolü kadar net anlaşılabilmiş değildir. Heterodimerik yapısı nedeniyle östrojen sinyalizasyonunda daha dominant bir regülatör olduğu öne sürülmektedir. ERbeta, meme glandlarında duktus gelişiminde rol oynamaz ancak heterodimerizasyon sonrası transaktivasyon fonksiyonunu engelleyerek ER α 'nın aktivitesini inhibe etmektedir. Bu nedenle antiproliferatif bir gen olduğu düşünülmektedir (35).

Normal meme dokusunda ER β , ER α 'nın aksine daha geniş bir dağılım paterni sergileyerek luminal epitel hücrelerinde, myoepitel hücrelerinde ve stromal hücrelerde nükleer ve bir miktar sitoplazmik ekspresyon gösterir (31). Normal memede ER β eksprese eden hücrelerin oranı %80-85 arasında değişmektedir (35). Yüksek dereceli DKIS'de ise her iki ER'nin ekspresyonu ya çok düşük ya da hiç yoktur. İnvaziv karsinomlarda ER β ekspresyonunun azaldığı ve ER α /ER β oranı yüksekliğinde kanser progresyonunun daha fazla görüldüğü bildirilmektedir (31).

ER'nün major ligand-bağımlı transkripsiyonel aktivite fonksiyonu heat-shock proteinleri kompleksini yerinden kaldırarak homodimerize olmasıdır. Bu homodimer hedef genlerdeki östrogene tepki veren elementlere bağlanarak çeşitli koaktivatörlerle birlikte transkripsiyonu artırır. Multimerik bir sinyal dizisinin içinde yer alması, östrojen ve östrojen benzeri ürünlerin (ör: tamoksifen) farklı hedef organlardaki farklı etkilerine katkıda bulunur. Meme kanserlerinin yaklaşık %70 kadarı östrojen reseptörü eksprese eder (ER pozitif); bu tümörler ER negatif olanlara göre daha yavaş çoğalma ve daha iyi diferansiye olma eğilimindedirler. Antiöstrogen tedavinin adjuvan kullanımı rekürrensi önlemede, metastaz varlığında ise sağkalımı uzatmada etkilidir (31,35).



Şekil 3. Antiöstrojenik Tedavinin Moleküler Etki Mekanizması

<http://www.cancer-therapy.org/CT6B/HTML/69.Kumar&Kumar,655-664.html>

2.1.4. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri multidisipliner yaklaşımı gerektirir. Bu nedenle olgular meme cerrahı, radyasyon onkoloğu, medikal onkolog, meme patolojisi ve radyolojisi uzmanının bulunduğu bir ekipçe değerlendirilmeli ve tedavisi planlanmalıdır. Her olgu ayrı değerlendirilmekle birlikte tedavi planlamasında aşağıdaki etmenler göz önünde bulundurulmalıdır;

- Tümörün çapı ve evresi,
- Kanseri hücrelerinin tipi,
- Aksilla lenf bezlerine yayılımın olup olmadığı,
- Tümörün hormon reseptörlerinin durumu,
- Kanseri hücrelerindeki genetik materyalin tipi,
- Kanseri hücrelerinin büyüme oranı,
- Uzak metastaz olup olmadığı
- Olgunun yaşı ve genel sağlık durumu.

Tedavi Yöntemleri:

Cerrahi Yöntemler

- Genişletilmiş veya süper radikal mastektomi,
- Radikal mastektomi
- Modifiye radikal mastektomi,
- Total mastektomi,
- Meme koruyucu cerrahiler.

Radyoterapi Yöntemleri

- Eksternal
3 boyutlu meme radyoterapisi,
Yoğunluk ayarlı radyoterapi,
Parsiyel meme ışınlaması,
- Brakiterapi,

Sistemik Tedavi Yöntemleri

- Kemoterapi
- Hormonal tedavi
- İmmünoterapi

2.1.5. Meme Radyoterapisi

Erken evre (Evre I ve II) meme kanserli olgular günümüzde genellikle meme koruyucu cerrahi , nadiren ise mastektomi ile tedavi edilmektedirler. Aksilla negatif olgularda aksiller bölgeye ise sentinel lenf bezi örnekleme ile yaklaşılmaktadır. Sentinel lenf bezi tutulumu saptanan olgularda standart aksiler diseksiyon uygulanmaktadır. Bu konuda yeterli deneyime sahip olmayan merkezlerde ise halen aksiller disseksiyon yapılmaktadır. Meme koruyucu cerrahi sonrası standart olarak tüm meme ışınlaması gerekmektedir. Erken evre olgularda hastaya ve hastalığa bağlı koşullar göz önüne alınarak mastektomi de yapılabilir. Mastektomi sonrası ise aksiller lenf bezi tutulumu varlığında ya da aksilla tutulumu olmayan olgularda olumsuz faktörlerin varlığında radyoterapi yapılmaktadır.

Randomize çalışmalar mastektomi ile meme koruyucu cerrahi ardından radyoterapi uygulanan olgular arasında hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım açısından fark olmadığını göstermiştir (39,40).

Meme koruyucu cerrahinin en önemli avantajı vücut imajı ve yaşam kalitesinin korunmasıdır. Yalnızca meme koruyucu tedavi ile meme koruyucu cerrahi sonrası radyoterapiyi karşılaştıran randomize çalışmalarda ise sağkalımda önemli bir farklılık sağlanmamasına rağmen lokal yineleme radyoterapi uygulanmayanlarda anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur (39).

Mastektomi sonrası radyoterapide amaç, operasyon sonrası göğüs ön duvarında, ciltte, kalan meme dokusunda ve bölgesel lenfatiklerde bulunan tümöral hücrelerin yok edilmesidir.

Radyoterapi meme kanseri tedavisinde gerek primer, gerekse adjuvan olarak önemli bir yere sahiptir. Erken evre meme kanserinde kemoterapi ve hormonoterapi ile 10 yıllık sağkalım % 70-80'lere ulaşırken, lokal kontrol uzun yaşam süresi olan bu hastalarda ciddi bir problem olmaya devam etmiştir.

Bunun üzerine yapılan metaanalizlerde postoperatif radyoterapinin lokal kontrolü arttırdığı gösterilmiştir (41,42). Artmış lokal kontrolün yanı sıra uzak metastaz üzerine de olumlu katkılar sağladığı gösterilmiştir (43). Meme koruyucu cerrahi uygulanmış tüm hastalarda postoperatif meme ışınlanması bugün için standart bir uygulama olmuştur.

2.1.6. Hormonoterapi:

Hormon reseptörü pozitif meme kanserlerinin çoğunda hormonal tedavi kullanımı sağkalım süresini uzatmaktadır.

Premenopozal Kadınlarda Standart Endokrin Tedavi:

Premenopozal kadınlarda standart endokrin tedavi tamoksifendir. Tamoksifenin 5 yıl süre ile kullanımı önerilmektedir. Overin baskılanması tamoksifene bir seçenek olarak kabul edilebilir. Premenopozal hastalarda tamoksifen ve LHRH analogları seçilmiş olgularda bir arada kullanılabilir.

EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) metaanalizi ER pozitif premenopozal hastalarda tamoksifen kullanımının yararlı olduğunu kanıtlamıştır (44).

Sonuç olarak premenopozal hastalarda 5 yıllık tamoksifen kullanımı standart tedavidir. Lenf bezi pozitif hastalarda daha uzun süre kullanımı klinik çalışmalarda araştırılmaktadır.

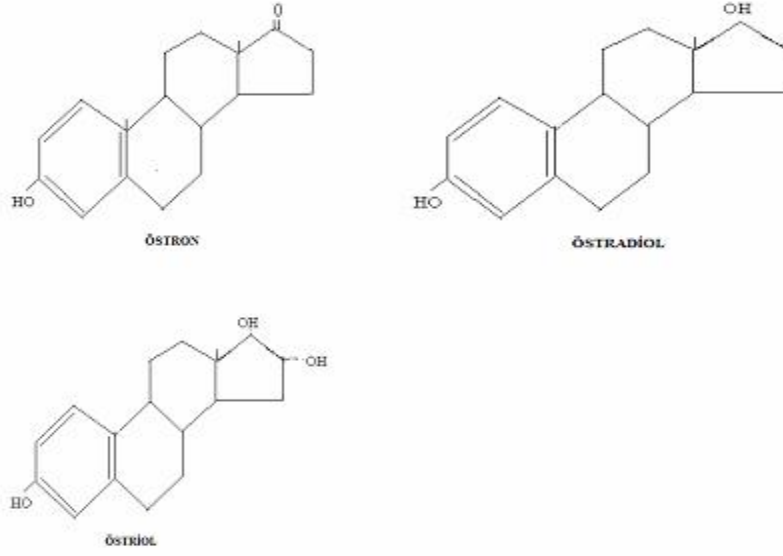
Postmenopozal Kadınlarda Standart Endokrin Tedavi:

Üçüncü jenerasyon aromataz inhibitörleri ile yapılan çalışmalar bu ilaçların ilerlemeye kadar geçen süre ve hastalısız sağkalım açısından en az tamoksifen kadar etkili veya daha üstün olduklarını göstermiştir (4,5,45,46,47,48,49,50).

Aromataz inhibitörlerinin kullanımı ile ilgili olarak Amerikan Klinik Onkoloji Derneği (ASCO) bir değerlendirme yaparak ER pozitif postmenopozal hastaların standart adjuvan endokrin tedavisinin aromataz inhibitörü içermesini önermiştir. Tedaviye aromataz inhibitörü ile başlanıp 5 yıl kullanılacağı gibi 2-3 yıl veya 5 yıllık tamoksifen tedavisi sonrasında 2-3 yıl veya 5 yıl aromataz inhibitörü kullanılabilir.

2.1.7. Östrojen Biyosentezi

Östrojen, normal meme epitel hücrelerinin farklılaşma ve çoğalmasının düzenlenmesinde, hamilelikte ve eşeyssel değişikliklerin meydana gelmesinde önemli rolü olan steroid yapıda bir hormondur (51,52,53,54). Östrojenik aktivite gösteren; östron (E1), 17 β -östradiol (E2) ve östriol (E3) olmak üzere üç bileşik izole edilmiştir. Östrojen hormonlarının birinci halkası doymamış (3 çift bağlı) olan bir monometilsteran halkası olup bunun 4. halkasının 17. karbonunda da bir O = ya da – OH grubu bulunur (Şekil 4) (54).



Şekil 4: Östrojenik aktivite gösteren bileşiklerin kimyasal yapısı .

(<http://www.cancer-therapy.org/CT6B/HTML/69.Kumar&Kumar,655-664.html>)

Bu bileşikler içinde en etkili olanı ovaryumda sentez edilen 17β -östradioldür. Seksüel olgunluğa erişmiş bir kadının kanında en fazla 17β -östradiol bulunmaktadır. Östron, postmenapozal dönemde kanda bulunan temel östrojendir. Diğer östrojenlerin metaboliti olan ve hamilelikte plasentada üretilen östriol'e ise hamilelikte kan ve idrarda yüksek düzeyde rastlanmaktadır (54). Premenapozal ve hamilelik dışı dönemde östrojenlerin temel üretim yeri ovaryumdur. Postmenapozal dönemde ise östrojenlerin büyük bir kısmı yağ dokuda aromataz aktivitesi ile androjenlerin periferik aromatazasyonu sonucu oluşmaktadır.

Östrojenlerin biyosentezi ise kolesterolden östrojene kadar bir seri basamaktan oluşur. Biyosentezde CYP17, CYP19 ve 17β -HSD gen ürünleri önemli rol oynamaktadır (Şekil 4). Östrojenlerin yapımında kullanılan ön maddeyi testosteron ve androstenedion oluşturur.

2.2. AROMATAZ İNHİBİTÖRLERİ

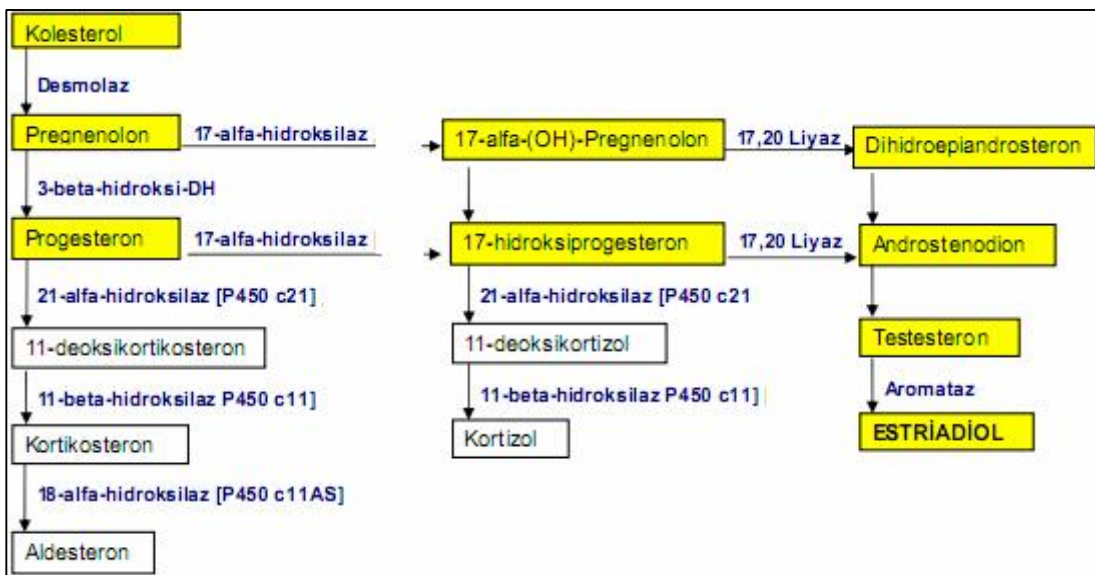
2.2.1.CYP-19 Geni:

CYP19 geni 15. kromozomun uzun kolu üzerine (15q21.2) yerleşmiştir. Östrojen biyosentezinde önemli rolü olan aromataz enzimini kodlar. Yaklaşık 12kb. büyüklüğündedir ve 10 ekzondan oluşmaktadır (55).

2.2.2. Aromataz Enzimi:

Aromataz enzim kompleksi, sitokrom P450 enzimi süper ailesinin bir üyesidir. Ovaryum, plasenta, adipoz doku, karaciğer, kas, beyin, normal meme ve meme tümörü dokusunda sentezlenir. Adipoz doku ekstrapnodal östrojen sentezinin ana kaynağıdır. Transkripsiyonu sitokinler, siklik nükleotidler, gonadotropinler, glukokortikoidler ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir (56,57).

Postmenapozal dönemde sentezlenen östrojenlerin büyük bir kısmı yağ dokuda aromataz enzim kompleksi aktivitesi ile androjenlerin periferik aromatisasyonu sonucu oluşur. Aromataz enziminin , karsinom hücrelerini çevreleyen adipoz stroma 6 hücrelerinde daha fazla eksprese olduğu kanıtlanmıştır. Bu da enzimatik aromatisasyonun tümör hücreleri için östrojen kaynağı olarak önemli olduğunu göstermektedir (58-61).



Şekil 5: Östrojen biyosentezi (<http://assulapia.com/index.htm>)

2.2.3 Aromataz inhibitörleri:

Aromataz inhibitörü kavramı antikonvülzif bir ajan olarak geliştirilen aminogluthemid'in yan etki olarak total adrenal yetmezliğe yol açtığı görülmüşdür (62). Aromataz inhibitörü ve antiöstrojenlerin tümör hücresi üzerine etki ederek östrojen etkileşimini nasıl bloke ettiği şekilde gösterilmiştir (63). Aromataz İnhibitörleri, antiöstrojenlere kıyasla östrojeni daha iyi baskırlar. Aromataz inhibitörleri premenopozal hastalarda over hiperstimülasyonuna neden olduğu için kullanılmaz.

Aromataz inhibitörleri etki meknizmalarına göre iki gruba ayrılır (62).

Tip I steroidal ajanlar:

Sitokrom p-450 enziminin katalitik bölgesine irreversibl olarak bağlanarak aromataz aktivitesinin kaybına neden olur. Bundan dolayı inhibisyonun devamı için ilacın sürekli kullanımı gerekmez. Devamlı kullanılmadığı için yan etkisi azdır.

Tip II nonsteroidal ajanlar:

Üst enzim ailesi olan sitokrom p-450'nin flavoproteini ile etkileşerek, kortizol ve aldesteron sentezini az veya çok oranda engeller.

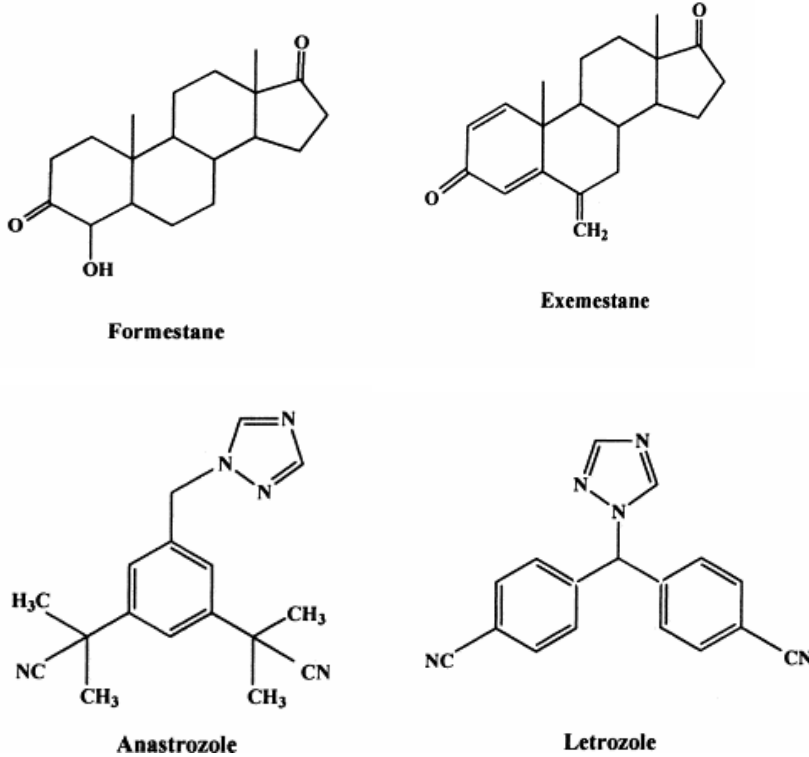
Aromataz inhibitörleri gelişim sıralamasına ve yapılarına göre üçe ayrılır. Gruplar Tablo 1'de gösterilmiştir.

	Nonsteroidal	Steroidal
1. Jenerasyon	Aminoglutetimid	
2. Jenerasyon	Rogletimid Fadrozol	Formestan
3. Jenerasyon	Vorozol Letrozol Anastrozol	Ekzemestan

Tablo 1: Aromataz İnhibitörleri Sınıflandırması

Yeni selektif aromataz inhbibitörleri kortikosteroid, mineralokortikoid ve tiroid hormon sentezini etkilemeksizin selektif olarak aromataz enzim aktivitesini inhbibe ederler. Bunun sonunda serumda ve tümör dokusunda östron, östradiol ve östron sülfat seviyelerini önemli ölçüde düşürürler.

Şekil 6'da aromataz inhbibitörlerinin kimyasal yapısı verilmiştir



Şekil 6: Aromataz İnhibitörlerinin Kimyasal Yapısı

(<http://www.cancer-therapy.org/CT6B/HTML/69.Kumar&Kumar,655-664.html>)

2.3. LETROZOL

Üçüncü jenerasyon nonsteroidal bir aromataz enzimidir.

2.3.1. Formülü:

Bir film kaplı tablet 2.5 mg letrozol içerir.Yardımcı maddeler: Sarı demir oksit, titandioksit.

2.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Tümör dokusunun gelişmesinin estrogen varlığına bağlı olduğu olgularda östrojen aracılığı ile olan uyarıcı etkilerin giderilmesi, tümör cevabı için bir ön şarttır.

Letrozol bir non-steroidal aromataz enzim inhibitörüdür. Sitokrom P-450 enziminin alt ünitesi olan heme kompetitif olarak bağlanmak suretiyle aromataz enzimini inhibe eder; bunun sonucunda bütün dokularda estrogen biyosentezi azalır. Sağlıklı postmenopozal kadınlarda, tek 0.1, 0.5 ve 2.5 mg dozlarda letrozol serum oston ve östradiol seviyelerini başlangıç değerine oranla sırasıyla % 75-78 ve % 78 baskılar. 48-78 saat içerisinde baskılanma maksimuma ulaşır. Sağlıklı postmenopozal kadınlarda, günlük tek 0.1, 0.5 ve 2.5 mg letrozol dozlarından sonra androjenler (androstenedion ve testosteron) in plazma konsantrasyonlarında veya 0.1 ila 5 mg günlük doz aralıklarında tedavi edilen postmenopozal hastalarda androstenedionun plazma konsantrasyonlarında değişiklikler bildirilmemiştir. Bu durum, estrogen biyosentezinin blokajının androjenik önmaddelerde birikime yol açmadığını belirtir.

Hastalarda, LH ve FSH plazma düzeyleri veya TSH, T4 ve T3 geri alma testi ile değerlendirilen tiroid fonksiyonu letrozol tarafından etkilenmez.

2.3.3. Emilim

Letrozol gastrointestinal kanaldan hızla ve tamamen emilir. (ortalama mutlak biyoyararlanım: % 99.9). Besinler emilim hızını biraz azaltır. Fakat emilen miktar değişmez. Emilim hızına olan düşük etkisinin klinik olarak ilişkisi kabul edilmemektedir ve bundan dolayı yemek zamanları dikkate alınmadan letrozol kullanılabilir.

2.3.4. Dağılım

Letrozolün plazma proteinlerine bağlanması başlıca albumine (%55) olmak üzere yaklaşık %60'dır. Letrozolün eritrositteki konsantrasyonu, plazmadakinin yaklaşık %80'idir. Metabolitlerin genel sistemik yapıya etkileri minimaldir. Letrozol hızla ve yaygın bir şekilde dokulara dağılır.

Kararlı durumdaki sanal dağılım hacmi yaklaşık 1.87 ± 0.47 L/kg'dır.

2.2.5. Metabolizma

Farmakolojik olarak aktif olmayan karbinol metabolite dönüşümü letrozolün ana önemli eliminasyon yoludur ($CL_m=2.1$ L/saat). Fakat hepatik kan akımına (yaklaşık 90 L/saat) oranla yavaştır. CYP3A4 ve CYP2A6 ile karaciğerde metabolize edilir ve idrarla itrah edilir. Plazmadaki sanal terminal eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 2 gündür. Günlük 2.5 mg alımından sonra 2 ila 6 hafta içinde kararlı durum düzeylerine erişir. Kararlı durumda plazma konsantrasyonları, tek dozdan sonra ölçülen konsantrasyonlardan 1.5 - 2 kat yüksek olduğu halde, tek 2.5 mg dozdan sonra ölçülen konsantrasyonlardan yaklaşık 7 kat daha yüksektir. Bu durum letrozolün günde 2.5 mg verildiğinde farmakokinetiğinin hafifçe non-lineer olduğunu belirtir. Kararlı durum düzeyleri uzun zaman sürdürüldüğünden, letrozolün devamlı birikimi olmadığı sonucuna varılabilir. Yaşın letrozolün farmakokinetiği üzerine etkisi gösterilmemiştir.

2.3.6.Endikasyonları

Postmenopozal, hormon reseptörü (estrojen ve/veya progesteron reseptörü) pozitif erken evre meme kanseri olan kadınların adjuvan tedavisinde ;postmenapozal, hormon reseptörü pozitif daha önce standart (5 yıl süre ile) tamoksifen kullanmış erken evre meme kanserli hastaların, 5 yıl süre ile uzamış adjuvan tedavisinde; metastatik ve lokal ileri meme kanserli, hormon reseptörü pozitif veya hormon reseptör durumu bilinmeyen, postmenopozal kadın hastaların ilk basamak tedavisinde endikedir (64).

2.4. HÜCRE ÖLÜMÜ

Homeostaz organizmanın belli bir denge halinde bulunmasıdır. Homeostaz başlıca 3 gelişimsel sürecin dengede tutulması ile sürdürülür

1. Hücre proliferasyonu
2. Hücre differansiyasyonu
3. Hücre ölümü

Hücre ölümü ilk kez Virchow tarafından tanımlanmıştır. 1885'te ilk defa kromotolizis diye nekrozdan farklı bir hücre ölümü çeşidi olduğundan bahsedilmiştir. Omurgalı ve omurgasızların normal gelişimindeki hücrelerin ölümü, 1951 yılında Glucksmann, 1966 yılında Saunders tarafından tanımlanmıştır (65,66). 1965 yılında Kerr portal ven ligasyonundan sonra karaciğer hücresinde çeşitli ölüm tipleri tanımlanmıştır (67). 1971 yılında yine Kerr, "büzüşme nekrozu" olarak adlandırdığı yapının ultrastrüktürünü yoğunlaşmış kromatin parçaları içeren ve organelleri iyi korunmuş nüklear kümeleri membrana ilişik cisimler olarak tanımlamıştır (68). Bu morfolojik değişiklikler, fizyolojik uyarılar altında çeşitli hayvan dokularında da gösterilmiş. Kerr ve Searle buna Yunancada bozulmak, azalmak anlamına gelen "apoptozis" adını vermişler ve bunun mitozla zıt bir rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir (69). 1979 yılında Kerr, Vyllie ve Currie apoptozisin nekrozdan farklı bir hücre ölüm tipi olduğunu göstermişlerdir (70). Apoptozis terimi, bazen letal bir genetik programı kasteden "programlanmış hücre ölümü" ile sinonim kullanılır (71). Embriyonik gelişme sırasında görülen bazı hücre popülasyonlarının ortadan kaldırılması da apoptozis ile gerçekleşir (71). Sonuç olarak apoptozis terimi, gelişme ve büyüme regülasyonunda önemli rolü olan spesifik bir hücre ölüm şekli için kullanılır.

1960'lardan beri elektron mikroskopi verileri ile alternatif türde programlanmış hücre ölüm tipleri (PHÖ) ileri sürülmüştür. 1972'de Schweichel ve Merker daha geniş kapsamlı bir sınıflandırma sunmuşlarsa da bu sınıflandırma ilgi görmemiştir (72). 1990 tarihli makalesinde, Schweichel ve Merker'in ilk çalışmalarını tekrar inceleyen Clarke, doğal gelişimsel hücre ölümü ve toksin uygulanması sonrası oluşan hücre ölümünde temel üç hücre morfolojisinin varlığından bahsetmiştir (73). Clarke,

apoptozu tip I programlı hücre ölümü olarak tanımlamıştır. Tip II otofajik hücre ölümüdür. Tip III programlı hücre ölümü, lizozomal olmayan hücre ölümü olarak tanımlanmıştır.

Bu sınıflandırmaya göre 4 morfolojik kategori sunulmuştur:

Tip I PHÖ: Hücre büzülmesi, nükleozomal DNA degradasyonu ve apoptotik veziküllerle karakterize bugün “apoptoz” olarak tanımladığımız PHÖ

Tip II PHÖ: Bugün otofaji olarak tanımlanan PHÖ

Tip IIIA ve III B PHÖ: Non-lizozomal ve sitoplazmik degradasyon

Ayrıca bu 4 tip morfolojik ölümün örtüşmeleri de tarif edilmiştir.

PHÖ, son zamanlarda gittikçe artan ilgi ve araştırmaların konusu olmuştur. Bu eğilim, 2002'de Sydney Brenner , H. Robert Horvitz ve John E. Sulston 'ın Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nü almasıyla da vurgulanmıştır.

Hücreler, gelişim sırasında dokunun yapısal şeklinin sağlanması ve yaşam süresince dokunun aynı büyüklük ve şekilde kalması; hücre sayısının sabit tutulması için gerekli olmayan hücreleri ortadan kaldırmak ve hasarlanmış hücreleri uzaklaştırmak (virus infekte hücreler, DNA hasarı) için ölürlür.

The Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) 2005 yılında yapılan ilk konsensusunda hücre ölümü ve farklılaşmasını formülarize etmiştir. O zamandan beri hücre ölümü araştırma alanında önemli ilerlemeler olmuş ve yeni hücre ölümü tanımları geliştirilmiştir. (74)

Hücre ölümü sınıflandırması genellikle apoptotik, nekrotik, otofajik ve mitotik katastrof gibi morfolojik görünümüne göre yapılır (Tablo 2). Bunun dışında sınıflandırma; nükleaz ve kaspaz, kalpain, katepsin, transglutaminaz gibi proteazları içeren enzimatik kriterler, programlanmış ya da kaza sonucu ölüm, fizyolojik ya da patolojik ölüm gibi işlevsel özellikler ve immunolojik kriterler göz önünde bulundurularak yapılabilir (75).

Hücre ölüm Tipi	Morfolojik Değişiklikler			Biyokimyasal özellikler
	Nukleus	Membran	Sitoplazma	
Apoptozis	Kromatin kondensasyonu, DNA ladder	Blebbing (Tomurcuklanma)	Apoptotik cisimler	Kaspaz bağımlı
Otofaji	Kısmi kromatin kondensasyonu, DNA ladder yok	Blebbing (Tomurcuklanma)	Otofajik vakuollerin artışı	Kaspaza bağımlı değil; Lizozomal aktivite artışı
Mitotik katastrof (felaket)	Mikronukleus oluşumu; nuklear fragmantasyon	-	-	Kaspaza bağımlı değil (erken safhada); anormal CDK1/siklinb aktivasyonu
Nekroz	Nuklear DNA'nın tesadüfi yığılımı ve yıkımı	Şişme; kırılma	Vakuolleşme artışı; organelyıkımı; mitokondriyal şişme	-
Yaşlanma	Belirgin heterokromatik yapı		Yassılaşıma ve granulasyon	SA-β-gal aktivitesi

Tablo 2: Hücre Ölümü Tipleri

(Okada H, Mak TW. Nat Rev Cancer. 2004)

Bu tanımlamalara göre kaspaz bağımlı apoptoz temel hücre ölüm şeklidir, fakat kaspaz bağımlı olmayan mekanizmalar da ölüm sinyali yollarında kaspazlarla işbirliği içinde çalışırlar. Bu ana nekrotik ölüm yolağında kaspaz bağımlı apoptozdan farklı olarak serin-treonin reseptör bağlayıcı protein (RIP 1 ve RIP 3), kaspaz-1 üzerinden etki gösterir (Proptozis)(76). Otofajik ölüm ise otofajik vakuolizasyon ile meydana gelir (77).

2.4.1. APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ

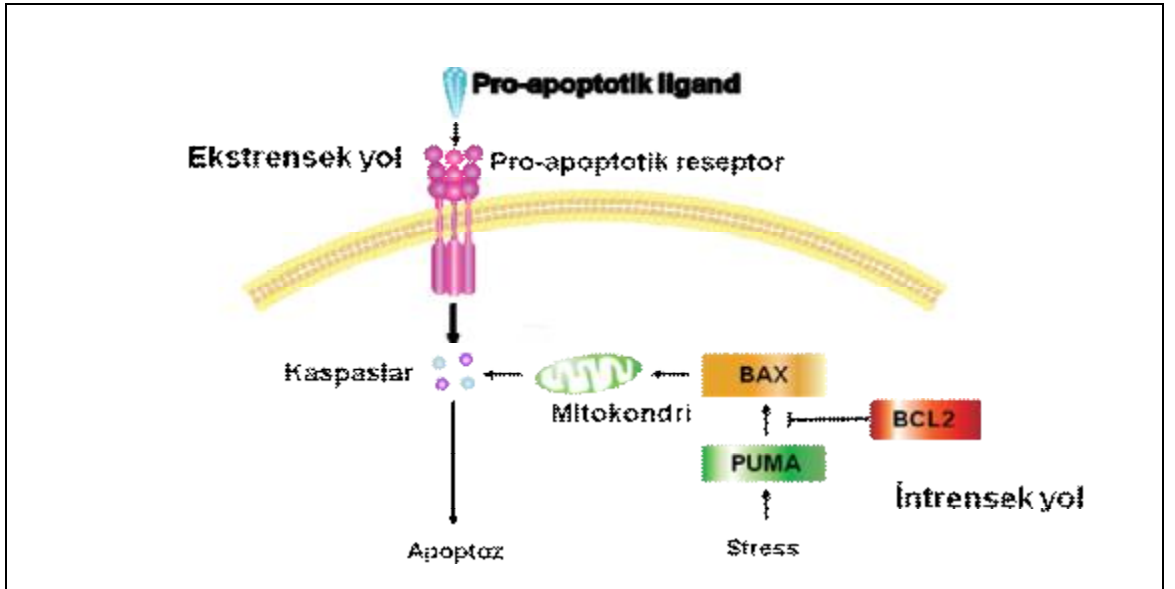
Apoptoz Yunanca'da apo(ayrı) ve ptosis(düşmek) kelimelerinden oluşan ve ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie adlı patologlar tarafından 1972 yılında kullanılan bir terimdir.

1983 yılında Duke ve arkadaşları jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermesi ile hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiş ve apoptoz ile ilgili çalışmalar hızlanmıştır.

Apoptoz organizmada görevini tamamlamış ya da hasara uğramış hücrelerin çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan, genetik olarak kontrol edilen programlanmış bir hücre ölümüdür. Selim ve malign tümörlerde proliferasyon ve hücre dönüşümünde kritik bir rol oynamakta olup, mitozun aksine iyi bir prognostik bulgudur.

Apoptozda hücre içi veya dışı kaynaklı ölüm sinyalleri ve hücre ölüm reseptörü veya mitokondri yoluyla apoptotik mekanizma aktive olur ve sonuçta DNA kırılması meydana gelir. Apoptotik hücreler apoptotik cisimlere ayrılarak çevre hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptoz p53, Bcl-2 gibi bazı onkogenler tarafından regüle edilir (78).

Programlanmış bir hücre ölümü olan apoptozda, intrinsik bir intihar programı harekete geçmekte ve hücre sistematik olarak hasara uğramaktadır. Nispeten kontrollü bir olay olan apoptozda, çevredeki diğer doku ve hücrelere zarar verebilecek olan parçalayıcı enzimler ve diğer unsurlar çok az miktarda salgılanmaktadır. Bütün yüksek canlılarda apoptoz embriyogenez, gelişme, hemostaz, iskemi, toksisite ve neoplazik değişiklikler sırasında, rejenerasyon ve tamir olaylarında, organların büyüklüklerinin korunması ve organların patofizyolojisinde kritik öneme sahiptir (79).



Şekil 7 : Apoptoz oluşum şeması (<http://www.slideworld.org/slidestag.aspx/apoptoz-ppt>)

Apoptoz hasta ve gerekmeyen hücrelerin kontrollü ve genetik olarak kontrol edilen bir mekanizma ile çevre hücrelere zarar verilmeden yok edilme olayıdır. Apoptoz fizyolojik durumlardaki hücre ölümü olsa da bazı patolojik etkenlerle de ortaya çıkabilir, hücre bütünlüğünü bozarak nekroza neden olan her durum hücre hala yaşıyorsa apoptozla sonuçlanabilir (80,81)

Son yıllarda yürütülen araştırmalar neticesinde, apoptozdan sorumlu moleküler mekanizmalar açıklığa kavuşmuştur. Bu çalışmalar sonucunda, kaspaz adı verilen, intrasellüler proteazların; apoptozun gerek direkt, gerekse indirekt morfolojik ve biokimyasal değişikliklerinden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur. Kaspazların apoptozla ilk ilişkisi bir nematod olan *Caenorhabditis Elegans*'ın genetik analizi sırasında ortaya çıkmıştır (82).

2.4.1.1. Apoptotik Hücre Ölümünün Moleküler Mekanizması

Kaspazlar apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kelime olarak "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs- CASPASE" olarak türetilmiştir. Öncelikle inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilmelerinin ardından hücre hedeflerindeki tetrapeptit motifleri tanır ve substratı, bir aspartat rezidüsünün karboksil tarafından ayırır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok sellüler ve morfolojik değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler sonucunda gelişir. Kaspaz-1, kaspaz ailesinin prototipidir ve önceleri prointerlökin-1-beta'nın biyolojik aktif formuna dönüşümünden sorumlu, ICE (interlökin-1-beta dönüştürücü enzim) olarak da adlandırılan, bir sistein proteaz olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları ise ICE'nin diğer sistein-proteazlardan farklı olarak amid bağının N-terminalindeki p1 pozisyonu olarak bilinen ucunda aspartik asitin mutlak varlığını gerektiren farklı bir sistein-proteaz olduğu keşfedilmiştir.

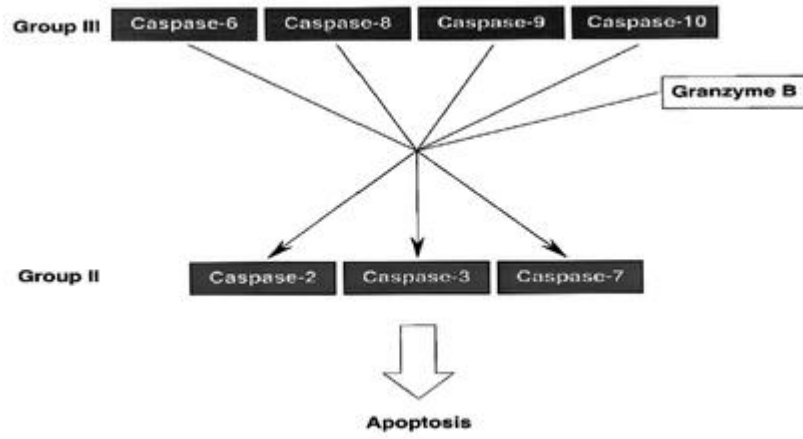
Memelilerde en az 14 kaspaz tanımlanmıştır. Filogenetik analiz sonucunda gen ailesinin ICE (kaspaz-1) ile ilişkili ve ced-3 benzeri olmak üzere iki subgrubu olduğu görülür. Proenzimlerin kısa (kaspaz 3 ,6 ,7) veya uzun prodomain barındırmalarına göre de kaspazları daha alt gruplara ayırmak mümkündür. Alternatif olarak bu

proteazlar, substrat spesifitelerine göre de gruplandırılabilir. Günümüzdeki modern yaklaşım ise proteazları üç gruba ayırmaktadırlar (Şekil 8).

Grup 1 : ICE ailesi: Sitokin matürasyonuna aracılık edenler (kaspaz-1, 4, 5, 13)

Grup 2 : ced-3 ailesi: Apoptotik hücre ölümü sürecinde efektör görevi üstlenenler (kaspaz-2,3,7)

Grup 3 : ced 3 ailesi : Apoptotik hücre ölümünde aktivatörler (kaspaz-6, 8, 9, 10)



Şekil 8: Kaspazların moleküler sıralanımı (83).

Kaspazlar inaktif üç parçalı proenzimler olarak sentez edilirler. Aktivasyonları sırasında aspartat (P1) - X (P2) bağının ayrılması ile proenzimden, küçük ve büyük subüniteleri içeren aktif enzim oluşur. Ayrılma noktasında aspartatın bulunması kaspazın oto-aktif ya da aktive edilebilir olmasıyla uyumludur. Ayrılma işleminden sonra 2 büyük ve 2 küçük alt ünitelerden oluşan tetramer yapısına sahip kaspaz yapısı izlenir (84,85).



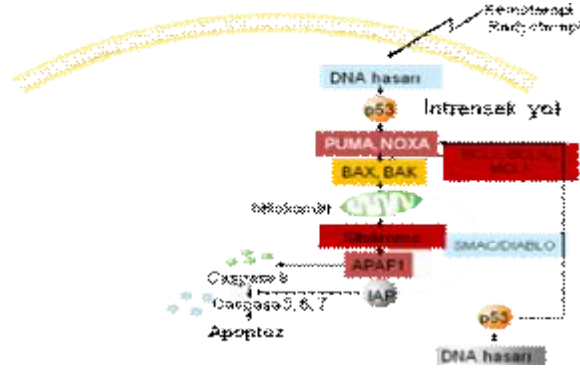
Şekil 9: Kaspaz Aktivasyonu

(<http://www.slideworld.org/slidestag.aspx/apoptoz-ppt>)

Memeli hücrelerinde apoptoz ekstrensek ve intrinsek yollarla aktive olurlar.

2.4.1.1.1. İntrinsik Yolak

İntrinsik yol hücrel stress (özellikle de mitokondrial stress) ile tetiklenir. Mitokondrial tetiklemede DNA hasarı ve heat shock gibi faktörler rol oynar. Stress sinyali alınması üzerine, sitoplazmada bulunan proapoptotik proteinler BAX ve BID mitokondri dış zarına bağlanarak mitokondri içeriğinin dışarıya çıkmasını sağlayacak sinyaller salar. Bununla birlikte, BAX ve BID sinyali tüm içeriğin salınımı için yeterli değildir. Bir başka proapoptotik protein olan ve mitokondri içinde bulunan BAK, sitokrom c ve mitokondri içi bileşiğin mitokondriden salınımı için gereklidir. Mitokondriden salındıktan sonra sitokrom c sitoplazmada ATP ve bir enzim olan APAF-1 (apoptosis-proteaz-activating faktör-1) ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleks bir başlangıç proteini olan kaspaz-9 'u aktive eder. Aktive kaspaz-9 sitokrom c, ATP ve APAF-1 ile birlikte hasarı başlatacak olan etkin kaspaz olan kaspaz 3'ü aktive eder. Membran içi boşluktan sitokrom c salınımı dışında, membran içi boşluk DNA fragmentasyonunu kolaylaştıran apoptozis inducing faktör (IAF) ve apoptozis inhibitör proteinini (IAP) inhibe eden Smac/Diablo proteinlerini ve Omi/HtrA2 proteinlerini içerir.(84)



Şekil 10: Apoptozda İntrensek Yolak

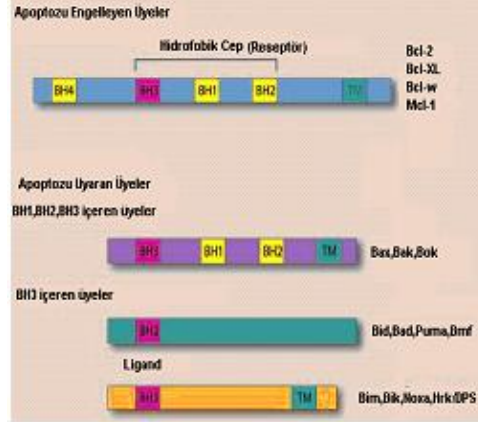
(<http://www.slideworld.org/slidestag.aspx/apoptoz-ppt>)

Mitokondriden salınan sitokrom c sitosolik protein APAF-1'e bağlanır. Bu etkileşim APAF-1'de konformasyonel değişiklik yapar. Bu değişiklik (ATP bağlanmasıyla) diğer APAF-1 moleküllerinin birbirleri ile ilişkili hale geçmesini sağlar. Bu şekilde 7 molekül APAF-1, sitokrom c ve ATP'den oluşan tekerlek benzeri bir yapı (apoptozom) oluşur. Apoptozomlar 7 molekül prokaspazın komplekste tutulmasını sağlar.

Kaspaz aktivasyonunun tam mekanizması henüz bilinmemektedir. Ancak iki mekanizma düşünülmektedir: İlk durumda APAF-1, sitokrom c ve prokaspaz 9 kompleksi sitosolik prokaspazı aktive ederek apoptozomlarda toplar. Diğer senaryoya göre, iki apoptozom birbiri ile etkileşerek diğer apoptozomdaki kaspazı aktive eder.

Prokaspaz aktivasyonunun mitokondriyal yolu kaspaz kaskadının başlatılması ve aktivasyonu apoptozisin çeşitli formlarında ortaya çıkar. Örneğin radyasyonun yol açtığı DNA hasarı apoptozisi tetikler. Bu yanıt genellikle p53'ü gerektirir. P53, mitokondriden sitokrom c salınımını sağlayacak proteinleri kodlayan transkripsiyon genlerini aktive edebilir. Bu proteinler Bcl-2 ailesine aittir. Aktive kaspaz-9 kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-6 üzerinden kaspaz kaskadını aktive ederek hücre ölümünü gerçekleştirir (84,85).

Apoptotik ölüm mekanizmasında kaspazlardan sonra önemli rol oynayan diğer bir protein olan Bcl-2 gen ailesi üyeleri, kendi içlerinde birbirlerine antagonist çalışarak apoptozu uyarıcı veya engelleyen bcl-2 proteinlerini kodlarlar. Bu proteinlerden Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 apoptozu engellerken, Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-xs apoptozu uyarır.

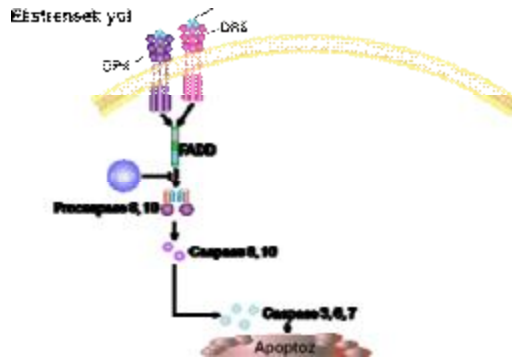


Şekil 11: Bcl-2 ailesi üyelerinin sınıflandırılması (86)

Bcl-2 ailesinden apoptozu uyan proteinler, mitokondrial yolda mitokondri zarlarından sitokrom-c (sit-c) salınımını, bunun devamında da kaspaz aktivasyonunu sağlayarak hücreyi apoptozu götürürler. DNA hasarı, büyüme faktörü (GF) eksikliği, ölüm reseptörlerinin uyarılması, radyasyon, kemoterapi vs. gibi apoptozu uyarıcı tüm ajanlar hücreyi mitokondriyal yolla apoptoza götürebilirler. Apoptozu uyan bu ajanlar, sitozolde bulunan Bcl-2 ailesi üyelerinin görev yapmasını sağladıklarından mitokondrial yol, iç sinyal yoluyla apoptoz adını alır (87,90,91).

2.4.1.1.2. Ekstresek Yolak:

Memeli hücrelerinde Fas ve TNF gibi sinyal proteinleri hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanarak apoptoza giden yolu uyarırlar (Şekil 12). Bunları kısaca açıklarsak ;



Şekil 12: Apoptozda Ekstresek

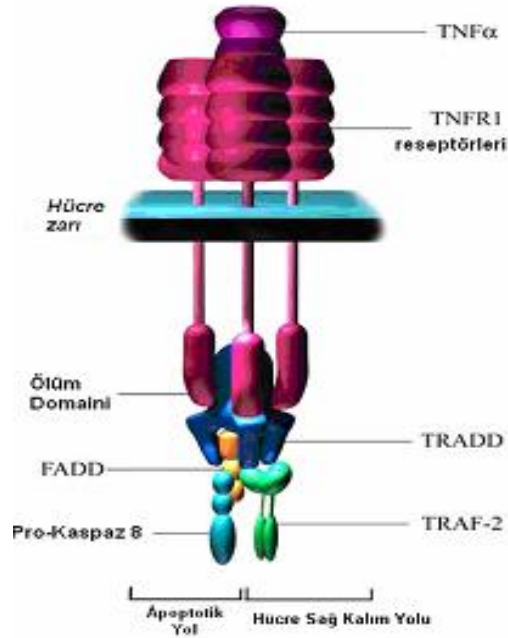
Yolak(<http://www.slideworld.org/slidestag.aspx/apoptoz-ppt>)

2.4.1.1.2.1 Fas sinyal iletimi yoluyla apoptoz:

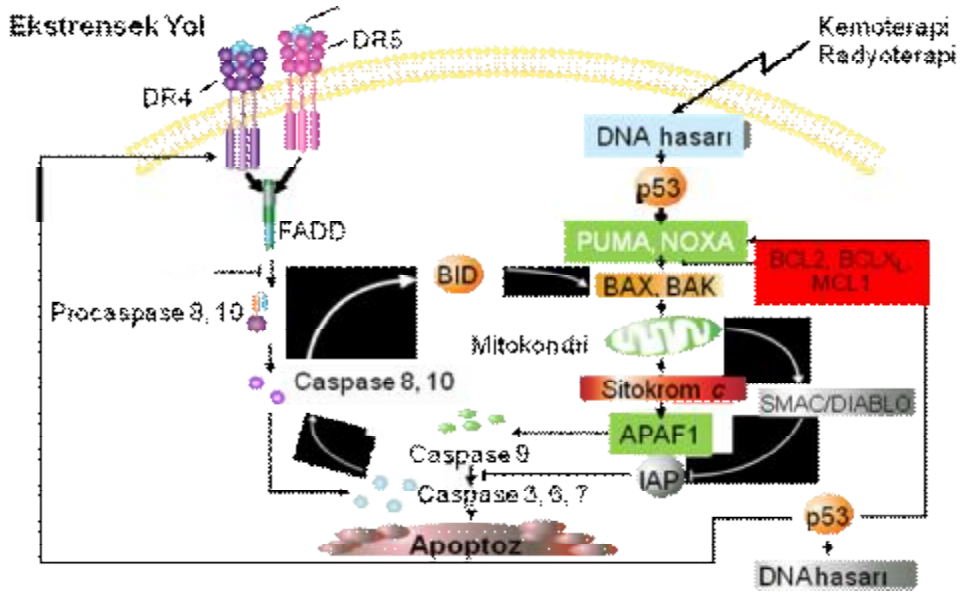
Mutasyonlu bir hücrenin ortadan kalkması gerektiğinde, öldürücü T lenfositinin zarında bulunan ve molekül ağırlığı 43 kD olan Fas sinyal proteini (Fas ligandı= CD95L), hedef hücrenin Fas reseptörüne bağlanarak olay başlar. Fas reseptörü, tümör nekroz faktör reseptör (TNF-R1) ile aynı gruptandır. Fas reseptörü, hücre ölüm reseptörü olup, 3 aynı polipeptid zincir içerir. Fas sinyal proteini, reseptörün amino (NH₂) ucuna bağlandığında, bu 3 aynı polipeptid zincir Fas reseptörü trimer hale geçerek aktifleşir. Fas reseptörü, lenfoid hücreler dahil, hemen hemen tüm hücrelerin zarında transmembran olarak uzanır. Fas aktivasyonu ile uyarılan apoptoz; bağışıklık yanıtının sonunda arta kalan lenfositlerin, kanser hücrelerinin veya virus ile enfekte hücrelerin ölümü ve ortadan kaldırılmasından sorumludur (88,92).

2.4.1.1.2.2 Tümör nekroz faktör (TNF) sinyal iletimi yoluyla apoptoz:

Sinyal görevi yapan ve bir sitokin olan TNF α proteini, hücre zarında sinyal görevi yapan ve bir sitokin olan TNF α proteini, hücre zarında bulunan TNFR-1 (Tümör Nekroz Faktör Reseptörü) ile kompleks oluşturur. Şekil.13' de görüldüğü gibi, TNFR-1 reseptörünün sitozole uzanan kısmındaki DD bölgesine, TRADD (TNFR'e bağlı Ölüm Bölgesi) proteini bağlanır. TRADD diğer kısmıyla da FADD (Fas Adaptör Ölüm Bölgesi) adaptör proteinine bağlanır. Bu bağlantılar sonucunda, prokaspaz-8 aktifleşir. Aktif kaspaz-8 de sonlandırıcı kaspaz üyelerini ve sonunda aynı gruptan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, Fas sinyal iletim yoluyla apoptozda olduğu gibi, hücrede gerekli morfolojik değişiklikleri sağlar ve hücre apoptoz yoluyla ölür (88,92,93).



Şekil 13: TNF α sinyal yoluyla apoptoz (Dash, P., Apoptoz, 1-6 p.).



Şekil 14: Apoptozda Ekstresek ve İntrensek Yolak Mekanizmaları
(<http://www.slideworld.org/slidestag.aspx/apoptoz-ppt>)

2.4.1.2 Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

1. Yüzey Organellerinin Kaybı

Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır .

2. Hücre Büzülmesi

Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur . Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez .

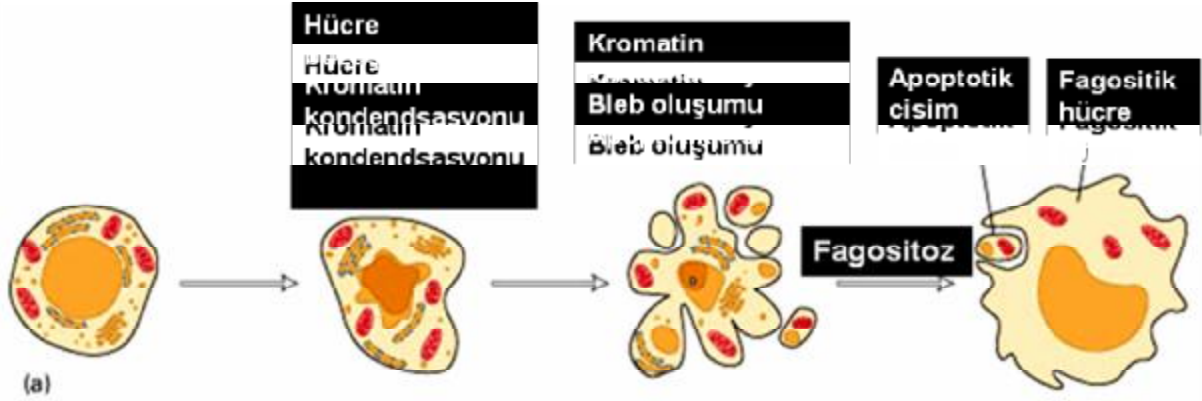
3. Kromatin Yoğunlaşması

Önemli yapısal değişiklik çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür . Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır .

4. Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (Şekil15).

Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfotidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfotidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (94) .



Şekil 15 :Apoptoz sürecindeki morfolojik değişiklikler (Gozuacik D and Kimchi A. Oncogene 2004).

2.4.2. OTOFAJİK HÜCRE ÖLÜMÜ

“Otofajik hücre ölümü” tip II programlı hücre ölümü olarak sınıflandırılmıştır. Bu tip hücre ölümünde en belirgin morfolojik değişiklik, sitoplazmada oluşan iki veya daha fazla katmanlı zarla (üst üste iki veya daha fazla yağ çift katmanı (lipid bilayer)) çevrili keseciklerin oluşmasıdır. Bu kesecikler sitoplazma parçaları ve/veya mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) gibi organelleri içerirler. Bu nedenle otofajik kesecikler elektron mikroskopisinde, taşıyıcı kesecikler (transport vesicles) ve stres keseciklerinden farklı olarak “elektron yoğun” (electron dense) olarak gözlenirler. Sonunda otofaji kesecikleri lizozoma kaynaşıp, içlerinde taşıdıkları yüklerin lizozomal enzimler tarafından parçalamasını sağlarlar. Bu hücre için hayati önem taşıyan bazı proteinlerin ve mitokondri gibi enerji metabolizmasında rol oynayan organellerin yıkımına yol açmaktadır(Şekil16).



Şekil 16 :Otofajik hücre ölümü aşamaları (Gozuacik D and Kimchi A. Oncogene 2004).

Otofaji görülen hücrelerde, apoptozdan farklı bir ölüm gözlenmesine karşın, hücre ölümüne yol açan moleküler mekanizmalar hala ayrıntılı olarak tanımlanmadığı için, otofajinin bu ölümden aktif rol oynayıp oynamadığı konusu alanın uzmanlarının bir araya geldiği toplantılarda ve bilimsel literatürde yoğun bir şekilde tartışılmaktadır (95,96,97).

Özellikle, apoptozla ölebilen hücrelerde görülebilen otofajik hücre ölümü konusu hala bazı araştırmacılar tarafından şüphelenilmektedir. Yine de çoğu araştırmacının üzerinde birleştiği fikir, apoptozun mümkün olmadığı durumlarda, uyarıcının türü, süresi ve miktarı gibi değişkenlere bağlı olarak, otofajinin hücre ölümüne doğrudan ya da dolaylı olarak yol açtığıdır. Kesin olan bir şey varsa, artmış otofaji görülen hücrelerde meydana gelen programlı ölüm, apoptozdan çok farklı morfolojik ve moleküler özellikler taşımaktadır.

Otofajik hücre ölümünde, kromatin yoğunlaşması gibi çekirdeğe özgü değişiklikler apoptotik hücre ölümüne nazaran çok daha sonra olmaktadır. Ölüm kaspaz etkinliğine bağımlı olmadığından, ne DNA merdivenleri ne de apoptotik cisim oluşması gözlenmektedir. Ayrıca, otofajide ölü hücrelerin fagositoz tarafından temizlenmesi apoptozda görüldüğünden çok daha geç ve düzensiz bir biçimde olmaktadır. Bütün bu gözlem ve veriler otofajik hücre ölümünün ayrı bir ölüm tipi olarak sınıflandırılmasının doğru olduğuna işaret etmektedir. Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin lizozomlarda parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır. Kısa ömürlü proteinlerin ubiquitin-proteazom sisteminde parçalanmasına karşın, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji sistemi tarafından parçalanırlar ve yapıtaşları (Örn. aminoasitler) hücre kullanımı için yeniden kazandırılırlar (98,99).

Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (*auto*) yeme (*phagy*) anlamına gelir ve hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyolojik koşullarda, besin elde etmek için hücre içindeki yapıların nasıl parçalandığını ifade etmek amacı ile kullanılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak, hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazının korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir (98,99).

Son on yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur (99,100).

Ayrıca araştırmalar, otofaji anormalliklerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir.

Otofaji; makrotofaji, mikrotofaji ve saponin aracılıklı otofaji şeklinde en az üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir.

Otofaji mekanizmalarında rol oynayan proteinlerin çoğu "otofaji ile bağlantılı proteinler" (Autophagy-related proteins) ya da kısaca Atg proteinleri olarak adlandırılmışlardır (101). Mayada yapılan çalışmalar sonucunda 30'dan fazla Atg geni tanımlanmıştır. "Otofajik kesecik" ya da bir başka deyişle "izolasyon membranının" oluşumunda çeşitli protein kompleksleri rol oynamaktadır. Bunlardan birincisi, sınıf III fosfoinositol 3 fosfat (PI3F) kinaz Vps34'ün aktivitesini düzenleyen, çalışmamızda da otofajiyi değerlendirmek için kullandığımız Atg6 protein (memelilerde **Beclin- 1**) kompleksidir. Bir başka deyişle, otofaji ile ilgili proteinlerin çoğu, otofajik zarların oluşumunda ve bunların uzayarak kesecik haline gelmesinde görev yapmaktadır. Otofagozom daha sonra geç endozom veya lizozomla birleşerek taşıdığı kargonun parçalanmasına yol açar (Şekil 16) (98,99,101). Lizozomal enzimler tarafından kargonun yıkımı sonrasında, kargo (proteinler, organeller vb.) ortaya çıkan yapı taşları (örn. aminoasitler, yağ asitleri, vb.) tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılır.

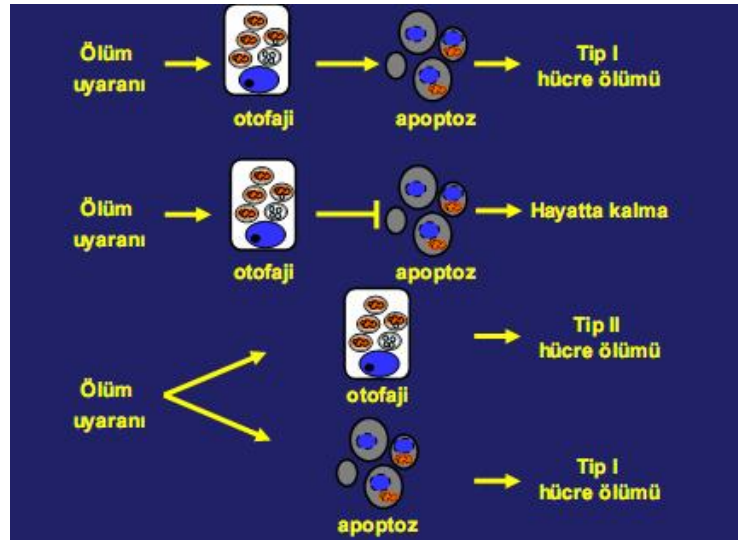
MA ve diğer PI3K inhibitörleri Wortmannin ve LY294002 gibi kimyasalların otofajiyi baskıladığının keşfedilmesi, otofajik hücre ölümünün analizinde bir dönüm noktası oluşturmaktadır (101). Farklı hücre tipleri ve farklı uyarıcılar kullanılarak birbirinden bağımsız gruplar tarafından yapılan çalışmalar, otofajik vezikül oluşumu ve lizozomal aktivite artışıyla ilerleyen, yukarıda sıralanan kimyasallar tarafından baskılanabilen ve kaspazlardan bağımsız bir hücre ölüm tipinin varlığını göstermiştir.

MCF-7 meme kanseri hücrelerinin ERantagonisti tamoksifen tarafından tetiklenen ölümü, lösemi hücrelerinin TNF- α 'ya bağlı ölümleri, mide ve gliom hücrelerinin aktive olmuş Ras tarafından öldürülmesi ve sinir hücrelerinin büyüme faktörü eksikliğinden dolayı ölümleri bu tür çalışmalara örnek gösterilebilir (102).

2.4.2.1. Otofaji ve Apoptoz Arasındaki Hücre Düzeyinde Bağlantılar

Otofaji ve apoptoz birbirinden bağımsız mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşse de giderek artan sayıda yayın bu iki mekanizma arasında daha karmaşık bir ilişkinin bulunduğunu ortaya koymaktadır.

Otofaji özellikle apoptotik hücre ölümünün baskılandığı koşullarda aktive olarak, apoptozla ölmesi mümkün olmayan hücrelerin ölümüne yol açabilir. Bu özelliği ile, bazı durumlarda apoptoz yanında bir "hücre ölümü B planı" şeklinde görev yapabilir. Bunun yanında, otofaji ve apoptoz arasında en az üç farklı bağlantı gözlenmiştir. Otofaji; apoptozla paralel olarak hücre ölümüne yol açabildiği gibi, apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir ya da apoptoz için bir ön koşul olabilir (Şekil 17) (103).



Şekil 17 : Apoptoz ve Otofaji (Gozuacik D, Kimchi A, Oncogene 2004)

Otofaji metabolik stres, ilaç ya da radyasyon hasarıyla karşı karşıya kalan hücrede anormal ve hasarlı proteinlerin yok edilmesinde ve genomik DNA'nın hasardan korunmasında önemlidir. Otofaji yokluğunda tümör hücrelerinde, DNA hasarı, gen amplifikasyonu ve kromozomal anormallikler artmaktadır (104). Yine aynı doğrultuda olmak üzere, otofajinin; meme, prostat ve kolon kanserlerindeki inhibisyonu, bu hücrelerin radyoterapiye ölüm yanıtını arttırmaktadır (105).

Başka hücre sel senaryolarda ise, otofaji kendi başına hücre ölümüne sebep olmaksızın apoptotik hücre ölümüne yardımcı olabilmektedir. Örneğin; besin yokluğunda otofaji bağımlı hücre sel ATP düzeyinin sürdürülmesi apoptozun önemli belirteçlerinden olan fosfotidilserinlerin hücre zarının dışına transferini sağlar. Bundan başka, apoptozda görülen hücre zarı tomurcuklanması (blebbing) enerji bağımlıdır; aktin-miyozin kasılması ATP ile meydana gelmektedir. Bazı koşullarda otofajinin kaspaz aktivasyonu için gerekli olduğunu gösteren yayınlar da bulunmaktadır. Örneğin otofajinin, CD4+ T hücrelerinin HIV ile enfeksiyonu sırasında kaspaz-bağımlı hücre ölümü için gerekli olduğu gösterilmiştir . Atg7 ya da Beclin-1'in hedeflenmesi ya da 3-MA ile muamele sonucunda otofajinin baskılanması, kaspaz aktivasyonu ve hücre ölümünü engellemektedir (106).

Bütün bu gözlemlerde ortaya çıkan karmaşık ilişkiler, moleküler düzeyde otofaji yollarının apoptoz sistemi ile birlikte regüle olabileceğine, aynı sinyal bağlantılarıyla uyarılabileceklerine ve bazı ortak proteinlerin bu iki sistemin birbiriyle ilişkilerini düzenleyebileceğine işaret etmektedir.

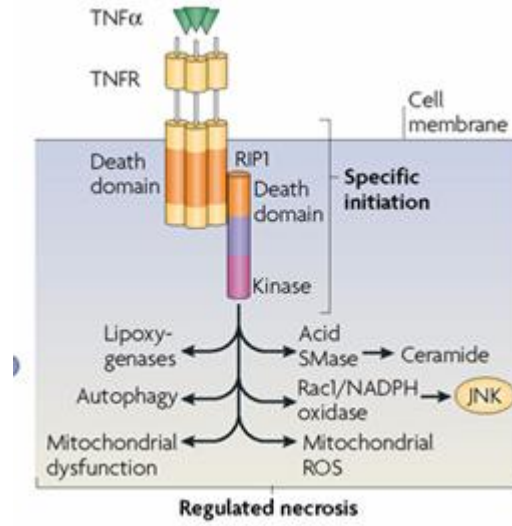
2.4.2. NEKROTİK HÜCRE ÖLÜMÜ

Nekroz, hücre sel hasara karşı oluşan patolojik, tesadüfi bir yanıttır . Son yıllarda yapılan çalışmalarda nekrozun da apoptoz gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla düzenlenen programlı bir hücre ölümü olduğu gösterilmiştir. Nekrotik hücre ölümünün embriyonik gelişim ve doku homeostazına katkıda bulunduğu, spesifik plazma membran reseptörlerine bağlanan ligandlar ile indüklenebildiği ve genetik, epigenetik ve farmakolojik faktörlerle düzenlenebildiği belirtilmiştir.

Ayrıca kaspazların inaktivasyonu ile apoptozdan , apoptoz ve nekroz morfolojilerinin birlikte görüldüğü hücre ölüm şekline ya da tam gelişmiş nekroza bir kayma olduğu gösterilmiştir (107).

Hitomi ve arkadaşları 2008 yılında nekroptosis olarak adlandırılan ve geniş bir gen yelpazesinin aracılık ettiği programlanmış nekrozu tanımlamışlardır (108).

Nekroptosis, nekroz ve apoptoz sonrası görülen sekonder nekroz; hücre membran bütünlüğünün kaybı, hücre şişmesi, ER dilatasyonu, organel parçalanması, vakuol oluşumu, hücre lizisi gibi benzer selüler morfoloji ile sonuçlanan farklı hücre ölüm şekillerini temsil eder. Nekroptosis dış uyaranlara bağlı olarak gelişen, hücre ölüm reseptörlerinin kendi ilgili ligandları (TNF- α , Fas ligand, TRAIL) ile uyarılması sonucu oluşan bir nekrotik hücre ölüm şeklidir. RIP-1 (reseptör interacting protein-1) serin/treonin kinaz aktivitesi nekroptosis mekanizmasında anahtar rol oynar (109).



Şekil 18: Programlanmış Nekroz mekanizması

(<http://sackler.tufts.edu/Academics/Degree-Programs/PhD-Programs/Faculty-Research-Pages/Alexei-Degterev.aspx>)

2.5. RADYASYON BİYOLOJİSİ

Radyasyon Onkolojisinde, tedavi aracı olarak iyonizan radyasyon kullanılmaktadır. İyonizan radyasyon biyolojik bir maddeden geçtiğinde o maddeyle etkileşir. Bu etkileşme sırasında birçok fiziksel, fiziko-kimyasal, kimyasal ve biyolojik olaylar zinciri sonucunda asıl biyolojik yanıt oluşur.

2.5.1. RADYASYON ETKİSİNE BAĞLI OLAYLAR

4 evreden oluşmaktadır :

1. Fiziksel evre : Radyasyon eksite ve iyonize moleküller oluşturur. Ortalama süresi 10^{-18} saniyedir.

2. Fiziko-kimyasal evre : Primer maddeler, kimyasal olarak reaktif serbest atomlar ve serbest radikaller meydana getirmek için, stabil molekül oluşturmak üzere sekonder reaksiyona girerler. Ortalama süresi 10^{-13} saniyedir.

3. Kimyasal evre : Kimyasal olarak reaktif olan maddeler ortam içinde birbirleriyle reaksiyona girerler. Ortalama süresi 10^{-6} saniyedir.

4. Biyolojik evre : Organizmanın ışınlama sonucu meydana gelen kimyasal ürünlerine vermiş olduğu biyolojik yanıttır. Ortalama süresi 10^{-6} sn. den başlayıp yıllarca sürebilir.

Işınlanmaya Bağlı Biyolojik Yanıtlar :

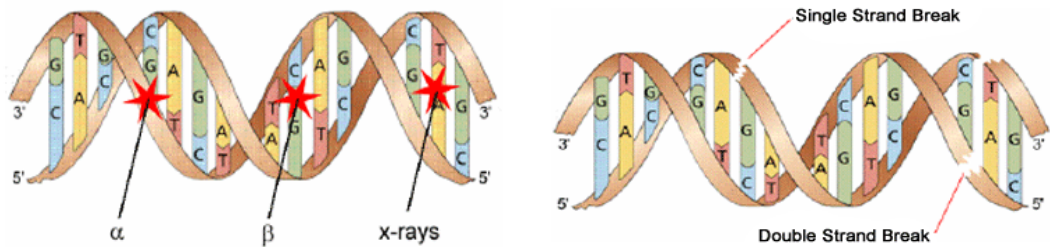
1. Subsellüler yanıt
 2. Hücresel yanıt
 3. Doku cevabı
 4. Tümör cevabı
- başlıkları altında toplanabilir.

2.5.1.1. Radyasyona Bağlı Fizikokimyasal, Kimyasal Olaylar ve Subselüler

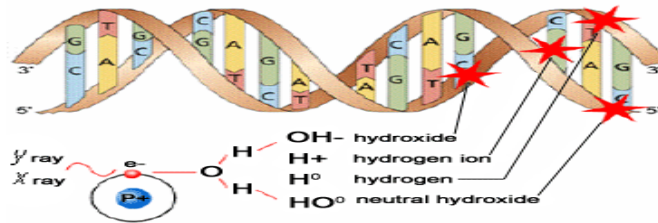
Yanıt:

Radyasyon hücrenin kritik moleküllerine etki ederek hücre biyolojisinde önemli değişikliklere neden olur. Bu şekilde molekülde meydana gelen hasar, ya molekülün **direkt etkisi** veya **indirekt etkisi** ile ortaya çıkar.(Şekil19, 20) Burada iyonizasyon ilk önce başka bir molekül içerisinde oluşmakta, enerji daha sonra hedef moleküle aktarılmaktadır. Radyasyon hasarının büyük bir kısmını indirekt etki oluşturur. DNA en önemli hedef moleküldür.

Molekül içi ve moleküller arası enerji transferi, triptofan ve benzen halkaları, alfa-heliks, DNA heliks gibi özel yapılar ve dissosiyeye olmuş küçük moleküler fragmanların migrasyonu ile olur. Hücrelerin en azından % 70'i su olduğuna göre çoğu indirekt etkileşmeler su moleküllerinden türemiş reaktif maddeleri içermektedir. Işın su ile etkileşerek diğer solid moleküllerle reaksiyona girer. Bu solid moleküllerin radikalleri ise stabil maddeleri oluşturur (110).



Şekil 19: Radyasyonun Direkt Etkisi



Şekil 20 :Radyasyonun İndirekt Etkisi

(www.wctb08.com/.../Workshop/Workshop%20Lecture%20Radiation/2.pdf)

2.5.1.2. Radyasyonun yaptığı molekül hasarını değiştiren faktörler :

Radyasyonun neden olduğu molekül hasarı ısı, ph, oksijen konsantrasyonu ve hedef molekül konsantrasyonu gibi intrasellüler faktörler tarafından değiştirilebilir. Oksijen, serbest radikalleri oluşumunda sayısal ve tip olarak değişiklik yaptığından radyasyon hasarı oluşumunda çok önemlidir. Bu ise hedef moleküllerdeki serbest radikal hasarın kimyasal tamiri evresinde olur. Radyokoruyucu ve radyoduyarlaştırıcı ilaçlar da radyasyon hasarını değiştirebilir.

2.5.1.3. Radyasyona Hücresel Yanıt ve Biyolojik Olaylar

Radyasyon etkisine bağlı hücresel ölüme giden hücreler sıklıkla şişkin, boyanma kapasitesinde azalmayla birlikte vakuol ve fibrotik çekirdekli olup karyoliz gösterirler. Hücreler normal hacimlerinin birçok katı büyüyerek dev hücre şekline gelebilirler.

Genellikle bunu hasarlı hücrelerin dejenerasyon ve fagositozu izler. Radyoterapi sonrası hücrelerde görülen iki önemli etki vardır :

1. Fonksiyon kaybı
2. Reprodüktivite kaybı.

Fonksiyon kaybı: Birçok, bölünmeyen veya bölünme yeteneği kısıtlı hücreler sonuçta fonksiyon kaybına uğrayarak interfaz ölümüne giderler. Bölünmeyen hücrelerde (adult sinir ve kas hücreleri) interfaz ölümü sadece yüksek doz(100 cGy'den yüksek) radyasyon uygulamasından sonra görülür. Lenfositler ise küçük dozlarda (100 cGy'den az) interfaz ölümüne giderler. İnterfaz ölümünün klinik önemi tüm beden ışınlanmasında ortaya çıkar.

Üreme yeteneğinin kaybı (Reprodüktif ölüm) : Bölünen hücrelerde radyasyonun yaptığı en önemli etkidir. Hücrelerin devamlı reprodüksiyon ile canlı yeni nesil yapabilme yeteneğinin ortadan kalkması ile sonuçlanır. Radyasyon etkisinin gösterilmesinde hücre sağkalım eğrileri kullanılmaktadır.(110)

2.5.2. RADYASYONUN BİYOLOJİK ETKİ MEKANİZMASI

Subletal ve potansiyel letal hasar oluşumu: Radyasyonun hedef molekülü DNA'dır. X ışını ve elektronların DNA'da yol açtığı subletal ve potansiyel letal hasarın (SLH, PLH) 2/3'ü indirekt yani su molekülü ile reaksiyona girerek ortaya çıkan reaktif serbest radikaller (H_2O^+ , OH^\bullet vs.) yoluyla meydana gelir. Hasarın 1/3'ü ise fotonun direkt olarak DNA ile etkileşimi sonucu ortaya çıkar.

Radyasyonun biyolojik etkisini gösterebilmesi için ortamda moleküler oksijen olmalıdır. Oksijen serbest radikaller yoluyla DNA'da oluşan hasarı sabitler. SLH, radyasyon uygulaması sonrası saatler içinde onarılan hasarlar iken, PLH hücrelerin bulunduğu ortamın değiştirilmesi (ısının azaltılması, dengeli tuz eriyiğinin katılması gibi) ile onarılan hasarlardır (110).

Hücre siklus fazlarına selektif etki: G2 ve M fazları radyasyona duyarlı fazlardır. Geç S fazı ise en dirençli fazdır.

Hücre sağkalım (doz-yanıt) eğrisinde değişiklik: Radyasyon dozları ile sağkalan hücre oranı arasındaki ilişkiyi gösteren eğrilere hücre sağkalım eğrisi denir. Nötron ve proton gibi partiküler radyasyonlarda sağkalım eğrisi dik iken, X ışını ve elektronlarda eğim artar ve bir omuz bölgesi oluşur. Bu bölge, SLH ve PLH birikimi ve onarımı ile sağkalan hücrelerin varlığını ve repopulasyonu gösterir. Radyoterapide tedavinin fraksiyone verilmesindeki amaç; oksik hücrelerin ölmesi, hipoksik hücrelerde oksijenlenmenin sağlanması (reoksijenasyon), radyoduyarlı fazdaki hücrelerin ölmesi ile S fazındaki hücrelerin G2/M fazına geçmelerinin sağlanması (redistribüsyon) ile tümör hücresindeki hasarın artırılmasıdır. Buna karşılık, fraksiyonasyon SLH ve PLH onarımı ve repopulasyon ile de normal doku iyileşmesine izin verir

Apoptoz (Programlanmış hücre ölümü): Radyasyon hücreleri 24–36 saat sonra apoptoze sokar ve bu durum p53, Bcl-2, BclX ve bax genlerine bağımlı bir olaydır. Apoptoz, radyasyona hassas olan hücrelerde daha erken meydana gelir.

Radyoterapinin tümör kontrolündeki katkısına rağmen meme kanserlerinin yaklaşık 1/3'ü sıklıkla ilk 5 yılda nüks (lokal-bölgesel ve uzak) etmektedir (111). Radyoterapi sırasında veya sonrasında tümörde progresyon görülebilmektedir ki bu durum hücrelerin tedaviye direnç kazandığının bir göstergesidir. Radyodirenç gelişimi ile ilgili olarak ileri sürülen mekanizmaları şu şekilde sıralayabiliriz (112).

1. *Artmış tümör yükü (yüksek klonojenik-anoksik hücre oranı)*: Büyük tümörlerin yok edilmesi küçük tümörlere göre daha zordur. Damardan uzaklaştıkça tümör hücrelerinde anoksi ve sonucunda nekroz ortaya çıkar. Nekrotik hücreler radyasyona dirençlidirler.

2. *Hipoksi*: Hipoksik hücreler, radyasyona normoksik hücrelere göre 2.5–3 kat daha fazla dirençlidirler. Kan damarından uzaklaşıldıkça tümör hücrelerinde hipoksi artar. Hücre sağkalım eğrilerine bakıldığında oksik hücrelerde eğri daha dik ve omuz bölgesi dar iken, hipoksik hücre oranı arttıkça eğrinin eğiminin de arttığı ve omuz bölgesinin de genişlediği yani daha fazla hücrenin sağkaldığı saptanmıştır.

3. *Radyodirenç sinyal yollarının aktivasyonu*: Tümör baskılayıcı gen olan p53'ün mutasyonu apoptozi engelleyerek, bir onkogen olan EGFR (epidermal growth factor receptor) ile sinyal yollarının aktivasyonu hücrelerde çoğalmaya yol açarak, DNA onarım genlerinin amplifikasyonu da hasar onarımı yaparak radyodirence neden olurlar.

4. *Repopulasyon*: Radyoterapi fraksiyonları arasında hücrelerde repopulasyon meydana gelir. Hızla proliferen olan tümörde radyodirençli olan S fazındaki hücre sayısı fazladır.

Radyodirenci azaltmak ya da yok etmek için RT'de alternatif tedaviler denenmektedir. Bunlar; hiperfraksiyone (günde 2 kere) veya akselere fraksiyone (haftada 6 kere) tedaviler hiperbarik oksijen, misonidazol, hipertermi gibi hipoksik radyoduyarlaştırıcılar ve diğer sitotoksik ajanlar ile eşzamanlı tedavilerdir (113- 119).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar günümüzde yapılan araştırmalarda önemli bir yer tutmaktadır. Çeşitli patolojik durumlarda (örneğin kanser) belli bir maddenin etkilerini, bir hücre ya da dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini (örneğin bir protein) belirlemek amacıyla belli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak canlı ortamında (*in vivo*) elde edilebilecek sonuçlarla ilgili öngöründe bulunulabilir. Hücre (doku) kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamaktadır. İlk olarak 1885 te Roux embriyonik tavuk hücrelerinin hayvanın vücudunun dışında tuz çözeltisinde canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir.

Hücre ve doku kültürü; aşı, monoklonal antikor, çeşitli enzimler ve hormonların üretimi için, hücre içi aktivite ölçümü, DNA ve RNA replikasyonu araştırması, protein sentezi, enerji metabolizmasının araştırılması, çeşitli ilaçların hücre döngüsünde etkisi, hormon-reseptör komplekslerinin davranışları, sinyal iletim mekanizması ve hücre haberleşmesi, hücrenin beslenme özellikleri, enfeksiyon, viral ve kimyasal transformasyon, özel ürünlerin sentezletilip salgılanması, embriyonik araştırmalar, hücre popülasyon kinetiği, adezyon, sitogenetik analiz, genetik manipülasyon ve immortalizasyon vb. gibi çeşitli amaçlarla yapılmaktadır. Hücre kültürü için çeşitli doku kaynakları, doğum öncesi tanı için amniyotik hücreler, çeşitli araştırmalar için epitel ve fibroblast hücreleri, non-invaziv ve çoğalma kabiliyetlerinden dolayı kemik iliği, periferik kan, ayrıca tüm doku hücrelerinin yanı sıra "hücre hattı" oluşturmada kullanılan tümör hücreleri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada ; hücre kültürü yöntemlerini kullanılarak *in vitro* koşullarda insan meme kanseri hücre hattı üzerinde (MCF-7 ve MCF-7 aro), radyoterapi ile eşzamanlı letrozol kullanımının hücre ölüm mekanizmaları üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ AŞAMASINDA KULLANILAN CİHAZ VE KİMYASALLAR

3.1.1. Hücre Kültürü Besiyeri Ve Solüsyonlar

Hücre kültürü besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikroçevreyi sağlayan besleyici solüsyonlardır. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini desteklerler. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki iyonlarla gerekli ozmolarite ve pH'ı da sağlarlar.

Standart bir besiyerinde bu bileşenlerin sağlanması için gerekli temel solüsyonlardan ilki en sık kullanılan ortam **Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)**'dir. Hücre kültüründe olması gereken temel aminoasit kombinasyonudur. Hücrelerin beslenebilmesi için gerekli glukoza, canlılıklarını sürdürebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir. Ancak tek başına hücre gelişimi için yeterli değildir. İkincisi ise en sık kullanılan serum "**Fetal Bovine Serum**"'dur. Serum hücrelerinin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan ve içeriği tam olarak tanımlanmamış zengin bir protein çözeltilisidir. İçinde hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinleri bulunur. Standart bir somatik hücre kültüründe serum oranı %10'dur. MCF-7 aro hücreleri ile yapılan deneylerde serumdaki steroidleri uzaklaştırmak için **Aktif Karbon İle Muamele Edilmiş Fötal Dana Serumu (CT-FBS; Chorcoal Treated-FBS)** kullanılır. Fötal dana serumu içerisine % 3 oranında aktif karbon ilave edilerek gece boyu + 4 C^o'de inkübe edilir. Süpernatant tamamen berraklaşana dek birkaç kez +4 C^o'de 4000 rpm'de 10 dak santrifüj edilir. Elde edilen süpernatant 2 kez filtrelenerek elde edilir ve -20 C^o'de saklanır.

"Dulbecco's Phosphate Buffered Saline" (dPBS): Hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solüsyonudur. İçerisindeki inorganik tuzlar ve su hücre membranını destekler. pH'ı tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar.

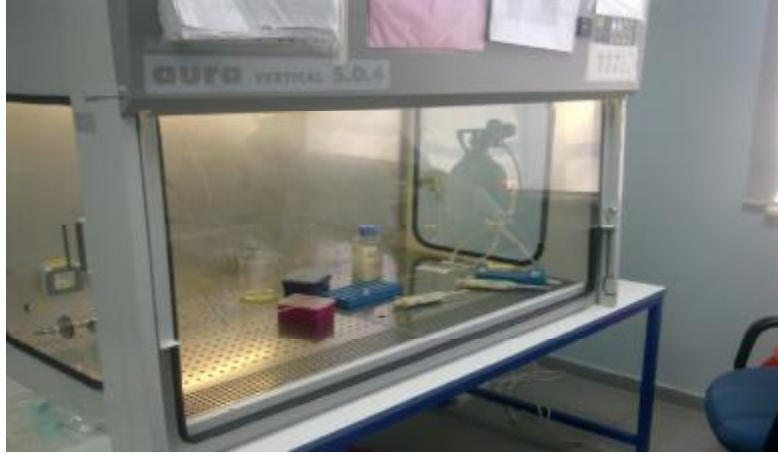
İçeriği:(pH:7.49):NaCl 140 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₂ 0.9 mM ,NaHPO₂ 6.4 mM

Hücre pasajlarında kullanılan temel enzim **Tripsin'dir**. Tripsin bir serin proteaz tipi enzimdir, lizin ve arjinin aminoasitlerinin peptitlerini yıkar. Tripsin kullanımında dikkat edilmesi gereken bazı noktalar şunlardır.

- -20 °C'de saklanır, daha yüksek sıcaklıklarda aktivitesi düşer.
- Serum tripsin inhibitörleri içerir, hücrelere tripsin uygulamadan önce mutlaka bir kere Mg ve Ca içermeyen PBS ile yıkamalı ve yüzeylerindeki serum uzaklaştırılmalıdır.
- Tripsin hücrelerin yüzeyini örtecek kadar uygulanır.
- Tripsin sıcaklık arttıkça daha etkili çalışır. Tripsin uygulanan hücreler inkübatöre konduklarında daha çabuk yüzeyden ayrılırlar.
- Hücreler yüzeyden ayrılır ayrılmaz tripsinin inhibe edilmesi önemlidir. Tripsin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranına zarar vermeye başlar.
- Tripsini inhibe etmek için tripsin hacminin en az iki katı kadar %10 FCS'li besiyeri uygulanmalıdır. Daha sonra hücreler pipetlenerek birbirinden ayrılırlar.

3.1.2. Hücre Kültürü Aşamasında Kullanılan Cihazlar

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli donanımdaki araç-gereçler, laminar akımlı kabin, karbon dioksit (CO₂) etüvü, inverted (oküler ve objektifi yer değiştirmiş) mikroskop, hücreleri saklama ve koruma için sıvı azot tankı ve hücrelerin üremek için tutunma ve hareketlerine olanak sağlayacak toksik olmayan, biyolojik olarak *inert* ve optik olarak saydam, tek kullanımlık steril plastik kaplardır. Laminar akımlı kabinler partikül filtresine sahiptirler. Bu kabinler dikey ya da yatay olabilirler, dikey olanlarında süzülen hava kabinin üstünden çıkarken yatay olanlarında kullanıcı bölgesinden yatay olarak dışarı üfürülmektedir. Kabinlerin kullanım öncesi UV (ultraviyole, morötesi) ışıkla sterilizasyonu sağlanmalıdır (Resim 1). Hücreler yaklaşık olarak % 5 CO₂ içeren ortamda üretildikleri için CO₂ etüvlerinden yararlanılmaktadır(Resim2). Hücreleri gözlemek için de inverted mikroskoplar kullanılır. (Resim3)



Resim 1: Laminar Akımlı Kabin



Resim 2: CO₂'li Etüv



Resim 3: İnverted Mikroskop

3.1.3. Hücre kültürü yönteminin temel aşamaları

Kültürler günlük olarak kontrol edilmelidir. Besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu gözlemlenmelidir. Kültürde hücreler; hücre tipine, ekilme yoğunluğuna, ortamın yoğunluğuna ve daha önceki işlemlere bağlı olarak önce sessiz (inaktif) ya da *lag* faz (evre) denilen bir döneme girerler. Bunu en yüksek metabolik aktivitenin gözlemlendiği logaritmik artış (üreme) dönemi izler. Bundan sonra da hücreler hücre sayısının sabit kaldığı bir durağan evreye girer (tüm üreme yüzeyleri kaplanmışır). Hücrelerin nüfus yoğunluğu üremeyi baskıladığı zaman besiyerinden alınır (harvesting). İdeal olanı hücrelerin durağan evreye girmeden önce kültürden alınmalarıdır. Hücrelerin kültür kabından alınmaları için değişik yöntemler kullanılabilir:

- Mekanik: Bir spatül kullanarak hücreler yüzeyden fiziksel olarak ayrılabilir. Ancak hızlı bir yöntem olmasıyla birlikte bu yöntemde hücreler zarar görebilirler. Bu nedenle ancak hücre canlılığının önemli olmadığı koşullarda bu yöntem tercih edilebilir.
- Proteolitik enzimler: Tripsin, kollajenaz ya da pronaz genellikle EDTA ile kombine edildiğinde hücrelerin üreme yüzeyinden ayrılmasına neden olur. Bu yöntem de hızlı ve güvenilir olmasına karşın hücre yüzeyine zarar verebilir. Proteolitik reaksiyon serum içeren tam kültür ortamının katılmasıyla hızlı bir biçimde sona erdirilebilir.
- EDTA: Tek başına EDTA kullanılarak da hücreler yüzeyden ayrılabilir.

Kültür ortamı (besiyeri) için gereken bileşenler ve üreme gereksinimleri sağlanmalıdır. Kültür kapları CO₂ etüvüne (37°C, % 5 CO₂) konduğu zaman gaz giriş çıkışı için kapların ağzı hafif açık olmalıdır. Ayrıca ortamın nemli olması ve görünür ışıktan sakınılması da gereklidir. Hücre kültürü çalışmalarında da tüm laboratuvar çalışmalarında olduğu gibi güvenlik önlemlerine dikkat edilmelidir.

3.2. MCF-7 ve MCF-7 ARO HÜCRELERİNİN KÜLTÜRE EDİLMESİ

Meme kanseri hücrelerinde radyoterapi ile eşzamanlı letrozol kullanımının hücre ölüm mekanizmaları üzerine olan etkilerini göstermeyi hedeflediğimiz çalışmamız in vitro koşullarda hücre kültürü yöntemleri kullanılarak yapıldı ve çalışmamızda, model olarak MCF-7 aro meme kanseri hücre hattı ve kontrol grubu olarak da MCF-7 hücreleri kullanıldı.

3.2.1 MCF- Hücre Hattı:

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation - 7,) Michigan Kanser Vakfı kısaltmasıdır. Bu meme adenokarsinomu, C.M Mcgrath tarafından, 69 yaşında 0 Rh+ kan grubuna sahip, Orta Asyalı bir kadından plevral efüzyon ile elde edilmiş, adherant epitelyal süt bezi adenokarsinomudur. MCF-7 hücreleri insülin growth faktör bağlama proteini (IGFBP)'nin BP-2, BP-4 ve BP-5 tiplerini üretir. MCF-7 hücreleri östrojen reseptörlerine bağımlı çalışır. Diğer deyişle bunlar ERpozitifdir. MCF-7 hücrelerinin büyümesi Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) tarafından baskılanır (120,121).

ATCC # (HTB-22™)

Organizma	: Homo sapiens (insan)
Yaş	: 69
Cinsiyet	: Dişi
Etnik köken	: Beyaz ırk
Organ	: Meme bezi
Hücre tipi	: Epitelyal
Hastalık	: Adenokarsinom
Reseptörler	: Östrojen reseptörü
Köken aldığı metastatik bölge:	Plevral efüzyon
Hücresel ürünler	: İnsülin benzeri büyüme faktör bağlama proteini (IGFBP)'nin BP-2, BP-4 ve BP-5 tiplerini
Antijen Ekspresyonu	: 0 Rh+

DNA profili (STR):

Amelogenin:	X
CSF1PO:	10
D13S317:	11
D16S539:	11,12
D5S818:	11,12
D7S820:	8,9
THO1:	6
TPOX:	9,12
vWA: 14,15	

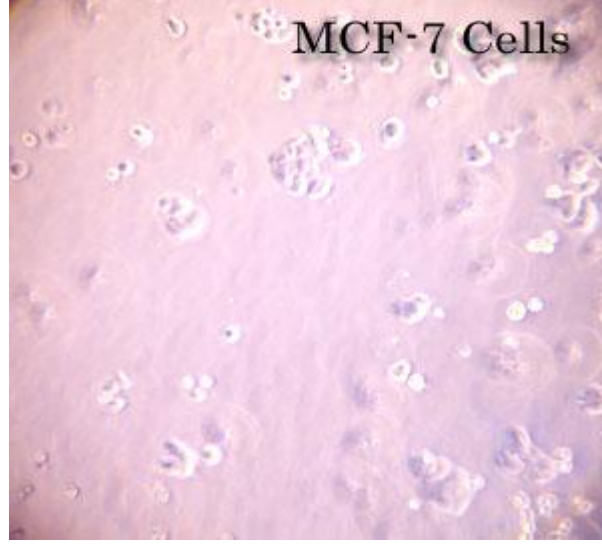
İzoenzimler:

AK-1,	1
ES-D,	1-2
G6PD,	B
GLO-I,	1-2
PGM1,	1-2
PGM3, 1	

Sitogenetik Analiz:Modal Kromozom Sayısı=82 Range:66-87

Başlangıçtaki kromozom sayıları hipertriploididen hipertetraploidiye değişir ve 2S içeriği %1'de oluşur. S metafazı başına 29-34 marker kromozom vardır. 24-28 marker hücrelerin en az %30'unda oluşmuştur ve genellikle metafazın %80'inden fazlasında S metafaz başına 1 büyük submetasentrik (M1) ve 3 büyük subtelosentrik (M2, M3 ve M4) marker tanımlanmıştır. Kromozom 20 nullisomik ve X disomiktir.

MCF-7 hücreleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK ve Doktora programı öğrencisi Birce Akpınar'dan temin edilmiştir.



Resim 4 : MCF-7 Hücrelerinin Mikroskopta Görüntüleri (<http://mcf7.com/>)

3.2.2 MCF-7 aro Hücreleri

Letrozol'ün invitro koşullarda etkisini gösterebilmek için CYP19 aromataz enzimi geni ile stabil olarak transfekte edilen ER-pozitif MCF-7 meme kanseri hücreleri kullanılmaktadır (122).

MCF-7 aro hücreleri Dr S Chen (City of Hope, Duarte, CA, USA) tarafından başışlanmıştır.

In vitro koşullarda gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besi ortamı, hücrelerin in vitro koşullar altında yaşayabilmeleri, büyüebilmeleri ve proliferasyonu için uygun olmalı ve gerekli maddeleri içermelidir. İnaktif serum, hücrelerin gereksinimlerini karşılamak amacıyla besi yerine mutlaka eklenmelidir. Çalışmamızda MCF-7 hücreleri için %10 fötal sığır serum (FBS), %1 L-glutamin, 100IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin içeren DMEM besiyeri, MCF-7 aro hücreleri için %10 fötal sığır serum (FBS), %1 L-glutamin, 100IU/ml penisilin 10 mg/ml streptomisin , 100 µg/ml G418 ve 1 µg/ml Amfoterisin-B içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. DMEM besiyeri ile üretilen MCF-7 hücreleri ve MCF-7 aro hücreleri 37 °C'de ve % 95 nem, % 5 CO₂' li etüvde çoğaltıldı.

3.2.3. MCF-7 ve MCF-7 Aro Hücrelerinin Dondurulması

- 1) Flasklarda bulunan hücreler öncelikle tripsinizasyon işlemi ile yapışmış oldukları flask yüzeyinden kaldırıldı.
- 2) Hücreler 15 ml' lik falcon tüplere alınarak 2000 rpm' de 5 dakika süre ile santrifüj edildi.
- 3) Santrifüj sonrası, her bir falcon tüpe ait 1,5 ml' lik cryo tüpler hazırlandı.
- 4) 9:1 oranında (%10' luk), serum: DMSO karışımından oluşan ortam hazırlandı.
- 5) Tüplerde bulunan süpernatant kısım uzaklaştırılarak falcon tüpler buz üzerine alındı. Falcon tüpler de bulunan hücreler üzerine 750 µl serum: DMSO karışımı eklenerek resüspanse edildi.
- 6) Buz içerisinde bulunan kriyotüpler içerisine bu karışım aktararak -80 C⁰'ye kaldırıldı.

3.2.4. Dondurulmuş MCF-7 ve MCF-7 Aro Hücrelerinin Çözdürülmesi

- 1) -80 C⁰' de kriyotüpler içerisinde bulunan %10 DMSO ile dondurulmuş MCF-7 ve MCF-7 aro hücreleri 37 C⁰' ye alındı
- 2) DMSO' nun hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi bulunmaktadır. DMSO' dan zarar görme sürecisini azaltmak amacıyla kriyotüp içerisine hızlı bir şekilde besi ortamı ilave edildi. Pasteur pipeti yardımıyla karıştırılarak hücreler 15 ml' lik falcon tüp içerisine alındı.
- 4) Santrifüj sonrası falcon içerisnde bulunan süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler üzerine tekrar (~10 ml) besi ortamı eklendi.
- 5) Tekrar 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- 6) Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve çöken hücrelerin üzerine 5 ml besi yeri eklenerek 75 cm²' lik flasklara alındı.
- 7) Flasklar, 37 °C' deki %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı.

48 saat sonra üremeye başlayan hücrelerin kullandıkları eski besi ortamı değiştirilerek yerine 5 ml taze besi yeri ilave edildi. Hücreler bütün flask yüzeyini

kapladıktan (confluent olduktan) sonra, hücrelerin canlılığını korumak ve devamlılığını sağlamak amacıyla pasaj yapıldı.

MCF-7 ve MCF-7 Aro Hücrelerinin Pasajlanması

- 1- MCF-7 ve MCF-7 Aro hücreleri monolayer hücreler oldukları için hücrelerin pasajlanması için ilk olarak yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları gerekir. Bu nedenle, flasklarda bulunan ortam dökülerek, flasklar bir kez serumsuz ortam kullanılarak yıkandı.
- 2- Daha sonra hücrelerin üzerine 2 ml tripsin ilave edildi. Bir süre bekletildikten sonra tripsin uzaklaştırılarak flasklar 5 dakika boyunca inkübatörde bekletildi.
- 3- İnkübatörden çıkan flasklar inverted mikroskopla incelendi ve tüm hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edildi.
- 4- Flaskda bulunan tüm hücreler kalktıktan sonra, 10 ml serumlu ortam ilave edildi.
- 5- Flask içerisinde bulunan hücre-ortam karışımınının 5 ml' si başka bir flaska aktararak pasajlama işlemi tamamlanmış oldu.
- 6- Hücrelerin yüzeye yapışarak üremeye devam etmeleri için flasklar inkübatöre kaldırılarak inkübasyona bırakıldı ve çoğalmaları sağlandı.

3.2.6. Hücrelerinin Canlılığının Belirlenmesi, Hücre sayılması ve Ekimi

3.2.6.1. Hücre sayılması

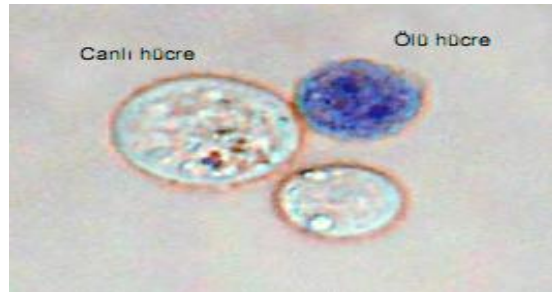
Canlı hücreler membran bütünlüğüne sahip olmaları nedeniyle tripan mavisi boyasını geçirmezler. Fakat ölü hücreler, membran bütünlükleri bozulduğu için boyayı geçirirler. Bu testte bir hücre süspansiyonu tripan mavisi ile karıştırılır ve hücrelerin boyayı alıp almadığı mikroskopta kontrol edilir. Canlı hücreler parlak ve temiz bir sitoplazmaya sahip olarak görülürken, ölü hücreler mavi sitoplazmalı olarak görülürler.

Gereçler:

1. Tripan mavisi % 0,5 (Biological Industries-Lot 420488)
2. 0,5 ml hücre süspansiyonu
3. Nauber lamı (Marienfeld- Ref 0610110, Lot 409104)
4. 20'lik ve 1000'lik pipet (ependorf 273747, 1854995) ve pipet ucu (Greiner bio-one FT 20 E, G)
5. Mikrosantrifüj tüpü
6. İnverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon-Diaphot 200)

Yöntem:

1. Süspanse hücre kültüründen 0,5 ml örnek alındı.
2. 1:1 oranında tripan mavisi ve PBS bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı.
3. Tripan mavisi + PBS karışımından 0,5 ml alınıp 0,5 ml hücre süspansiyonu ile karıştırıldı.
4. Naubauer lamının kenarlarına 1'er damla distile su damlatılıp üzerine lamel kapatıldı.
5. Lamel ile lam arasındaki boşluktan 10 µl tripan mavisi + hücre karışımından eklendi.
6. Işık mikroskobunda 10 X objektifte sayım yapıldı.
7. Mavi boyayı almamış olan hücreler canlı, almış olanlar ise ölü olarak değerlendirildi.
8. Canlı hücre sayısı = 1 büyük karede sayılan canlı hücre x dilüsyon faktörü x 10^4 formülü ile belirlendi.

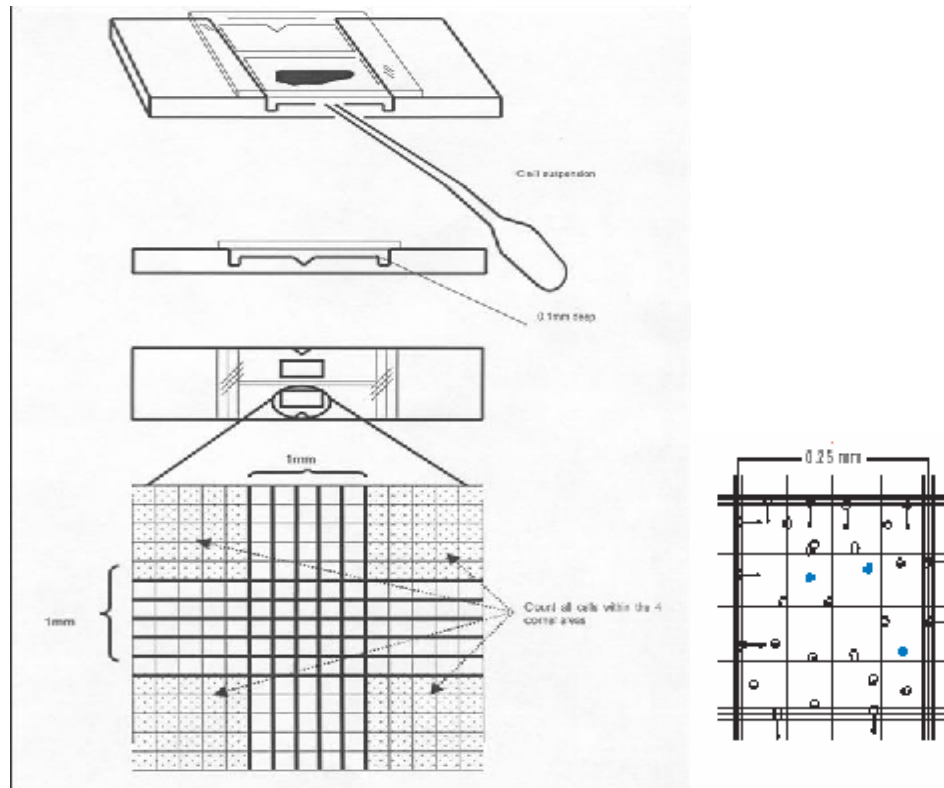


Resim 5 : Tripan Mavisi ile canlı ve ölü hücrelerin boyanması

(www.steteskop.net/News-file-article-sid-444.html)



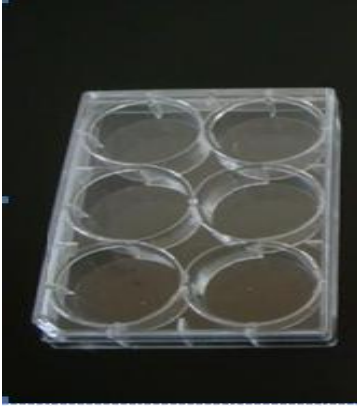
Resim 6: Neubauer hemositometresi



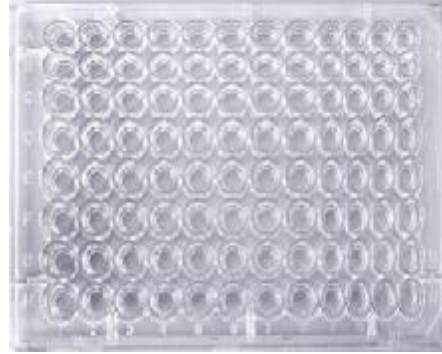
Şekil 21: Neubauer hemositometresi (31)

3.2.6.2. Hücre Ekimi:

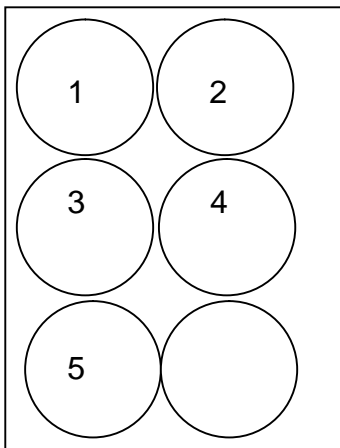
6 well plate'de her bir göze 200 000 hücre olacak şekilde 5 göze 3 adet well'e (kontrol, 2 Gy, 4 Gy) annexin deneyi için, 96 well plate'de 10 000 hücre olacak şekilde 10 göze 3 adet well'e (kontrol, 2 Gy, 4 Gy) caspas deneyi için ve 10 cm'lik petri kutularına 1 000000 hücre olacak şekilde 15 petri kutusuna western blotlama için hücreler ekildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra (hücrelerin tabana yapışma zamanı kadar geçen süre) letrozol eklendi. 1 gün, 3 gün ve 6 gün letrozole maruz bırakılarak RT uygulandı. Deneyler RT sonrası 24.saatte yapıldı.



Resim 7: 6 Well plate

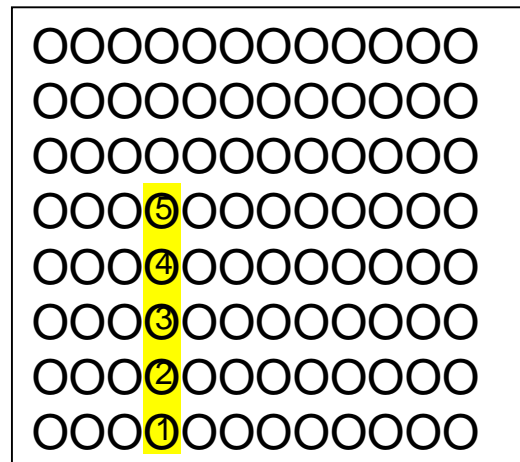


Resim 8: 96 Well plate



Şekil 22:

6 Well plate'e hücre ekilmesi



Şekil 23:

96 well plate'e hücre ekilmesi

1.Kontrol (yalnızca ortam) 2. Etanol 3.100 nM Letrozol 4.500 nM Letrozol 5.1000 nM Letrozol

3.3. DENEY DÜZENİĞİNİN HAZIRLANMASI

3.3.1. Letrozol'ün Stok Solüsyonu Hazırlanması ve Dilüsyonu

4- [(4-cyanophenyl)-(1,2,4-triazol-1-yl)methyl]benzonitrile kimyasal formülüne sahip letrozol (Femera®) Novartis Pharma AG (Basel, İsviçre) laboratuvarlarında üretilmiş ve çalışma için 50 mg Novartis Onkoloji Grubu tarafından temin edilmiştir. MW=285,303 g/mol olan letrozolden optimizasyon yapılmaksızın Azria ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandığı letrozol dozları göz önünde bulundurularak 100nM,500nM ve 1000nM'lık stoklar hazırlanmıştır (10).

Birinci Basamak: 10mM'lık 5 ml ara stok hazırlamak için:

M (molarite)=n (mol)/V (volüm) formülü kullanılarak;

10mM=n/5 ml 10m/1000ml=n/5 ml n=5x10⁻² mol Letrozol gerektiği hesaplandı.

n=m(ağırlık)/MA(moleküler ağırlık) formülü kullanılarak;

5x10⁻² mol =m/285,303 g/mol m=0,0143 gr olarak bulunan Letrozol miktarı hassas terazi ile tartılarak hazırlandı.

0.0143 gr Letrozol 5 ml steril %100'lük etanol içerisinde çözüldü.

20µm por çaplı filtre ile sterilize edildi.

İkinci Basamak: 1mM'lık 5 ml ara stok hazırlamak için:

M₁ . V₁ = M₂ . V₂ formülü kullanılarak;

10mM . V₁ = 1mM . 5 ml V₁=0.5 ml olarak hesaplandı.

10 mM'lık stoktan 0,5 ml alınarak 4.5 ml ortama eklendi.

Daha sonra bu stok kullanılarak 100nM'lık, 500 nM'lık ve 1000 nM'lık ortamlar hazırlandı

3.3.2. Testosteron'un Stok Solüsyonu Hazırlanması ve Dilüsyonu

8R,9S,10R,13S,14S,17S-17-hydroxy-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17 - dodecahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one kimyasal formülüne sahip testosteron Applichem 'in Almanya'daki laboratuvarlarından temin edilmiştir. Testosteron dozu da aynı şekilde Margarida ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandığı doz göz önünde bulundurularak 1 nM olarak belirlenmiştir (MW=288,43 gr/mol), (133).

Birinci Basamak: 50mM'lık 5 ml ana stok hazırlamak için:

M (molarite)= n (mol)/ V (volüm) formülü kullanılarak;

$50\text{mM}=n/5\text{ml}$ $n= 25 \cdot 10^{-5}$ mol olarak Testosteron gerektiği hesaplandı.

$n=m(\text{ağırlık})/MA(\text{moleküler ağırlık})$ formülü kullanılarak;

$m=0.072$ gr Testosteron hassas terazi ile tartıldı ve 5 ml DMSO içinde çözüldü.

20 μm por çaplı filtre ile sterilize edildi.

İkinci Basamak: 1mM'lık 5 ml ara stok hazırlamak için:

$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$ formülü kullanılarak;

$50\text{mM} \cdot V_1=1 \text{mM} \cdot 5 \text{ml}$ $V_1=0,1 \text{ml}$ 50 mM'lık ana stoktan alınarak 4,9 ml ortama eklendi.

Üçüncü Basamak: 1 μM 'lık 5 ml ara stok hazırlamak için:

$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$ formülü kullanılarak;

$1000 \mu\text{M} \cdot V_1 = 1 \mu\text{M} \cdot 5\text{ml}$ $V_1 = 5 \mu\text{l}$ 1mM'lık stoktan alınarak 4,995 ml ortama eklendi

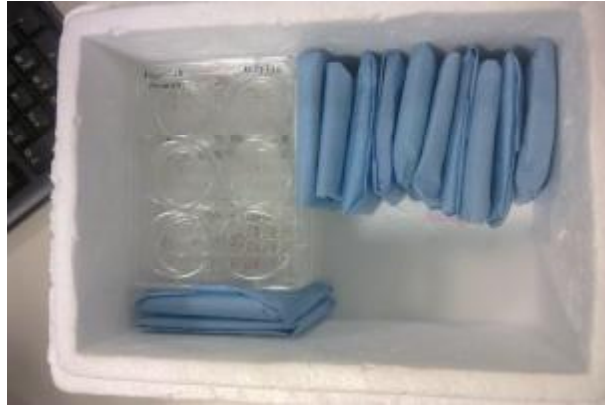
Dördüncü Basamak: 1nM Testosteron içeren 100 ml ortam hazırlanması:

$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$ formülü kullanılarak;

$1000\text{nM} \cdot V_1 = 1\text{nM} \cdot 100\text{ ml}$ $V_1 = 0.1\text{ ml}$ $1\text{ }\mu\text{M}$ 'lık stoktan alınarak 99.9 ml ortam içine eklendi.

3.3.3. Radyoterapi Düzeneginin Hazırlanması

Radyoterapi de yine Azria ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandığı 2Gy ve 4Gy olarak Letrozol uygulandıktan 1, 3 ve 6. günlerde uygulanmıştır. Hücrelerin bulunduğu "well" 'ler radyoterapi cihazına gidene kadar dış etkilerden korumak için strofor kutular içinde sallanmalarını engellemek için sıkıştırılarak taşınmıştır (Resim 9). Kontrol grubu da aynı şartlarda radyoterapi cihazına götürülmüştür. Radyoterapi, Dokuz Eylül Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında uygulanmıştır.



Resim 9: Hücrelerin Laboratuardan Radyoterapi Cihazına Taşınması

Hücre ışınlanmasında, Theratronics marka T1000 model Co-60 kaynağı içeren teleterapi cihazı kullanılmıştır. Hücreler flask dibinde 3mm sıvı içerisinde bulunmaktadır. Flask yüksekliği 2cm olduğu için AP ışınlama ile sıvı düzeyde doz homojenitesini sağlamanın zorlaşacağı ve ışınlama süresi uzun olacağından şekildedeki düzenekte görüldüğü gibi hücreler gantry 180 derecede ışınlanmıştır. Bu düzenekte 5 adet 40x40 boyutlarında ve 1cm kalınlığında PTW RW3 katı su fantomları kulla-

nılmıştır. Fantomlar direkt kolimatör üzerine konmuştur. İlk üç plakadan sonra ışınla-
ma alanını merkezleyecek şekilde flasklar konulmuştur. Flaskların etrafındaki hava
boşlukları jel bolus ile doldurulmuş ve üzerine de 2 fantom plaka konarak
inhomojenite etkisi minimuma indirilmiştir. Kaynak ile flask tabanı arasındaki mesafe
61.7 cm ve bu mesafede radyasyon alanı da 24,7x24,7 dir. Hücre ışınlanması yapıl-
madan önce şekil 24'deki ışınlama düzeneğinde, 61.7cm de iyon odası ile gerçek
dozimetri yapılarak Co60 kaynağının doz hızı ölçülmüş ve hesaplamalarda oluşabile-
cek belirsizlikler azaltılmıştır.



Resim 10: Radyoterapi Düzeneği

Şekil 24: Radyoterapi Düzeneği

Cihaz

Theratron1000 (Co60)

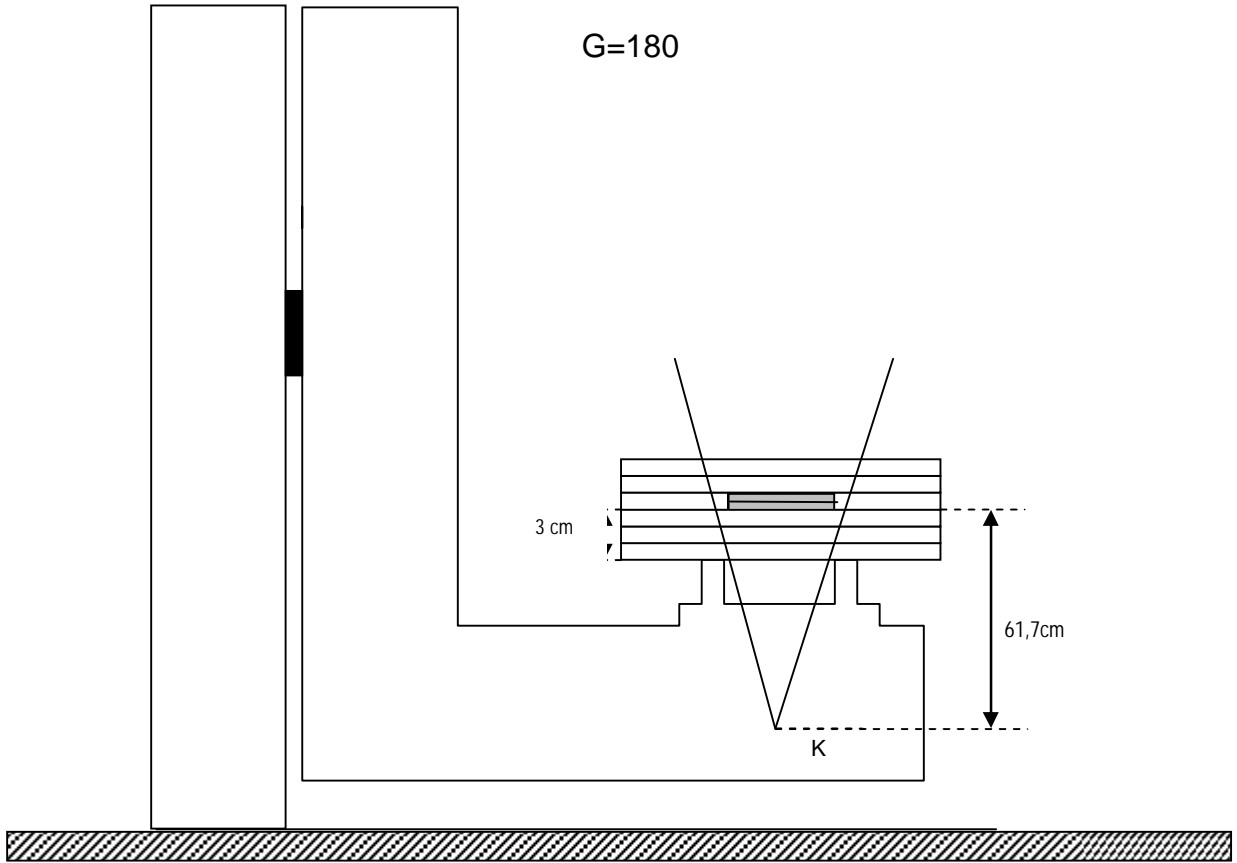
Alan

İzomerkezde:40x40 cm

61,7cm'de :24,7x24,7 cm

Aşağıdaki "setup" koşulunda 3 cm de doz hızı 06.04.2010 tarih itibarıyla

228.24cGy/dak



NOT

Rölatif ölçümler

06.04.2010

SSD=100 d=5cm Okuma=77,763

SSD=58,7 d=3cm Okuma=232,4

Alan 40x40cm

3.4. SİTOTOKSİSİTE DENEYLERİ

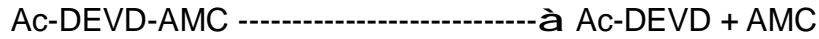
3.4.1. APOPTOZ'UN GÖSTERİLMESİ

2.4.2.1. Kaspaz-3

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler .

3.4.1.1.1. "Fluorometric Caspase 3 Assay Kit" ile Apoptotik Davranış Ölçümü:

Kaspaz 3 Florometrik assay peptit substrat aacetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC)'nin kaspaz 3 ile hidrolizine dayanır. Hidroliz sonucunda florescent 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) salınır.



AMC'nin eksitasyon ve emisyon dalga boyları 360 ve 460 nm'dir. Salınan AMC konsantrasyonu dolayısıyla kaspaz 3 miktarı, konsantrasyonları bilinen AMC solüsyonlarından elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak belirlenebilmektedir.

3.4.1.1.1.1 Gereçler:

5X Lizis tamponu (Ürün kodu L 2912) : Çift distile su ile 1X halinde dilüe edilir. -20 °C' de saklanır.

10X Reaksiyon tamponu (Ürün kodu A 0219) : Çift distile su ile 1X halinde dilüe edilir.-20 °C'de saklanır.

Kaspaz 3 (Ürün kodu C 5974): 50 µg çift distile su µg liyofilize toz sulandırılarak 100 µg/µl konsantrasyonda solüsyonu hazırlanır. Alikatlanıp -80 °C 'de saklanır.

Ac-DEVD-AMC Substratı (Ürün kodu A1086): Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin 2,5 mg içerik 370 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) içerisinde çözülerek 10 mM'lık solüsyon hazırlanır. -20 °C 'de saklanır.

Ac-DEVD-CHO İnhibitörü (Ürün kodu A0835): Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al. 0,5 mg içerik 500 µl DMSO içerisinde çözülerek 20 mM'lık solüsyon hazırlanır. -20 °C'de saklanır. Kullanmadan önce 1X assay tampon ile 100 kat 200 µM.'a dilüe edilir.

7-Amino-4.methylcoumarin Standart (Ürün kodu A9891): 1 mg içerik 570 µl DMSO'da çözülür. Kalibrasyon eğrisinde standart olarak kullanılır. . -20 °C'de saklanır. AMC kalibrasyon eğrisi hazırlamak için 1X tampon ile 1000 kat dilüe edilerek konsantrasyonu 10 µM'a getirilir.

Apoptotik ajan ile indüklenen hücreler Letrozol eklenmiş ve eklenmemiş MCF-7 hücre hattı

Plate okuyucu (Biotek Synergy HT)

AMC Kalibrasyon Grafiği Hazırlanması

96 well plate microassay metodu için tablo 9 daki standart solüsyonlar hazırlanır.

- Her solüsyondan 200' er µl 96 well plate gözlerine eklenir.
- Referans için bir göze 200 µl 1X assay tampon eklenir.
- Flüoremetrenin eksitasyonu 360 nm, emisyonu 460 nm' ye ayarlanır. Solüsyonların flüoresans değerleri ölçülür.
- Flüoresans yoğunluğuna karşı AMC konsantrasyonu grafiği çizilir.

Tablo 3: AMC Kalibrasyon Grafiği

AMC Standard	200µl Hacim içerisindeki AMC miktarı (nm)	10µM AMCSolüsyon miktarı	1X Assay Tampon Miktarı
6 µM	1,2 nmol	180 µl	120 µl
4 µM	0,8 nmol	120 µl	180 µl
2 µM	0,4 nmol	60 µl	240 µl
1 µM	0,2 nmol	30 µl	270 µl
500 nM	0,1 nmol	15 µl	285 µl
100 nM	0,02 nmol	3 µl	297

3.4.1.1.1.4. Hücre Lizatı Hazırlanması:

- Apoptoz indüklenen MCF-7 hücreleri inkübasyon süresi sonunda PBS içerisinde hücre kazıyıcı ile kazıyarak kaldırılır.
- 600 g'de, 5 dak ,+ 4 °C'de santrifüjlenerek çöktürülür.
- Bir kez PBS ile yıkanır.
- 250000 hücre başına 40 µl 1X lizis tampon eklenir ve süspanse edilir.
- Buzda 15-20 dak. İnkübe edilir.
- Lizis edilen hücreler 14000 g'de, 10-15 dakika , + 4 °C'de santrifüjlenir.
- Süpernatantlar yeni tüplere aktarılır.
- Lizatlar hemen analiz edilir ya da alikatlanarak, -80 °C'de saklanır.

96 Well Plate Microassay Methodu ile Apoptotik Davranışın Belirlenmesi

- Her 3 ml 1X Assay tampon başına 5 µl 10 mM Ac-DEVD-AMC eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanır. 96 gözlü platelerin uygulama yapılacak her gözüne 200 µl reaksiyon karışımı eklenir.
- Tablodaki gibi 96 gözlü plate hazırlanır.

	1X assay Tampon	Kaspaz3 (0,5 µg/µl)	Hücre Lizatı	Kaspaz 3-İnhibitörü Ac-DEVD CHO	Reaksiyon Karışımı
Blank	5 µl	-	-	-	200 µl
Kaspaz3 pozitif kontrol	-	5 µl	-	-	200 µl
Kaspaz3 pozitif kontrol + İnhibitör	-	5 µl	-	2 µl	200 µl
Apoptoz İndüklenmeyen hücre lizatı	-	-	5 µl	-	200 µl
Apoptoz İndüklenmeyen hücre lizatı + İnhibitör	-	-	5 µl	2 µl	200 µl
Apoptoz İndüklenen hücre lizatı	-	-	5 µl	-	200 µl
Apoptoz İndüklenen hücre lizatı + İnhibitör	-	-	5 µl	2 µl	200 µl

Tablo 4: 96 gözlü plate metodu ile apoptotik davranışın belirlenmesi

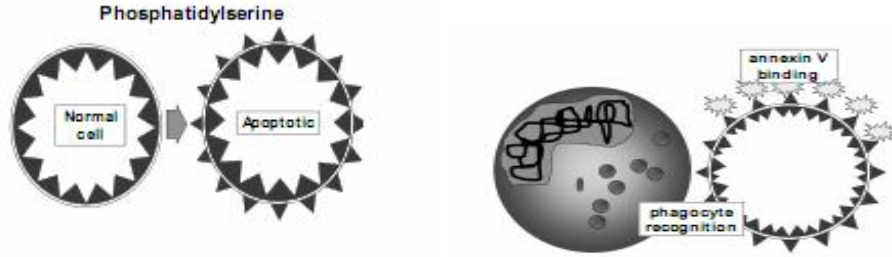
- Plate'in kapağı kapatılıp oda sıcaklığında 1-1,5 saat ışık almayacak şekilde inkübe edilir.
- Eksitasyon 360 nm, emisyon 460 nm'de plate fluoremetre'de okutulur.
- Kalibrasyon grafiğine göre AMC konsantrasyonları hesaplanır

2.4.3.1. Annexin V

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Annexin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Annexin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir.

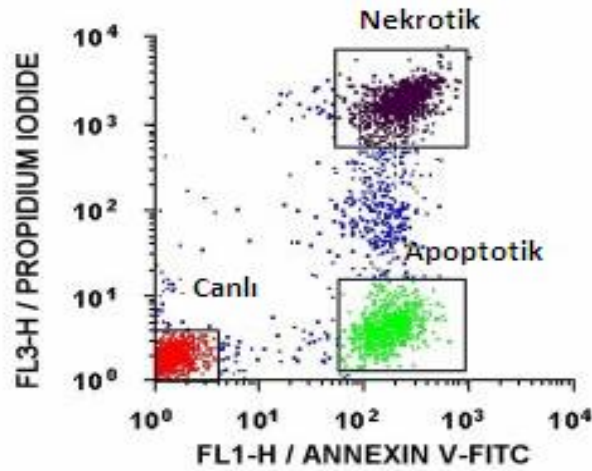
Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir.

Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidyum iodide (red fluorescence) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITCPI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir.



Şekil 25: Fosfotidilserin ve Annexin V

(<http://www.uchsc.edu/immuno/student/current/IMMU%207662%20Notes/Apoptoz%202010%207662%20Cohen.pdf>)



Şekil 26: FITC-Anneksin-V kompleksinin flow sitometri ile gösterilmesi

(Kopman G, Reutelingsperger C P, Kuijten G A, Keehnen R M, Pals S T, van Oers N H (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptoz. Blood., 84: 1415–1420.)

3.4.1.2.1. Akım Sitometrede PI ile Boyanan Ölü Hücrelerin Analizi:

Gereçler:

- Annexin-V FITC Apoptoz Tespit Kiti I (BD Pharmingen 556547)
- Kit içeriği: Annexin-V FITC
Bağlanma Çözeltisi(10X)
Propidyum İyodid
- PBS Tablet (AMRESCO E404-100 TABS)
- BD FACS Calibur Akım Sitometre Cihazı (Seri no:342975 San Jose,USA)

Yöntem

- Yüzeğe bağımlı hücreler hücre kazıyıcısı ya da tripsinizasyon ile kaldırılır.
- Bir kez PBS ile yıkanılır,
- 600 g' de, 4 °C' de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürülür,
- Üst faz dikkatlice çekilir,
- Üzerine 1ml PBS eklenir,
- 600 g' de, 4 °C' de 5 dakika tekrar santrifüjlenir,
- Pellet alınır, üzerine 500 µl 1/10'luk bağlanma çözeltisi eklenir,
- 490 µl hücre süspansiyonuna 5µl kullanıma hazır Annexin-V FITC çözeltisi ve 5µl Propidyum İyodid eklenir,
- Tüpler 15-20 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra hücre üzerine 400µl bağlanma çözeltisi eklendi karıştırıldı.
- Hücre örnekleri Akım Sitometrede analiz edildi ve şekildeki gibi grafikler elde edildi.

3.4.2. Otofajinin Gösterilmesi

3.4.2.1. Sodyum Dedosil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve Western Blotlama

Proteinleri ve glikoproteinleri belirlemek için kanser araştırmalarında en yaygın kullanılan ve en kullanışlı yöntem Western blotlama tekniğidir. Kan örneği ya da katı tümör homojenatı gibi kompleks bir örnek içerisinde bulunan proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasına ve jel bir matriks ya da antikorların bağlanabildikleri bir membrana transferi ile görüntülenmelerine olanak sağlar. Yüklü moleküllerin elektriksel alanda ayrılmaları temeline dayanan elektrofrez tekniği proteinlerin analizinde ve ayrılmasında da geniş çapta kullanılır. Temelde protein tanımlama ve saflaştırma amacıyla kullanılan bu yöntem doğal veya rekombinant bir proteinin sentezlenip sentezlenmediği; sentezleniyorsa işlevsel olup olmadığı hakkında da bilgi verir. Hücre hatlarında otofajide rol alan beclin geninin ekspresyonunun protein düzeyinde belirlenmesi için western blot tekniği kullanılmaktadır.

3.4.2.1. Hücre Lizatı Hazırlanması:

Gereçler:

- Lizis tamponu
 - 1 M Hapes (pH: 7.6) çözeltisi
 - 2 M, KCl
 - 1 M, MgCl₂
 - Gliserol
 - %20 NP40 solüsyonu
 - PMSF
 - IM, DTT
 - Proteaz inhibitör kokteyli
- İnsulin şırıngası
- PBS

- Hücre kazıyıcı
- Mikrosantrifüj tüpleri
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Eppendorf centrifuge 5417 R)

Yöntem:

- Yüzeğe bağımlı hücreler hücre kazıyıcısı ya da tripsinizasyon ile kaldırılır.
- Bir kez PBS ile yıkanılır.
- 400 g' de, 4 °C' de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürülür.
- Üst faz dikkatlice çekilir.
- Pellet üzerine üç katı hacimde lizis tampon eklenir.
- 10 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
- Bir insülin şırıngasının ucu ile üç kez çekilip bırakılarak genomik DNA kırılır
- 10 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
- 20 dakika en yüksek hızda (20000g) 4 °C'de santrifüjlenir.
- Üst faz önceden buzda soğutulmuş mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
- Lizatlar kullanılana kadar – 80 °C'de saklanır.

3.4.2.1.2. Protein Konsantrasyonu Ölçülmesi:

“ BCA™ Protein Assay” bicinchonic asit (BCA) temelli, kolorimetrik olarak total protein konsantrasyonu ölçülmesi için formüle edilmiş bir testtir. Bu yöntem Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} e alkali ortamdaki protein ile indirgenmesi esasına dayanmaktadır. BCA'nın iki molekülü ile bir bakır iyonunun şelat oluşturması ile mor renkli ürün açığa çıkar. Bu suda çözünebilir kompleks 562 nm' de güçlü bir absorbands verir. Konsantrasyonları bilinen standartların 562 nm'de verdiği absorbandlardan yararlanılarak standart grafiği çizilir. Böylece konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin verdiği absorbandların standart grafikten karşılığı okunarak, protein konsantrasyonları belirlenebilir.

Gereçler:

Protein konsantrasyonları Pierce'in BCA™ Protein Assay'i (ürün kodu:232279) kullanılarak ölçülmüştür.

Yöntem:

- 50 kat hacimdeki A solüsyonu, 1 kat hacimde B solüsyonu karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı.
- 96 well plate'in gözlerine reaksiyon karışımı eklendi.
- 6000, 4000, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125'er µg/ml konsantrasyonlarında standartlardan ve protein konsantrasyonu belirlenmesi amaçlanan lizatlardan 25 ya da 10'ar µl reaksiyon karışımları üzerine eklendi.
- 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- Oda sıcaklığına gelmesi için beklendi.
- 562 nm'de plate okuyucuda absorbanları ölçüldü.
- Konsantrasyonları bilinen standartların absorbanlarından yararlanılarak standart grafiği çizildi.
- Standart grafiğinden yararlanılarak örneklerin absorbanlarına karşılık gelen konsantrasyonları hesaplandı.

3.4.2.1.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Western blotta ilk aşama protein makromoleküllerinin SDS PAGE jel elektroforezi ile molekül büyüklüklerine göre ayrılmasıdır. Elektrofrezde iki farklı jel kullanılır. Bunlar ayrıştırıcı jel ve paketleyici jeldir.

Gereçler:

- Mini-PROTEAN® 3 cell (Katalog no:165-3301) cihazı
- Güç kaynağı
- %10'luk ayrıştırıcı jel ve paketleyici jel
- Yürütme tamponu
- 4X ya da 2X yükleme tamponu

- 50 ml'lik ve 15 ml'lik tüpler
- Protein markerı (İnvitrogen-SeeBlue® Pre-Stained Katalog no:LC5625)

Yöntem:

- %10'luk ayrıştırıcı jel için monomer karışımı aşağıdaki tablo izlenerek hazırlanır.

Ayrıştırıcı (seperating) Jel Hazırlanması: 0.375 M Tris, pH 8.8					
	%5	%7	%10	%12	%15
Saf su	7.5 mL	12.7 mL	10.7 mL	4.65 mL	3.65 mL
3 M Tris-HCL, pH 8.8	1.25 mL	2.5 mL	2.5 mL	1.25 mL	1.25 mL
% 20 (w/v) SDS	0.05 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.05 mL	0.05 mL
Akrilamid/Bis-akrilamid (%29,2/%0.8 w/v)	1.15 mL	4.6 mL	6.6 mL	4.0 mL	5.0 mL
%10 (w/v) amonyum persülfat	0.05 mL	0.2 mL	0.2 mL	0.05 mL	0.05 mL
TEMED	0.005 mL	0.02 mL	0.02 mL	0.005 mL	0.005 mL
Total monomer karışımı	10.005 mL	20.12 mL	20.12 mL	10.005 mL	10.005 mL

Tablo 5: Ayrıştırıcı (seperating) Jel Hazırlanması

- Jel yüzeyi izopropanol ile kaplanır.
- 45-60 dakika polimerize olması için beklenir.
- Jel yüzeyindeki izopropanol dökülür.
- Paketleyici jel için monomer karışımı aşağıdaki tablo izlenerek hazırlanır ve üzerine dökülür.

Paketleyici (stacking) Jel Hazırlanması: %4, 0.125 M Tris, pH 6,8	
Saf su	7.35 mL
1.5 M Tris-HCL, pH 6.8	1.25 mL
%20 (w/v) SDS	0.05 mL
Akrilamid/Bis-akrilamid (%29,2/%0.8 w/v)	1.34 mL
%10 (w/v) amonyum persulfat	0.04 mL
TEMED	0.1 mL
Toplam monomer karışımı	10.13 mL

Tablo 6: Paketleyici (stacking) jel hazırlanması

- Jel tarakları dikkatli bir biçimde polimerize olmamış karışım içine yerleştirilir.
- Polimerizasyonun tamamlanması için 45-60 dakika beklenir.

3.4.2.1.4. Örnek Hazırlanması

- Her bir kuyuya aynı miktarda (20-40 µg) hücre lizatı eklendi. Mikrosantrifuj tüplerine 20-40 µg protein içerecek hacimde lizat alındı. Üzerine lizatın 1/3 hacimde 4X RG ya da aynı hacimde 2X RG yükleme tamponu eklendi. Mikro santrifüj tüpler, ısı bloğu üzerinde 95-100 °C'de 5-10 dakika inkübe edilerek proteinler denatüre edildi.
- Isı bloğundan alınan ependorflar buzda 5 dakika inkübe edildi.
- Lizatlar ve protein marker polakrilamid jele yüklendi.
- Mini-PROTEAN® 3 Cell (Katalog numarası:1653301) cihazında yürütüldü.

3.4.2.1.5. Elektroforetik Yürütme

- Örnek yüklendikten sonra sistem kapatıldı ve elektrotlar bağlandı.
- Örnekler ayrıştırıcı jele girinceye kadar düşük akımda 100 volt gerilim uygulandı.
- Örnek ayrıştırıcı jele geçtikten sonra ise gerilim 150-200 volt'a çıkarıldı.
- Bromfenol mavisi jelin alt ucuna varınca akım kesildi ve jel tanktan uzaklaştırıldı.
- Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic transfer Cell (Biorad-Katalog numarası:170-3940) cihazında nitroselüloz membrana transferi yapıldı.

3.4.2.1.6. Membrana Yarı Kuru (Semi-Dry) Yöntem ile Transfer

Gereçler:

- Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic transfer Cell (Biorad-Katalog numarası:170-3940) cihazı
- Nitroselüloz membran (Applichem-Pure Nitrocellulose Unsupported 0.45µm transfer membran –A5239.3020R)
- Towbin transfer solüsyonu

10X Towbin Transfer Tamponu	
Tris	30 g
Glisin	144 g
SDS %10	20 mL
Distile su	800 mL'ye tamamlanır.
Metanol	200 mL eklenir.(kullanılacağı zaman)

Tablo 7: 10X Towbin Transfer Tamponu Hazırlanması

Yöntem:

- Transferde kullanılacak membran metanol ile doyurulur,
- 3 MM filtre kağıtları Towbin transfer tamponu ile ıslatılır,

- 2 adet 3 MM filtre kağıdı en alta yerleştirilir, üzerlerine membran koyulur,
- Membran üzerine jel yerleştirildikten sonra diğer iki 3 MM filtre kağıtları koyulur,
- Bu aşamalar sırasında arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir.
- Kapaklar kapatıldıktan sonra 15 Volt'a 50 dakika süreyle transfer gerçekleştirilir.

3.4.2.1.7. Western-Blot

Gereçler:

- TBST (Tris buffered saline= %0,05 Tween 20)
- Transferi yapılmış membran
- Süt tozu
- **Birincil antikor:** Membran üzerindeki proteinlere ilk bağlanan antikordur.
- **İkincil antikor (anti tavşan keçi):** Keçide tavşan antikoruna karşı üretilmiş antikordur. İkincil antikora HRP (horseradish peroksidase) bağlanmıştır. Birincil antikora özgül oldukları için membranda birincil antikorun bağlı oldukları bölgelere bağlanırlar. İkincil antikora bağlı bulunan HRP peroksidaz enzimi, ECL çözeltisi içinde bulunan Lumigen PS-3 substratını katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan luminol ışımaya yol açar. Oluşan bu ışımaya fotoğraf filmi ya da CCD kamera ile görüntülenerek ilgilenilen protein bantları belirlenebilmektedir.

Yöntem

- Transfer sonrası proteinleri bağlanmış olan membran 1.5 saat, % 5'lik süttozu ve %0,1'lik Tween 20 içeren PBS (TBST) (bloklama çözeltisi) içinde çalkalamaya bırakılır.
- Bu süre sonunda membran 3 kez %0,1'lik Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkanır.
- **Birincil antikor ile inkübasyon:** Membran bloklama çözeltisi içinde 1/1000 oranında dilüe edilmiş birincil antikor ile bir gece boyunca inkübe edilir. Inkübasyon süresi her antikor için ayrı olarak belirlenmiştir.

- Bu süre sonunda membran 3 kez %0,1'lik Tween 20 içeren PBS (TBST) çözeltisi ile 5 dakika süre ile yıkanır.
- **İkincil antikor ile inkübasyon:** 4° C'de %1 oranında süt tozu ve 1/2500 oranında sekonder antikor içeren TBST içerisinde iki saat inkübe edildi.
- Membran iki kez TBST ve bir kez de TBS ile yıkandı.

3.4.2.1.8. Deteksiyon

Gereçler:

- “SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate”(Pierce –Katalog no:34080) kiti
- “Exposure Cassette”(Kodak,Biomax-Katalog no:115193)
- Poşet dosya
- Film (Kodak, Biomax Light Film-Katalog no:8761520 ve Kodak Medakal X-ray Film Katalog no:8143059)

Yöntem:

- “SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate” kitinin peroksit ve enhancer solüsyonları 1:1 oranında karıştırıldı.
- Membran 5 dakika boyunca bu karışım içinde inkübe edildi.
- Bir poşet dosya içerisine alınıp kaset içine yerleştirildi.
- Kaset içerisine karanlık odada film yerleştirildi.
- 10 saniye-30 dakika'ya kadar olan farklı aralarla film kaset içerisinde tutulup, görüntü elde edildi.

3.4.2.1.9. Membranın “Strip” edilmesi:

Bir defa western blot yapılan membranın ikinci kez başka bir antikorla blotlanması mümkündür. Bunun için membranın “strip” edilerek bağlı durumdaki antikorun uzaklaştırılması gerekmektedir. Proteinlerin eşit miktarda yüklendiğini kanıtlamak amacıyla membran “strip” edilerek membran üzerindeki proteinlere bağlanan antikor uzaklaştırılır ve tekrar TBP primer antikor ile western blot yapılır.

Gereçler:

- “Restore™ Western Blot Stripping Tampon”(Pierce Katalog no:210599)
- 50 ml’lik falkon tüp
- Hibridizasyon fırını

Yöntem:

- Önceden 37 °C’ye ayarlanmış hibridizasyon fırınında 25 dakika boyunca stripping tampon ile birlikte membran bir 50 ml’lik falkon tüp içerisinde dödürülerek inkübe edildi.
- Membran üç kez TBST ile ve bir kez TBS ile yıkandı.
- %5 oranında süttozu içeren TBST içerisinde blotlamaya alındı.

3.4.2.2. WESTERN BLOT ÇÖZELTİLERİ:**LİZİS TAMPONU (50 ml. için):**

- 1,25 ml 1 M HEPES (pH: 7,6) çözeltisi
- 10 ml. 2M. KCl
- 625 µl 1M. MgCl₂
- 10 µl 500 µM EDTA
- 5 ml. Gliserol
- 500 µl. %20 NP40 solüsyonu
- 500 µl 100 µM PMSF
- 50 µl 1M. DTT
- 50 µl proteaz inhibitör kokteyli.
- Hacim ddH₂O ile 50 ml.’ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır

TBS:

- 10 mM Tris (pH: 8)
- 150 mM NaCl

TBST:

- %0,05 Tween 20 + TBS

4X YÜRÜTME TAMPONU

- 18,17 gr Tris Bazı
- 4 ml %10'luk SDS
- dH₂O ile hacim 100 ml.'ye tamamlanır.
- pH' ı 12 N HCl ile 8,8' e ayarlanır.

4X YÜKLEME TAMPONU (500 ml için) :

- 0,05M Tris : 25 ml 1 M Tris Buffer (pH: 6.8) alınır.
- %0,05 SDS: 20 ml %10'luk SDS alınır.
- Hacim çift distile su ile 500 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır

STOK SDS PAGE ÖRNEK YÜKLEME TAMPON ÇÖZELTİLERİ:**2X Gliserol (no R) Stoğu:**

- 2,5 ml. 4X Stacking Buffer
- 2,0 ml %10 SDS
- 0,25 mg Brom Fenol Blue Boyası
- 2,0 ml Gliserol
- 2,5 ml ddH₂O

2X R (no Gliserol) Stoğu:

- 2,5 ml. 4X Stacking Buffer
- 2,0 ml %10 SDS
- 0,25 mg Brom Fenol Blue Boyası
- 4,5 ml ddH₂O

2X R/G Stoğu:

- 2,5 ml. 4X Stacking Buffer
- 2,0 ml %10 SDS
- 0,25 mg Brom Fenol Blue Boyası
- 2,0 ml Gliserol
- 2,5 ml ddH₂O

4X Gliserol (no R) Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue Boyası
- 4,0 ml ddH₂O

4X R (no Gliserol) Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue Boyası
- 4,0 ml ddH₂O

4X R/G Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 4,0 ml ddH₂O

Tüm örnek tampon stokları oda sıcaklığında saklanır.

SDS PAGE ÖRNEK YÜKLEME ÇÖZELTİLERİ:**2X Gliserol (no R):**

- 900 λ Stok 2XG no R
- 100 λ ddH₂O 144

2X R (no Gliserol)

- 900 λ Stok 2XR no G
- 100 λ Beta Mercapto ethanol.

2X R/G:

- 900 λ Stok 2XR no G
- 100 λ Beta Mercapto ethanol.

4X Gliserol (no R) :

- 800 λ Stok 4XG no R
- 200 λ ddH₂O

4X R (no Gliserol):

- 800 λ Stok 4XG no R
- 200 λ Beta Mercapto ethanol.

4X R/G:

- 800 λ Stok 4XR/G
- 200 λ Beta Mercapto ethanol.

% 10' LUK AMONYUM PER SÜLFAT ÇÖZELTİSİ:

- 1 gr. Amonyumpersülfat tartılır.
- Son hacmi 10 ml olacak kadar çift distile suda çözülür.
- + 4 °C' de saklanır.

% 10' luk SDS PAGE JELİ :

- 5 ml % 30' luk Akrilamid bis solüsyonu
- 3,8 ml 4X Running Buffer
- 6 ml çift distile su
- 224 µl % 10' luk Amonyum Per sülfat çözeltisi
- 10 µl TEMED

% 5' lik YÜKLEME JELİ: 145

- 900 µl % 30' luk Akrilamid bis solüsyonu
- 1332 µl 4X Running Buffer
- 3 ml çift distile su
- 84 µl % 10' luk Amonyum per sülfat çözeltisi
- 15 µl TEMED

TOWBIN TRANSFER TAMPONU:

- 25 mM Tris: 3,03 g Tris
- 192 mM Glisin: 14,4 g Glisin
- %20 Metanol (pH: 8,3)
- 1 g SDS
- ddH₂O ile hacim 1 L.' ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

TRANSFEKSİYON ÇÖZELTİLERİ:

- 2X HBS (pH:7,1 – 7,2 aralığında 4 farklı solüsyon hazırlanır.):
- 275 mM NaCl: 16 gr tartılır.
- 10 mM KCl : 0,74 gr tartılır.
- 1 mM Na₂HPO₄ :0,178 gr Na₂HPO₄.2H₂O tartılır.

- 11 mM Glukoz/Dekstroz: 2,08 gr C₆H₁₂O₆. H₂O tartılır.
- 42 mM Hapes: 10 gr tartılır.
- Hacmi 1 lt.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

4. BULGULAR

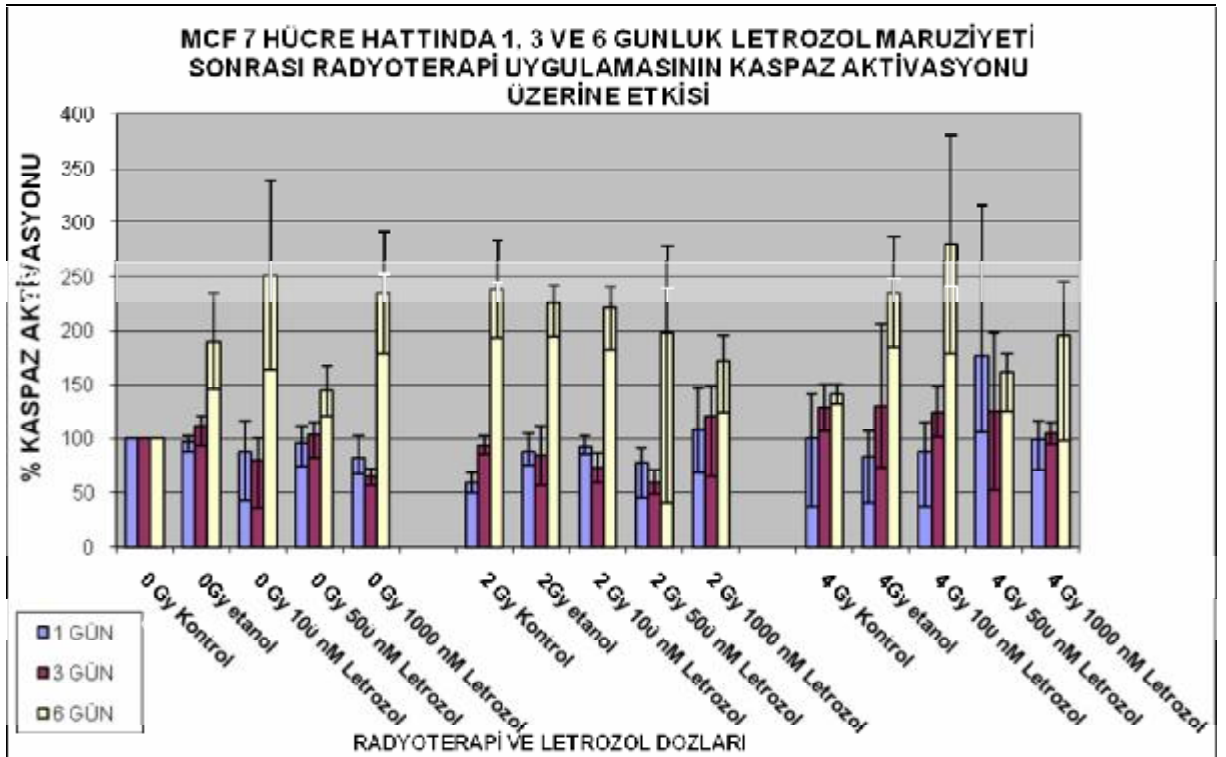
Çalışmamızda, MCF-7 aro ve MCF-7 hücre dizisinden oluşturulan gruplarda, letrozolün üç ayrı dozunun, belirlenen her üç zaman için, hücre ölüm mekanizmaları olan apoptoz ve otofaji üzerine olan etkileri araştırılarak deneyler üç kez tekrarlandı ve elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak elde edilen bulgular sırasıyla belirtildi. MCF-7 Aro hücrelerini elde etme ve çoğaltmada yaşanan problemler nedeniyle bu hücrelerle deneyler sadece bir kez yapılabildi.

Letrozol ve radyoterapinin eşzamanlı uygulaması sonucu oluşacak etkiyi apoptoz ve otofaji düzeyinde karşılaştırmalı olarak analiz etmek amacıyla aşağıdaki gibi 15 çalışma grubu oluşturuldu.

- 1- Kontrol-kontrol
- 2- Kontrol-etanol
- 3- Kontrol- 100nM Letrozol
- 4- Kontrol- 500nM Letrozol
- 5- Kontrol- 1000nM Letrozol
- 6- 2 Gy -kontrol
- 7- 2 Gy-etanol
- 8- 2 Gy-100nM Letrozol
- 9- 2 Gy-500nM Letrozol
- 10- 2 Gy-1000nM Letrozol
- 11- 4 Gy- kontrol
- 12- 4 Gy-etanol
- 13- 4 Gy-100nM Letrozol
- 14- 4 Gy-500nM Letrozol
- 15- 4 Gy-1000nM Letrozol

4.1. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Kaspaz-3 Yöntemi İle Belirlenmesi

Radyoterapi ile eşzamanlı uygulanan Letrozol'ün 100, 500 ve 1000 nM olan 3 farklı dozunun, 1,3,6 gün maruziyet sonrasında apoptotik etkisinin gösterilmesi için MCF-7 hücreleri 6 well platelere ekildi. Radyoterapi uygulandıktan 24 saat sonra Fluorometric Caspase 3 Assay Kit (Sigma) ile apoptozun bir göstergesi olan kaspaz aktivasyonu ölçüldü. Deneyler 3 kez yapıldı. Sonuçların ortalaması alınarak elde edilen sonuçlar Tablo.8' de verilmiştir.

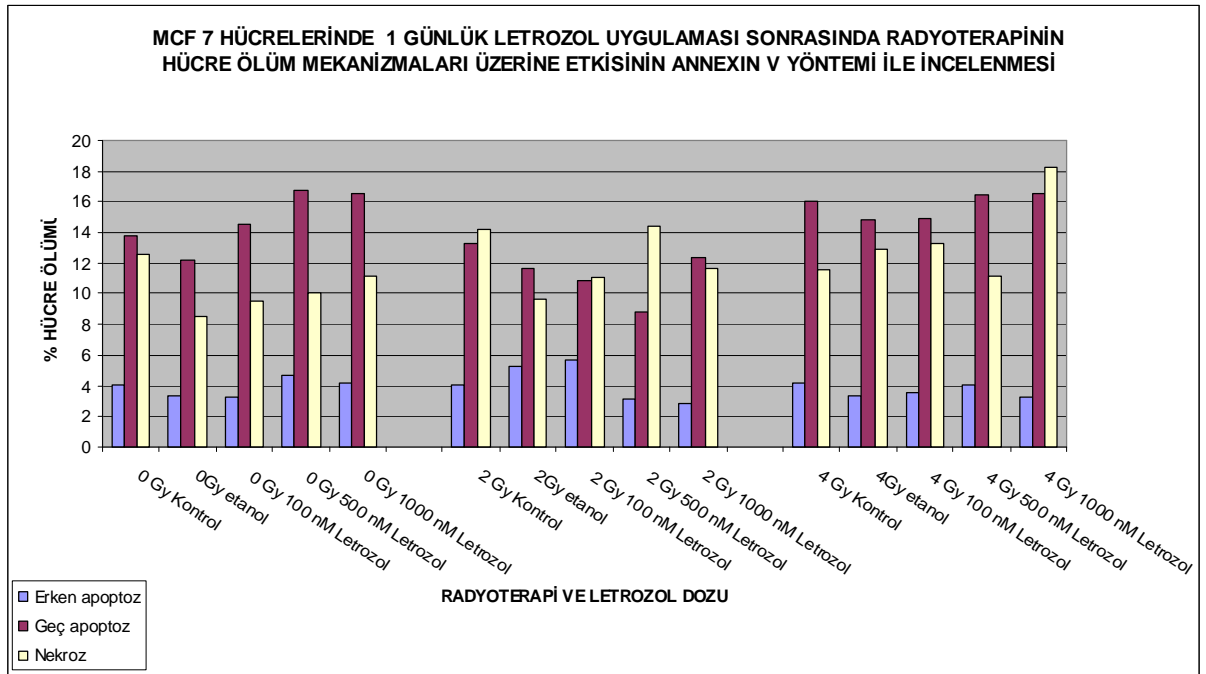


Tablo 8: MCF-7 Hücre Hattında 1,3 ve 6 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrası Radyoterapi Uygulamasının Kaspaz Aktivasyonu Üzerine Etkisi

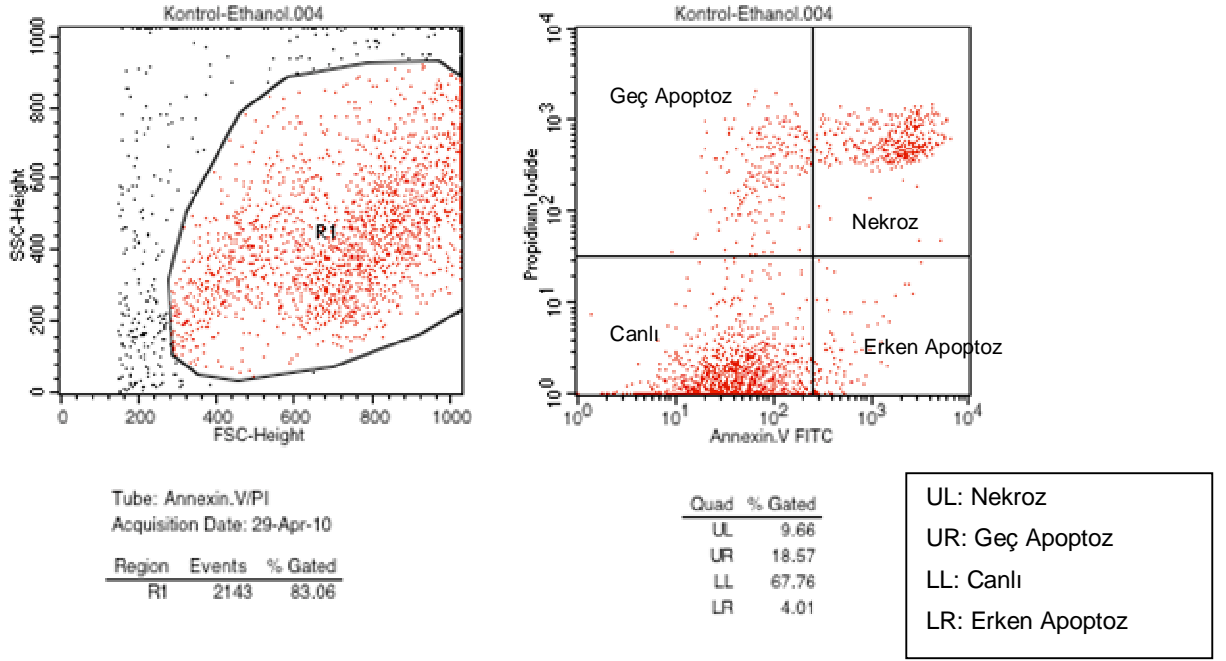
MCF-7 hücre hattında 2, 4 Gy radyasyon dozunda, 100,500,1000 nM Letrozole 1,3,6 gün maruziyet sonrası apoptotik etkide kontrol grubuna göre bir fark olmadığı izlenmiştir.

4.2. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Annexin-V Yöntemi İle Belirlenmesi

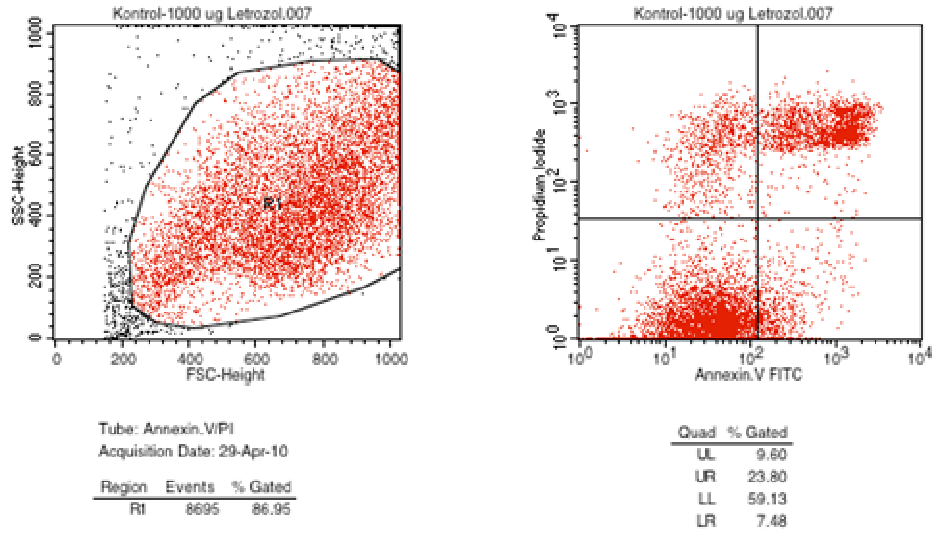
Kaspaz-3 yöntemi ile gösterilen apoptotik davranış şeklini doğrulamak için diğer bir apoptoz tespit yöntemi olan Annexin-V kullanılmıştır. Bu deneyler için de radyoterapi ile eşzamanlı uygulanan Letrozol'ün 100, 500 ve 1000 nM olan 3 farklı dozunun, 1,3,6 gün maruziyet sonrasında apoptotik etkisinin gösterilmesi için MCF-7 hücreleri 6 well plâtelere ekildi. Radyoterapi uygulandıktan 24 saat sonra Annexin-V FITC Apoptoz Tespit Kiti I (BD Pharmingen 556547) kullanılarak Akım Sitometrede hücrelerin analizi yapıldı. Şonuçların ortalamaları alınarak elde edilen değerler Tablo 9-10-11 ve Şekil 26-40 'da verilmiştir.



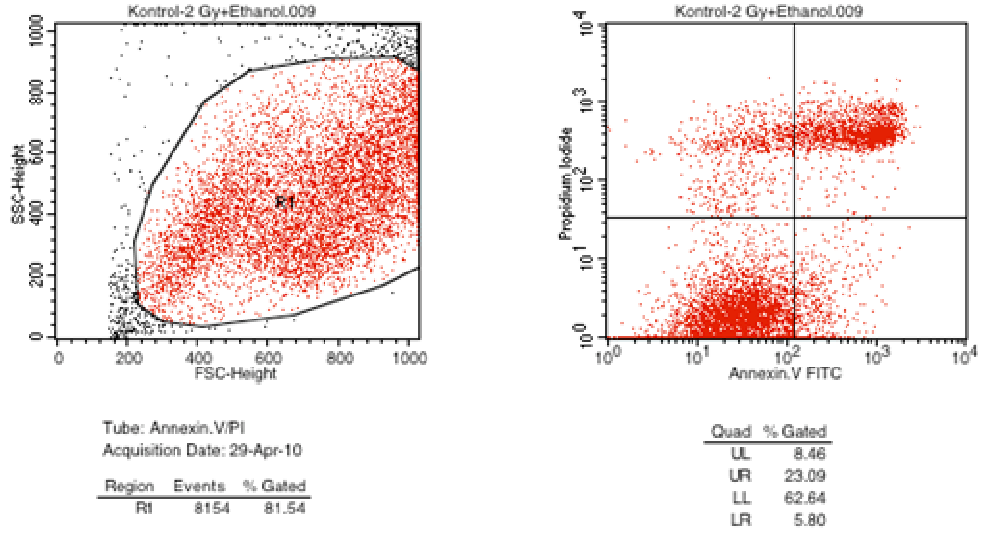
Tablo 9 : MCF-7 Hücre Hattında 1 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Üzerine Etkisinin Annexin V Yöntemi İle İncelenmesi



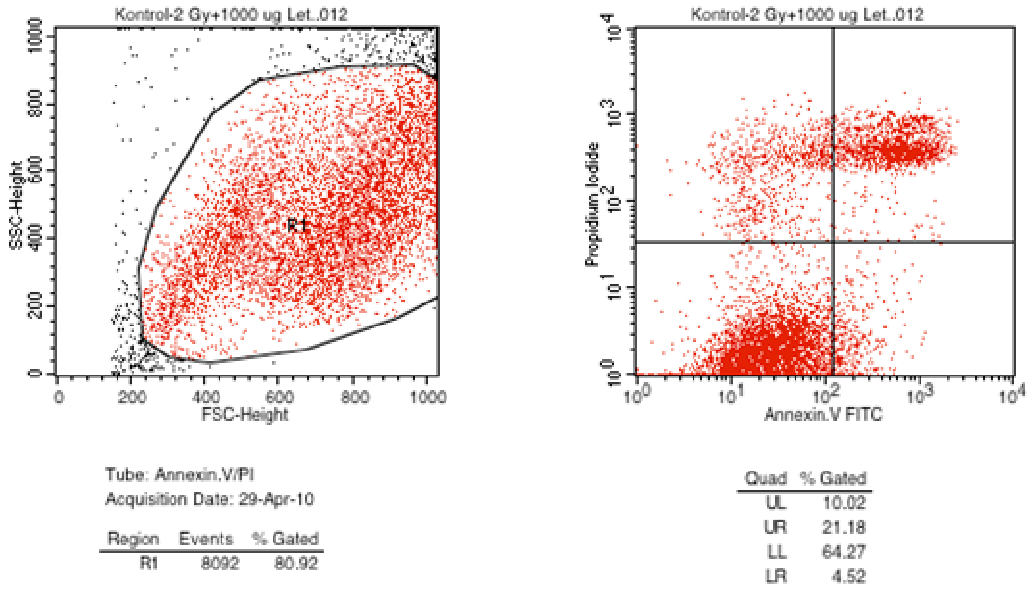
Şekil 26: Sadece Etanole 1Gün Maruz Bırakılmış MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



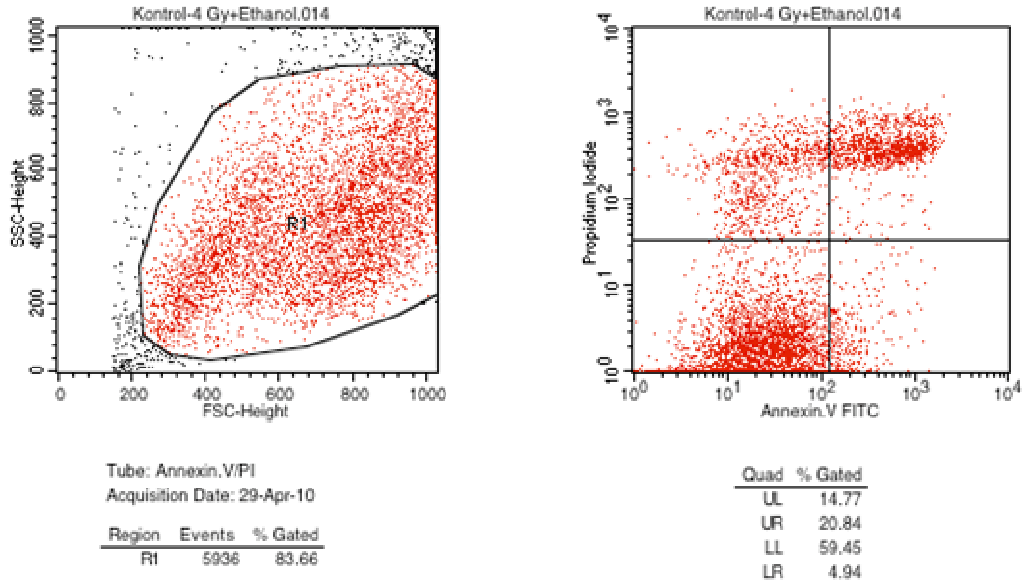
Şekil 27: Sadece 1000nm Letrozole 1Gün Maruz Bırakılmış MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



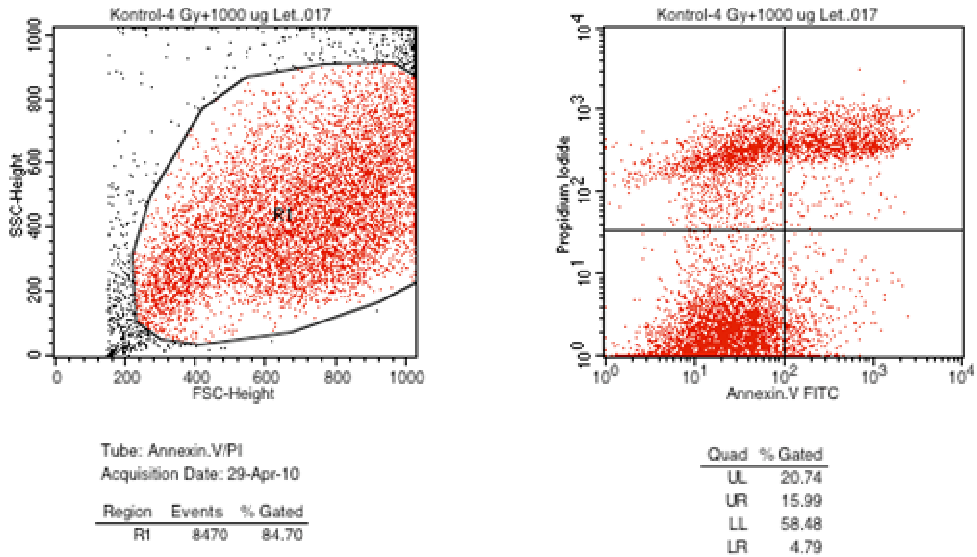
Şekil 28: Sadece Etanole 1Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



Şekil 29: 1000 Nm Letrozol'e 1Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları

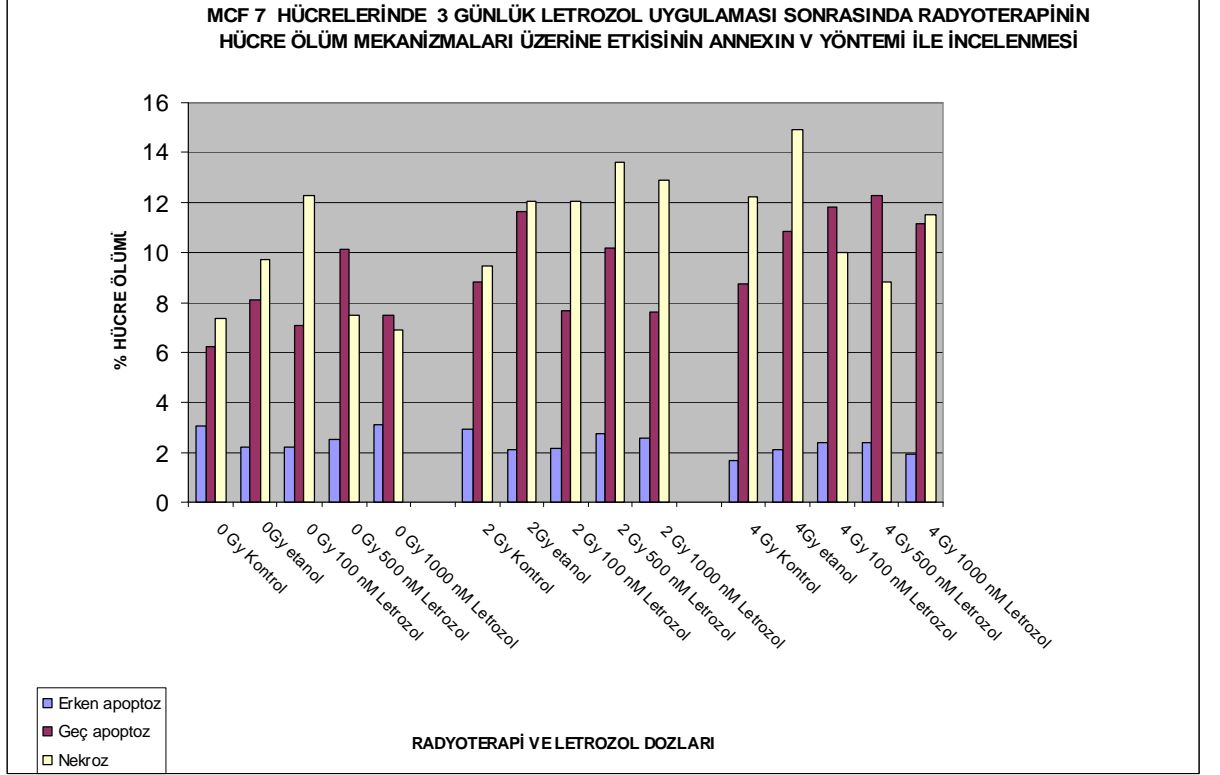


Şekil 30: Sadece Etanole 1Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları

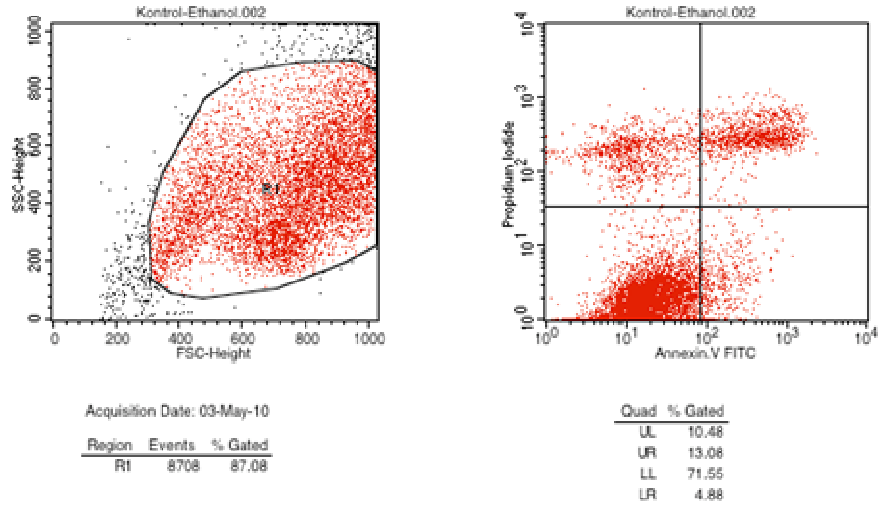


Şekil 31: 1000 Nm Letrozol'e 1Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları

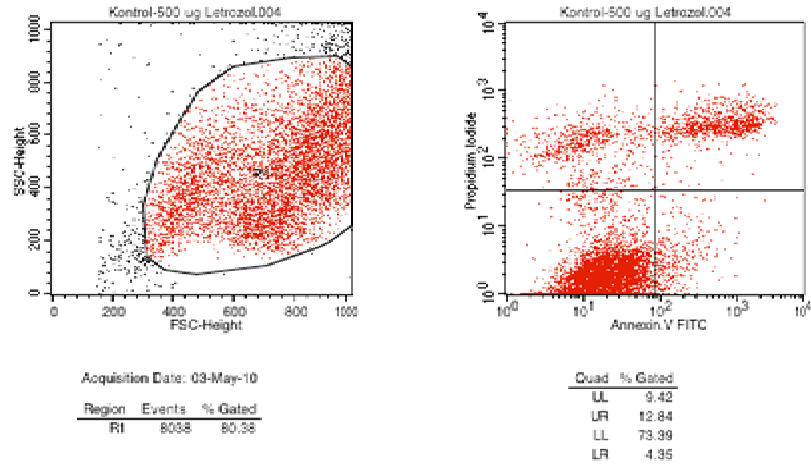
Annexin –V yöntemi ile değerlendirdiğimiz apoptotik davranış deneyinde 1 günlük letrozol maruziyeti sonrası 2 ve 4 Gy radyoterapi uygulanan kollarda artan ilaç ve radyasyon dozlarında; erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.



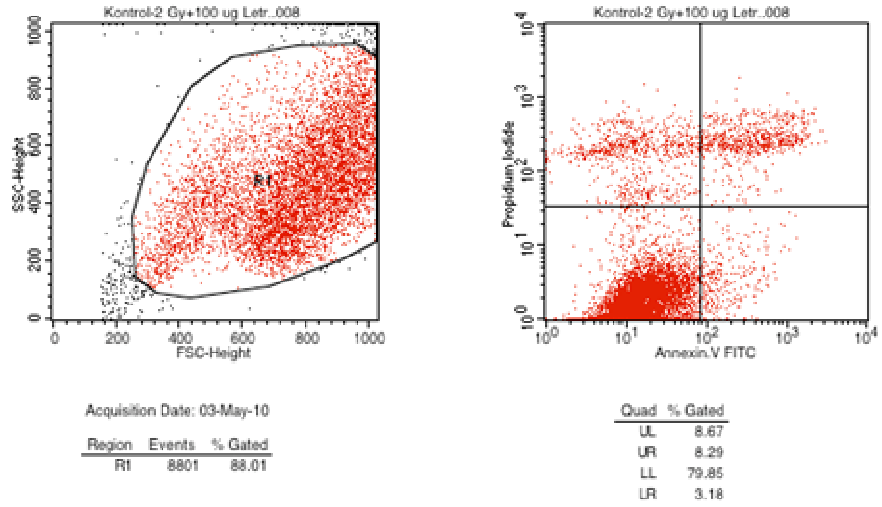
Tablo10: MCF-7 Hücre Hattında 3 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Üzerine Etkisinin Annexin V Yöntemi İle İncelenmesi



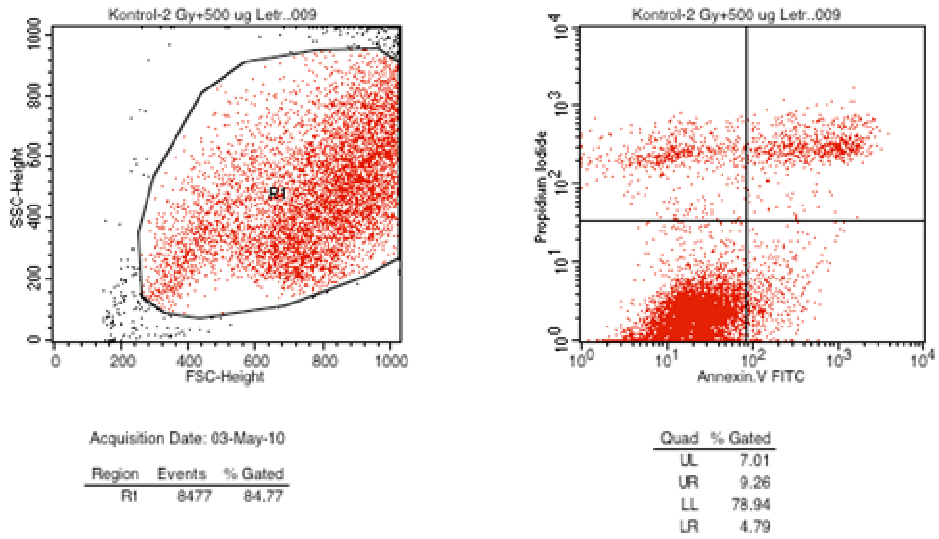
Şekil 32: Sadece Etanole 3 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



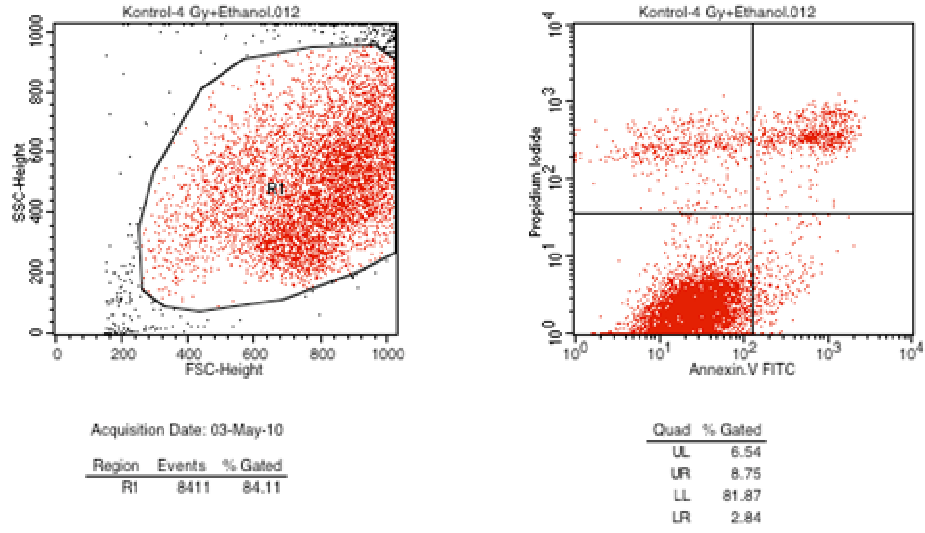
Şekil 33: 500 Nm Letrozol'e 3 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



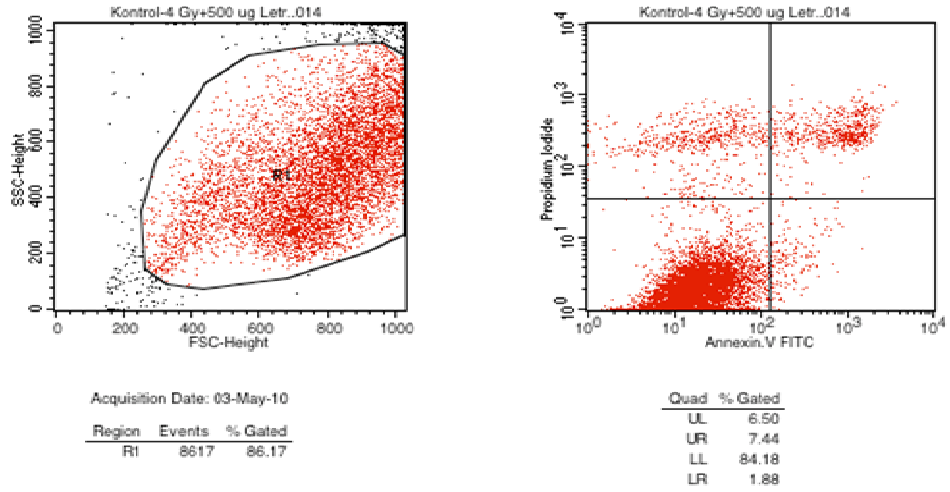
Şekil 34: Sadece Etanol'e 3 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



Şekil 35: 500 Nm Letrozol'e 3 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları

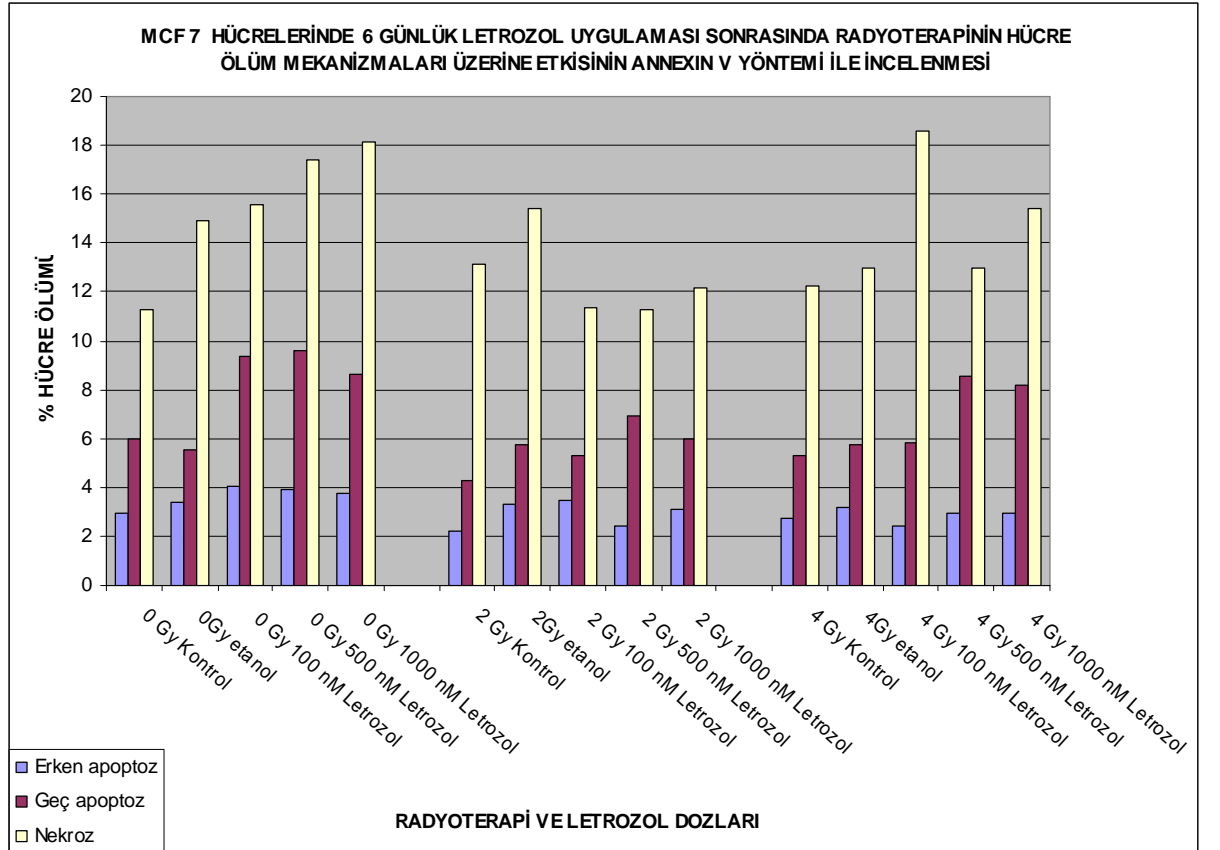


Şekil 36: Sadece Etanol'e 3 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları

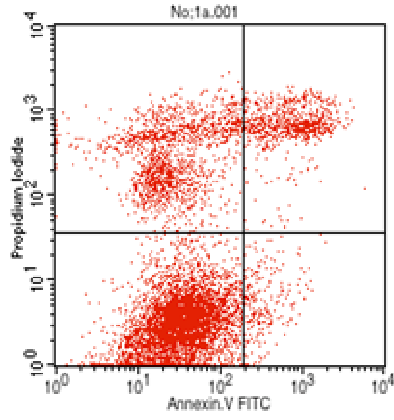


Şekil 37: 500 Nm Letrozol'e 3 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları

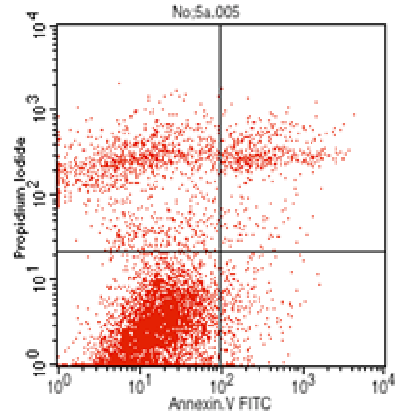
Annexin –V yöntemi ile değerlendirdiğimiz apoptotik davranış deneyinde 3 günlük letrozol maruziyeti sonrası 2 ve 4 Gy radyoterapi uygulanan kollarda bir günlük deneylerdeki sonuçlara benzer şekilde artan ilaç ve radyasyon dozlarında; erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.



Tablo11: MCF-7 Hücre Hattında 6 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Üzerine Etkisinin Annexin V Yöntemi İle İncelenmesi

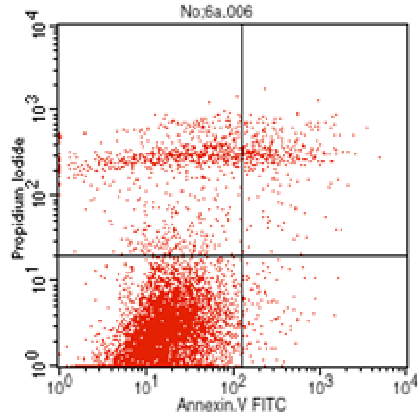


Quad	% Gated
UL	20.46
UR	10.10
LL	66.48
LR	2.96

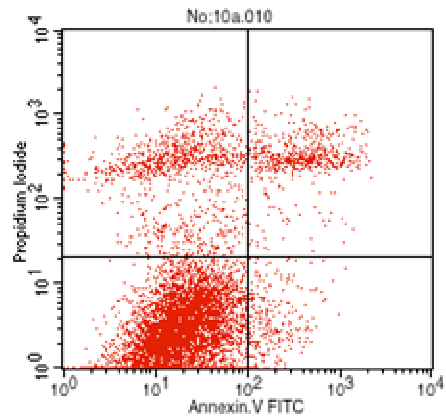


Quad	% Gated
UL	16.32
UR	7.01
LL	73.41
LR	3.26

Şekil 38 a: Sadece Etanol'e **b:**500 Nm Letrozol'e 6 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları

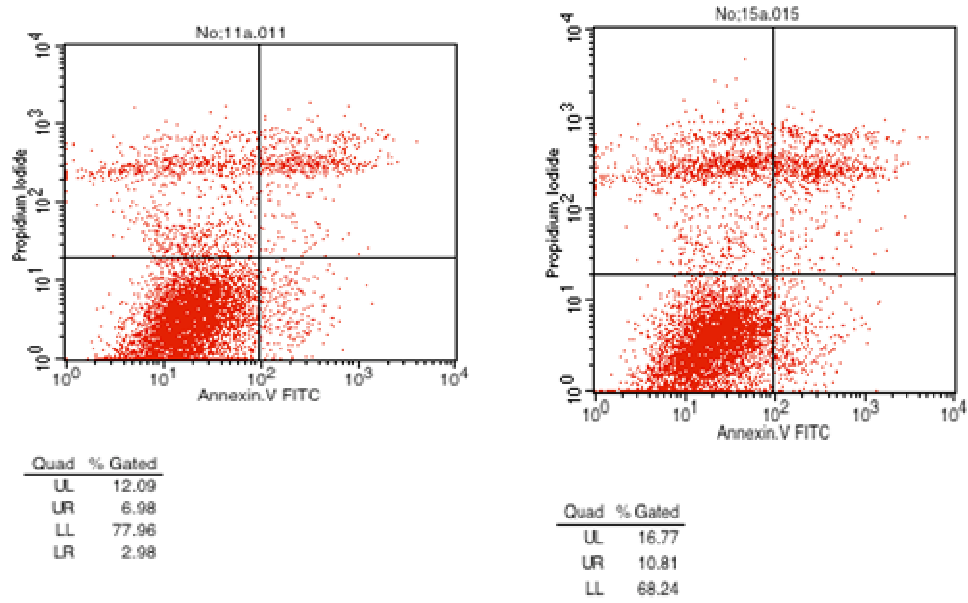


Quad	% Gated
UL	11.16
UR	4.32
LL	83.24
LR	1.28



Quad	% Gated
UL	12.90
UR	7.34
LL	76.53
LR	3.23

Şekil 39 a: Etanol'e **b:**1000 Nm Letrozol'e 6 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



Şekil 40 a: Etanol'e **b:** 1000 Nm Letrozol'e 6 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları

Annexin –V yöntemi ile değerlendirdiğimiz apoptotik davranış deneyinde 6 günlük letrozol maruziyeti sonrası elde edilen sonuçlarda da 1 ve 3 günlük deneylerdeki sonuçlara benzer şekilde artan ilaç ve radyasyon dozlarında; erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.

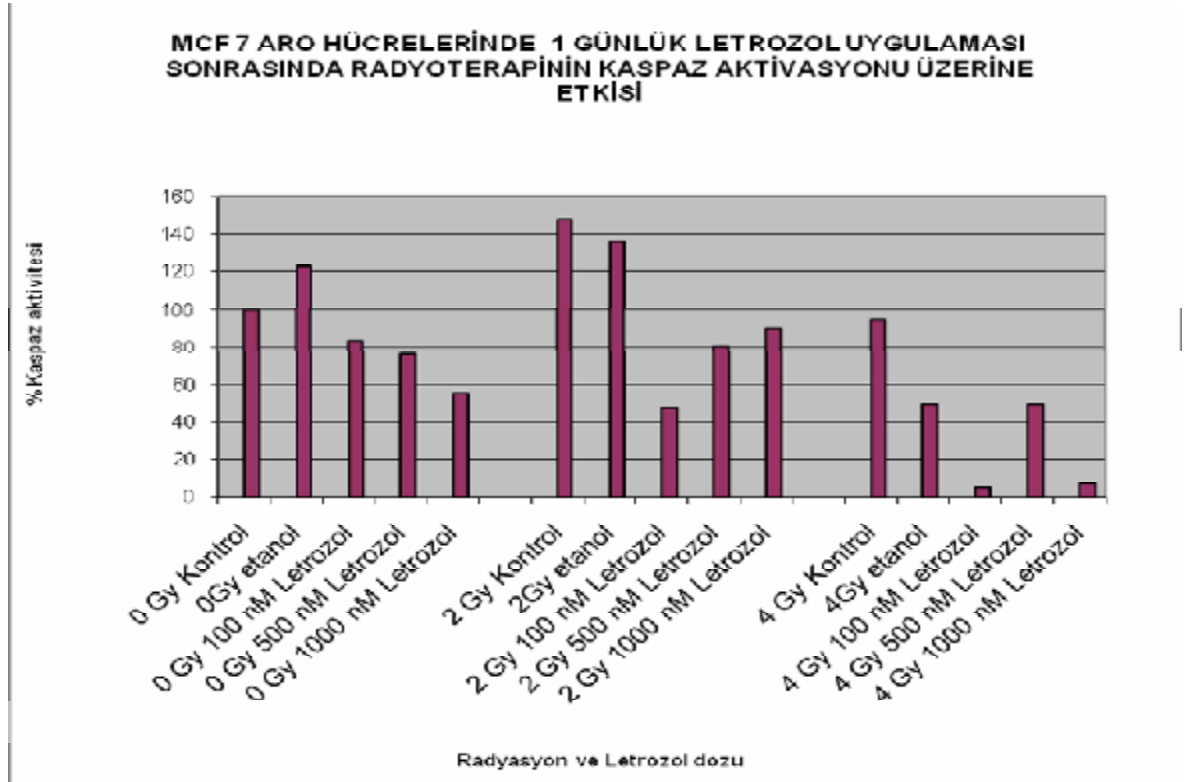
MCF-7 hücrelerinde hücre ölüm mekanizması şekillerinden biri olan apoptotik ölümü Kaspaz-3 ve Annexin-V yöntemi ile değerlendirdiğimiz deneylerimizde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Letrozol varlığının uygulanan dozlarda apoptotik hücre ölümüne etkisi olmadığı gösterilmiştir.

4.3. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Aro Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Kaspaz-3 Yöntemi İle Belirlenmesi

Üçüncü kuşak nonsteroidal bir aromataz inhibitörü olan Letrozol'ün etkisini daha iyi gösterebilmek için CYP19 aromataz enzimi geni ile stabil olarak transfekte edilen ER-pozitif MCF-7 meme kanseri hücreleri MCF-7 Aro'lar kullanılmıştır. Ancak hücre

hattının elimize geç ulaşması nedeniyle sadece 1 günlük deneyler ancak 1 kez yapılabilmektedir ve diğer deneyler hala devam etmektedir.

Diğer deneyde de olduğu gibi Radyoterapi ile eşzamanlı uygulanan Letrozol'ün 100, 500 ve 1000 nM olan 3 farklı dozunun, 1 günlük maruziyet sonrasında apoptotik etkisinin gösterilmesi için MCF-7 Aro hücreleri 6 well platelere ekildi. Yine aynı şekilde Radyoterapi uygulandıktan 24 saat sonra Fluorometric Caspase 3 Assay Kit (Sigma) ile kaspaz aktivasyonu ölçülerek, elde edilen sonuçlar Tablo.8' de verilmiştir.



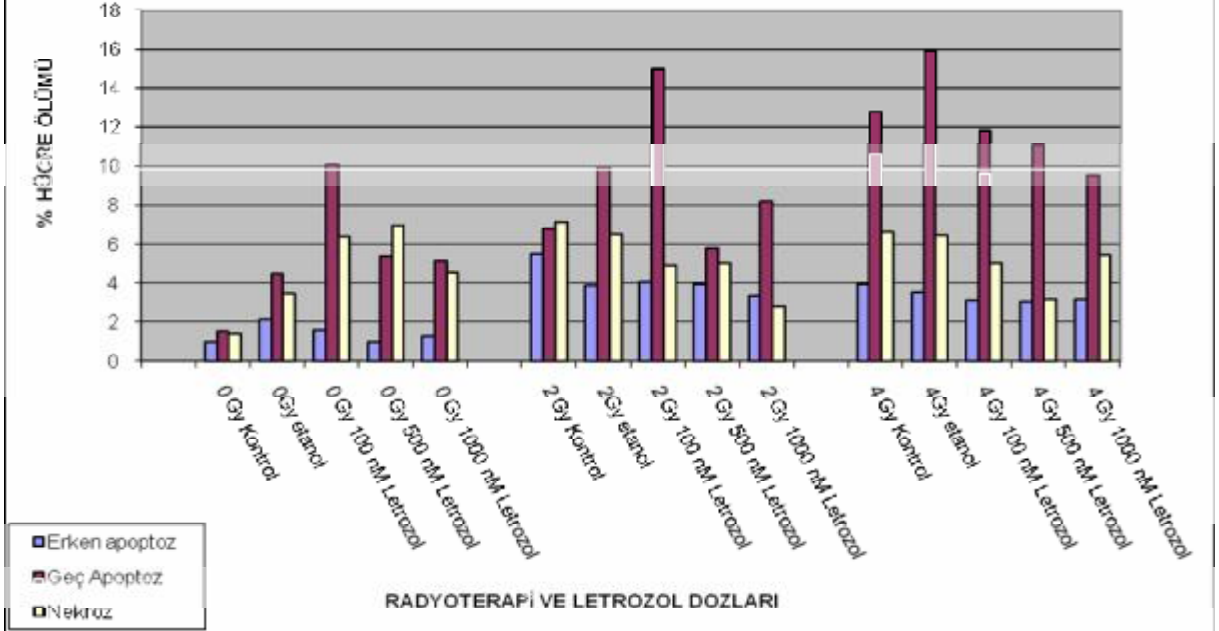
Tablo 12: MCF-7 Aro Hücre Hattında 1 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrası Radyoterapi Uygulamasının Kaspaz Aktivasyonu Üzerine Etkisi

MCF-7 Aro hücrelerinde 1 günlük belirlenen dozlardaki Letrozol maruziyeti sonrası radyoterapi uygulamasında özellikle yüksek dozlarda apoptotik etkinin azaldığı görülmektedir.

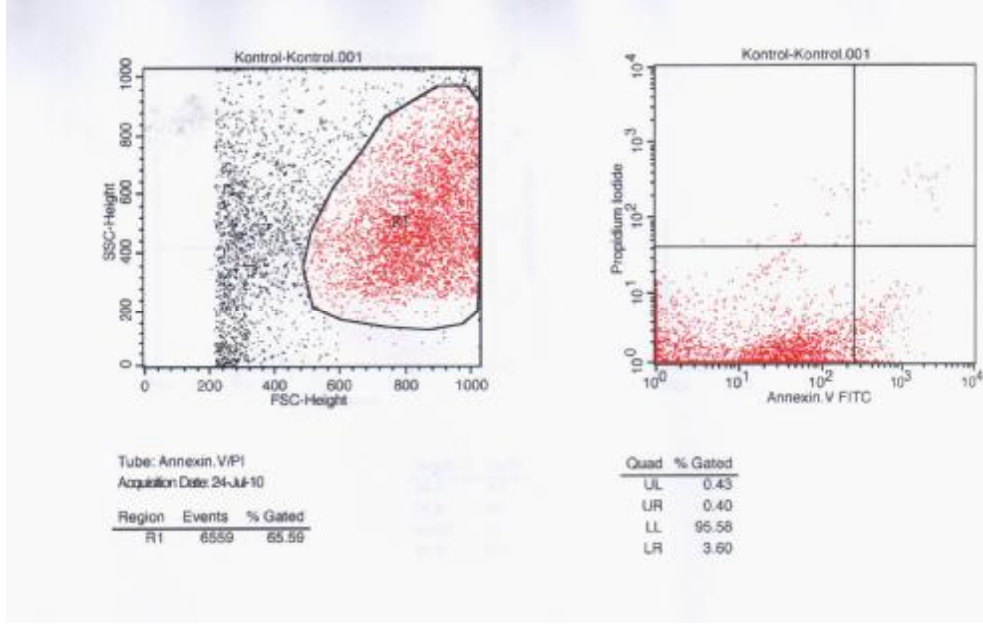
4.4. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Aro Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Annexin-V Yöntemi İle Belirlenmesi

MCF-7 Aro hücrelerinde de Kaspaz-3 yöntemi ile gösterilen apoptotik davranış şeklini doğrulamak için Annexin-V yöntemi kullanılmıştır. Bu deneyler için de radyoterapi ile eşzamanlı uygulanan Letrozol'ün 100, 500 ve 1000 nM olan 3 farklı dozunun, 1 gün maruziyet sonrasında apoptotik etkisinin gösterilmesi için MCF-7 Aro hücreleri 6 well platelere ekildi. Aynı şekilde hücre hattının elimize geç ulaşması nedeniyle bu deneyler de sadece 1 günlük ve 1 kez yapılabilmiş ve kalan deneyler devam etmektedir. Radyoterapi uygulandıktan 24 saat sonra Annexin-V FITC Apoptoz Tespit Kiti I (BD Pharmingen 556547) kullanılarak Akım Sitometrede hücrelerin analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 13'de ve Şekil 41-49'da verilmiştir.

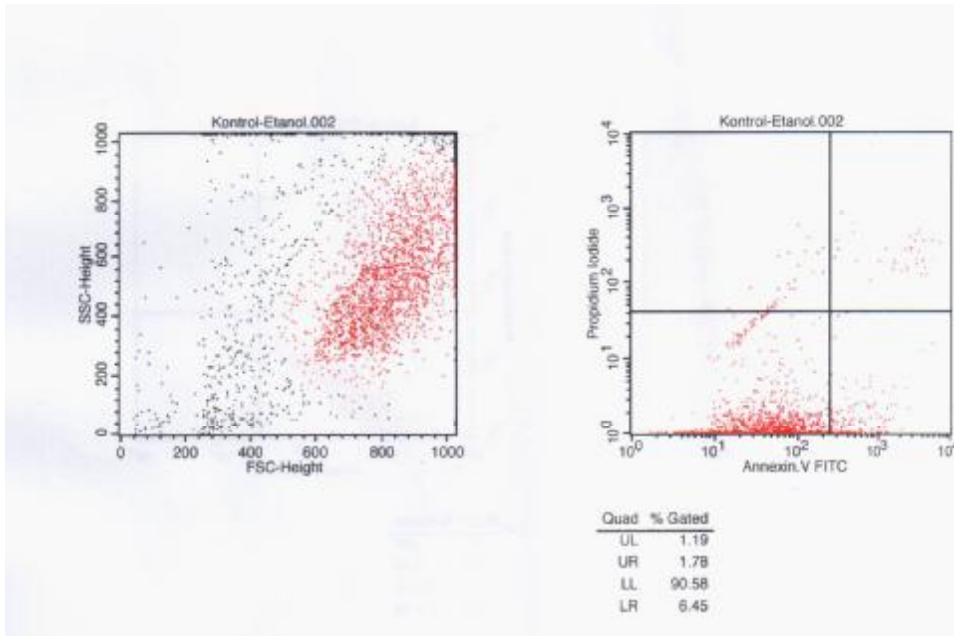
MCF 7 ARO HÜCRELERİNDE 1 GÜNLÜK LETROZOL UYGULAMASI SONRASINDA RADYOTERAPİNİN HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİSİNİN ANNEXIN V YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ



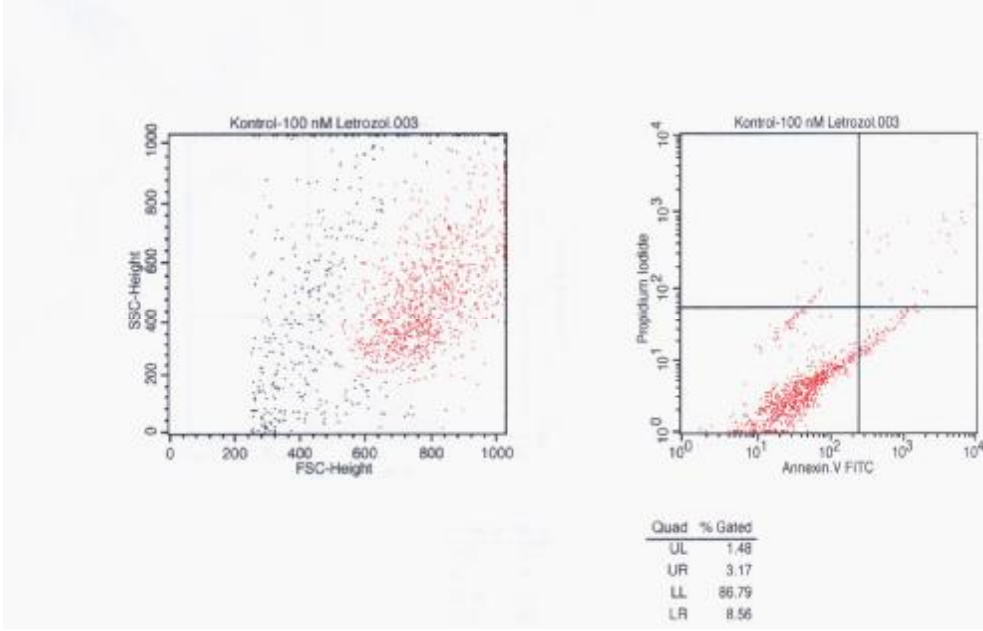
Tablo13: MCF-7 Aro Hücre Hattında 1 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Üzerine Etkisinin Annexin V Yöntemi İle İncelenmesi



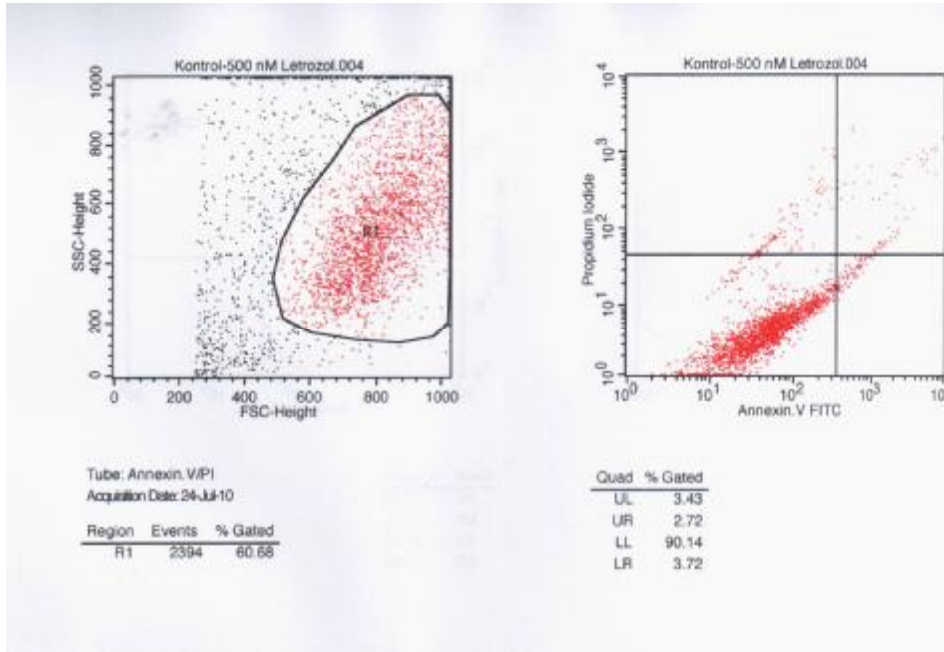
Şekil 41 : Herhangi Bir Apoptotik Etken Olmaksızın MCF-7 Aro Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



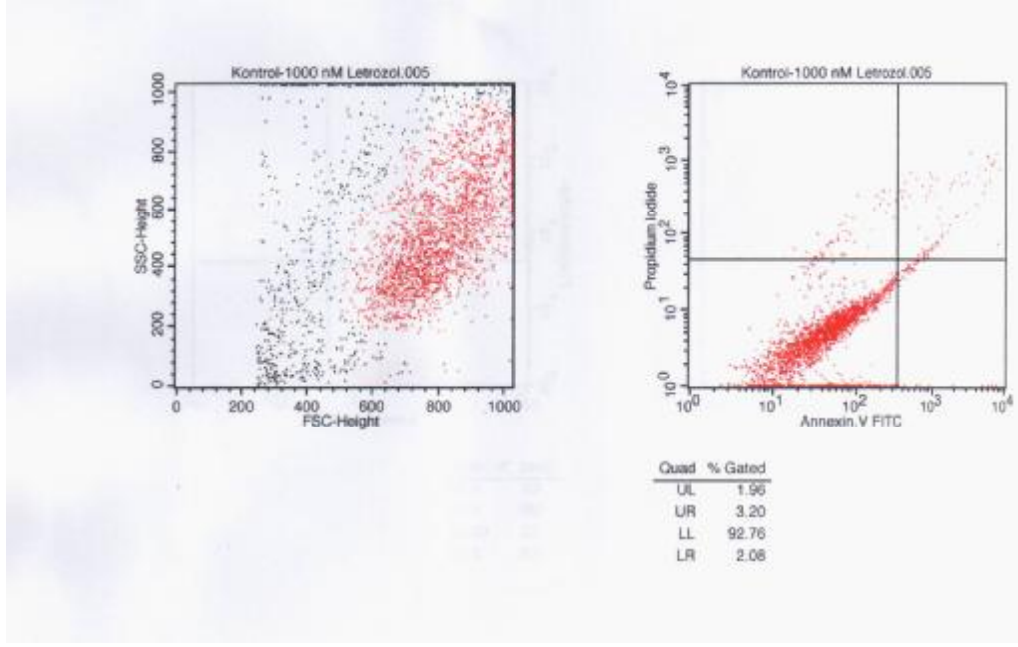
Şekil 42: Sadece Etanol'e 1 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Aro Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



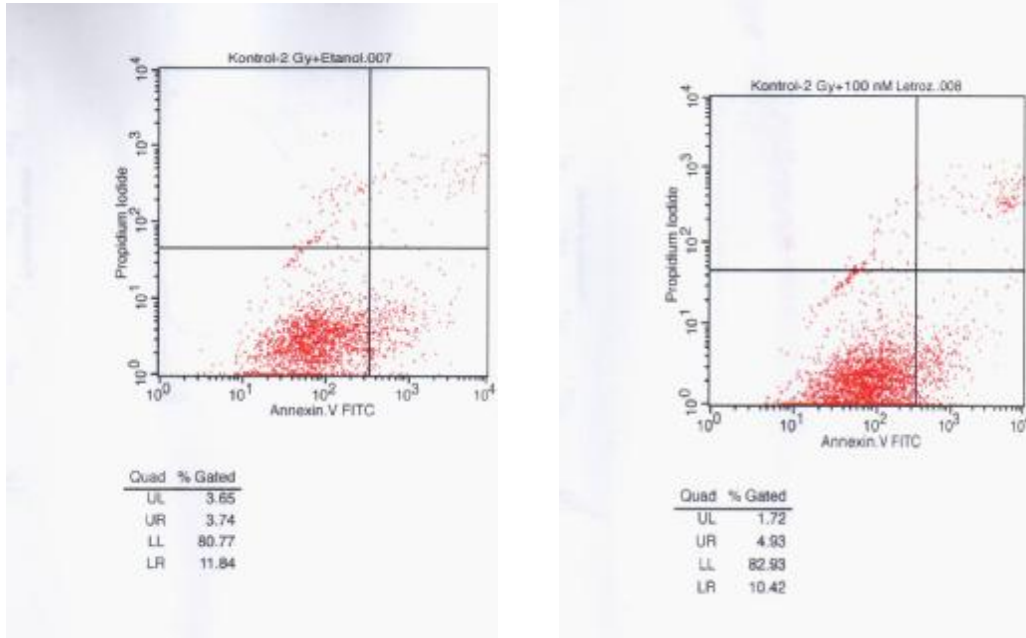
Şekil 43: 100nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Aro Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



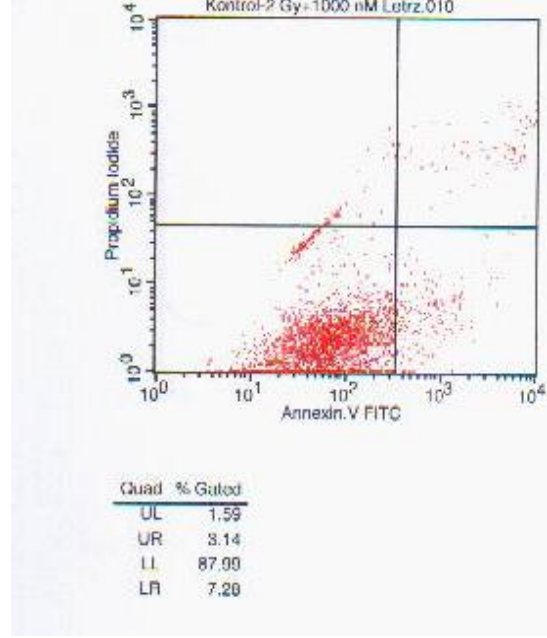
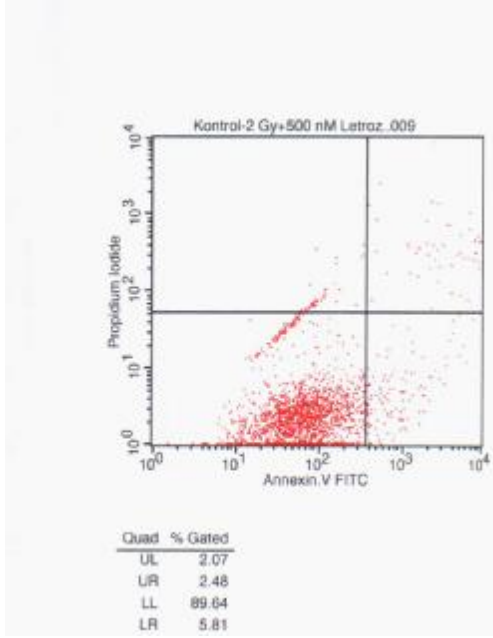
Şekil 44: 500 Nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Aro Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



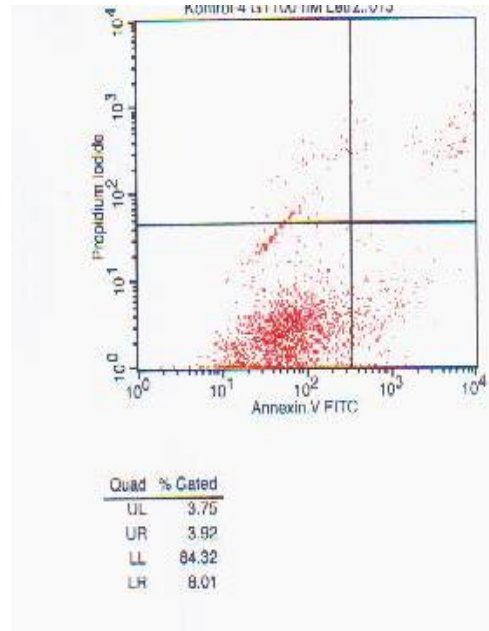
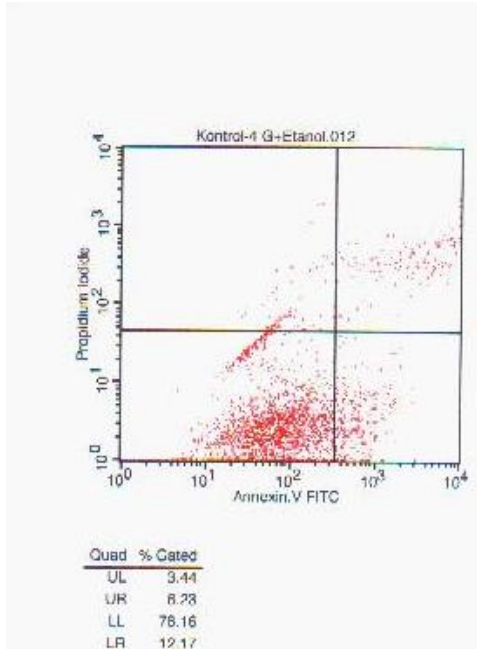
Şekil 45: 1000 Nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakılan MCF-7 Aro Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



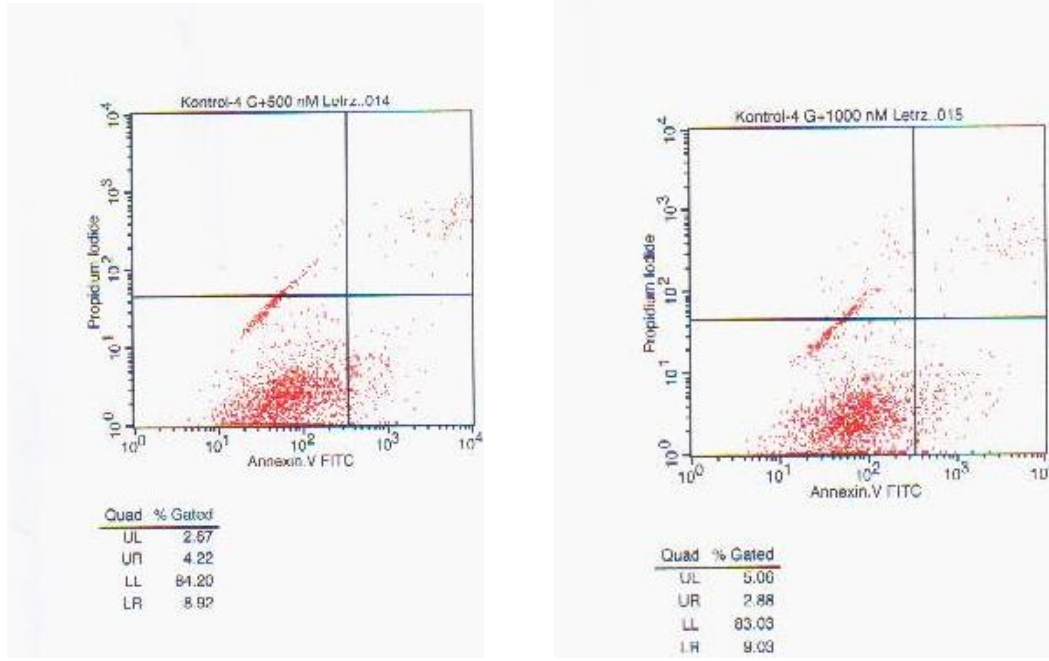
Şekil 46 a: Sadece Etanol'e **b:** 100nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 2 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



Şekil 47 a: 500 nM Letrozol'e **b:** 1000 nM Letrozol'e 1 Gün Maruz bırakıldıktan Sonra 2 Gy radyasyon uygulanan MCF-7 hücrelerinde Flow-sitometri sonuçları



Şekil 48 a: Sadece Etanol'e **b:** 100nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları



Şekil 49 a: 500 nM Letrozol'e **b:** 1000 Nm Letrozol'e 1 Gün Maruz Bırakıldıktan Sonra 4 Gy Radyasyon Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde Flow-Sitometri Sonuçları

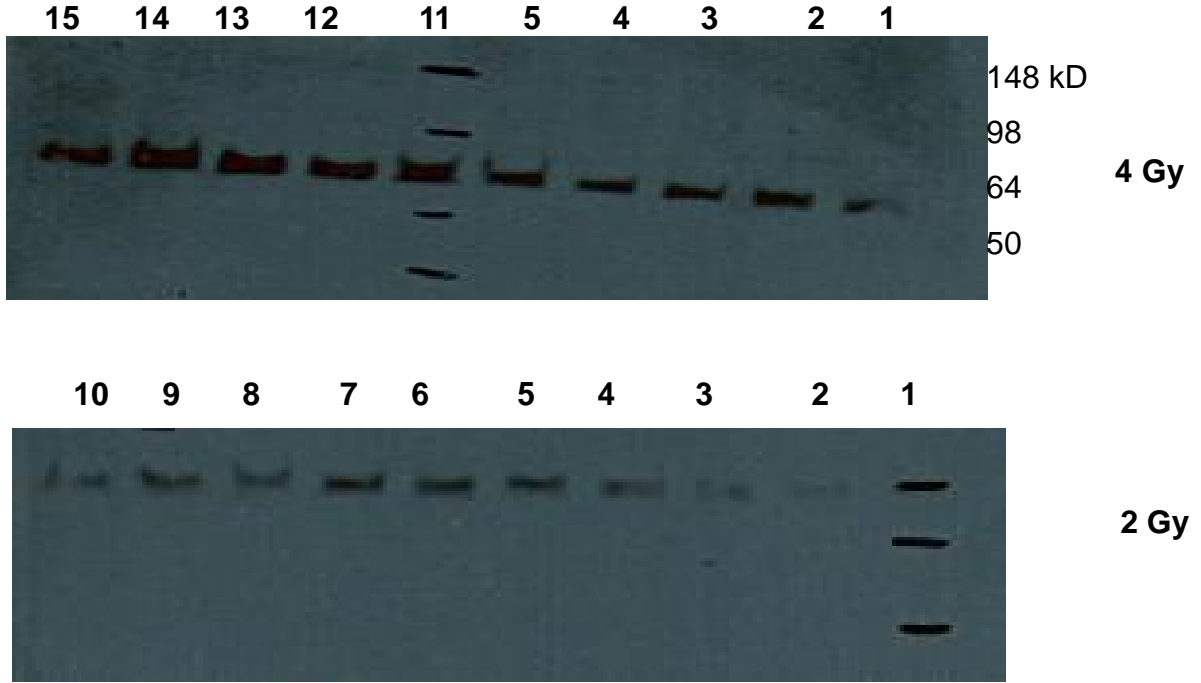
MCF-7 Aro hücrelerinde de Annexin-V yöntemi ile apoptotik davranışın değerlendirilmesinde özellikle yüksek radyoterapi dozunda apoptozda bir düşme saptanarak Kaspaz-3 deneyi sonuçları desteklenmiştir. Bu yöntemle bu sonuca ek olarak apoptotik ölüm mekanizması kendi içinde değerlendirildiğinde geç apoptozda kontrol grubuna göre belirgin bir artış olduğu ve nekrotik hücre ölüm modelinden apoptotik hücre ölümüne bir kayış olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar incelendiğinde Letrozol'ün MCF-7 Aro hücrelerini nekrozdan koruyup, zaman içerisinde apoptozise girmelerini sağladığı söylenebilir.

Sonuç olarak Letrozol varlığında Kaspaz ve Annexin ile detekte ettiğimiz MCF-7 aro hücre hattında gözlenen hücre ölümünde genel olarak yüksek dozlarda apoptozisde azalma görmekteyiz. Deneyler sonucu nekrozda da gözlenen azalma, apoptozisde gözlenen azalmaya rağmen alt grup değerlendirmesinde geç apoptoziste gözlenen artış ile hücre ölümünün nekrozdan apoptozaya kaydığını göstermektedir.

4.5. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Otofajik Etkisinin Western-Blot Tekniği İle Otofajide Rol Alan Beclin Geninin Ekspresyonunun Belirlenmesi ile Gösterilmesi

Uyarana ve deney sistemine bağılı olarak hücrenin yaşamını sürdürmesine ya da ölümüne neden olabilen bir mekanizma olan otofaji; otofaji mekanizmasında rol oynayan, otofaji ile ilişkili protein olan beclin-1 geninin protein düzeyinde ekspresyonunun Western-Blot tekniği ile gösterilmesi ile değerlendirilebilir.

Otofajiyi değerlendirmek için MCF-7 meme kanseri hücre hattında apoptoz deneyleri ile aynı şekilde Radyoterapi ile eşzamanlı uygulanan Letrozol'ün 100, 500 ve 1000 nM olan 3 farklı dozunun, 1,3,6 gün maruziyet sonrasında otofajik etkisinin gösterilmesi için MCF-7 hücreleri 6 well platelere ekildi. Radyoterapi uygulandıktan 24 saat sonra SDS-jel elektroforezi ve Western Blot tekniği kullanılarak beclin ekspresyonu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 50,52, 53 'de gösterilmiştir.

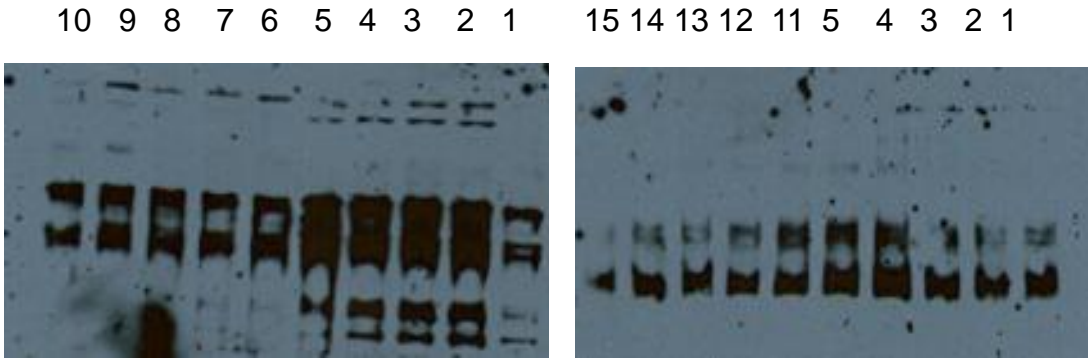


Şekil 50: MCF-7 Hücre Hattında 1 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Üzerine Etkisinin Beclin Ekspresyonu İle Gösterilmesi (1 numaralı kuyu:Kontrol-kontrol; 2 numaralı kuyu:Kontrol-etanol; 3 numaralı kuyu:Kontrol 100 nM Letrozol; 4 numaralı kuyu:Kontrol- 500 nM Letrozol; 5 numaralı kuyu: Kontrol-1000 nM Letrozol; 6 numaralı kuyu:2 Gy-Kontrol; 7 numaralı kuyu:2 Gy-Etanol; 8 numaralı kuyu: 2 Gy-100 nM letrozol; 9 numaralı kuyu:2 Gy 500 nM Letrozol; 10 numaralı kuyu: 2 Gy 1000 nM Letrozol; 11 numaralı kuyu:4 Gy-Kontrol; 12 numaralı kuyu: 4 Gy-Etanol; 13 numaralı kuyu: 4 Gy-100 nM letrozol; 14 numaralı kuyu: 4 Gy 500 nM Letrozol; 15 numaralı kuyu: 2 Gy 1000 nM Letrozol)

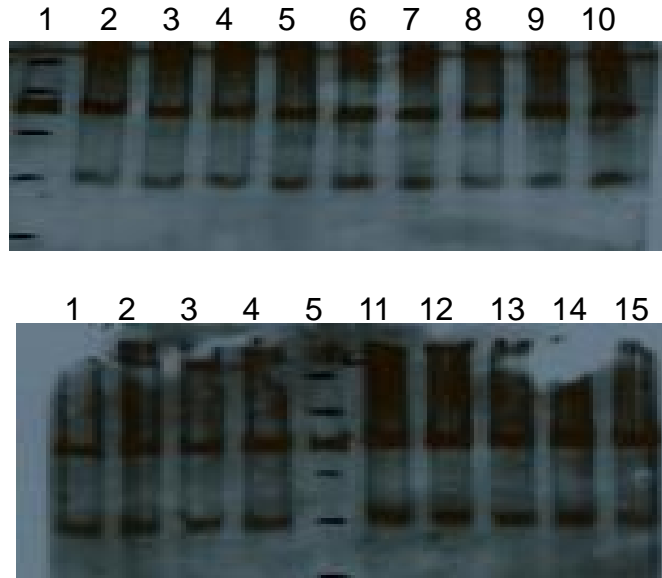
1 günlük belirlenen dozlardaki Letrozol maruziyeti sonrası uygulanan radyoterapi dozlarından 2 Gy'in otofaji üzerine olan etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında farklı değildir. Ancak 4 Gy'de kontrol grubuna göre otofajide bir artış gözlenmektedir. Uygulanan radyoterapi sonrası her ne kadar otofajik hücre ölümünü değerlendiriyor olsak da, otofajinin hücre ölümü yanında hücrenin yaşamını sürdürmesine neden

olabilen bir mekanizma olduğunu da göz önünde bulundurursak, 4 Gy sonrası beclin ekspresyonunda gözlenen bu artış hücrenin kendini kurtarmaya çalıştığının bir göstergesi olarak da değerlendirilebilir.

Yapılan bu deneyde kuyulara eşit miktarda protein yüklendiğini kanıtlamak amacıyla ilk deneyde kullanılan membran "strip" edilerek membran üzerindeki proteinlere bağlanan antikor uzaklaştırılır ve tekrar TBP primer antikoruna ile western blot yapılır. Şekil 51 'de bu sonuçlar görülmektedir.

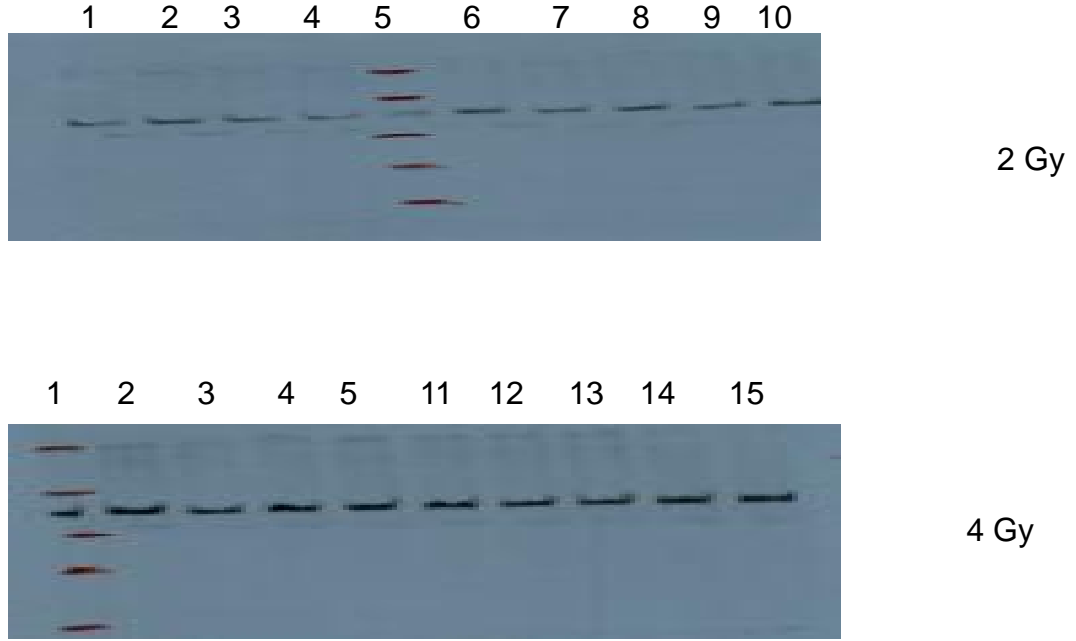


Şekil51 : Yüklenen Protenin Miktarının Eşit Olduğunu Doğrulamak İçin Membranın TBP Antikoru İle Strip Edilmesi



Şekil 52: MCF-7 Hücre Hattında 3 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Otofaji Üzerine Etkisinin Beclin Ekspresyonu İle Gösterilmesi

3 günlük belirlenen dozlardaki Letrozol maruziyeti sonrası uygulanan radyoterapi sonrasında gerek 2 Gy gerekse 4 Gy'de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında otofajik protein beclinin ekspresyonunda hiçbir artış izlenmemektedir.



Şekil 53 : MCF-7 Hücre Hattında 6 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Otofaji Üzerine Etkisinin Beclin Ekspresyonu İle Gösterilmesi

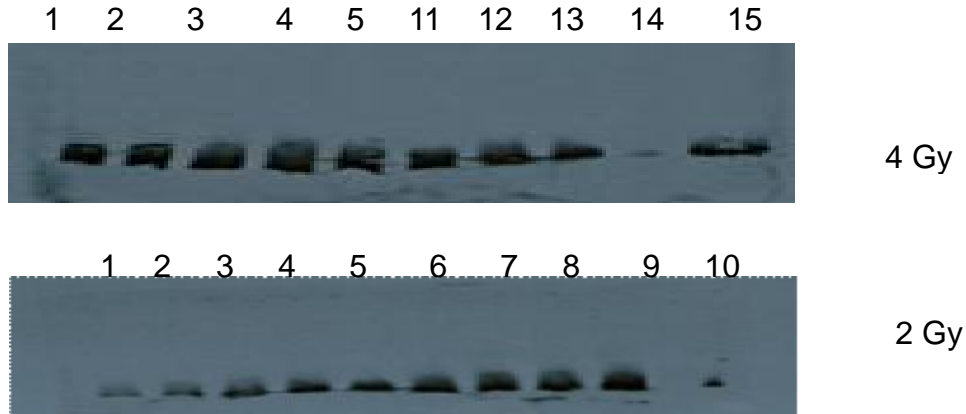
(1 numaralı kuyu:Kontrol-kontrol; 2 numaralı kuyu:Kontrol-etanol; 3 numaralı kuyu:Kontrol 100 nM Letrozol; 4 numaralı kuyu:Kontrol- 500 nM Letrozol; 5 numaralı kuyu: Kontrol-1000 nM Letrozol; 6 numaralı kuyu:2 Gy-Kontrol; 7 numaralı kuyu:2 Gy-Etanol; 8 numaralı kuyu: 2 Gy-100 nM letrozol; 9 numaralı kuyu:2 Gy 500 nM Letrozol; 10 numaralı kuyu: 2 Gy 1000 nM Letrozol; 11 numaralı kuyu:4 Gy-Kontrol; 12 numaralı kuyu: 4 Gy-Etanol; 13 numaralı kuyu: 4 Gy-100 nM letrozol; 14 numaralı kuyu: 4 Gy 500 nM Letrozol; 15 numaralı kuyu: 2 Gy 1000 nM Letrozol)

6 günlük belirlenen dozlardaki Letrozol maruziyeti sonrası uygulanan radyoterapi dozlarında ise her iki doz için bakıldığında otofajide kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hiçbir fark gözlenmemektedir.

Bir günlük deney sonuçlarında yüksek radyoterapi dozunda otofajide artış olup, düşük radyoterapi dozu ve daha uzun letrozole maruziyette herhangi bir artış olmaması erken hücre yanıtının bir göstergesi olup hücrenin hasar gördüğünün ancak yaşamını sürdürebilmek için de enerjiye ihtiyaç duyduğunun bir göstergesi olarak da değerlendirilebilir.

4.6. Radyoterapi İle Eşzamanlı Uygulanan Letrozol'ün Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Aro Hücreleri Üzerindeki Otofajik Etkisinin Western-Blot Tekniği İle Otofajide Rol Alan Beclin Geninin Ekspresyonunun Belirlenmesi ile Gösterilmesi

MCF-7 Aro hücrelerinde letrozol ile indüklenen otofajiyi değerlendirmek için apoptoz deneyleri ile aynı şekilde Radyoterapi ile eşzamanlı uygulanan Letrozol'ün 100, 500 ve 1000 nM olan 3 farklı dozunun, 1.gün maruziyet sonrasında otofajik etkisinin gösterilmesi için MCF-7 Aro hücreleri 6 well platelere ekildi. Radyoterapi uygulandıktan 24 saat sonra SDS-jel elektroforezi ve Western Blot tekniği kullanılarak beclin ekspresyonu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 54 'de gösterilmiştir.



Şekil 54 : MCF-7 Aro Hücre Hattında 1 Günlük Letrozol Maruziyeti Sonrasında Radyoterapinin Otofaji Üzerine Etkisinin Beclin Ekspresyonu İle Gösterilmesi

Eş zamanlı Letrozol kullanımının hücre ölüm mekanizmalarından olan otofaji üzerindeki etkisi diğer deneyde olduğu gibi CYP19 aromataz enzimi geni ile stabil

olarak transfekte edilen ER-pozitif MCF-7 meme kanseri hücreleri MCF-7 Aro'larla da yapılmıştır. Ancak hücre hattının elimize geç ulaşması nedeniyle sadece bu deneyler de 1 günlük ve 1 kez yapılabilmektedir ve diğer deneyler hala devam etmektedir.

Her ne kadar tekrarlanması gerekse de Letrozol'ün indüklediği otofajiyi değerlendirdiğimizde genel olarak 2 ve 4 Gy 'de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bir artış gözlenmektedir.

5-TARTIŞMA

Meme kanserli hastaların büyük çoğunluğunu postmenapozal, ER pozitif hastalar oluşturur. Menapoz sonrası dönemde dolaşımdaki östrojenin ana kaynağı karaciğer, deri, kas ve çevre yağ dokusu gibi ekstranodal bölgelerdir (58-61). Postmenapozal hastalarda östrojen aktivitesinin baskılanması tedavi başarı oranlarını arttıran bir tedavi modalitesidir. Son 2 dekatta ER pozitif hastalarda hormonoterapinin tedavi seçenekleri arasında önemli bir yeri olduğu belirtilmiş ve ER blokörü olan tamoksifen hormonal tedavide altın standart olarak kabul edilmiştir (44). Buna rağmen kapsamlı bir değerlendirme yapılarak yan etkiler gözden geçirildiğinde tamoksifen kullanan kadınlarda tromboembolik olaylar, endometrium karsinomuna kadar ilerleyebilen endometrial değişikliklerde artış gözlenmektedir (123-124). Bunlara ek olarak bazı ER pozitif meme kanserlerinde tamoksifen tedavisine yanıt alınamayıp ve bazılarında da tedavi sırasında direnç geliştirerek yinelemeler olabilmektedir (125-126). Tüm bunları engellemek için östrojen biosentezini engelleyen üçüncü kuşak aromataz inhibitörleri etkili bir hormonal tedavi seçeneği olmuş ve klinik rehberlerde hormon duyarlı erken evre meme kanseri tedavisinde yerini almıştır (127-128). Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda aromataz inhibitörlerinin erken evre meme kanserinin adjuvan tedavisinde hastalısız sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir (128). Bununla birlikte tamoksifen ile karşılaştırıldığında endometrial kanser ve tromboembolik olay riskini azaltması bakımından aromataz inhibitörleri tamoksifene üstün bulunmuştur. Steroidal ve non-steroidal aromataz inhibitörleri östrojen sentezini baskılamada oldukça etkilidir. Tüm bu faydalarına karşın steroidal ve nonsteroidal aromataz inhibitörleri kemik kırıklarına, kemik ağrılarına, kemik yoğunluğunda azalmaya ve lipid metabolizması bozukluklarına neden olabilmektedir.

Meme koruyucu cerrahi ve meme radyoterapisi çok uzun yıllardır meme kanseri tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Overgaard ve arkadaşları postoperatif radyoterapinin yerel bölgesel yineleme riskini azaltmakla birlikte kemoterapi ve/veya tamoksifen kullanan yüksek riskli hastalarda sağkalımı arttırdığını göstermişlerdir (6).

Östrojen, özel büyüme faktörleri ve bunlara ait reseptörler ile hücre siklus mekanizmasını etkileyerek, fonksiyonel ER'üne sahip meme kanserinin büyümesini uyarır ve apoptozu engeller (129-130).

Çalışmalar göstermektedir ki antiöstrojenik tedaviler ya da östrojen yoksunluğu durumunda MCF-7 hücreleri S ve G₂/M fazına girerler (131,132). Buna ek olarak hücre döngüsündeki ilerlemede östrojen hücreleri apoptotik yolla ölmekten korumaktadır. Yapılmış olan çeşitli invitro ve invivo çalışmalarda gösterilmiştir ki östrojenin çekilmesi ve tamoksifen veya aromataz inhibitörleri ile tedavi edilmesi östrojen bağımlı meme kanseri hücrelerinde apoptozisi arttırmaktadır. Bu nedenle meme kanseri tedavisinde antihormonal tedaviler, hormon bağımlı hücre büyümesi üzerine olan güçlü inhibitör etkileri ile önemli bir rol oynamaktadır (132,133).

Tamoksifen gibi diğer hormonoterapi ajanlarının radyoterapi ile eşzamanlı kullanımına ait kısıtlı ve olumsuz bilgiler mevcuttur. Tamoksifen sitostatik aktivitesini hücreleri G₀/G₁ fazında duraklamalarını sağlayarak gösterir. Erken G₁ fazının radyoterapiye daha az duyarlı olduğu bilinmektedir. Bir çalışmada radyoterapi ile eşzamanlı tamoksifen kullanımının tümör hücrelerini radyoterapiye dirençli hale getirdiği gösterilmiştir.(135)

Letrozolün radyoterapi ile eşzamanlı kullanımı ile ilgili tek invitro çalışma olan Azria ve arkadaşlarının çalışmasında letrozolün hücreleri G₁ fazında bloke ederek veya hücre siklus basamakları arasındaki geçişi yavaşlatarak hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca az sayıda hücrenin letrozole duyarlı olduğu ve proliferasyon fazında kaldığı belirtilmiştir (%9 S fazında). Antiöstrojenlerle yapılan çalışmalardaki sonuçlara benzer şekilde aromataz inhibitörlerinin de etkilerini direkt sitotoksik etki yerine hücre proliferasyonunu bloke ederek gösterdikleri belirtilmiştir. Radyoterapi ve Letrozol'ün eşzamanlı uygulandığı kolda ise G₂ fazında kalan hücrelerde tekbaşına radyoterapi koluna göre artış olduğu ve G₁ hücrelerde yeniden oransal bir düzenlenme olduğu izlenmiştir. Hücre siklusundaki bu düzenlenmenin eşzamanlı tedaviyle yaşayan hücre oranındaki azalışı açıkladığı belirtilmiştir (10).

Bu çalışmamızda, in vitro koşullarda aromataz geni transfeksiyonu yapılmış, ER pozitif MCF-7 aro hücreleri ve ER pozitif MCF-7 hücreleri kullanılarak, radyoterapi ile eşzamanlı kullanılan letrozolün hücrelerdeki ölüm mekanizmalarından apoptozis ve otoesfaji üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu konu ile ilgili daha önce yapılmış olan Azria ve arkadaşlarının çalışmasında bizim çalışmamızdan farklı olarak sitotoksisite analizleri MTT yöntemi, hücre sayımı yöntemi ve flow sitometri yöntemi kullanılarak yapılmıştır (10). Bizim çalışmamızda ise sitotoksisite deneyleri hücre

ölüm mekanizmaları ile ilgili daha ayrıntılı bilgi veren apoptoz'u gösteren Caspas-3 ve Annexin-V yöntemi, otofajik protein beclin artışını gösteren Western-Blot tekniği kullanılarak yapılmıştır.

Margarida ve arkadaşlarının çalışmasında aromataz inhibitörlerinin hücre ölümü üzerine olan etkilerini incelemek için bizim de çalışmamızda kullandığımız MCF-7 aro hücreleri kullanılmıştır. Bu çalışmada in vitro koşullarda yalnızca aromataz inhibitörü uygulaması sonrası hücre canlılığı, hücre döngüsü ve indüklenen hücre ölümü değerlendirilmiştir. MCF-7 aro meme kanseri hücre hattında aromataz enzimi testosteronun östrojene aromatzasyonu üzerinden hücre büyümesini uyarır. Testosteronun bu hücre hattında büyümeyi uyarıcı en düşük konsantrasyonu, bu steroid hormonun fizyolojik konsantrasyonu da olan 1 nM'dir. Biz de bu nedenle çalışmamızda MCF-7 aro hücreleriyle yaptığımız deneylerde aromataz enzimi substratı olarak 1 nM testosteron kullandık. Margarida ve arkadaşları, bu çalışmalarında MCF-7 aro hücrelerinde aromataz inhibitörleriyle aromataz enziminin baskılanması sonucu hücre üremesini uyarıcı östrojeni inhibe ederek, hücre döngüsünün G₁/S fazında bloke olduğunu, S ve G₂/M fazındaki hücre oranlarında azalma olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanında bu çalışmada aromataz inhibitörlerine maruziyet sonrası hücrelerde kromatin yoğunlaşması, membran tomurcuklanması, stoplazma vakuolizasyonu gibi apoptotik süreçlere giriş gösteren morfolojik bulgular gözlenmişse de tipik apoptotik cisimcikler gözlenmemiştir. Bu bulgular MCF-7 aro hücrelerinde Letrozol uygulaması sonrası kaspaz-3 ve annexin-V deneyleri ile elde ettiğimiz apoptotik hücre ölümü sonuçlarımızı desteklemektedir. Elektron mikroskopisi sonuçlarına göre aromataz inhibitörü uygulanmış MCF-7 aro hücrelerinde veziküller ve sitozolde dağınık olarak bulunan otofagozomlar olduğu belirtilmiştir. Bu bulgularla da aromataz inhibitörleri tarafından farklı ölüm yollarının uyarılabildiği ve bu yollar arasında bağlantılar olduğu gösterilmiştir. Bu da bizim deneyimizde MCF-7 aro hücrelerinde letrozol ile indüklenen otofajide gözlenen artışını desteklemektedir (134).

Diğer yapılmış olan iki çalışmada MCF-7 hücre hatlarının apoptotik uyarana duyarlı hücreler olduğu, ancak prokaspaz-3 polipeptidine sahip olmadıkları gösterilmiştir. Bu çalışmalarda MCF-7 ve MCF-7 aro hücrelerinde herhangi bir aromataz inhibitörü ile bizim bulgularımızı da destekleyen kaspaz-3 aktivasyonu gözlemlenmediği belirtilmiştir (136,137).

Cui Q ve arkadaşları çalışmalarında, apoptotik ve otofajik hücre ölümü mekanizmalarının kesişim noktalarını vurgulamışlardır. Bu çalışmayla, apoptotik hücre ölümü düzenlenmesinin otofajiye bağlı veya otofaji öncesinde olabileceği ya da otofajinin apoptozisi antagonize etmek veya geciktirmek için oluşabildiği ve otofaji inhibisyonu ile hücrelerin apoptotik sinyallere duyarlı hale gelebildiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda MCF-7 aro hücrelerinde 1 günlük letrozol maruziyeti ardından radyoterapi uygulaması ile yüksek dozlarda apoptotik etkinin azalarak otofajik etkinin arttığı gösterilmesiyle bu karmaşık mekanizmalar desteklenmektedir (138).

Çalışmamızın sonuçları, MCF-7 hücrelerinde elde edilen verilere göre Letrozol kullanımının hücrelerde aromataz geni olmadığı zaman hücre ölümüne bir katkısı olmadığını göstermektedir. Aromataz geni transfekte edilmiş hücrelerle deneylerin tamamlanamamış olması ve veri eksikliği olması nedeniyle bu hücrelere ait olan sonuçların tekrarlanabilirliği değerlendirilememiştir. Ancak aromataz geni varlığında apoptotik hücre ölümünde azalma, otofajiye kayma görülmüştür. Bu bulgu literatür verileri ile desteklenen karmaşık mekanizmalarla açıklanmış olsa da çalışmamızda gözlenen otofajiye kayış, hücrenin stres yanıtına karşı verdiği bir yanıt olabilir. Bu bulgunun daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Uzun vadede değerlendirildiğinde aromataz inhibitörlerinin eşzamanlı uygulaması sonrasında, letrozolün kanser hücre hatlarında, hücreleri nekrozdandan koruyup apoptoza girmelerini sağlayarak gösterdiği etki, fibroblast doku kültürü deneyleri yapılarak, doku kültürlerinde de aynı sonuçlar elde edilirse, Altınok ve arkadaşlarının deney hayvanı çalışmasındaki sonuçları destekleyici olarak letrozolün normal dokularda oluşan yan etkilere karşı bir koruma sağladığı gösterilecektir (139).

Sonuç olarak, daha sağlıklı bilgiler verebilmek için devam eden deneylerin sonuçlarına da ihtiyaç vardır. Elde edilen veriler doğrultusunda Letrozol'ün eşzamanlı kullanımının hormon duyarlı, reseptör pozitif ve aromataz enzimi eksprese eden hücrelerde hücre ölüm mekanizmaları üzerinde olumlu etkisi olduğu söylenebilir. Bu konu ile ilgili yapılmış çok fazla çalışma olmaması nedeniyle bu sonuçlar geliştirilmiş çalışmalarla desteklenmelidir.

6.KAYNAKLAR

1-Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ; American Cancer Society. Cancer statistics. CA Cancer J Clin.; 2009 May; 59:225-249

2-Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. J Clin Oncol. 1999 May;17(5):1474-81.

3- Winer EP, Hudis C, American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004.J Clin Oncol. 2005 Jan 20;23(3):619-29. Epub 2004 Nov 15. Review

4-Crivellari D, Sun Z, Coates A et al, Letrozole compared with tamoxifen for elderly patients with endocrine-responsive early breast cancer: the BIG 1-98 trial. J Clin Oncol. 2008 Apr 20;26(12):1972-9. Epub 2008 Mar 10

5-Paul E. Goss, James N. Ingle, et al, A Randomized Trial of Letrozole in Postmenopausal Women after Five Years of Tamoxifen Therapy for Early-Stage Breast Cancer, N Engl J Med 2003; 349:1793-1802

6-Hanne M. Nielsen, Marie Overgaard, Cai Grau, Anni R. Jensen, Jens Overgaard, Study of Failure Pattern Among High-Risk Breast Cancer Patients With or Without Postmastectomy Radiotherapy in Addition to Adjuvant Systemic Therapy: Long-Term Results From the Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82 b and c Randomized Studies. Journal of Clinical Oncology, Vol 24, No 15 (May 20), 2006: pp. 2268-2275

7-Ragazz E, Olivotto I, Spinelli JJ, et al. Locoregional radiation therapy in patients with high-risk breast cancer receiving adjuvant chemotherapy: 20-year results of the British Columbia randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:116–126

8-Azria D, Gourgou S, Sozzi WJ et al, Concomitant use of tamoxifen with radiotherapy enhances subcutaneous breast fibrosis in hypersensitive patients.*Br J Cancer*. 2004 Oct 4;91(7):1251-60.

9- Wazer DE, Tercilla OF, Lin PS, Schmidt-Ullrich R Modulation in the radiosensitivity of MCF-7 human breast carcinoma cells by 17β-estradiol and tamoxifen. *Br J Radiol*. 1989 Dec;62(744):1079-83

10-David Azria, Christel Larbouret, Severine Cunat, Mahmut Ozsahin, Sophie Gourgou , Pierre Martineau, Dean B Evans, Gilles Romieu, Pascal Pujol , Andre Pèlerin; Letrozole sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation, *Breast Cancer Res*. 2005;7(1):R156-63.

11- Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, et al: The Global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer* 2005; 6:391-401.

12- Smigal C, Jemal A, Ward E, et al: Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer Clin* 2006; 56:168-153.

13- Fentiman IS, Fourquet A, Hortobagyi GN: Male breast cancer. *Lancet* 2006; 367:595-604.

14- Ries L, Young J, Kel G, et al: SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1988-2001, Patient and tumor Characteristics, Bethesda, MD, National Cancer Institute SEER Program NIH Pub. No. 07-6215, 2007.

15-Klauber-DeMore N. Tumor biology of breast cancer in young women. *Breast Dis* 2006;23:9-15.

16-Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:5367-74.

17-de Bono JS, Rowinsky EK. The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med* 2002;8(4): 19-26.

18-Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Celi Biol*2001;2(2):127-37.

19-Brennan PJ, Kumagai T, Berezov A, Murali R, Greene MI. HER2/Neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene* 2000; 19: 6093-101.

20-Torregrosa D, Bolufer P, Lluch A, López JA, Barragán E, Ruiz A, et al. Prognostic significance of *cerbB2*/neuamplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer and their relation to estradiol receptor (ER) status. *Clin Chim Acta* 1997; 262: 99-119.

21- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:11-31.

22-Klijn JG, Look MP, Portengen H, Alexieva-Figusch J, van Putten WL, Foekens JA. The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res Treat* 1994 ;29(1):73-83.

23-Yoder BJ, Wilkinson EJ, Massoll NA. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. *Breast J* 2007; 13(2): 172-9.

24-Bhagavan NV. *Medical Biochemistry* 4th edition. 2002, Hartcourt/Academic Press, Massachusetts, USA.

25-Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9: 140-147, 1999.

26- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000; 127: 4277–4291.

27- Olefsky JM. Nuclear receptor mini review series. *J Biol Chem* 2001; 276: 36863-36864.

28-Carder PJ, Murphy CE, Dervan P, Kennedy M, McCann A, Saunders PTK, et al. A multi-centre investigation towards reaching a consensus on the immunohistochemical detection of ER β in archival formalin-fixed paraffin embedded human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 92: 287-293.

29-Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagerkrantz S, Lagerkrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4258-4265.

30- Speirs V, Carder PJ, Lane S, Dodwell D, Lansdown MRJ, Hanby AM. Oestrogen receptor β : what it means for patients with breast cancer. *Lancet Oncol* 2004; 5: 174-181.

31- Speirs V, Walker RA. New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast. *J Pathol* 2007; 211: 499-506.

- 32- Roger P, Esslimani-Sahla M, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 2537–2541.
- 33-Jarvinen TA, Pelto-Huikko M, Holli K, Isola J. Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 2000; 156: 29–35.
- 34-Murphy L, Cherlet T, Lewis A, Banu Y, Watson P. New insights into estrogen receptor function in human breast cancer. *Annals of Medicine* 2003; 35: 614–631.
- 35- Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Wärrri A, Weihua Z, et al. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2002; 9: 1–13.
- 36-De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, et al: A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res* 2003; 63:5236-5238.
- 37-Arpino G, Weiss H, Lee AV, et al: Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1254-1261.
- 38- Cui X, Schiff R, Arpino G, et al: Biology of progesterone receptor loss in breast cancer implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23:7721-7735.
- 39- Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1233–41.
- 40- Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1227–32

41- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Favorable and unfavorable effects on long term survival of radiotherapy for early breast cancer. Lancet 2000;355:1757-1770.

42- Levitt SH: Is there a role for postoperative adjuvant radiation in breast cancer? Beautiful hypothesis versus ugly facts: 1987 Gilbert H. Fletcher Lecture. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1988;14:787-796.

43- Ragaz J, Jackson SM, Le N et al: Adjuvant radiotherapy and chemotherapy in node positive premenopausal women with breast cancer, N Engl J Med; 1997;337:956-62.

44-Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of adjuvant tamoxifen and of cytotoxic therapy on mortality in early breast cancer: an overview of 61 randomised trials among 28 896 women. N Engl J Med 1988; **319**: 1681-1692.

45- Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JG, Sahmoud T: Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. Lancet 2002 , 359:2131-9

46-Jakesz R, Samonigg H, Greil R: Extended adjuvant treatment with anastrozole: results from the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 6a (ABCSG-6a). Proc Am Soc Clin 2005 , 23:abstract 527.

47-Kaufmann M, Jonat W, Hilfrich J, Eidtmann H, et al ;Improved overall survival in postmenopausal women with early breast cancer after anastrozole initiated after treatment with tamoxifen compared with continued tamoxifen: the ARNO 95 Study. J Clin Oncol 2007, **25**:2664-70.

48-Muss HB, Tu D, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Pater JL, et al. Efficacy, toxicity, and quality of life in older women with early-stage breast cancer treated with letrozole or placebo after 5 years of tamoxifen: NCIC CTG intergroup trial MA.17J Clin Oncol. 2008 Apr 20;26(12):1956-64

49-Fallowfield LJ, Bliss JM, Porter LS, Price MH, et al; Quality of life in the intergroup exemestane study: a randomized trial of exemestane versus continued tamoxifen after 2 to 3 years of tamoxifen in postmenopausal women with primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 20;24(6):910-7.

50-Boccardo F, Rubagotti A, Puntoni M, Guglielmini P, et al; Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer: preliminary results of the Italian Tamoxifen Anastrozole Trial. *J Clin Oncol* 2005 , 23:5138-47

51-Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev*, 1993;15:17-35.

52- Suzuki T, Moriya T, Ishida T, Kimura M, et al. In situ production of estrogens in human breast carcinoma. *Breast Cancer*, 2002; 9: 296-302.

53--Simpson ER, Jones M, Davis S, Rubin G. Local estrogen synthesis in the breast - role in cancer development. *J. Soc. Gynecolog. Invest*, 2000; 7:518-521.

54-<http://www.3dchem.com/moremolecules.asp?ID=242&othername=Estrogens>

55- Sebastian S, Bulun SE. A Highly Complex Organization of the Human CYP19 (Aromatase) Gene Revealed by the Human Genome Project. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006; 86: 4600-4602.

56- Simpson ER. Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression. *Semin Reprod Med*. 2004; 22:11-23.

57-Chen S, Zhou D, Okubo T, Kao YC, Yang C. Breast tumour aromatase: functional role and transcriptional regulation. *Endocr. Relat. Cancer*, 1999; 6:149–156.

58-Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, et al. Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis. *Endocrine Reviews*, 2006; 15: 342-355.

59- Miller WR. Aromatase and the Breast: Regulation and Clinical Aspects. *Maturitas*, 2006; 54: 335-341

- 60- MillerWR, Mullen P, Sourdain P, Watson C, Dixon JM, Telford J. Regulation of aromatase activity within the breast. *J Steroid Biochem*, 1997; 61:193–202.
- 61- Bulun SE, Simpson ER. Regulation of aromatase expression in human tissues. *Breast Cancer Res. Treat.*; 1994; 30:19–29.
- 62-Aromatase Inhibitors (Birkhauser), Hardcover (2005) by Barrington J a Furr (Editor), William R Miller, PH.D., PhD (Contributions by), Angela Brodie (Contributions by)
- 63- Bhatnagar, A.S. and Miller, W.R., 1999. Pharmacology of inhibitors of estrogen biosynthesis. In: Oettel, M. and Schillinger, E., Editors, 1999 vo l135/2 pp223-230
- 64- <http://www.femara.info.com/index.jsp>
- 65-Glucksmann A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 1951;26:59-86.
66. Sauders JW. Death in embryonic systems. *Science* 1966; 154:604-12.
67. Kerr JFR. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 1965; 90:419-35.
- 68- Kerr JFR. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971; 105:13-20.
- 69- Kerr JFR, Searle J. A suggested explanation for the para-doxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. *J Pathol* 1972; 107:41-4.
- 70- Lawrence M Schwartz, Barbara A Osborne. Programmed cell death, apoptoz and killer genes. *Immunology Today* 1993;14:582-90.

71- Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptoz: a different type of cell death. *Faseb J* 1992; 6:2450-55.

72-Schweichel JU, Merker HJ: The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973; 7:253-66

73-Clarke PG: Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*. 1990; 181:195-213

74- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P *et al*. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005; 12 (Suppl 2): 1463–1467

75- L. Galluzzi, M.C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M.,et all; Cell death modalities: classification and pathophysiological implications, *Cell Death Differ*. 14 (2007), pp. 1237–1243.

76-P. Fuentes-Prior and G.S. Salvesen, The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition, *Biochem. J*. 384 (2004), pp. 201–232.
View Record in Scopus | Cited By in Scopus (228)

77- G.S. Salvesen and S.J. Riedl, Caspase mechanisms, *Adv. Exp. Med. Biol*. 615 (2008), pp. 13–23.

78-Cotran R.S., Kumar V. ve Collins T., (2000), “Pathologic Basis of Disease”, WB Saunders Company, 1173-1211 Philadelphia.

79- Kinloch R.A., Treherme J.M. ve Furness L.M., (1999), “The Pharmacology of Apoptoz” *Trends Pharmol Sci*, 20: 35-42.

80 Kerr J.F.R., Willie A.H. ve Currie A.R., (1972) “Apoptoz: a Basic Biological Phenomenon With Wide Ranging Implications in Tissue Kinetics”, *Br J Cancer*, 26: 239-257.

- 81- Wyllie A.H. ve Duvall H., (1992), "Cell death. In: McGee JOD, Iseacson PG, Wright M, eds. Oxford Textbook of Pathology", vol 1. USA, Oxford University Pres, 141-147.
- 82- Constantinou C., Papas K.A., Constantinou A.I., Caspase-independent pathways of programmed cell death: The unraveling of new targets of cancer therapy?, Current Cancer Drug Targets, 2009; 9: 717-728
- 83- Yüksel B, "Apoptoz and Caspase System" Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi , 2 Ekim 2009
- 84- Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptoz. Eur J Endocrinol. 1998 May;138(5):482 - 91.
- 85- Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptoz and its role in disease. JAMA. 1998 Jan 28;279(4):300-7.
- 86- Bras, M., Queenan, B. and Susin, S.A., 2005, Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying, Biochemistry (Moscow), 70, 2, 231-239 .
- 87- Burlacu, A., 2003, Regulation of apoptoz by Bcl-2 family proteins, J. Cell. Mol. Med., 7, 3, 249-257
- .
- 88- Pagliari, L.J., Pinkoski, M.J. and Gren D.R., 2003, Apoptoz signaling: a means to an End, Handbook of Cell Signaling, 3, 331, 431-439 .
- 89-Twomey, C. and McCarthy, J.V., 2005, Pathways of apoptoz and importance in development, J.Cell. Mol. Med., 9, 2, 345-359 .
- 90- Gulbins, E., Dreschers, S. and Bock, J., 2003, Role of mitochondria in apoptoz, Experimental Physiology, 88.1, 85-90 .

- 91 Esposti, M.D. and Dive, C., 2003, Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304, 455-461.
- 92-Sprick, M.R. and Walczak, H., 2004, The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptoz, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1644, 125-132.
- 93- Philchenkov, A. 2004, Caspases: potential targets for regulating cell death, *J.Cell. Mol. Med.*8, 4, 432-444 .
- 94- Elmor S., Apoptoz: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicologic Pathology*, 2007; 35:495–516
95. Gozuacik D, Kimchi A: Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* 2007; 78:217-25
- 96- Levine B, Yuan J: Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005; 115:2679-88.
- 97-. Gozuacik D. Kimchi A., Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism, *Oncogene* (2004) 23: 2891–2906
- 98- Ohsumi Y: Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin- like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:211-6
- 99-Shintani T, Klionsky DJ: Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004; 306:990-5
- 100-Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ: Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451:1069-75

- 101- Xie Z, Klionsky DJ: Autophagosome formation: core machinery and adaptation. *Nat Cell Biol* 2007; 9:1102-9
- 102-Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelárová H, Meijer AJ: The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1997; 243:240-6.
- 103- Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Török L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS: Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 1996; 17:1595-607
- 104- Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E: Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2007; 21:1621–1635
- 105-Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp C, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E: Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007; 21:1367–81
- 106- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ: Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004; 304:1500-2.
- 107-Miao B, Degterev A Methods to analyze cellular necroptosis. *Methods Mol Biol.* 2009;559:79-93
- 108-Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell.* 2008 Dec 26;135(7):1311-23.
- 109-C T Vanden Berghe, N Vanlangenakker, Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features, *Cell Death and Differentiation* (2010) 17, 922–930

- 110- Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the radiologist. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.)
- 111-Topuz E, Aydiner A, Dinçer M. Meme Kanseri. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 2003.
- 112- Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE. The Concurrent Chemoradiation Paradigm-General Principles. Nat Clin Pract Oncol 2007; 4: 86-100.
- 113-Dische S, Saunders M, Barrett A, Harvey A, Gibson D, Parmar M. A randomised multicentre trial of CHART versus conventional radiotherapy in head and neck cancer. Radiother Oncol 1997; 44: 123
- 114 -Horiot JC, Le Fur R, N'Guyen T, Chenal C, Schraub S, Alfonsi S, Gardani G, Van Den Bogaert W, Danczak S, Bolla M, Van Glabbeke M, De Pauw M. Hyperfractionation versus conventional fractionation in oropharyngeal carcinoma: final analysis of a randomized trial of the EORTC cooperative group of radiotherapy. Radiother Oncol 1992; 25: 231-241
- 115 -Overgaard J, Hansen HS, Specht L, Overgaard M, Grau C, Andersen E, Bentzen J, Bastholt L, Hansen O, Johansen J, Andersen L, Evensen JF. Five compared with six fractions per week of conventional radiotherapy of squamous-cell carcinoma of head and neck: DAHANCA 6 and 7 randomised controlled trials. Lancet 2003; 362: 933-940.
- 116- Overgaard J, Hansen HS, Andersen AP, Hjelm-Hansen M, Jørgensen K, Sandberg E, Berthelsen A, Hammer R, Pedersen M. Misonidazole combined with split-course radiotherapy in the treatment of invasive carcinoma of larynx and pharynx: report from the DAHANCA 2 study. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 16: 1065-1068.
- 117-Vernon CC, Hand JW, Field SB, Machin D, Whaley JB, van der Zee J, van Putten WL, van Rhoon GC, van Dijk JD, González González D, Liu FF, Goodman P, Sherar M. Radiotherapy with or without hyperthermia in the treatment of superficial localized breast cancer: results from five randomized controlled trials. International Collaborative Hyperthermia Group. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996; 35: 731-744.

118-Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE. The Concurrent Chemoradiation Paradigm-General Principles. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 86-100.

119 - John MJ. Radiotherapy and Chemotherapy. In: Leibel SA, Phillips TL, eds. *Textbook of Radiation Oncology*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 2004: 77-100.

120-Levenson AS, Jordan CV. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. 1997, *Cancer Res* 57:3071–3078

121-Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. 1973, *J Natl Cancer Inst* 51:1409–1416

122- Dujin Zhou, Denis Pompon, and Shiuan Chen. Stable Expression of Human Aromatase Complementary DNA in Mammalian Cells: A Useful System for Aromatase Inhibitor Screening; 1990, *Cancer Research* 50. 6949-6954.

123-Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM: Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86:527-537.

124- Fisher B, Dignam J, Bryant J, Wolmark N: Five versus more than five years of tamoxifen for lymph node-negative breast cancer: updated findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93:684-690

125- Ali S, Coombes RC: Endocrine-responsive cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* 2002 2:101-115

126- Nicholson RI, Hucheson IR, Hiscox SE, Knowlden JM, Giles M, Barrow D, Gee JM: Growth factor signalling and resistance to selective oestrogen receptor

modulators and pure anti-oestrogens: the use of antigrowth factor therapies to treat or delay endocrine resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005, 12:S29-S36.

127-Thuerlimann B, Koeberle D, Senn H: Guidelines for the adjuvant treatment of postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: Past, present and future recommendations. *Eur J Cancer* 2007, 43:46-52.

128- Perez EA: Appraising Adjuvant Aromatase Inhibitor Therapy. *Oncologist* 2006, 11:1058-1069.

129- Barron-Gonzalez, A., Arias-Martinez, J., Castro-Romero, I.: Antiestrogens: Mechanism of Action and Clinical Applications. 2001, *Salud Publica de Mexico* 43, 577-584.

130- Thintanawat, A., Long, B. J., Brodie, A. M.: Signaling Pathways of Apoptoz by Aromatase Inhibitors and Antiestrogens, 2003, *Cancer Research* 63, 8037-8050.

131-Truchet I, Jozan S, Guerrin M, Mazzolini L, Vidal S, Valette A: Interconnections between E2-dependent regulation of cell cycle progression and apoptoz in MCF-7 tumors growing on nude mice. *Exp Cell Res* 2000, 254(2):241-248.

132-Thiantanawat A, Long BJ, Brodie AM: Signaling pathways of apoptoz activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* 2003, 63(22):8037-8050

133-Obrero M, Yu DV, Shapiro DJ: Estrogen receptor-dependent and estrogen receptor-independent pathways for tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen-induced programmed cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(47):45695-45703.

134- Margarida Cepa, Georgina Correia-da-Silva, Elisiário J Tavares da Silva, Fernanda MF Roleira, Margarida Borges and Natércia A Teixeira New steroidal aromatase inhibitors: Suppression of estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and induction of cell death, BMC Cell Biology 2008, 9:41

135-Osborne CK, Boldt DH, Clark GM, Trent JM: Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase. Cancer Res 1983, 43:3583-3585.

136-Jänicke RU, Sprengart ML, Wati WR, Porter A: Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptoz. J Biol Chem 1998,273(16):9357-9360.

137- Mooney LM, Al-Sakkaf KA, Brown BL, Dobson PRM: Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells.

138-Cui Q, Tashiro S, Onodera S, Minami M, Ikejima T: Autophagy preceded apoptoz in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells. Biol Pharm Bull 2007, 30(5):859-864

139- Altınok A, Beşe N, Özşahin M, Yıldırım Ş. ve ark; Aromataz inhibitörlerinin radyoterapi ile eşzamanlı kullanımının akciğer fibrozisi üzerine etkileri; 8. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, Program, Bildiri ve Konuşma Özetleri Kitabı; Sözel Bildiriler no:5 , Ref:149 S:70

EK-1 ETİK KURUL ONAYI

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2010/ 05-35	Tarih:23.06.2010				
	Prof.Dr.İlknur Bilkay GÖRKEN'in proje yöneticisi olduğu Dr. Dr.Burcu Durmak İŞMAN sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Radyoterapi ile eş zamanlı letrozol kullanımının radyoduyarlayıcı etkisinin invitro gösterilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	DEU Girişimsel (İnvaziv) Olmayan Klinik Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu Yönergesi , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof. Dr. Ayşegül YILDIZ (Başkan)	Psikiyatri	DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Dr.Ecz.İskender İNCE (Başkan yardımcısı)	Eczacı	Ege Üniversitesi ARGEFAR	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D..Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Derya ERÇAL	Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Hülya ELLİDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Prevatif Onkoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç Dr.Yeşim ÖZTÜRK	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Av. Tayfun OZANKAYA	Hukuk	Serbest	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı

* Girişimsel (İnvaziv) Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu Karar Formu

EK-2

ÇIKAR İLİŞKİSİ BELGESİ

Novartis ilaç firması ile karşılıklı olarak çıkar ilişkisi bulunmadığına dair belge imzalanmış ve etik kurul onayına sunulmuştur.