

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**α -CHACONİNE VE α -SOLANİNE'İN ANTİKANSEROJEN
ETKİLERİNİN RL95-2 HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Ecz. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN**

**Danışman
Doç. Dr. M. Betül AYCAN**

Doktora Tezi

**Mayıs 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**α -CHACONİNE VE α -SOLANİNE'İN ANTİKANSEROJEN
ETKİLERİNİN RL95-2 HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Ecz. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN**

**Danışman
Doç. Dr. M. Betül AYCAN**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TDK-2014-5446 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

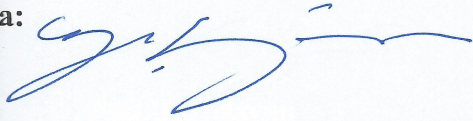
**Mayıs 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

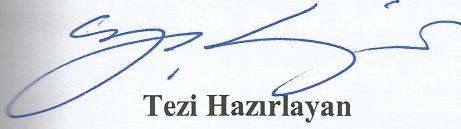
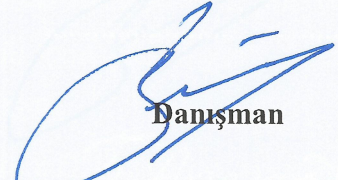
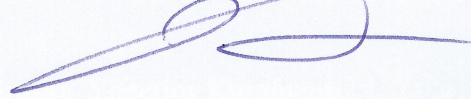
Ecz. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN

İmza:



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

" α -Chaconine ve α -Solanine'in Antikanserojen Etkilerinin RL95-2 Hücrelerinde Araştırılması" adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

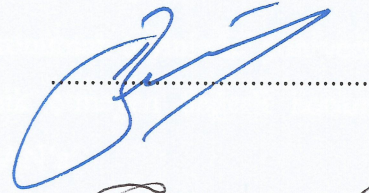
**Tezi Hazırlayan****Ecz. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN****Danışman****Doç. Dr. Mükerrerem Betül AYCAN****Farmakoloji Ana Bilim Dalı Başkanı****Yrd. Doç. Dr. Zafer SEZER**

Doç. Dr. M. Betül AYCAN danışmanlığında **Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN** tarafından hazırlanan “ α -Chaconine ve α -Solanine’in Antikanserojen Etkilerinin RL95-2 Hücrelerinde Araştırılması” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Ana Bilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

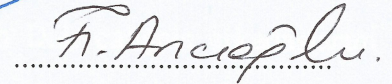
18.../5/...17

JÜRİ**İmza**

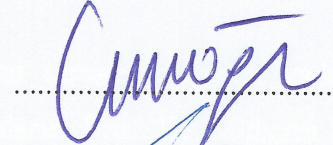
Danışman : Doç. Dr. M. Betül AYCAN
(Tıbbi Farmakoloji ABD)



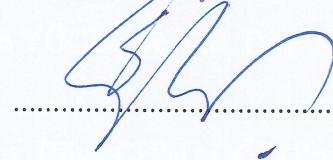
Üye : Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
(Farmakoloji ABD)



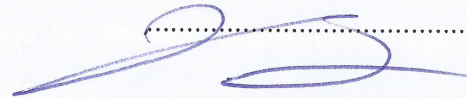
Üye : Doç. Dr. Ahmet CUMAOĞLU
(Biyokimya ABD)



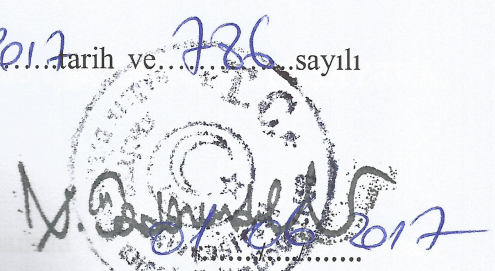
Üye : Doç. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT
(Farmakoloji ABD)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Zafer SEZER
(Tıbbi Farmakoloji ABD)


ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 01.06.2017 tarih ve 726 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın tamamlanmasındaki değerli katkılara değinmeden önce, bu uzun süre boyunca yaşamış olduğum tüm sıkıntılı durumlara rağmen, benim için tecrübe dolu, öğretici, heyecan verici ve fikir üretici bir süreç olduğunu belirtmek isterim. Bu uzun süreçte farklı biçimlerde yardımda bulunan herkese teşekkür ederim. Umarım bu çalışma, konuyla ilgili yapılacak olan araştırmalara ışık tutar.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince, tez konumun tayininde, yön verilmesinde ve tamamlanmasında bilgi ve tecrübelerini eksik etmeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mükerrerem Betül AYCAN'a,

Yardımlarını eksik etmeyen Farmakoloji Ana Bilim Dalı çalışma arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Eren DEMİRPOLAT ve tüm çalışma aşamalarımda yanımda olan Arş. Gör. Ebru ÖZTÜRK'e,

Öğrenciliğimin başlama döneminden tez çalışmamın tamamlanmasına kadar geçen sürede bilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Müberra KOŞAR, Doç. Dr. Ahmet CUMAOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Çiğdem YÜCEL ve Yrd. Doç. Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK'a

Arkadaşlarım Dr. Canan ASLAN TORÇUK ve Dr. Ecz. Bilge CUMAOĞLU'na,

2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı bursiyeri olduğum TÜBİTAK'a,

Tez çalışmamı TDK-2014-5446 kodlu proje ile finansal olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Yardımlarını esirgemeyen ve desteğini her zaman özveri ile gösteren Emine TÜRK'e, Desteğiyle beni hiç yalnız bırakmayan canım arkadaşlarım Arş. Gör. Esra KÖNGÜL ve Arş. Gör. Aysun ÖKÇESİZ'e

Manevi varlığıyla her zaman yanımda olan aziz dostum Öğr. Gör. Leyla PAŞAYEVA ve eşi Öğr. Gör. Hanefi FETULLAYEV'a,

Sevgili kardeşim Taha Çağrıhan KARABOĞA'ya,

Hayatım boyunca arkamda duran, bugünlere ulaşmamda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden her daim yararlandığım, hayattaki başarıları ve saygın yerleri ile örnek aldığım ve ailem olmasından gurur duyduğum; sevgili annem Prof. Dr. Nurhan KARABOĞA ve babam Prof. Dr. Derviş KARABOĞA'ya,

Doktora çalışmam suresince sabırla yanımda olup desteğiyle her daim cesaret veren ve imkân sunan, fedakrlıklarının değerini kelimelerle ifade edemeyeceğim değerli hayat arkadaşım, sevgili eşim Ecz. Uğur ARSLAN'a ve doktora surecimde birlikte geçireceğimiz zamanlar biraz da olsa azalmasın diye çabalasam da her zaman vicdanen borçlu olduğumu bildiğim canım oğlum Yavuz Arel ARSLAN'a, Bütün kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

Ayşe Kübra KARABOğA ARSLAN

Kayseri, Mayıs 2017

α -CHACONİNE ve α -SOLANİNE’İN ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN RL95-2 HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Ecz. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı
Doktora Tezi, Mayıs 2017
Danışman: Doç. Dr. M. Betül AYCAN**

KISA ÖZET

Endometriyum kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türlerinden olup genellikle adenokarsinomdur. Endometriyum kanserinin gelişim ve ilerlemesindeki moleküler yollarının araştırılması, bu hastalık süreci hakkındaki bilginin artırılmasını sağlayarak hastalar için yeni, etkili tedavi seçeneklerinin keşfedilmesine yol açacaktır. Bundan dolayı bu tez çalışmasında *Solanum tuberosum*’da (patates) bulunan majör glikoalkaloitlerden α -chaconine ve α -solanine’in RL95-2 östrojen reseptör pozitif endometriyum kanser hücresinde antikanser etki potansiyellerinin ve kanser ilişkili Akt yolağı ve östrojen reseptör alfa (ER α) ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada α -chaconine ve α -solanine’in hücre canlılığına etkili dozları Sülförodamin B (SRB) testi ile belirlendi, farklı dozlarının hücre büyüme eğrisi üzerinde etki profilleri; elde edilen eğri profillerinden etki mekanizması hakkında fikir sahibi olabildiğimiz gerçek zamanlı hücre analizörü (RTCA) sistemi ile değerlendirildi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı. Tüm deneylerde maddelerin Akt yolağı ile ilişkisi Akt inhibitörü API-1 ile östrojen reseptör (ER) ile ilişkisi ise ER α

inhibitörü MPP dihidroklorür ile karşılaştırılarak ortaya konmuştur. Ayrıca Akt ve p-Akt ile ER α ve p-ER α protein ifadeleri western blot yöntemi aracılığıyla Akt ve ER α mRNA ifadeleri qPCR yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin migrasyon yeteneği üzerine etkileri ise migrasyon kiti ile değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, RL95-2 insan endometriyum kanseri hücrelerinde α -chaconine ve α -solanine’in Akt sinyal yolağını inhibe ettiği ve ER α aktivitesini ve ifadenmesini azalttığı, dolayısıyla hücre proliferasyonunu baskılayıcı etkisi ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca, RL95-2 hücrelerinde, RTCA ile büyüme profil eğrilerinin oluşturulması; α -chaconine ve α -solanine’in bu eğriler üzerindeki etkileri; RL95-2 hücrelerinde bu maddeler için IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi; hücre migrasyonuna etkilerinin gösterilmesi de yine ilk kez bu tez çalışması ile ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: α -chaconine, α -solanine, Akt, ER α , RL95-2, xCELLigence (RTCA)

**INVESTIGATION of ANTICARCINOGENIC EFFECTS of
 α -CHACONINE and α -SOLANINE in RL95-2 CELLS**

Pharm. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN
Erciyes University, Institute of Health Sciences
Department of Pharmacology
Doctorate Thesis, May 2017
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. M. Betül AYCAN

ABSTRACT

Endometrium cancer which is usually an adenocarcinoma is one of the most common cancer types in women in the World. Investigation of the molecular mechanisms underlying the development and progress, increases the knowledge about the disease and thus will lead to explore effective therapeutic alternatives. Therefore, in this thesis the potential anticancer effects of two major glycoalkaloids of *Solanum tuberosum*; α -chaconine and α -solanine in RL95-2 estrogen receptor positive endometrium cancer cell line and the relations to the Akt and estrogen receptor alpha (ER α) have been investigated.

In this thesis the effects of α -chaconine and α -solanine in cell viability is determined via Sulphorhodamine B (SRB) test and the action profiles of different concentrations on cell growth curves have been evaluated via real time cell analyzer (RTCA) system where we can gain an idea about the action of mechanism from this profiles and the IC₅₀ values have been calculated. Through all experiments the relation of the compounds with Akt pathway has been manifested via comparing with Akt inhibitor API-1 and with ER α via comparing with ER α inhibitor MPP dihydrochloride. Furthermore, Akt and p-Akt; ER α and p-ER α protein expressions were shown by using western blotting and Akt, and ER α mRNA expressions by qPCR. The effects of the compounds on cell migration were evaluated by migration kit.

In conclusion, the inhibitory effects of α -chaconine and α -solanine on Akt signalling pathway and ER α expression and activity and therefore suppressive effects of the compounds on cell proliferation have been investigated by this study for the first time. Furthermore, the cell growth curve profiles of the RL95-2 cell lines and the effects of α -chaconine and α -solanine on these curves; the calculation of IC₅₀ of the compounds on RL95-2 cell lines; the effects of the compounds on the migration of this cells are firstly manifested by this study.

Keywords: α -chaconine, α -solanine, Akt, ER α , RL95-2, xCELLigence (RTCA)

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
KISA ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Endometriyum Kanseri	4
2.1.1. Genel Bilgi	4
2.1.2. İnsidans ve Epidemiyolojisi	7
2.1.3. Endometriyum Kanserinin Patolojik Sınıflandırması	9
2.1.3.1. Teşhis.....	9
2.1.3.2. Histopatolojik Özellikler	9
2.1.3.3. Evrelendirme ve Risk Değerlendirmesi.....	10
2.1.4. Endometriyum Kanseri Tedavisi.....	11
2.1.4.1. Cerrahi Tedavi.....	11
2.1.4.2. Primer ve Adjuvan Radyoterapi.....	12
2.1.4.3. Adjuvan Kemoterapi	12
2.1.4.4. Adjuvan Hormon Tedavisi.....	12
2.1.4.5. Kombine Radyoterapi-Kemoterapi	12
2.1.5. Lokal Bölgesel Rekürrens	12

2.1.6. İleri Dönem Hastalık	12
2.1.7. Metastatik Hastalık ve Nüksü	13
2.1.8. Prognoz	13
2.1.9. Takip ve Uzun Vadeli Etkiler	13
2.1.10. Kısa ve Uzun Vadeli Sağlığa Etkileri	13
2.1.11. Endometriyum Kanserlerin Moleküler Temeli	14
2.1.11.1. Tip 1 Endometriyal Kanserdeki Genetik Değişiklikler	14
2.1.11.2. Tip 2 Endometriyal Kanserdeki Genetik Değişiklikler	16
2.1.11.3. Hedefe Yönelik Tedaviler.....	16
2.2. Östrojenler	18
2.2.1. Östrojen Kimyası, Biyosentezi, ve Etki Mekanizması	18
2.2.2. Östrojen Reseptörleri ve Sinyal İleti Yolları.....	21
2.2.3. Östrojenin Endometriyum Kanserindeki Rolü.....	23
2.2.4. Östrojen Reseptör Alfa (ER α) Blokörü MPP Dihidroklörür ve Biyolojik Aktivitesi.....	24
2.3. Akt B Proteini.....	25
2.3.1. Akt İnhibitörü API-1 ve Biyolojik Aktivitesi	25
2.4. Steroidal Glikoalkaloitler: α -Chaconine ve α -Solanine	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	35
3.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	35
3.2. Deneylerde Kullanılan Gereçler	36
3.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	36
3.4. RL95-2 Hücre Hattı Ve Kültürü Hakkında Bilgi	40
3.5. GZHA Büyüme Profili Deneyi.....	42
3.6. RL95-2 Hücresindeki Sitotoksik Etkinin Sülforodamin B (SRB) Deneyi ile Belirlenmesi ve IC ₅₀ Hesaplanması.....	46
3.7. GZHA Canlılık Deneyi	49
3.8. Deney Grupları	50
3.9. BCA ile Protein Miktar Tayini	51

3.10. Western Blot Deneyi.....	53
3.10.1. Protein İzolasyonu	55
3.10.2. Poliakrilamit Jelin Hazırlanması ve Dökülmesi.....	57
3.10.3. Örneklerin Yüklenmek Üzere Hazırlanması.....	58
3.10.3. Elektroforezin Yapılması	60
3.10.4. Proteinlerin Membrana Transferi	61
3.10.5. Blokaj.....	62
3.10.6. Membranların Primer ve Sekonder Antikor ile İnkübasyonu	62
3.10.7. Görüntüleme İşlemi	62
3.11. RNA İzolasyonu, Revers Transkripsiyon ile cDNA Oluşturulması ve qPCR Deneyi.....	64
3.11.1. RNA İzolasyonu ve Absorbsiyon Spektroskopisi ile RNA Örneklerinin Ölçülmesi	71
3.11.2. RNA'dan cDNA Elde Edilmesi	72
3.11.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)	73
3.12. Hücre Migrasyon Deneyi	74
3.12.1. Deney Esası.....	75
3.12.2. Kit İçeriği.....	76
3.12.3. Deney Prosedürü	76
3.13. İstatistiksel Analizler	77
4. BULGULAR	78
4.1. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (GZHA) Deney Sonuçları.....	78
4.2.1. Genel Doz Tarama SRB Deneyi Sonuçları.....	80
4.2.2. SRB Deneyi Sonuçları.....	83
4.3. GZHA Canlılık Deney Sonuçları	88
4.4. BCA ile Protein Miktar Tayin Sonuçları	91
4.5. Western Blot Deney Sonuçları	91
4.6. RNA İzolasyonu ve qPCR Deney Sonuçları.....	96

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	100
6. KAYNAKLAR	111
ÖZGEÇMİŞ	122

KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
4T1	: Fare meme karsinoma hücre hattı
Akt	: Protein kinaz B
ANOVA	: Varyans analizi
APS	: Amonyum persülfat
ATCC	: Amerikan tipi kültür koleksiyonu
BKİ	: Beden kitle indeksi
BSA	: Sığır serum albumini
CDK1	: Siklin-bağımlı kinaz 1
cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
Ct	: Döngü eşiği
CT	: Bilgisayarlı tomografi
CTNNB1	: β-katenin geni
D&C	: Dilatasyon ve küretaj
DMEM:F12	: Dulbecco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotit trifosfat
Dsh	: Dishevelled
DTT	: Ditiyotritol
ECM	: Ekstrasellüler matriks
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	: Enzime bağlı immünosorban yöntemi

ERα	: Östrojen reseptör alfa
ERβ	: Östrojen reseptör beta
ERE	: Östrojen cevap elemanı
ERK1/2	: Hücre dışı sinyal ile düzenlenen protein kinaz
FBS	: Fetal sığır serum
FGFR2	: Fibroblast büyüme faktörü reseptör 2
FIGO	: Uluslararası jinekoloji ve obstetrik federasyonu
FR-α	: Folat reseptör alfa
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
g	: Gram
GAME	: Glikoalkaloit metabolizma enzimleri
GBG	: Gonadal steroid bağlayıcı globülin
GZHA	: Gerçek zamanlı hücre analizi
HepG₂	: İnsan hepatokarsinoma hücre hattı
HMGR	: 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A redüktaz
HRT	: Hormon replasman tedavisi
HuH-7	: İnsan hepatosellüler karsinoma hücre hattı
IC₅₀	: İnhibitör konsantrasyon %50
ICD	: Hastalıkların ve İlgili Sağlık Sorunlarının Uluslararası İstatistiksel Sınıflandırılması
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
LH	: Luteinleştirici hormon
M	: Molar
mA	: Miliamper
MA	: Moleküler ağırlık
MAPK	: Mitojen-aktive protein kinaz

MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
MGA	: Megestrol asetat
MPA	: Medroksiprogesteron asetat
MPP	: Metil-piperidinopirazol
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
mTOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
NaCl	: Sodyum klorür
N	: Normalite
OD	: Optik dansite
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PK1	: Fosfoinozidit bağımlı kinaz 1
PH	: Plekstrin homoloji
PI3K	: Fosfoinozidit 3-kinaz
PI3KA	: Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit α
PIP2	: Fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat
PIP3	: Fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat
PKB	: Protein kinaz B
PPT	: 4,4',4''-(4-Propil-[1H]-pirazol-1,3,5-triil)trisfenol
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
PVDF	: Polivinilidenflorür
qPCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon
RL95-2	: İnsan endometriyum kanser hücre hattı
RNA	: Ribonükleik asit

RNAaz	: Ribonükleik asit sentaz
RT	: Revers transkriptaz
SGC-7901	: İnsan gastrik karsinoma hücre hattı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SGA	: Steroidal glikoalkoloit
SGT	: Solanidine glikoziltransferaz
SMT1	: S-adenozil-l-metiyonin sterol:C24-metil transferaz tip 1
SQS	: Skualen sentaz
TBS	: Tris tamponlu salin
TBST	: Tris tamponlu salin tween
TEMED	: N,N,N,N'-Tetrametil-etilendiamin
V	: Voltaj
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Endometriyal kanser evrelendirilmesi (FIGO: 2009).....	11
Tablo 2.2. Tip 1 ve 2 endometriyal kanserde genetik değişiklikler ve mutasyonların yüzde sıklığı	14
Tablo 2.3. Çeşitli patates bitki parçalarında glikoalkaloit konsantrasyonları.....	30
Tablo 2.4. Western blot yöntemi için kullanılan primer ve sekonder antikorlar	54
Tablo 3.1. RIPA lizis tampon sistemi içeriği ve RIPA lizis tamponu.....	57
Tablo 3.2. Yığılmalı ve ayırıcı jel çözeltileri içerikleri	57
Tablo 3.3. Western blot deney gruplarının kuyulara yüklenme sırası	59
Tablo 3.4. cDNA sentezinde kullanılan maddeler ve 1 reaksiyon için gerekli miktarları	72
Tablo 3.5. Hedef genlerin amplifikasyonu için kullanılan primerler dizileri.....	73
Tablo 3.6. qPCR tepkime karışımı	74
Tablo 3.7. RL95-2 hücrelerinin 24 sa.'lik IC ₅₀ değerleri	87
Tablo 3.8. RL95-2 hücre lizatında protein miktarları ve jele yüklenen örnek hacimleri.....	91
Tablo 3.9. RNA izolasyonu sonucu örneklerin konsantrasyon ve saflık verileri	96

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Hücre döngüsü	5
Şekil 1.2. Korpus uterinin anatomik bölgeleri ve alt bölgeleri	7
Şekil 2.1. Tip 1 endometriyal kanserin moleküler temeli	15
Şekil 2.2. Tip 2 endometriyal kanserin moleküler temeli	16
Şekil 2.3. Endometriyal kanser tedavisinde hedeflenen hücresel yollar.....	17
Şekil 2.4. Adrenal korteks ve gonad steroidlerinin temel yapısı.....	19
Şekil 2.5. Östrojenlerin biyosentezi ve metabolizması.....	20
Şekil 2.6. E ₂ 'nin hedef hücreler üzerindeki hızlı, orta ve uzun vadeli etkileri arasındaki ilişkiyi gösteren şematik model	23
Şekil 2.7. MPP dihidroklorürün 2D molekül yapısı	24
Şekil 2.8. API-1'in 2D molekül yapısı	25
Şekil 2.9. PI3K/Akt/mTOR yolağına genel bakış ve endometriyal kansere ilişkin diğer yollarla ilişkisi	27
Şekil 2.10. <i>Solanum tuberosum</i> L.....	28
Şekil 2.11. Solanaceae türlerinde steroid glikoalkaloitlerin biyosentezi	29
Şekil 2.12. α -Chaconine'in molekül yapısı.....	31
Şekil 2.13. α -Solanine'in molekül yapısı.....	31
Şekil 2.14. Glikoalkaloit ile indüklenen membran harabiyetinin mekanizması	32
Şekil 2.15. α -Chaconine ve α -solanine glikoalkaloitlerinin yapısal ilişkileri	33
Şekil 3.1. Gerçek zamanlı hücre analiz cihazı	42
Şekil 3.2. 96 kuyulu e-plaka.....	43
Şekil 3.3. CI hesaplama formülü	43
Şekil 3.4. Hücresel empedansa genel bakış	44
Şekil 3.5. Hücresel empedansın hücreyle ilişkili olarak değişimi.....	44
Şekil 3.6. Genel bir apoptoz deneyi için gerçek zamanlı empedans izi değişimi	45
Şekil 3.7. Sülförodamin B'nin 2D kimyasal yapısı	47
Şekil 3.8. SRB deney prosedürü.....	47
Şekil 3.9. BCA protein tayin yöntemi mekanizması	52
Şekil 3.10. Western blot aşamaları	55

Şekil 3.11. Proteinlerin SDS bağlanması sonucu denatürasyonu.....	56
Şekil 3.12. Western blot jel dökme aparatı, elektroforez tankı ve güç kaynağı.....	57
Şekil 3.13. Western blotta jel polimerizasyonu.....	58
Şekil 3.14. Western blotta örneklerin kuyulara yüklenmesi	59
Şekil 3.15. Geniş aralıklı çok renkli protein merdiveninin SDS-PAGE bant profili	60
Şekil 3.16. Western blotta elektroforeze genel bir bakış	60
Şekil 3.17. Western blot transfer tankı ve aparatları	61
Şekil 3.18. Western blot transfer tankı ve transfer sandviçi hazırlanması.....	62
Şekil 3.19. Western blot görüntüleme işleminde kimyasal ışımanın mekanizması-I.....	63
Şekil 3.20. Western blot görüntüleme işleminde kimyasal ışımanın mekanizması-II ...	64
Şekil 3.21. Polimeraz zincir reaksiyonunun temel basamakları.....	66
Şekil 3.22. SYBR Green boyasının çalışma prensibi	67
Şekil 3.23. Hidroliz prob ışıma mekanizması	68
Şekil 3.24. qPCR deney basamakları.....	69
Şekil 3.25. mRNA'dan cDNA sentezinin şematik gösterimi.....	70
Şekil 3.26. Thermal cycler cihazı	73
Şekil 3.27. Roche LightCycler® 480 Instrument II qPCR cihazı	74
Şekil 3.28. Migrasyon kiti deney prensibi	77
Şekil 4.1. RL95-2 hücreleri büyüme profili e-plakaya ekim şeması	78
Şekil 4.2. E-Plakaya ekimi yapılan RL95-2 hücrelerinin 96 sa. verileri	79
Şekil 4.3. E-plakaya ekimi yapılan RL95-2 hücrelerinin 48 sa. hücre indeksi verileri..	79
Şekil 4.4. RL95-2 hücrelerine ait API-1 genel doz tarama SRB deneyi sonuçları	80
Şekil 4.5. RL95-2 hücrelerine ait MPP dihidroklorür genel doz tarama SRB deneyi sonuçları	81
Şekil 4.6. RL95-2 hücrelerine ait α -chaconine genel doz tarama SRB deneyi sonuçları	82
Şekil 4.7. RL95-2 hücrelerine ait α -solanine genel doz tarama SRB deneyi sonuçları..	83
Şekil 4.8. RL95-2 hücrelerine ait API-1 SRB deney sonuçları.....	84
Şekil 4.9. RL95-2 hücrelerine ait MPP dihidroklorür SRB deney sonuçları.....	85
Şekil 4.10. RL95-2 hücrelerine ait α -chaconine SRB deney sonuçları	86
Şekil 4.11. RL95-2 hücrelerine ait α -solanine SRB deney sonuçları	87
Şekil 4.12. API-1 uygulanmasından sonraki ilk 24. sa. hücre indeksi verileri	88
Şekil 4.13. MPP dihidroklorür uygulanmasından sonraki ilk 24. sa. hücre indeksi verileri	88

Şekil 4.14. α -Chaconine uygulanmasından sonraki ilk 24. sa. hücre indeksi verileri	89
Şekil 4.15. α -Solanine uygulanmasından sonraki ilk 24. sa. hücre indeksi verileri	89
Şekil 4.16. RL95-2 hücrelerinde maddelerin uygulanmasından sonraki 24. sa. hücre indeksi verileri	90
Şekil 4.17. α -Chaconine ve α -solanine uygulanmasından sonraki 24 sa.'lık IC_{50} değerleri.....	91
Şekil 4.18. RL95-2 hücrelerinde rölatif p-Akt (Ser473) protein düzeyi.....	92
Şekil 4.19. RL95-2 hücrelerinde p-Akt (Ser473)/Akt oranı	93
Şekil 4.20. RL95-2 hücrelerinde p-ER α protein düzeyi	94
Şekil 4.21. RL95-2 hücrelerinde p-ER α /ER α oranı	95
Şekil 4.22. RL95-2 hücrelerinde Akt, p-Akt, ER α , p-ER α ve β -aktin'in western blot analizi ile elde edilen görüntü bantları.	96
Şekil 4.23. RL95-2 hücrelerinde Akt'nin rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri	97
Şekil 4.24. RL95-2 hücrelerinde ER α 'nın rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri	98
Şekil 4.25. RL95-2 hücrelerinde migrasyon deneyi sonuçları.....	99

1. GİRİŞ VE AMAÇ

α -Chaconine ve α -solanine, *Solanum tuberosum* L. (patates) isimli bitkiden elde edilen ve çeşitli etkileri araştırılmakta olan toksik steroidal glikoalkaloitlerdir (1). α -Chaconine'in yan zinciri; bir glikoz ve iki ramnoz, α -solanine'in ise bir glikoz, bir galaktoz ve bir ramnoz şeker üniteleri içerir (2). Biyolojik aktiviteleri temel olarak iki özelliğe dayandığı düşünülmektedir. Bu glikoalkaloitler, asetilkolinesteraz ve bütirikolinesterazın inhibisyonu ve membran 3β -hidroksi steroller ile kompleksleşme; böylece membran bozulmasına ve membranın bütünlüğünün kaybolmasına neden olur (3).

α -Chaconine ve α -solanine'in farklı kanser türlerinde, hücredeki biyolojik süreçlere etkilerini gösteren *in vitro* (4-7) ve *in vivo* (8, 9) çalışmalar bulunmaktadır. Bu glikoalkaloitlerin, çeşitli kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ederek ve apoptozu indükleyerek oldukça güçlü etki gösterdikleri bildirilmiştir (7, 10-12). α -Chaconine ve α -solanine'in meme ve pankreas kanserinin *in vivo* ksenograft modellerinde, metastaz ve tümör anjiyogenez inhibisyonu yoluyla antitümör etkisi ile kanser riskinin azaldığı gösterilmiştir (8, 13). Terapötik potansiyeli, *in vitro* ve *in vivo* klinik öncesi araştırmalarda umut vaat etmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalar, α -chaconine ve α -solanine kullanımının kansere karşı koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

Steroidal glikoalkaloitlerin multipleks biyoaktivitelerinin ayrıntılı mekanizmaları henüz tam aydınlatılamamış olsa da, kanser tedavisi için başlıca moleküler hedefleri belirlenmiştir. α -Chaconine ve α -solanine'in PI3K/Akt/NF- κ B sinyal yolunu baskılayarak ve MMP-2/MMP-9 ekspresyonlarını azaltarak kanser hücrelerinin migrasyonunu ve invazyonunu engeller (7, 11-14). Ayrıca, steroidal alkaloitlerin

sitotoksik ajanlar ile kombine edildiğinde kemosenstizer olarak kemoterapinin etkinliğini artırmaktadır (15).

Endometriyum kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen jinekolojik hematolojik kanser olup genellikle adenokarsinomdur (16, 17). Tedavisinde karboplatin, sisplatin, dosetaksel, paklitaksel, topotekan ve iksabepilon mono ve kombine tedavide kullanılan aktif ajanlardır (18).

α -Chaconine ve α -solanine'in; akciğer (10), pankreas (13), cilt (12), prostat (19), servikal (5), karaciğer (20), lenfosit (21), mide (22), kolorektal (23) ve meme (22) kanser hücrelerinde etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır. Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda çoklu ilaç direncine sahip tümör hücrelerinde, steroidal alkaloidlerin kemoterapötik ilaçlarla kombine halde verilmesinin ilaç direncini aşmada etkili olduğu tespit edilmiştir (15).

Endometriyum kanserinde α -chaconine ve α -solanine'in etkili olup olmadığının ve muhtemel etki mekanizmalarının aydınlatılması, tedavide yeni terapötik stratejiler için moleküler hedeflerin belirlenmesine yardımcı olacaktır. Farklı bileşenleri hedefleyen yeni ajanların geliştirilmesi, moleküler hedefli tedavilerde tek başına veya kombine olarak tedavide kullanılmaya olanak sağlar. Endometriyum kanserinin gelişim ve ilerlemesindeki moleküler yollarının araştırılması, bu hastalık süreci hakkındaki doğru bilginin artırılmasını sağlayarak hastalar için yeni, üstün tedavi seçeneklerinin keşfedilmesine yol açacaktır. Bu nedenle, yukarıda yer verilen literatür bilgileri göz önünde bulundurularak planladığımız tez çalışmada; üzerinde daha önce ayrıntılı olarak moleküler mekanizmaları araştırılmamış östrojen reseptör pozitif bir endometriyum kanser hücre hattı olan RL95-2 seçilerek aşağıdaki unsurların aydınlatılması amaçlanmıştır:

- 1) Bu hücrelerde gerçek zamanlı büyüme profil eğrisinin ilk kez bu çalışma ile gösterilmesi,
- 2) Steroidal glikoalkaloit olan α -chaconine ve α -solanine'in RL95-2 hücrelerinde tek başına *in vitro* sitotoksik etkisi olup olmadığının ilk kez tespiti,
- 3) Bu glikoalkaloitlerin Akt ve ER α ekspresyonları üzerine etkilerinin ilk kez bu hücre hattında gösterilmesi,

- 4) Ayrıca kullanılan glikoalkaloitlerin RL95-2 hücresinin migrasyon yeteneğine olan etkilerinin yine ilk kez bu çalışma ile araştırılması amaçlanmıştır.

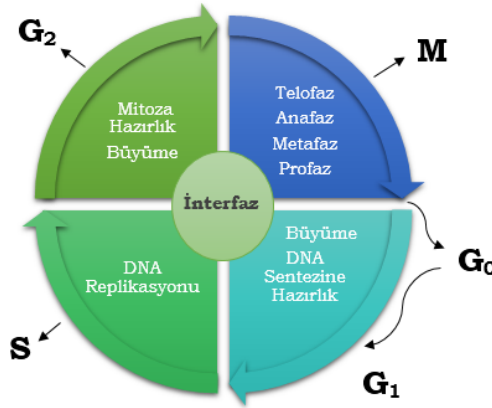
Böylece α -chaconine ve α -solanine'in RL95-2 hücrelerinde antikanser etki potansiyellerinin ve kanser ilişkili süreçlere etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endometriyum Kanseri

2.1.1. Genel Bilgi

Kanser, vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilecek geniş bir hastalık grubu için genel bir terimdir. Kanser için kullanılan diğer terimler malin tümörler ve neoplazmlardır. Kanser tanımıyla ilgili özelliklerinden biri, normal sınırlarının ötesinde çoğalan ve vücudun bitişik bölümlerine istila edebilen ve diğer organlara yayılabilen anormal hücrelerin hızla oluşmasıdır. Metastaz olarak adlandırılan bu son süreç kanserden ölümlerin önemli bir nedenidir (24). Hücre döngüsü düzenleme ve bölünmesinden sorumlu sinyal yollarının aktivitesinin bozulduğu, çok aşamalı bir süreç olan kanserde apoptoz inhibe olmuş ve proliferasyon artmıştır (25). Kanser her yaşta ve doku veya organda gelişebilir. Kanser hücresel ve moleküler temeline bakılırsa hücre kinetiğinin bilinmesi antineoplastik ilaçların tasarlanmasında oldukça önemli yere sahiptir. Çoğalma süresi, sessiz bir hücrenin hücre döngüsüne girmesi için gereken süre olup (Şekil 1.1) sonunda 2 hücre meydana gelir. Malin hücrelerin oluşum süresi benin hücrelere göre daha kısa olup hücrelerin az bir kısmı G_0 'a (dinlenme fazı) girer. Bundan dolayı çoğalma oranları hayli yüksektir. Başlangıçtaki eksponansiyel büyümeyi, ölen hücrelerin yeni hücre oluşum oranına eşitlendiği plato evresi takip eder (17).



Şekil 1.1. Hücre döngüsü

G₀: Dinlenme fazı; G₁: DNA replikasyonu öncesi değişken faz (12 sa.-birkaç gün); S: DNA replikasyonu (6-8 sa.); G₂:DNA replikasyonu sonrası hücre bölünmesine hazırlık için hücre büyümesi (2-4 sa.); M: Mitoz

Kanser hücreleri büyürken besinler doğrudan difüzyon ile dolaşımdan sağlanır ve lokal büyüme, komşu dokularda değişikliğe neden olan ya da komşu dokuları yok eden kollajenaz gibi enzimler ve sitokinler tarafından kolaylaştırılır. Hücre büyümesi arttığı zaman yüzey alanının hücre hacmine oranı küçülünce, hücrenin daha fazla büyümesi için gerekli olan bağımsız bir vasküler destek oluşumunu sağlayan tümör anjiyogenez faktörleri üretilir (17).

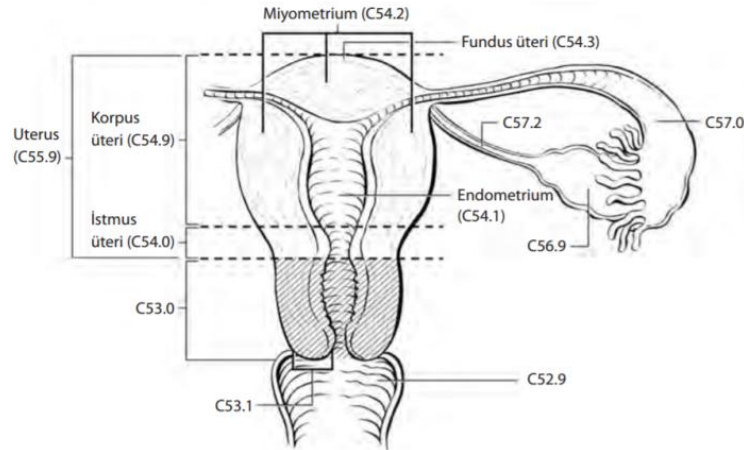
Endometriyum kanseri en sık rastlanan jinekolojik hematolojik kanser olup genellikle adenokarsinomdur (16, 17). Endometriyum kanser vakalarının %10'u kalıtsal iken yaklaşık %90'ı sporadiktir (16).

Uterus, internal servikal osun yukarısında kalır ve üst 2/3'lük kısım uterin korpus olarak adlandırılır ve şeklen armuda benzer (Şekil 1.2). Tubouterin orifisleri birbirine birleştiren çizginin üzerinde kalan uterus parçası uterin fundus olarak ve uterusun alt üçüncü parçası serviks olarak adlandırılır (16). Uterus dış kas tabakasına sahiptir; miyometrium; endometriyumu çevreleyen, bazal ve işlevsel bir tabakadan oluşmaktadır (26). Uterusa sınırlı varsayılan endometriyal kanser vakalarının yaklaşık %10'unda peritoneal sitoloji örneklerinde malin hücreler saptanmaktadır. Miyometrial invazyonun derinliği, tümörün derecesi ve ekstrauterin hastalık varlığı prognostik olarak anlamlıdır. Vajina ve akciğerler sıklıkla karşılaşılan metastatik bölgelerdir (27). Kanser

yayılması, uterus boşluğunun yüzeyinden servikal kanala; miyometriumdan seroza ve periton boşluğuna; fallop tüplerinden over, ligament ve periton yüzeylerine, dolaşım ile metastazlara yol açar veya lenfatikler yoluyla gerçekleşir (17).

Günümüzde endometriyal tümörigenezin ikili modeli 1983'te Bokhman tarafından hipotezi kurulan bir sınıflandırma sistemine dayanılarak, tip 1 ve tip 2 olarak adlandırılmaktadır (28). Bu model, kanserlerin hem etiyoloji hem de klinik davranış açısından kategorize edilmesinde faydalı bir yöntemdir ancak endometriyal kanserlerin minör bir kısmı ortak özellikler göstermesi nedeniyle tamamen doğru olmadığı belirtilmiştir (16). Tip 1 endometriyal kanser, sporadik endometriyal kanser vakalarının çoğunluğunu temsil eder ve yeni vakaların %70-80'ini oluşturur, tipik olarak endometrioid tipindedir ve östrojen maruziyeti ile ilişkilidir. Risk faktörleri, obezite, anovulasyon, nulliparite ve ekzojen östrojen maruziyetini içerir (28). Klinik olarak, tip 1 kanserler genellikle düşük-grade tümörler olup, olumlu bir prognoza sahiptir. Buna karşılık, tip 2 endometriyal kanser daha az yaygın olup endometriyal kanserlerin %10-20'sini oluşturur (29). Tip 2 endometriyal kanser östrojen maruziyeti ile ilgisiz olup hormonal risk faktörleri patogenezinde rol oynamaz ve tipik olarak atrofik endometriyumun arka planında ortaya çıkar (28).

Endometriyal kanser genellikle semptomatik olduğu için, sıklıkla I. evrede teşhis edilir. Tedavi geçmişine bakılırsa standart tedavide; histerektomi, bilateral salpingo-ooferektomi ve pelvik lenf nodu diseksiyonu, takiben de nihai histolojiye göre uyarlanmış adjuvan tedavi izlenir (30).



Şekil 1.2. Korpus uterinin anatomik bölgeleri ve alt bölgeleri (27)

ICD Kodları: C54.0 Isthmus uteri C54.1 Endometriyum C54.2 Miyometrium C54.3 Fundus uteri C54.8 Korpus uterinin çıkışan lezyonları C54.9 Korpus uteri C55.9 Uterus, NOS

2.1.2. İnsidans ve Epidemiyolojisi

Kanser, 2015 yılında 8,8 milyon ölümle dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir. Genel olarak, altı ölümün yaklaşık biri kanserden dolayıdır. Ölümlerin yaklaşık %70'i düşük ve orta gelirli ülkelerde gerçekleşmektedir ve yaklaşık 1/3'ü yüksek beden kitle indeksi (BKİ), düşük meyve ve sebze tüketimi, fiziksel aktivite eksikliği, tütün kullanımı ve alkol kullanımı olmak üzere davranışsal ve diyetle ilgili başlıca risklerden kaynaklanmaktadır. Tütün kullanımı kanser için en önemli risk faktörüdür ve kanser ölümlerinin yaklaşık %22'sinden sorumludur. Yeni vaka sayısının önümüzdeki 20 yıl içinde yaklaşık %70 artması beklenmektedir (24).

Endometriyal kanser, 2012 yılında dünyada kadınlarda 5. en sık rastlanılan kanser türü olup bu hastalığa yakalanma riski 75 yaşına kadar yükselmektedir. 2012'de dünya çapında 320.000 yeni endometriyal kanser vakası teşhisi konulmuştur. Mortalitesine bakılırsa 76.000 ölüm ile 14. sırada yer almaktadır (30).

Türkiye'de endometriyum kanseri 2012 yılı verilerine bakılırsa non melanoma deri kanserleri hariç diğer kanser türleri arasında, kadınlarda 5. en sık görülen kanser türüdür ve 15 yaş üstü için insidans ve mortalite verileri sırasıyla 3.787 ve 951 olup 5 yıllık prevalansı 13.987'dir (31).

Kanserin ekonomik etkisi oldukça önemli bir şekilde artmaktadır. Kanserin toplam yıllık ekonomik maliyetinin 2010 yılında yaklaşık 1.16 trilyon US \$ olduğu tahmin edilmektedir (32).

Endometriyal kanser teşhisi konan hastaların yaklaşık %30'u 54 yaşın altındakiler olup yaklaşık %9'u 44 yaşın altında ve %20'si 45-54 yaş arasındadır. Bu nedenle, endometriyal kanser tedavi yönetiminde fertilite koruyucu yaklaşımlar ile kadınları özenle seçmek zorunludur. Non invaziv, evre I endometriyal kanserlere sahip olan ve bir gebelik elde etme şansı olan hastalar doğurganlık koruyucu tedaviler için ideal adaydır. Bu tedaviler için hastaların seçilmesi için kılavuzlar bulunmamakla birlikte, invaziv tümörler ve metastatik hastalığa karşı yapılan değerlendirme önemlidir (33).

Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da endometriyal kanser insidansı artışı, nüfusun yaşlanmasının yanı sıra bu bölgelerdeki obezite ve metabolik sendromun genel yaygınlığı ile ilişkilendirilmektedir (30). Endometriyal kanserin çoklu risk faktörü olarak obezite, uzun süreli endojen veya ekzojen hiperöstrojenizm (polikistik over, tamoksifen tedavisi, anovulasyon, nulliparite, düzensiz menstrüel siklus), hipertansiyon, diabetes mellitus tanımlanmıştır (34, 33). Endometriyal kanserin oluşma riski, 45 yaşın altındaki BKİ'yi 35'ten büyük olan kadınlarda 22 kat artabilir. Uzun dönem (10 yıl kadar) östrojen ve progestin hormon replasman tedavisinin (HRT) kullanımı endometriyal karsinomu gelişme riskini artırmaktadır. Dış kaynaklı östrojen kullanımını, kombine östrojen-progesteron müstahzarlarını kullanan kadınlarda, kullanmayanlara göre 2-3 kat artmış postmenopozal endometriyum kanser riski ile ilişkilidir. HRT kullanımı düşünülen hastalar, riskler ve faydalar hakkında dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. Tedaviye başlatma kararı verilirse, daha önce histerektomi uygulanmamış kadınlara, endometriyal kanser gelişme riskini en aza indirmek için kombine bir tedavi uygulanmalıdır (33).

Buna ek olarak, endometriyal kanserlerin %5 kadarı Lynch sendromu tip II (kalıtsal polipozis dışı kolorektal kanser) ile ilişkilidir ve bu sendromu olanların yaşam boyu endometriyum kanseri gelişme riski %30 ile %60 arasındadır. Kombine oral kontraseptiflerin kullanılması, menopoz öncesi ve perimenopozal kadınlarda endometriyum kanser insidansını azaltarak endometriyum neoplazisi riskini azalttığına dair artan kanıtlar bulunmaktadır (34). Levonorgestrel salan bir intrauterin sistemin,

endometrial malin transformasyona karşı koruyucu bir etkiye sahip olabileceği literatürde yer almaktadır (35).

2.1.3. Endometriyum Kanserinin Patolojik Sınıflandırması

2.1.3.1. Teşhis

Anormal uterin kanama endometriyum kanserli vakaların %90'ında semptom olduğundan endometriyum kanseri vakalarının çoğu erken evrede teşhis edilir (34).

Endometriyum kanseri için temel inceleme metodu olarak önceden dilatasyon ve küretaj (D&C) uygulanırdı. D&C'nin doğruluğunu sınırlandıran, yanlış-negatif oranlarının yaklaşık %10 gibi yüksek olduğunu bildiren çeşitli yayınlardır. Günümüzde ise endometrial biyopsi, vajinal ultrason tarama ve histeroskopi ile minimal invaziv muayeneler konusuna eğilim vardır. Endometrial örneklemede kullanılan Pipelle veya Vabra cihazları, endometriyum karsinomasının tespiti için çok hassas tekniklerdir (%99,6 ve %97,1). Yeni bir araştırma, endometrial kanserin tanısı yolundaki ilk basamağın, 3 veya 4 mm'lik bir cut-off noktası kullanarak endometrial kalınlığın ölçülmesini ve takiben endometrial örnekleme yapılmasını önermektedir. Fokal ve yaygın patolojileri ayırt etmek için salin infüzyon sonografisi kullanılabilir. Eğer gerekirse, biyopsi ile histeroskopi, postmenopozal kanamalı kadınların tanı yolunda son adım olarak kullanılmalıdır ve histeroskopi endometriyum kanseri teşhisinde oldukça doğru sonuçlar verir ve klinik olarak faydalıdır (34).

2.1.3.2. Histopatolojik Özellikler

Östrojen bağımlı endometrioid (Tip 1) ve östrojenden bağımsız non-endometrioid karsinoma (Tip 2) karşılık gelen 2 ana klinikopatolojik tipte endometriyum karsinomu tanımlanmıştır. Endometrioid adenokarsinomlar, endometriyum karsinomlarının %80'ini oluşturmuş olup iyi diferansiye edilmiş formda, normal endometriyumlara benzeyen bezlerden oluşur ve endometrial hiperplazi ile bağlantılı olabilir (34).

Genetik anomaliler arasında; mikrosatelite instabilitesi, fosfataz ve tensin homologu (*PTEN*), fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik subunit α (*PIK3CA*), *KRAS* ve *CTNNB1* genlerinin mutasyonları bulunur. Mikrosatelite instabilitesi, tipik olarak

kalıtsal polipsiz kolon kanserli hastalarda bulunur. *CTNNB1*, skuamöz diferansiyasyonlu karsinomlarda daha sık mutasyon geçirir. Seröz karsinomlar Tip 2'nin prototipi olarak kabul edilirler. Over ve fallop tüplerinin seröz karsinomlarına benzer şekilde, p53 mutasyonları ve kromozomal instabilite ile karakterizedirler ve öncül olduğu düşünülen bir lezyon olan intraepitelyal seröz karsinom formuyla ilişkilidir. Berrak-hücreli karsinomlar tip 1 ve tip 2 arasındaki ara özelliklere sahip, ender ve heterojen bir tümör grubunu temsil eder. Sınıf 3 endometrioid, seröz ve berrak hücreli adenokarsinomlar da dahil olmak üzere yüksek dereceli endometriyal karsinomların tümü kötü prognoza sahiptir, ancak adjuvan tedavisine farklı şekillerde cevap verebilir. Tipik (veya prototipik) tümörlerin aksine, çeşitli vakalarda immünohistokimya (ER, PR, p53, p16, PTEN) gerektiren, morfolojik olarak belirsiz veya hibrid adenokarsinomlar vardır ve doğru yorumun yapılması için mutasyonel analiz yapılmaktadır (36, 34).

2.1.3.3. Evrelendirme ve Risk Değerlendirmesi

Endometriyal kanser genellikle Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik (FIGO) Federasyonu'na göre evrlenir (Tablo 2.1). Preoperatif değerlendirme; göğüs röntgeni, klinik ve jinekolojik muayene, transvajinal ultrasonografi, kan sayımı ve karaciğer ve böbrek fonksiyon profillerini içerir. Ekstra pelvik hastalığın varlığını araştırmak için abdominal bilgisayarlı tomografi (37) taraması endikedir. Dinamik kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme (MRI), servikal tutulumu değerlendirmek için en iyi araçtır (34).

Tablo 2.1. Endometriyal kanser evrelendirilmesi (FIGO: 2009) (34)

Evre I	Tümör korpus uteri ile sınırlı
I A	Tümör endometriyuma sınırlı veya miyometriumun yarısından azına invaze
I B	Miyometriumun yarısı veya daha fazlasına invazyon
Evre II	Tümör serviksin stromal bağ dokusuna invaze fakat uterus dışına yayılım yok
Evre III	Tümörün lokal ve/veya bölgesel yayılımı
III A	Tümör seroza ve/veya adneksleri tutmuş (direkt yayılım veya metastazla)
III B	Vajinal tutulum (direkt yayılım veya metastazla) veya parametrial tutulum
III C	Pelvik ve/veya paraaortik lenf nodlarına yayılım
III C1	Pozitif pelvik nodlar
III C2	Pozitif paraaortik lenf nodları birlikte/değil pozitif pelvik lenf nodları
Evre IV	Tümör, mesane ve/veya bağırsak mukozasını ve/veya uzak metastazları istila eder
IV A	Tümör mesane veya bağırsak mukozasına invaze olur
IV B	İntra-abdominal metastazlar ve/veya inguinal lenf nodları dahil olmak üzere uzak metastazlar

2.1.4. Endometriyum Kanseri Tedavisi

Tedavinin ana yöntemleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Diğer yöntemlerin başlıcası ise hormon tedavisidir (17).

2.1.4.1. Cerrahi Tedavi

Endometriyal kanser tedavisinde cerrahi yaklaşım geleneksel olarak laparotomi olmuştur. Bununla birlikte, son 15 yılda minimal invaziv tekniklerin kullanımı birçok araştırmacı tarafından yaygın bir şekilde kabul görmüştür. Evre I endometriyal kanserde cerrahi tedavi; evre I endometriyum kanseri için standart cerrahi yaklaşım, total histerektomi ve lenfadenektomili ya da lenfadenektomi uygulanmayan bilateral salpingo-ooforektomidir. Evre II endometriyal kanserde cerrahi tedavi; geleneksel olarak, cerrahi yaklaşım, bilateral salpingo-ooforektomi ile radikal histerektomi ve paraaortik lenfadenektomi olan ya da olmayan sistematik pelvik lenfadenektomiden oluşur. Evre II'de cerrahi evreleme ve adjuvan tedavisine rehberlik etmek için lenfadenektomi önerilir. Evre III–IV endometriyal kanserde cerrahi tedavi; maksimum cerrahi daraltma iyi performans durumu ve rezektabl tümörü olan hastalarda endikedir (34).

2.1.4.2. Primer ve Adjuvan Radyoterapi

Evre I veya II endometriyal karsinomlar için adjuvan radyasyon, lokal ve bölgesel tekrarlama oranını düşürür, ancak genel sağ kalımı etkilemez. Erken evre endometriyal kanserli hastalarda vajinal brakiterapi, tüm pelvik radyasyon tedavisine göre seçilecek adjuvan tedavi olması önerilmektedir (33).

2.1.4.3. Adjuvan Kemoterapi

Gelişmiş endometriyal kanser tedavisinde kemoterapi kullanımı hasta sonuçlarını iyileştirir. Paklitaksel ve karboplatin ile kemoterapi, literatürde bildirilen diğer rejimler kadar etkili olup daha az toksisiteye sahiptir (33). Platin bazlı kemoterapi, evre I'de advers risk faktörleri (hasta yaşı, lenfovasküler alan invazyonu ve yüksek tümör hacmi) değerlendirilerek ve evre II-III'teki hastalara uygulanır (34).

2.1.4.4. Adjuvan Hormon Tedavisi

Endometriyal kanserde progestinler, fertilitiyi korumak isteyen genç kadınlar için hormonal tedavinin temel dayanağı olmuştur. En sık kullanılan progestinler medroksiprogesteron asetat (MPA) ve megestrol asetat (MGA)'tır. Levonorgestrel gibi bir progestin salan intrauterin cihaz da kabul edilebilir bir alternatiftir (33).

2.1.4.5. Kombine Radyoterapi-Kemoterapi

Kombinasyon halinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi, tekli tedavi yöntemine kıyasla üstün sonuçlar vermektedir (33).

2.1.5. Lokal Bölgesel Rekürrens

Merkezi pelvik rekürrens için, tedavi seçeneği ameliyat veya radyasyon tedavisidir; bölgesel pelvik rekürrenslerde radyasyon tedavisi, mümkünse kemoterapi ile birlikte uygulanır (34).

2.1.6. İleri Dönem Hastalık

Gelişmiş endometriyal kanserli kadınların standart tedavisi konusunda herhangi bir mutabakat yoktur. Tipik olarak, cerrahi, radyoterapi ve/veya kemoterapi kombinasyonu kullanılır (34).

2.1.7. Metastatik Hastalık ve Nüksü

Metastatik ve nükseden hastalığın sistemik tedavisi, hormon tedavisi veya sitotoksik kemoterapiden oluşur. Hormonal tedavi sadece endometrioid histolojiler için önerilmektedir ve temelde progestasyonel ajanlar içerir. Bununla birlikte tamoksifen ve aromataz inhibitörleri de kullanılmaktadır. Metastatik hastalığın tedavisinde yanıtın ana prediktörleri, iyi diferansiye tümörler, hastalıksız geçirilen uzun süre ve ekstra pelvik (özellikle pulmoner) metastazların yeri ve kapsamıdır. Progestinlere genel yanıt yaklaşık %25'tir. Yalnız bir sitotoksik ajanla sadece kemoterapi alan, metastatik endometriyum kanseri bulunan hastalarda %40'a kadar bir yanıt oranı elde ettiği bildirilmiştir. Bunlardan platin bileşikler, antrasiklinler ve taksanlar en sık tek başına ve kombinasyon halinde kullanılanlardır (34).

2.1.8. Prognoz

Endometrial kanser genellikle olumlu bir prognoz ile ilişkilidir. Bu iyi prognoza neden olan anahtar faktör, çoğu olgunun erken dönemde tanılanmasıdır (34).

2.1.9. Takip ve Uzun Vadeli Etkiler

Çoğu rekürrens tedaviden sonraki ilk 3 yıl içerisinde gerçekleşir. Önerilen takip sıklığı, ilk 2 yıl boyunca 3-4 ayda bir fiziksel ve jinekolojik muayene ile daha sonra 5 yıl sonrasına kadar 6 aylık aralıklardır. Eğer gerekirse ileri tetkikler yapılabilir (34).

2.1.10. Kısa ve Uzun Vadeli Sağlığa Etkileri

Histerektomi infertiliteye ve bilateral ooforektomi premenopozal kadınlarda menopoza neden olur. Menopoza bağlı sıcak basması, gece terlemesi, atrofik vajinit ve osteoporoz gibi semptomlar da oluşabilir. Radyasyon tedavisinin uzun vadeli yan etkileri arasında mesane ve bağırsak disfonksiyonunun yanı sıra atrofik vajinit de vardır. Uterus kanserinden kurtulan kişiler arasında genellikle seksüel sorunlar bildirilmektedir. Pelvik lenfadenektomi, özellikle radyasyon alan kişilerde, alt ekstremitelerde lenfödemine neden olabilir (38).

2.1.11. Endometriyum Kanserlerin Moleküler Temeli

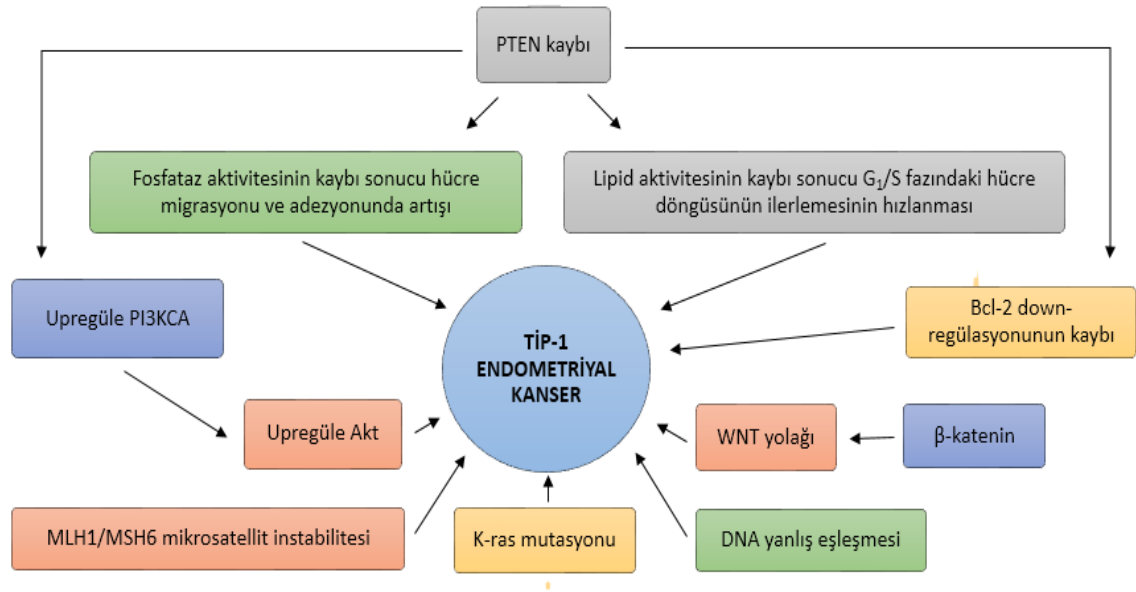
Endometrioid karsinomlar pek çok çeşitli genetik değişiklikler ile karakterizedir ve bunlardan en sık gözlenen PTEN'dir. Endometrioid karsinomların her ikisinde de %83'e kadar ve prekanseröz lezyonların %55'inde PTEN'de değişiklik gözlenmektedir (Tablo 2.2). Morfolojik ve klinik özelliklerinin yanı sıra, tip 1 ve tip 2 endometrial kanserler genetik değişikliklerle de daha seçkin olarak ayrılırlar (16).

Tablo 2.2. Tip 1 ve 2 endometrial kanserde genetik değişiklikler ve mutasyonların yüzde sıklığı (16)

Genetik Değişiklik	Tip-1 Karsinoma (%)	Tip-2 Karsinoma (%)
PTEN inaktivasyonu	50-80	10
K-ras mutasyonu	15-30	0-5
β -katenin mutasyonu	20-40	0-3
Mikrosatelit instabilitesi	20-40	0-5
p53 mutasyonu	10-20	80-90
HER-2/neu	10-30	40-80
p16 inaktivasyonu	10	40
E-kaderin	10-20	60-90

2.1.11.1. Tip 1 Endometrial Kanserdeki Genetik Değişiklikler

PTEN, kromozom 10q23'te bulunan, tirozin kinaz fonksiyonu olan bir proteini kodlayan tümör baskılayıcı bir gendir. PTEN'in inaktivasyonuna ve ekspresyon kaybına mutasyonlar neden olur. PTEN, her biri farklı fonksiyona sahip olan hem lipid hem de protein fosfataz aktivitesine sahiptir. PTEN'in lipid fosfataz aktivitesi G₁/S noktasında hücre döngüsünün durmasına neden olur. Ayrıca, Akt'ye bağlı mekanizmaları içeren pro-apoptotik mekanizmaların yukarı akımı, PTEN sayesinde sağlanır (Şekil 2.1) (39). PTEN'in protein fosfataz aktivitesi; fokal adezyon oluşumu, hücre yayılımı ve migrasyon inhibisyonunun yanı sıra büyüme faktörü tarafından uyarılan mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) sinyalleme sisteminin engellenmesidir. PTEN kaybı, muhtemelen prekanseröz lezyonlarda kanıtlandığı üzere endometrial tümörigenezde erken bir olay olup muhtemelen bilinen hormonal risk faktörlerine yanıt olarak başlatılır. Böylece, PTEN ekspresyonunun azalması veya değişmesi anormal hücre büyümesi ve apoptozdan kaçış ile sonuçlanır (16).



Şekil 2.1. Tip 1 endometriyal kanserin moleküler temeli (16)

PTEN, fosforile Akt seviyelerini kontrol etmek için fosfoinozitol-3-kinaz'a (PI3K) karşı etkimektedir. PTEN'in mutasyonu, PI3K aktivasyonunu arttırarak Akt'nin fosforilasyonunu sağlar. PI3K mutasyonu endometrioid endometriyum kanserlerinin %36'sında görülür ve PTEN mutasyonunu taşıyan tümörlerde en sık görülendir (16, 40).

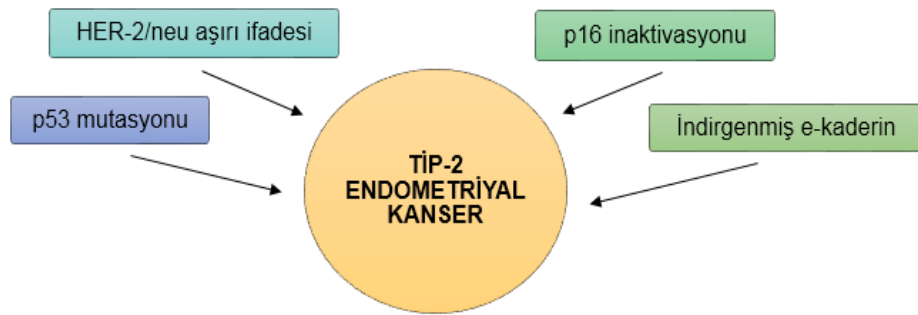
PTEN, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfatın 3 konumunu defosforile eden bir lipid fosfatazdır. PTEN, PI3K aktivitesini antagonize eder ve onun aşağı doğru hedef olan serin/treonin kinaz Akt'yi negatif olarak regüle eder. Kültüre edilen endometriyal stromal hücrelerinin progesteron ile tedavisi PTEN seviyesini upregüle eder ve 17β-östradiol (E₂) ise hücrelerde PTEN fosforilasyonunu başlatır. Bu bulgular PTEN'in endometriyal kanser gelişiminde ve/veya progresyonunda güçlü bir rol oynadığını göstermektedir (41). PTEN inaktivasyonu, *PIK3CA* veya *Akt* mutasyonları, PI3K/Akt yolunda artmış iletim, apoptoz inhibisyonu, yoğun hücre bölünmesi, rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) uyarımıyla sonuçlanır (25).

Sıklıkla mutasyona giren başka bir gen olan *PIK3CA*, endometriyum kanserdeki PI3K/Akt yolunun değişmesinde de rol oynayabilir. *PIK3CA* mutasyonları tip 1 tip 2 endometriyum kanserlilerin sırasıyla %25-36 ve %15'inde görülür ve genellikle *PTEN* mutasyonları ile denk gelir (42).

APC (adenomatöz polipozis koli), *AXIN* veya *CTNNB1* (beta-katenin 1) genlerindeki mutasyonlar β -katenin'in aşırı aktivasyonuna yol açarak aşırı gen ifadesine neden olabilir (25).

2.1.11.2. Tip 2 Endometriyal Kanserdeki Genetik Değişiklikler

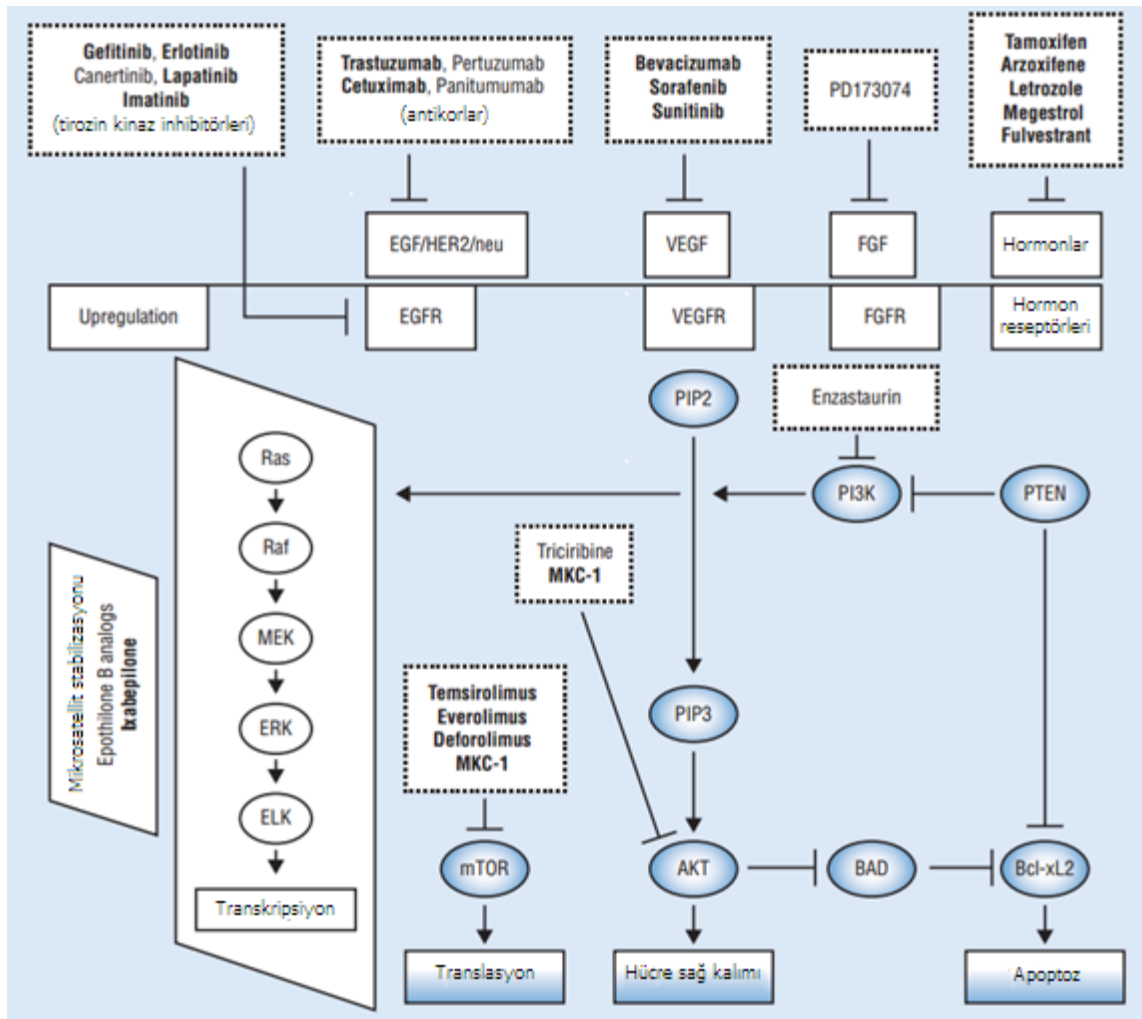
Tip 2 seröz karsinomlarda en sık, bir tümör süpresör geni olan *TP53*'te genetik değişiklik görülür (Şekil 2.2) ve bu mutasyon, seröz karsinomların yaklaşık %90'ında mevcuttur. *TP53*, kromozom 17 üzerinde bulunur ve DNA'sı hasar görmüş hücrelerin çoğalmasını önlemede oldukça önemlidir. p16-siklinD / CDK-pRb'yi oluşturan bir proteini kodlayan gen p16'daki düzensizlikler de genetik değişiklikler içerisinde (16).



Şekil 2.2. Tip 2 endometriyal kanserin moleküler temeli (16)

2.1.11.3. Hedef Yönelik Tedaviler

Endometriyum kanserinin oluşumuna yol açan moleküler olayların anlaşılmasındaki gelişmeler, hedeflenen antikanser tedavilerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Tedavi için ortak hedefler; apoptozu, sinyal iletimini, epigenetik modifikasyonu, ilaç direncini, protein katlama ve bozunumunu, hücre döngüsünün ilerlemesini, hormon reseptör aktivitesini ve anjiyogenezi etkileyen ilaçlar üzerindendir. Bu yeni hedefli ajanlar endometriyal kanser tedavisinde tek başına ve konvansiyonel tedavi ile birlikte araştırılmaktadır. İncelenen hedef yolları Şekil 2.3'te gösterilmektedir (16).



Şekil 2.3. Endometriyal kanser tedavisinde hedeflenen hücresel yollar (16)

mTOR hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozun merkezi bir düzenleyicisi olan ve Akt-PI3K-PTEN yolu ile regüle edilen bir serin/treonin kinazdır. mTOR yolağını hedef alan potansiyel tedaviler arasında; mTOR inhibitörleri, temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001) ve deforolimus (AP23573) bulunur (30, 16).

Epotion B analogları mikrotübül stabilizasyonunu indükler ve taksanla ön-muamele edilen tümörlere karşı aktiftirler. İksabepilon (BMS-2474550), epotion B'nin yarı sentetik bir analogu olup taksanlardan farklı direnç mekanizmalarına sahip olan ve taksanlara dirençli veya duyarsız tümörlerde duyarlı kalmaya devam eden bu yeni sınıf sitotoksik tübül polimerizasyon ajanlarının bir parçasıdır (16).

Endometriyal kanserlerde, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) aile üyeleri; ERBB1 (EGFR veya HER-1), ERBB2 (HER-2/neu), ERBB3 (HER-3) ve ERBB4'ün (HER-4) yüksek düzeyde eksprese edilmektedir ve bu sebeple anti-EGFR hedefli tedaviler halen araştırılmaktadır. İki tip endometriyal kanserde %60-80 EGFR'yi ve %20-30'u HER-2/neu'yu aşırı ifade eder. Bu ajanlar etkilerini, MAPK ve PI3K/Akt sinyal iletim yollarının downregülasyonu ile gösterir (16).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörleri normal ve patolojik anjiyogeneze önemli bir rol oynamaktadır ve bu yolu hedeflemek için antianjiyogenik ajanlar geliştirilmiştir. Endometriyal kanseri de içeren solid tümörlerde VEGF'yi hedefleyen monoklonal antikör bevacizumab'ın oldukça başarılı etkisi diğer ajanların gelişimini teşvik etmiştir (16).

Bir diğer önerilen hedef, değiştirilmiş bir fibroblast büyüme faktörü reseptör 2 (*FGFR2*) geni bulunan hücrelerde yatar. Değiştirilmiş *FGFR2* geni reseptörlerin aktif hale gelmesine ve hücre proliferasyonuna neden olur. *FGFR2* inhibisyonu, *PTEN* mutasyonundan dolayı yapısal olarak aktif Akt'ye sahip olan tümörlerde hücre ölümüne yol açmaktadır. Bu nedenle, *PTEN*'in inaktivasyonu yaygın bir durumken, değişmiş *FGFR2*'ye sahip kanserlerin hedeflenmesi kişiselleştirilmiş tıbbın geleceğinde yer alabileceği düşünülmektedir (16).

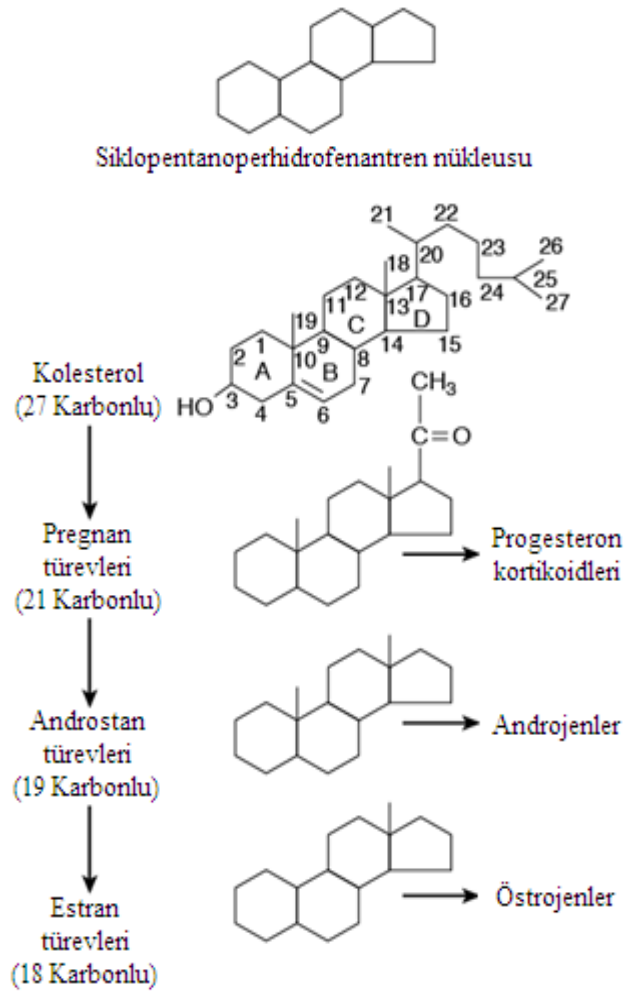
Yüksek riskli endometriyum karsinomalarında, folat reseptör alfa (FR- α) hedefli bir tedavi çalışılmış ve non-endometrioid, yüksek dereceli ve ileri evre endometriyum kanserlerinde aşırı eksprese edildiği ortaya konmuştur. Bu nedenle östrojen negatif kanserlerde FR- α hedefli tedavinin yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır (43).

2.2. Östrojenler

2.2.1. Östrojen Kimyası, Biyosentezi, ve Etki Mekanizması

Östrojenler; dişi üreme organları, endokrin organlar, merkezi sinir sistemi, primer ve sekonder seks karakterleri üzerinde çeşitli etkilere sahiptir (44, 45). Gonadal hormonlar, hormon replasmanı, kontrasepsiyon, osteoporoz ve postmenopozal kullanılırken bazı hormon antagonistleri kanser kemoterapisinde kullanılmaktadır (45).

Bütün gonadal hormonların prekürsörü kolesteroldür. Doğal östrojenler; 17β -östradiol, östron ve östriol olup 18 karbonlu (Şekil 2.4) steroitlerdir; A halkalarında, 10. Karbona bağlı bir metil grubu veya D4-3-keta yapısı içermezler. Doğal östrojenler içerisinde etkisi en kuvvetli olan 17β -östradiol, en zayıf olan ise östrioldür (44).



Şekil 2.4. Adrenal korteks ve gonad steroitlerinin temel yapısı (44)

Kolesterolün yapısındaki harfler 4 temel halkayı, sayılar da moleküldeki konuşları, açılal metil grupları ise (18 ve 19 konuşları) düz bir çizgi ile gösterilmektedir.

Östrojenler over foliküllerinin teka interna ve granüloza hücreleri, korpus luteum ve plasenta olmak üzere farklı yerlerden salgılanır. Biyosentetik yolla ise androstenedionun aromatzasyonu ile sentezlenir. Aromataz (CYP19), androstenedionun östrona, testosteronun ise E_2 'ye dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Şekil 2.5) (44).

metabolitleri ile birlikte idrarla gerçekleşir. Yüksek oranda safrayla salgılanır ve enterohepatik dolaşıma girer (44, 45).

2.2.2. Östrojen Reseptörleri ve Sinyal İleti Yolları

Östrojenlerin etkilerine aracılık etmekten sorumlu, ligandla uyarılabilen bir transkripsiyon faktörü olan östrojen reseptörleri (ER), farklı genlerin kodladığı iki ayrı alt tip olarak bulunur. Bunlardan ilk karakterize edilen ER olan ER α ve daha yakın zamanda tanımlanan ER β 'dir. ER'nin bu iki alt türünün DNA bağlanma alanlarında (yaklaşık %96 amino asit benzerliği) yüksek özdeşliğe sahip olmalarına rağmen, iki alt türün ligand bağlama alanları arasında önemli farklılıklar vardır (yaklaşık %59 amino asit benzerliği). Dolayısıyla, E₂, bağlayıcı bağlanma alan dizilerindeki bu farklılığa bağlı olarak, ER α ve ER β 'ye nispeten benzer bir afinite ile bağlanmasına rağmen, ER alt tipi, bazı ligandları tamamen farklı afinitelerle bağlar. ER α ve ER β , doğrudan DNA'ya bağlanmadan, E₂'ye bağımlı östrojen cevap elementlerini (ERE) içermeyen genlerin transkripsiyonunu aktive eden veya aktive etmeyen diğer transkripsiyon faktörlerine bağlanarak dolaylı olarak transkripsiyonu düzenlerler. (48, 49).

Bunlara ek olarak, ER'nin ifadesi bazı hedef dokularda üst üste gelirken, diğerlerinde farklı şekilde ifade edilirler. Bu nedenle, bu ER alt tiplerine selektif olarak bağlanma ve bu alt tipleri aktive etme veya inhibe etme kapasitesine sahip olan ligandlar, bu 2 reseptörün biyolojik yapılarının aydınlatılmasında faydalı olacak ve geliştirilmiş doku seçiciliğine sahip östrojen farmasötiklerinin geliştirilmesine yardımcı olabilecektir (49).

Hem östrojen hem de progesteron, etkilerini intra- ve ekstra-nükleer reseptörler aracılığıyla gösterir. ER, aynı ERE'leri bağlayan ve benzer gen gruplarını düzenleyen sırasıyla *ESR1* ve *ESR2* tarafından kodlanan ER α ve ER β olmak üzere 2 ana formda mevcuttur. Bununla birlikte, ER α ve ER β , hücresel proliferasyon ve farklılaşma sırasında değişen, dokularda farklı bir ifade tarzına sahiptir. ER α , östrojene duyarlı dokuların temel gelişimi için gerekli olup ER β , epitel hücrelerin organizasyonu ve adhezyonu için ve dolayısıyla farklılaşmış doku morfolojisi ve fonksiyonel gelişimi için gereklidir (50).

E₂ ile doymuş ER kompleksi, birçok hedef genin transkripsiyonunu uyarır veya bastırır. Bazı östrojen yanıt veren genler, ligandlı ER'nin direkt olarak bağlandığı promotör bölgelerinde palindromik ERE'ler içerse de, çok yeni bilgiler ER transaktivasyonu ve

transrepressyonun karmaşıklığını vurgulamıştır. ER, DNA'ya doğrudan bağlanmadan belirli yerlerde transkripsiyonu da değiştirebilir. Bu bölgelerde, ER etkilerini AP-1 veya Sp1 gibi başka bir transkripsiyon faktörüne bağlamak suretiyle gerçekleştirir. İlginç bir şekilde belirli bir hedef gendeki ER ve diğer nükleer reseptörlerin farmakolojisi, ligandın ER alt tipi veya doğası tarafından belirlenerek değişkenlik gösterebilir (49). Östrojen normal endometriyal hücrelerde transkripsiyonel olmayan mekanizma ile de PI3K/Akt sinyal yolunu aktive edebilir (51).

ER; yumurtalıklar, uterus, myometriyum ve endometriyum, testis ve prostat olmak üzere üreme dokularında yaygın olarak eksprese edilirler. Myometriyumda, ER α ve ER β 'nın her ikisi de eksprese edilir, ancak ER α mRNA ekspresyonu ER β 'dan yüksektir (26).

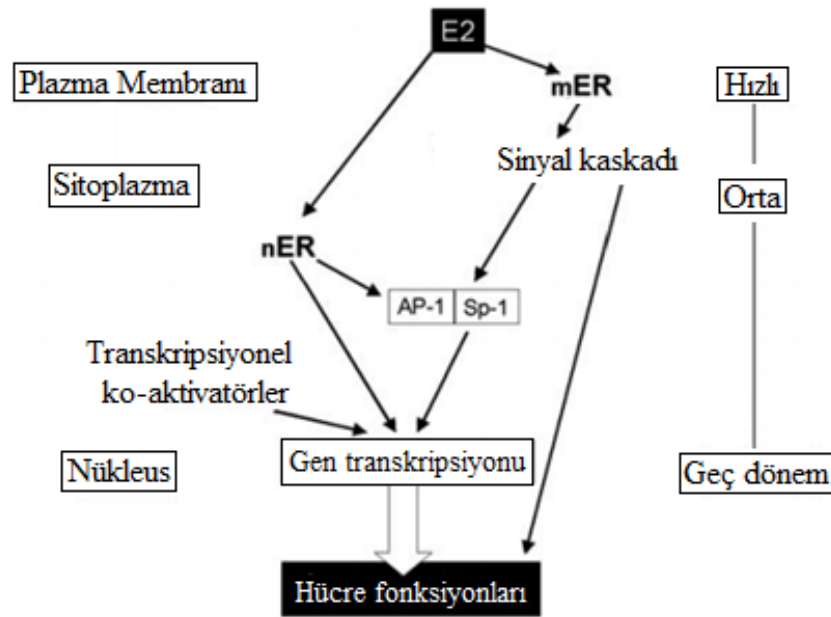
ER β agonistlerinin inflamatuvar bağırsak hastalığı ve romatoid artrit (52) tedavi potansiyeline sahip olduğu, ER α agonisti 4,4',4''-(4-Propil-[1H]-pirazol-1,3,5-triil)trisfenolün (PPT) nöroprotektif olduğu (53) ve her iki izotipin de kardiyovasküler hastalıkların gelişimini etkileyebileceği (54) çalışmalarda yer almaktadır.

Sinyal yolları, hücre yüzeyinden sitoplazma ve çekirdeğe aktive edilen reseptörlerden, bir sinyal ileten protein kaskadının karşılıklı aktivasyonunu içeren karmaşık sinyal iletim süreçleridir. Bu mekanizma, büyüme, farklılaşma, hücre döngüsü kontrolü, hücre adezyonu ve transkripsiyon regülasyonu gibi normal ve kanser hücrelerinin birçok biyolojik prosesine dahil olan reseptör ve reseptör olmayan tirozin protein kinazları içerir. Kinazlar; siklinler ve siklin bağımlı kinazlar tarafından pozitif olarak aktive edilir. Sinyal iletimi çok aşamalı bir şekilde gerçekleşir; reseptör dimerizasyonu, otofosforilasyon ve sinyal kaskadlarının başlatılması, sinyal yolunda yer alan proteinlerin konformasyonunda ve aktivitesinde bir değişime neden olan ligand bağlanmasını içerir. Protein kinaz aktivitesi (CDK1), inhibitörleri tarafından ligand bağlama bölgelerini bloke ederek veya aktif dimerlerin, bir reseptörün dış alanına bağlanarak ortaya çıkmasını önleyerek bastırılabilir. Aynı zamanda, sinyal iletimini bloke eden ATP bağlanma bölgelerinin inhibisyonu yoluyla, reseptörlerin hücre içi alanlarının işlevini de etkileyebilirler. Bahsedilen sinyal iletim öğelerinin hepsi hedeflenmiş kanser tedavisinin hedefi olabilir (25).

2.2.3. Östrojenin Endometriyum Kanserindeki Rolü

Östrojen, endometriyum dokuları içindeki büyümeyi stimüle eder. Bu stimülasyon, seçici östrojen reseptör modulatorleri (SERM), gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analogları ve aromataz inhibitörleri de dahil olmak üzere birçok ajanın araştırılmasına yönelimi sağlamıştır. Bütün bu ajanlar, ya vücuttaki östrojenin genel seviyelerini düşürmek ya ER ile etkileşime girme kabiliyetini engellemek için çalışır (55).

Östrojene hücresel yanıt, östrojenin hem ER'nde ERE'ye bağlanmasıyla, hem de sinyal transdüksiyon yollarının aktivasyonu gibi nükleer olmayan aktivasyonlarla olmaktadır. Östrojen, ER'ye bağlanarak aşağı akım genlerin ekspresyonunu modüle eder ve ardından reseptör dimerlerin nükleer translokasyonunu indükler. Nükleustaki östrojen, transkripsiyonel düzeyde ER'deki olayların gelişimi yoluyla östrojene duyarlı genlerin sentezlenmesini modüle eder (Şekil 2.6). Östrojenin hücre çoğalmasını temelde nükleer olaylarla etkilediğine inanılır (51).



Şekil 2.6. E2'nin hedef hücreler üzerindeki hızlı, orta ve uzun vadeli etkileri arasındaki ilişkiyi gösteren şematik model (48)

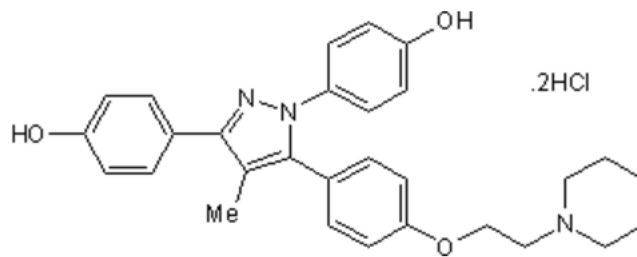
mER = Membran östrojen reseptör, nER = Nükleer östrojen reseptör

E_2 'nin baskın biyolojik etkileri, gen ekspresyonunun düzenlenmesiyle sonuçlanan klasik genomik bir mekanizma olan hücre içi ER ile etkileşimi yoluyla (48). Bununla birlikte, E_2 'nin fizyolojik konsantrasyonu, endometrial karsinogenezi tetiklediği düşünülen membran reseptörleri; G proteine bağlı östrojen reseptörü (GPER)1/GPR30'un aktivasyonu da dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde çeşitli nongenomik etkileri hızla uyarabilir. Bu etkiler iyon kanallarının modülasyonu, cAMP ve NO üretimi, MAPK'lerin aktivasyonu ve hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun ($[Ca^{2+}]_i$) yükselmesi gibi ikinci haberci yollarının düzenlenmesidir (51, 56).

PI3K/Akt ve MAPK'nin, endometrial kanser hücrelerinde E_2 ile indüklenen sinyal yollarında merkezi rol oynadığı düşünülmektedir. Her iki sinyal yolağı da hücrenin akıbetini esas olarak farklı hücre dışı uyarılara hücrel tepkilere aracılık ederek belirler (57).

2.2.4. Östrojen Reseptör Alfa ($ER\alpha$) Blokörü MPP Dihidroklorür ve Biyolojik Aktivitesi

1,3-bis(4-hidroksifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletoksi)fenol]-1*H*-pirazol (metil-piperidino-pirazol; MPP) (Şekil 2.7), pirazolün, $ER\alpha$ için yüksek yüksek bağlanma afinitesini (yaklaşık 200 kat) koruyan bir antagoniste dönüştüren temel bir yan zincir sübstüenti içeren bir pirazol bileşimidir. K_i değerleri, sırasıyla $ER\alpha$ ve $ER\beta$ reseptörlerinde 2,7 ve 1.800 nM'dir (58, 49).



Şekil 2.7. MPP dihidroklorürün 2D molekül yapısı (58)

MPP'nin bir endojen gen olan $ER\alpha$ uyarımını baskılama kabiliyetini değerlendirmek için, yüksek seviyelerde $ER\alpha$ ve en düşük düzeyde $ER\beta$ içeren MCF-7 meme kanseri hücrelerinde E_2 'nin pS2 mRNA üretme indüksiyonunu bloke etme etkinliğini izlenen bir

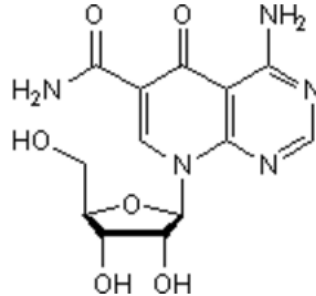
çalışmada; MPP'nin pS2 mRNA indüksiyonunu tamamen baskıladığı ve bu hücrelerin neredeyse tamamen ER α içerdiği gerçeği ile tutarlı bulunmuştur (59).

2.3. Akt (Protein Kinaz B) Proteinini

2.3.1. Akt İnhibitörü API-1 ve Biyolojik Aktivitesi

4-Amino-5,8-dihidro-5-okso-8- β -D-ribofuranosil-pirido[2,3-d]pirimidin-6-karboksamit (API-1) (Şekil 2.8), Akt/protein kinaz B (PKB) inhibitörüdür (60). API-1Akt'nin plekstrin homoloji (PH) alanına bağlanıp Akt zar translokasyonunu bloke ederek Akt inhibisyonuna yol açar. Sonuç olarak, API-1, selektif olarak apoptozu indükler ve hücre büyümesini engeller (61).

Bir ksenograft nude fare modelinde, API-1, hiperaktif Akt'li tümörlerin büyümesini inhibe etmiş olup bununla birlikte p-Akt'nin (Ser473) düşük seviyelerde olanları inhibe etmemiştir (61).



Şekil 2.8. API-1'in 2D molekül yapısı (60)

2.3.2. Endometriyum Kanserinde Akt Proteininin Rolü

PI3K'ler, membrana bağlı fosfo-inositlerin, inositol halkasının 3'-OH grubunu fosforile eden lipid kinazlardan bir ailedir. Oluşan ana fosfolipit (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat) ve Akt ile aktive protein kinaz hayatta kalma ve motilite, hücre büyümesi ve proliferasyonu ile yanıtların kaskadını tetikler. Öte yandan, MAPK yolları aynı zamanda, hücre çoğalması, hücre sağ kalımı ve bazı durumlarda hücre hareketliliği gibi

önemli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde yer alan önemli sinyal iletili sistemlerdir (62).

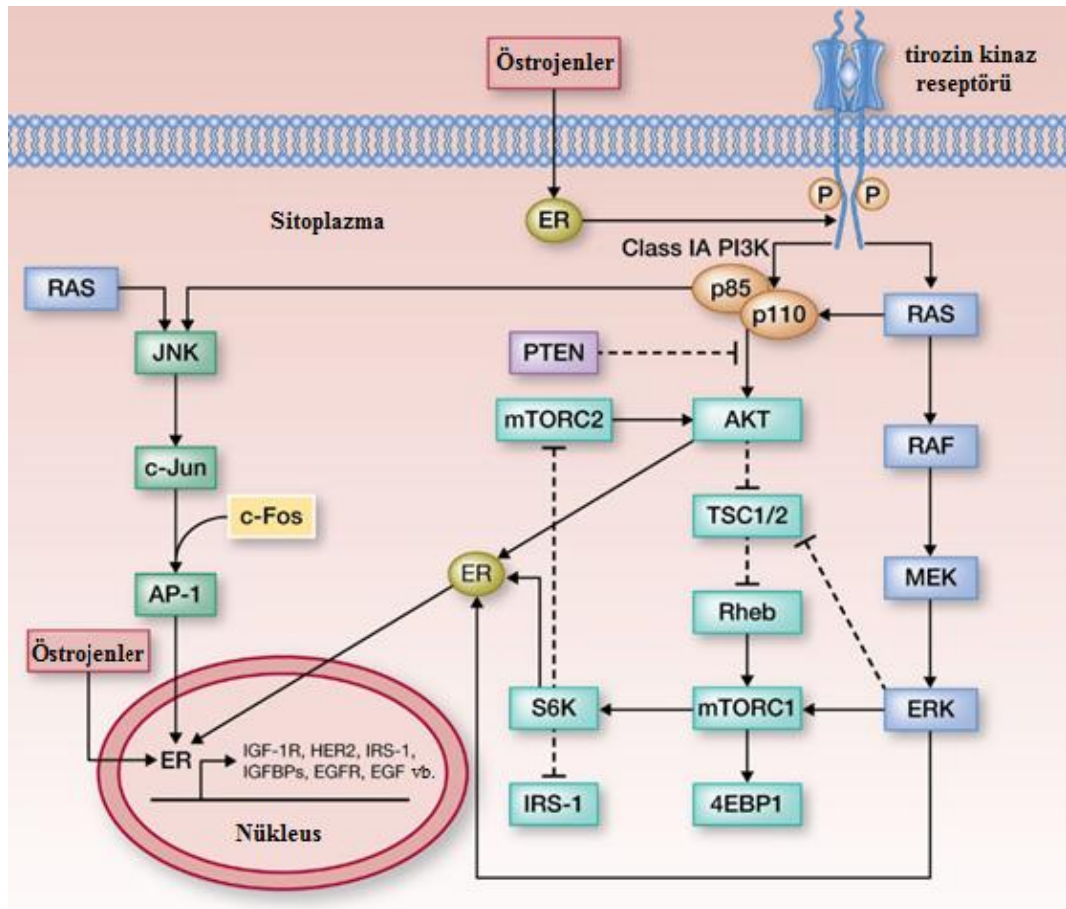
Akt'nin fizyolojik aktivitesi çok yönlüdür; özgün proteinlerin fosforilasyonu yoluyla hücre döngüsünü düzenler, apoptozu inhibe eder. Ayrıca protein sentezi ve hücre proliferasyonu ile glikoz metabolizmasını da regüle eder (25).

Akt yolağının insan kanser türlerinde anormal şekilde harekete geçmesi, insan hematolojik kanser oranının hemen hemen %50'sinde olması ve Akt'nin inhibisyonu ile hücre büyümesinin durdurulması ve apoptozun indüklenmesi, ilaç endüstrisi ve bilim dünyasını antikanser ilaç olarak Akt inhibitörlerini geliştirmeye yönlendirir. Hücre dışı ve hücre içi kanserojen sinyalleri ileten bir ana nodal nokta olarak işlev görür ve bu nedenle moleküler terapötikler için önemli bir hedef sunar (61).

Akt mutasyonları son derece seyrek olmakla birlikte, endometrial kanserde genellikle artmış Akt sinyalleri görülmektedir. Akt inhibitörleri; ATP bağlama bölgesi için yarışır ya da Akt'yi allosterik olarak inhibe ederler (63).

PH alanı, hücre içi sinyallemeye görev alan geniş bir protein yelpazesinde yer alan veya hücre iskeletinin bileşenleri olarak bulunan, yaklaşık 120 amino asitlik bir protein domainini ifade eder (64). Akt'nin PH alanının, plazma membranının iç yüzeyindeki PIP3'e bağlanması, pleckstrin homoloji (PH) alanının otoinhibitör işlevini serbest bırakır ve böylece fosfoinozid bağımlı kinaz 1'in (PDK1) Akt'yi fosforile etmesine izin verir. Bundan dolayı PTEN, PI3K aktivitesini defosforile ederek antagonize eder (64).

Aktive Akt, hücrel büyüme, metabolizma, proliferasyon, hayatta kalma, migrasyon, apoptoz ve anjiyogenezi teşvik eden bir dizi aşağı yönde sinyal olayını başlatır. Akt'nin majör bir downstream efektörü, mTOR kompleks 1 (mTORC1)' dir. Bir başka mTOR kompleksi de mTORC2, Ser473'ün fosforilasyonu yoluyla Akt'nin aktivasyonuna katılır. PI3K/Akt/mTOR yolu, RAS/RAF/MEK ve ER de dahil olmak üzere diğer sinyal yolları ile çapraz etkileşime de katılır (Şekil 2.9) (63).



Şekil 2.9. PI3K/Akt/mTOR yolağına genel bakış ve endometriyal kansere ilişkin diğer yolaklarla ilişkisi (63)

Kesintisiz çizgiler; aktivasyonu, kesikli çizgiler; inhibisyonu temsil eder. 4EBP1, ökaryotik başlatma faktörü 4E bağlayıcı protein 1; AP-1, aktivatör protein-1; EGFR, EGF reseptörü; IGF-1R, insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü; IGFBP, insülin benzeri büyüme faktörü bağlama proteini; IRS-1, insülin reseptör substratı-1; JNK, c-Jun N-terminal kinaz; MTORC1/2, mTOR kompleksi 1/2; Rheb, enriched brain RAS homoloğu; S6K, S6 kinazı; TSC, tuberoskleroz proteini gösterir.

Akt/PI3K yolağının aktivasyonu ligandların, diğer bir deyişle büyüme faktörlerinin, sitokinlerin veya insülinin, hücre zar reseptör tirozin kinazlara bağlanmasıyla oluşur ve bu da hücre içi alanlarının otofosforilasyonuna yol açar. Bu durum, konformasyonel değişiklikler ve ardından bir katalitik (p110) ve düzenleyici (p85) alt birimden oluşan heterodimerik bir protein olan PI3K aktivasyonuna izin verir. PI3K, fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfatın (PIP2), PDK1 yoluyla fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfata (PIP3) dönüşmesini ve Akt proteininin fosforilasyonu ve aktivasyonunu sağlar (25).

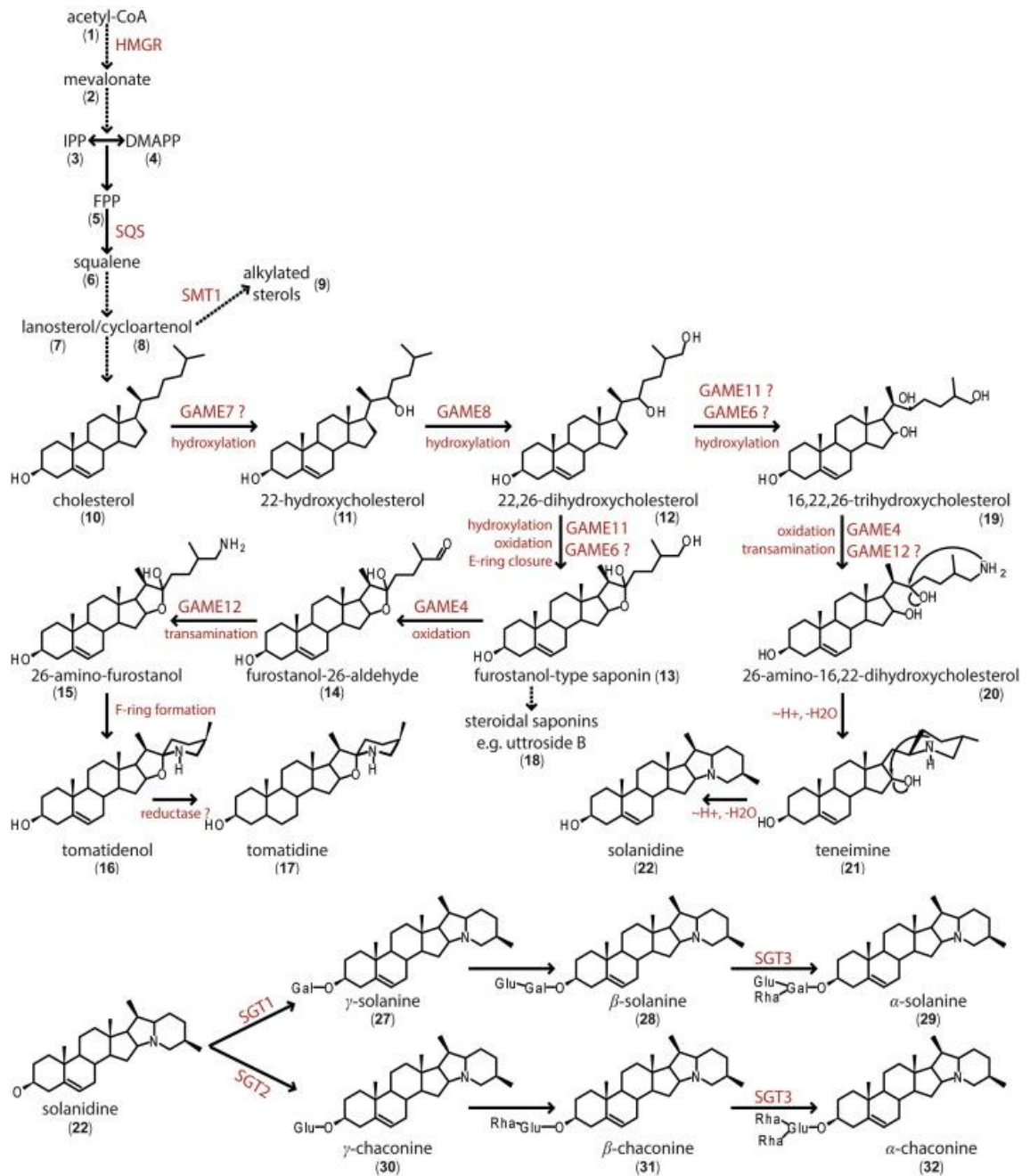
2.4. Steroidal Glikoalkaloitler: α -Chaconine ve α -Solanine

Azot içeren steroidal glikozitlerin bir sınıfı olan glikoalkaloitler, biyolojik açıdan aktif ikincil bitki metabolitleri olup, bunlar genellikle *Solanum* cinsinin bitkilerinde bulunur. Bu bitkilere *S. Tuberosum* (Şekil 2.10) (65), *S. lycopersicum* (domates) ve *S. melongena* (patlıcan) gibi birçok tarımsal bitki dahildir (3).



Şekil 2.10. *Solanum tuberosum* L. (65)

Steroida glikoalkaloitler (SGA'ler), sitozolik terpenoit (mevalonat) biyosentetik yolağından elde edilir. Asetil-CoA'dan başlayarak, kolesterol üretilir ve hidroksilasyon, oksidasyon ve transaminasyon yoluyla glikoalkaloit metabolizma enzimleri (66) ile modifiye edilir ve patatesta solanidine sentezlenir. Patatesta aglikon solanidine; α -solanine ve α -chaconine üretmek için solanidine glikoziltransferaz (SGT) enzimleri tarafından glikozile edilir. Solanaceae cinsindeki SGA içeriğı; mevalonat yolundaki kolesterolün yukarı öncüllerinin sentezinde yer alan enzimler olan; 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A redüktaz (HMGR), skualen sentaz (SQS) ve S-adenozil-l-metiyonin sterol:C24-metil transferaz tip 1 (SMT1)'e bağılıdır (Şekil 2.11) (67).



Şekil 2.11. Solanaceae türlerinde steroid glikoalkaloitlerin biyosentezi (67)

Kesikli oklar çoklu biyosentetik reaksiyonları temsil ederken katı oklar tek bir adımı temsil eder.

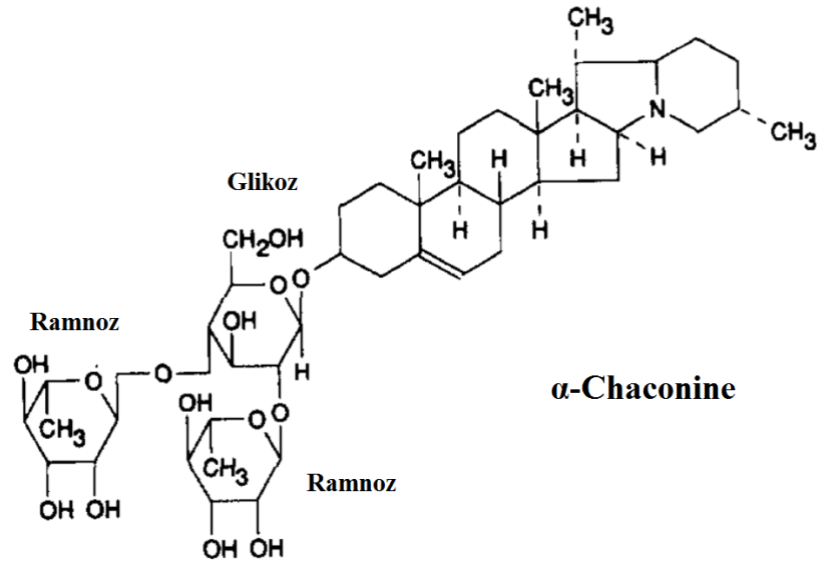
Steroidalkaloitler (SA)'ler ve bunların glikozile edilmiş formları özellikle Solanaceae ve Liliaceae bitki familyalarında bulunan azot içeren toksik bileşiklerdir (68). SGA'lar, biyolojik açıdan aktif ikincil bitki metabolitleri olup, genellikle Solanum cinsinin bitkilerinde bulunur. SGA'lar, bakteriler, mantarlar, virüsler, böcekler ve hayvanlar da

dahil olmak üzere geniş bir yelpazede patojenlere ve yırtıcı hayvanlara karşı bitki direncine katkıda bulunur (3).

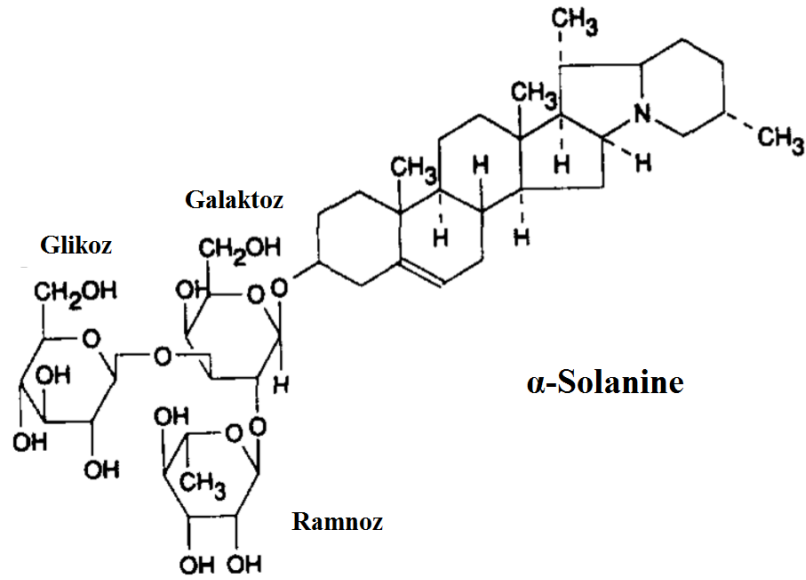
Tablo 2.3. Çeşitli patates bitki parçalarında glikoalkaloit konsantrasyonları (3)

Bitki parçası	GA konsantrasyonu (mg/kg taze ağırlık)
Çiçekler	2.150-5.000
Yapraklar	230-1.000
Saplar	23-33
Kökler	180-400
Acı tadında yumrular	250-800
Bütün yumru	10-150
Skin (yumrunun %2-3'ü)	300-640
Peel (yumrunun %10-12'ü)	150-168
Etli kısım	12-100
Korteks	125
Öz	Tespit edilemeyen
Filiz	2.000-7.300

S. tuberosum, glikoalkaloitleri doğal olarak üretilir ve ana glikoalkaloitler, toplam glikoalkaloit içeriğinin %95'ini oluşturan α -chaconine (Şekil 2.12) ve α -solanine'dir (Şekil 2.13). α -Chaconine/ α -solanine oranı yaklaşık 60:40'dır. Her iki maddenin molekülleri aynı steroid iskeletini (aglikon) içerir, ancak trisakkarit parçasında farklılık gösterir. Glikoalkaloitler, bir patates bitkisinin her yerinde bulunur. En yüksek glikoalkaloit seviyeleri çiçekler ve filizlerde iken, en düşük glikoalkaloit seviyeleri ise patates yumrularındadır (Tablo 2.3). Glikoalkaloitler kabukta yoğunlaşır ve yumruların ışığa uzun süre maruz kalması patates yumrusu yüzeyinde glikoalkaloitlerin oluşumunu teşvik eder.



Şekil 2.12. α-Chaconine'in molekül yapısı (69)

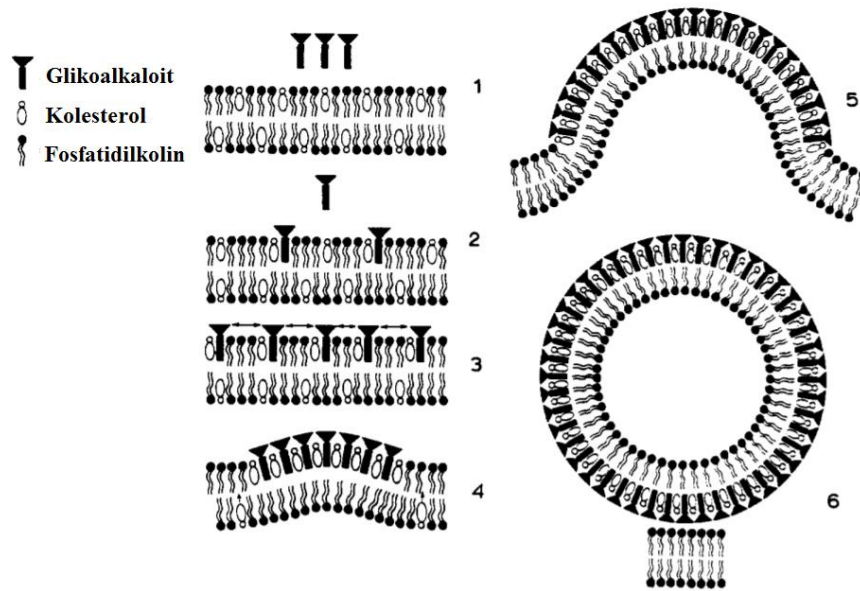


Şekil 2.13. α-Solanine'in molekül yapısı (69)

Glikoalkaloit seviyesi pişirme yöntemi ile önemli ölçüde düşürülemez çünkü ısıya oldukça dayanıklı olup 230°C ile 280°C arasında parçalanmaya başlar. Bundan dolayı patateslerin serin, kuru ve karanlık bir yerde saklanması tavsiye edilir. Patatesteki

glikoalkaloitlerin miktarını azaltmak için patatesin kabuğunun soyulması ve yumrusunun hasarlanan, çürüyen, yeşil renge sahip ve pişmeden önce filizlenen kısımlar çıkarılmalıdır.

Glikoalkaloitler, insanlarda yüksek seviyelerde toksik etki gösterir. Buna göre mevcut güvenlik düzenlemeleri, yenilebilir yumru kökündeki içeriğini 20 mg/100 g taze ağırlıkla sınırlar. Glikoalkaloitler tarafından indüklenen toksisite mekanizması; zar yıkım özellikleriyle ilişkilidir (3).



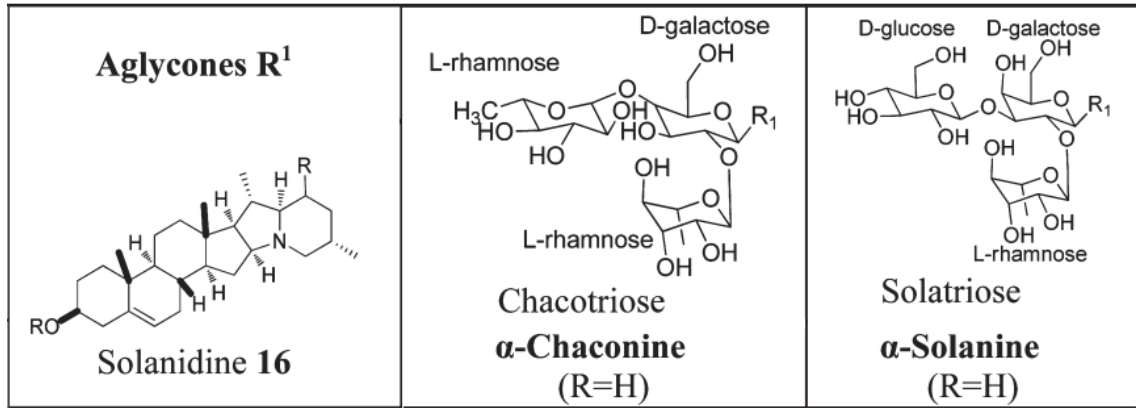
Şekil 2.14. Glikoalkaloit ile indüklenen membran harabiyetinin mekanizması (69)

SGA'ların biyolojik aktivitesi toksisitesi (9) ile sınırlı olmayıp antikanser (4), antikolinesteraz (70), antimalaryal (71), antibakteriyel (72) ve antiviral (73) özelliklere sahip oldukları literatürde yer almaktadır.

Membran bozucu aktivite (Şekil 2.14) için glikozidik rezidü gerekli olup biyoaktivite açısından incelendiğinde karbonhidrat yan zincirlerinin (Şekil 2.15) etkiyi daha da güçlendirdiği sonucuna varılmıştır. Farelerde, α -chaconine ve α -solanine için intraperitoneal LD₅₀ değerleri sırasıyla 30 ve 27 mg /kg vücut ağırlığı olup çoğu hayvan için çeşitli glikoalkaloitlerin intraperitoneal LD₅₀ değerleri 30-60 mg/kg vücut ağırlığı civarındadır (3).

Glikoalkaloitlerin embriyotoksitesi araştırılmış olup kurbağa, sıçan, fare, hamster ve sığır embriyoları test modelleri olarak kullanılmıştır (3). α -Solanine, parenteral olarak farelere uygulandıklarında embriyotoksiteye neden olduğu ve aspirinin toksik etkilerini güçlendirdiğini gösterilmiştir (74). Folik asit ve antimetabolit; folik asit analogu metotreksat, konsantrasyona bağlı olarak, α -chaconine'in neden olduğu membran potansiyelinin depolarizasyonunda bir azalma ile toksiteye karşı koruma sağlamıştır. Ayrıca, koruyucu bir etki elde etmek için nispeten yüksek folik asit konsantrasyonları gerekli olmasının, toksiteye karşı koruma için folik asidin "besinsel" değil "farmakolojik" konsantrasyon olması gerektiği belirtilmiştir (3).

Aglikon üzerindeki 3-OH pozisyonuna bağlanan glikozidik rezidüleri



Şekil 2.15. α -Chaconine ve α -solanine glikoalkaloitlerinin yapısal ilişkileri (3)

Patates SGA'lerini, insanlarda toksik etkilerle ilişkilendiren bir dizi rapor bulunmaktadır. Acı bir tat veren yüksek düzeyde SGA içeren patateslerin tüketiminin ciddi hastalıklara ve hatta ölüme neden olduğu bildirilmektedir. Hafif SGA zehirlenme vakalarında baş ağrısı, kusma ve diyare belirtileri bulunur. Kayıtsızlık, huzursuzluk, uyuşukluk, zihinsel karışıklık, sersemlik, halüsinasyonlar, baş dönmesi, titreme ve görme bozuklukları gibi nörolojik belirtiler de bildirilmiştir. Ölüm, yüksek düzeyde SGA içeren patates, patates yaprakları ve meyvelerin yenmesi ile ilişkilendirilmiştir (75-79). İnsanların SGA zehirlenmesine karşı duyarlılık raporları çeşitlidir. Ölümcül zehirlenme vakaları tahmini olarak oral dozlarda toplam glikoalkaloit/kg vücut ağırlığında > 3-6 mg olarak; hafif zehirlenme durumlarında ise 1-5 mg/kg olarak bildirilmiştir (80, 81).

İnsanlarda, patatesteki 200 mg toplam glikoalkaloit/kg taze ağırlık, üst güvenlik limiti olarak kabul edilir (79). FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA), toplam patates glikoalkaloit içeriğinin 20-100 mg/kg taze ağırlık olması durumunda toksikolojik açıdan bir endişe kaynağı olmayacağını bildirmiştir (82). α -Chaconine ve α -solanine'in patates püresi ile tüketimi sonrası *in vivo* metabolizmasının araştırıldığı çalışmalarda; vücutta bir miktar patates glikoalkaloit birikimi bildirilmiş olup glikoalkaloitlerin vücuttan uzaklaştırılmasının 24 sa.'ten uzun süre gerektirdiği ayrıca α -chaconine'in biyolojik yarılanma ömrünün, α -solanine'e kıyasla çok daha uzun olduğu sonucuna varılmıştır (81, 83).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Hadiye Kılıçer İnsan Hücre Kültürü ve Moleküler Çalışmalar Laboratuvarı'nda bulunan ilgili cihazlar ve tedarik edilen gereçlerle gerçekleştirildi.

3.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Deneylerde aşağıda belirtilen cihazlar kullanıldı.

➤ -20 °C dondurucu ve +2/+8 °C:	Siemens
➤ -80 °C dondurucu:	Operon
➤ Etüv:	EcoCell
➤ Güç kaynağı:	PowerPac™ Basic-BioRad
➤ Hassas terazi:	Adventurer Ohaus
➤ Hücre sayım cihazı:	Innovatis Cedex Xs
➤ Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı:	MR Hei-Standart Heidolph
➤ Isıtıcı ve soğutucu blok:	CHB-202 Bioer
➤ Isıtıcı çalkalayıcı:	PST-60 HL plus Biosan
➤ İnkübatör:	New Brunswick Galaxy 170 R
➤ Kabin:	S Faster Elite
➤ Küçük Uçlu Parçalayıcı:	IKA®T10 basic ultra-Turrax®
➤ Membran immun-blot PVDF:	Bio-Rad 162-0177
➤ Mikro pipet ve multi pipet:	Eppendorf
➤ Multi fonksiyonel mikro plaka okuyucu:	Biotek Synergy HT
➤ PCR cihazı:	Roche Lightcycler® 480 II
➤ pH metre:	Mettler Toledo
➤ Santrifüj:	Hettich Universal 320 R

➤ Spin:	Hettich Mikro 200R
➤ Spin capsulefuge:	MSC-6000 Biosan
➤ T100™ Thermal Cycler:	GmClab Gilson®
➤ XCELLigence® RTCA SP:	Bio-Rad
➤ Vorteks:	ACEA Biosciences
➤ Vorteks:	Heidolph
➤ Vorteks:	UM-10 Wisemix
➤ Western blot cihazı:	Mini-Protean® Tetra System-BioRad

3.2. Deneylerde Kullanılan Gereçler

➤ Cryo hücre dondurma tüpü, 2 ml	Biosigma
➤ CytoSelect™ 24-Kuyu Migrasyon Kiti	Cell Biolabs CBA-100-T
➤ E-plaka 96 kuyu	Roche
➤ Eldiven, pudrasız	Dolphin
➤ Flask, 25 cm ²	Greiner
➤ Flask, 75 cm ²	Greiner
➤ Hücre sayım kartuşu	Roche
➤ LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Roche
➤ Mikro ependorf tüpü, 0,2; 0,5; 1; 1,5; 2 ml	Isolab
➤ Mikro plaka 6 kuyu	Grenier
➤ Mikro plaka 96 kuyu	Greiner
➤ Otomatik pipetler	Eppendorf
➤ Pipet ucu, 10; 200; 1000 µl	Isolab
➤ Santrifüj tüpü 15; 50 ml	Isolab
➤ Serolojik kağıt/plastik pipet 5; 10; 25 ml	Greiner
➤ Şırınga, 2; 5 ml	Hayat

3.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Deneylerde aşağıda belirtilen kimyasal maddeler kullanıldı. Deneylerde kullanılan çözelti ve tamponlar deiyonize su ile hazırlandı. Kimyasal maddeler gerekli ortam sıcaklıklarında saklandı.

➤ α -Solanine:	Sigma S3757-5 mg
➤ α -Chaconine:	AppliChem A9544-5 mg
➤ β -Aktin Rabbit Ab:	Cell Signaling 4967S-100 μ l
➤ β -Merkaptoetanol:	Sigma M3148-100 ml
➤ Akrilamit:	Sigma A8887-500 g
➤ Akt Ab:	Cell Signaling 9272S-100 μ l
➤ Amonyum persülfat (APS):	Fluka A3678
➤ Anti Rabbit IgG:	Cell Signaling 7074S-1 ml
➤ API-I:	Tocris 3897-10 mg
➤ Bisakrilamit:	AppliChem A3636-50 g
➤ BCA Protein Deney Kiti:	Cell Signaling 7780
➤ Sığır Serum Albümin:	Santa Cruz SC2323-50 g
➤ Bromfenol mavisi	Sigma B8026
➤ Butanol:	Fluka 19430
➤ Gen: <i>ACTB</i> :	Roche Assay Id. 143636-300 reaksiyon
➤ Gen: <i>AKT1</i> :	Roche Assay Id. 100816-300 reaksiyon
➤ Gen: <i>ESR1</i> :	Roche Assay Id. 102495-300 reaksiyon
➤ Cedex Tripan Mavisi Solüsyonu:	Roche 05 650 640 001-60 ml
➤ Dimetil Sülfoksit (DMSO):	Sigma D8418- 250 ml
➤ DMEM/F-12 (HAM) besiyeri:	Biological Industries 01-170-1A-500 ml
➤ Östrojen Reseptör Alfa (D8H8) mAb:	Cell Signaling 8644S- 100 μ l
➤ Etanol:	Tekkim 64-17-5-2,5 l
➤ FastStart Essential DNA Prob Master:	Roche 06 402 682 001-500 reaksiyon
➤ Fetal sığır serum:	Biochrom S 0115-500 ml
➤ Fosfataz inhibitör kokteyli:	A.G. Scientific B1352
➤ Gliserol:	Merck K42347192
➤ Glisin:	Sigma, G8898-500 g
➤ İnsülin solüsyonu insan:	Sigma, I9278-5 ml
➤ L-glutamin , 200 mM:	Sigma G7513-100 ml
➤ LightCycler® 480 Prob Master:	Roche 04 707 494 001
➤ Metanol:	Merck I690709
➤ MPP dihidroklorür:	Tocris 1991-10 mg
➤ N,N,N,N'-Tetrametil-etilendiamin	

(TEMED):	Sigma T9281-50 ml
➤ fosfo-Akt Rabbit (Ser473) Ab:	Cell Signaling 9271S-100 µl
➤ fosfo-Östrojen Reseptör α (Ser118) Rabbit Ab:	Cell Signaling 2515-100 µl
➤ Pen-Strep Solüsyonu 10,000 ünite/ml Penisilin G Sodyum Tuzu, 10 mg/ml Streptomisin Sülfat:	Biological Industries 03-031-1C-20 ml
➤ Fosfat tamponlu tuz çözeltisi: Oxoid BR0014G-100 tablet Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat:	AppliChem A9177-100 tablet, Merck A0270087-1 kg
➤ RIPA Lizis Tampon Sistemi:	Santa Cruz sc-24948-50 ml
➤ RNAzol [®] RT:	R4533-200 ml
➤ Propanol:	Riedel-de Haen 24137
➤ Sodyum karbonat:	Merck A0250292-1 kg
➤ Sodyum klorür:	AppliChem A4256-1 kg
➤ Sodyum Dodesil Sülfat (SDS):	Sigma 71725-500 mg
➤ Spectra [™] Multicolor	
➤ Geniş Sprektrumlu Protein Ladder:	Thermo Scientific 26634-2x250 µl
➤ Sülfrodamin B sodyum tuzu:	Santa Cruz sc-253615A-5 g
➤ Super Signal [®] West Pico Kemilüminesans Substrat:	Thermo Scientific 34080-500 ml
➤ Yağsız süt tozu:	Fluka 70166-500 g
➤ Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti:	Roche, 05 081 955 001-50 reaksiyon
➤ Trikloroasetik asit:	Sigma T6399-100 g
➤ Tripan mavi solüsyonu %0,4	Sigma T8154
➤ Tripsin-EDTA %0,25	Sigma T4049-100 ml
➤ Tris Hidroklorür:	Amresco 0234-1 kg
➤ Trizma Baz:	Sigma T6066-1 kg
➤ Tween [®] 20:	Sigma P5927-100 ml

SDS-PAGE ve Western Blot yönteminde kullanılan çözeltiler ve jeller Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell (katalog numarası 165-8001) (84) kullanım kılavuzunda belirtildiği gibi hazırlandı.

4X Yığınlama (Stacking) jeli çözeltisi (50 ml) (0,5 M Tris, %0,4 SDS pH 6,8): 3,0275 g Tris baz (Sigma, T6066), 0,2 g sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma, 71725) tartılarak deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlanır. pH 6,8'e ayarlanır.

4X Ayırma (Separating) jeli çözeltisi (50 ml) (1,5 M Tris, %0,4 SDS pH 8,8): 9,09 g tris baz ve 0,2 g SDS tartılarak deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlanır. pH 8,8'e ayarlanır.

10X Elektroforez yürütme tamponu (Running Buffer, 50 mM Tris, 384 mM Glisin): 6,055 g tris baz 28,82 g glisin (Sigma, G8898) tartılarak deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlanır.

1X Elektroforez yürütme tamponu: 100 ml 10X elektroforez stok yürütme çözeltisine 10 ml %10 SDS eklenir ve deiyonize su ile 1 l'ye tamamlanır.

6X Yükleme tamponu (Sample Buffer) (10 ml): 7 ml 4X yığınlama jeli çözeltisi, 3,6 ml gliserol (Merck, K42347192), 1 g SDS, 1,2 mg bromfenol mavisi (Sigma, B8026) deiyonize su ile 10 ml'ye tamamlanır. 5-10 dk. kaynatılır.

6X Protein yükleme tamponu (İndirgeyici): 100 µl tampon içine 4 µl β-merkapto etanol (Sigma, M3148) eklenir. Taze hazırlanır.

%10 SDS çözeltisi (a/h): 10 g SDS tartılarak hafifçe ısıtılan 100 ml deiyonize su ile çözünür.

%30 Bisakrilamit çözeltisi (100 ml): 29 g akrilamit (Sigma, A8887), 1 g bisakrilamit (AppliChem, A3636) tartılarak deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanır.

%10 Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (1 ml): 100 mg APS (Fluka, A3678) tartılarak deiyonize su ile 1 ml'ye tamamlanır. Ependorflara bölünerek -20 °C'de saklanır.

Transfer çözeltisi (1 litre): 100 ml 10X Elektroforez stok yürütme çözeltisine 200 ml metanol (Merck I690709) eklenir ve deiyonize su ile 1 l'ye tamamlanır.

TBS blotlama çözeltisi (1 litre) (20 mM Tris, 1554 mM NaCl): 2,42 g tris baz, 9 g NaCl (AppliChem, A4256) tartılıp deiyonize su ile 1 litreye tamamlanır. pH 7,4'e ayarlanır. +4 °C'de saklanır.

TBST blotlama çözeltisi (1 litre) (%0,1 Tween 20): Bir l TBS içerisine 1000 µl Tween 20 (Sigma, P5927) eklenir. Manyetik karıştırıcı ile 10 dk. karıştırılır. Taze hazırlanır.

%5 Bloklama çözeltisi: 500 mg süt tozu (Fluka, 70166) tartılarak 10 ml TBST içinde çözülür.

Film banyosunda kullanılan developer çözeltisi (1 litre): Developer karışımı A (hidrokinon), B (%77,5 asetik asit) ve C (glutaraldehit) şeklinde üç ayrı çözeltiden oluşur. Çözeltiler korozif ve toksik özellikte olduğundan karışım hazırlanırken gözlük, eldiven, maske ve önlük giyilir. Beş litre karışım; 1.400 ml A, 50 ml B, 50 ml C, 3.500 ml distile su ile hazırlanır. Karışım hazırlanırken öncelikli olarak 3.500 ml distile su ile 1.400 ml A hafifçe çalkalayarak karıştırılır. Bu karışımın üzerine 50 ml B eklenir ve hafifçe karıştırılır. Son olarak 50 ml C'den eklenerek karıştırılır. Beş litrelik sarı renkte bir karışım elde edilir. Developer güneş ışığından korunmalıdır.

Film banyosunda kullanılan fixer çözeltisi (1 litre): Fixer karışımı A ve B olmak üzere iki çözeltiden oluşur. Beş l karışım; 1.250 ml A, 250 ml B ve 3.500 ml distile su ile hazırlanır. Distile sudan 3.500 ml alınarak üzerine 1.250 ml A çözeltisinden eklenir ve hafifçe çalkalanır. Bu karışımın üzerine 250 ml B çözeltisi konulur ve karıştırılır. Karışımın güneş ışığından korunmasına gerek yoktur.

3.4. RL95-2 Hücre Hattı Ve Kültürü Hakkında Bilgi

Deneylerde insan endometriyum adenokarsinoma hücre hattı RL95-2 (ATCC, CRL-1671™) kullanıldı ve bu hücre hattı ATCC®'den temin edildi. RL95-2; 65 yaşındaki bir kadın hastadan alınan; epitelyal morfolojiye sahip, östrojen reseptör ekspresyonu pozitif ve yapışan tipte bir kanser hücresidir (37).

Çalışma boyunca; RL95-2 hücrelerinin 4-6 arasındaki pasajları kullanıldı. RL95-2 hücreleri flask (Greiner) içerisinde %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde (New Brunswick Galaxy 170 R) inkübe edilerek rutin olarak %10 fetal sığır serumu (Biochrom, S 0115), 200 mM L-glutamin (Sigma, G7513), antibiyotik (Biological

Industries 03-031-1C) ve 0,005 mg/ml insülin (Sigma, I9278) içeren DMEM:F12 (Biological Industries, 01-170-1A) besiyeri ile beslendi. Çoğalmakta olan hücre pasajları %70-80 doygunluğa ulaşınca yeniden pasajlandı. Pasaj alınırken 2-3 ml %0,25 tripsin-EDTA (Sigma, T4049) solüsyonu uygulandı ve 3-4 dk. süreyle inkübatörde bırakıldı. Hücreler inkübatörden çıkarıldıktan sonra tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeri ile inhibe edildi.

Hücreleri dondurmak için 1.000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüj (Hettich) edildikten sonra elde edilen hücre pelleti, %95 besiyeri, %5 oranında DMSO (Sigma, D8418) içeren solüsyonun ardından kriyo tüplere (Biosigma) aktarılarak -80 °C'deki derin dondurucuya (Operon) kaldırıldı.

Çözdürülecek olan hücreler, -80 °C'deki derin dondurucudan çıkarılır çıkarılmaz 37°C'lik su banyosunda çözülene kadar (yaklaşık 1-2 dk.) bekletildi. Ardından flasttaki 9 ml besiyeri üzerine ilave edildi.

Hücre sayımı, hücre süspansiyon yoğunluğunun belirlenmesi için yapılan bir işlemdir. Hücreler pasajlanırken, istenilen miktarda hücre alabilmek amacıyla hücre sayım cihazı (Innovatis Cedex Xs) kullanılarak sayım işlemi uygulandı. Sayım işlemi için her uygulama öncesinde homojen hale getirilen 1 ml hücre süspansiyonundan 20 µl alınıp 1:5 dilüsyon yapıldı. Daha sonra %0,4 tripan mavisini (Sigma, T8154) ile 1:1 oranında dilüsyonu yapıldı.

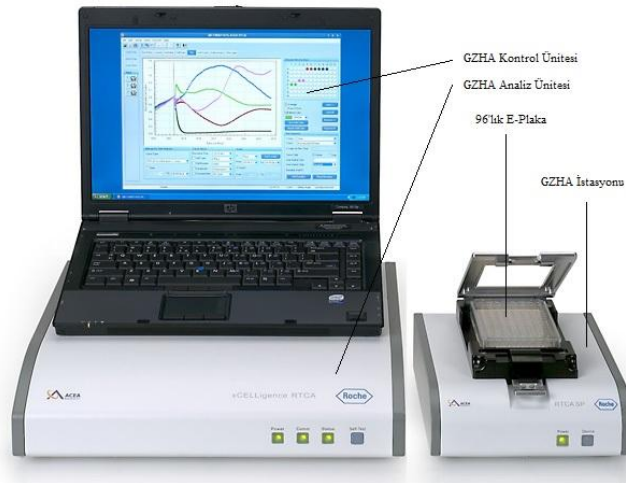
Tripan mavisini çözeltisi, tripan mavisine dayalı sitotoksite ve proliferasyon testlerinde kullanılır. Bu tür testler hücre pasajlama, dondurma ya da çözme gibi potansiyel olarak travmatik bir işlemden sonra canlı kalan hücrelerin oranını ölçmek için kullanılır. Sağlıklı canlı hücreler tarafından absorbe edilmeyen bir boyadır. Bu canlılık testi membran bütünlüğünün bozularak hücrenin, normalde geçirgen olmadığı bir boyayı alması esasına dayanır. Hücreler hasar gördüğünde veya öldüğünde, tripan mavisini hücrenin içine girer ve ölü hücrelerin sayılmasına izin verir (85).

Sayım kartuşunda (Cedex Smart Slide package, 05650801001) bulunan oluğa pipet ile 10 µl süspansiyon sızdırılarak yayılması sağlandı. Cihaz programına kullanılan dilüsyon faktörü girilerek ml'deki hücre sayısı belirlendi.

3.5. GZHA Büyüme Profili Deneyi

Gerçek zamanlı büyüme profili deneyinin esası, yapışan özellikteki hücrelerin mikro elektrot kaplı yüzeye yapıştıklarında empedansta meydana getirdikleri değişimin ölçülmesine dayanmaktadır. Empedans ölçümü; hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi gibi hücrelerin mevcut durumları hakkında gerçek zamanlı kantitatif bilgi verir. Herhangi bir boya veya kimyasal kullanmaya gerek kalmadan ölçüm yapılabilmektedir. Etiket ya da boyaya duyulan gereksinimi ortadan kaldırarak, edinilen verilerin fizyolojik olarak en üst düzeye getirilmesi sağlanır. Cihazın yazılımı, deneyin gerçek zamanlı olarak izlenmesine ve gerçek zamanlı olarak veri görüntüleme ve analiz fonksiyonlarını gerçekleştirmeye imkân verir (86, 87).

Gerçek Zamanlı Hücre Analizör'ü (GZHA) (xCELLigence® RTCA SP ACEA Biosciences); 96 kuyulu e-plaka (Roche, 05 232 368 001) (Şekil 3.1), cihaz istasyonu ve analiz ünitesi olarak 3 ana bileşene sahiptir 96 kuyulu e-plaka, inkübatörde bulunan cihaz istasyonuna elektronik olarak bağlanmaktadır. Cihaz istasyonu, inkübatör dışında bulunan analiz ünitesine bağlıdır. Sistemden e-plaka'ya sabit akımlı elektrik sağlanmaktadır (Şekil 3.2) (86, 87).



Şekil 3.1. Gerçek zamanlı hücre analiz cihazı

E-plakanın her bir kuyusundaki altın mikro elektrot biyosensörleri, yüzey alanının %70-80'ini kaplar ve her kuyucuğundaki elektrotlar, birbirine geçmeli bir dizi oluşturan "iplikler" e bağlanır. Bu düzenleme, hücre popülasyonlarının eşzamanlı olarak

izlenmesini sağlar ve böylece plakaya bağlanan hücre sayısı, hücrelerin boyutu/morfolojisi ve hücre-substrat bağlanma kalitesi için hassasiyet sağlar. Bu fiziksel özellikler, binlerce farklı gen/proteinin ürünü olduğu için, GZHA hücre sağlığı ve davranışıyla ilgili son derece geniş bir görüş alanı sağlar. Empedans izinin özellikleri spesifik hücresel/moleküler ilişkilendirmeyi mümkün kılmaktadır (86, 87).



Şekil 3.2. 96 kuyulu e-plaka

Her bir kuyudaki empedans değişimi bireysel olarak sistem analiz ünitesinde 10 kHz, 25 kHz ve 50 kHz olarak 3 farklı frekansta okunmaktadır. Ölçülen empedans ilk önce rezistansa, rezistans ise analiz ünitesi aracılığıyla hücre indeksi (CI) olarak adlandırılan bir orana çevrilir. CI aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır (86, 87).

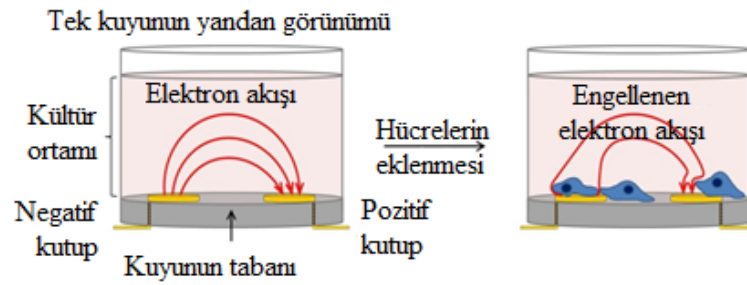
$$CI = \max_{i=1, \dots, N} \left(\frac{R_{\text{cell}}(f_i)}{R_b(f_i)} - 1 \right)$$

Şekil 3.3. CI hesaplama formülü

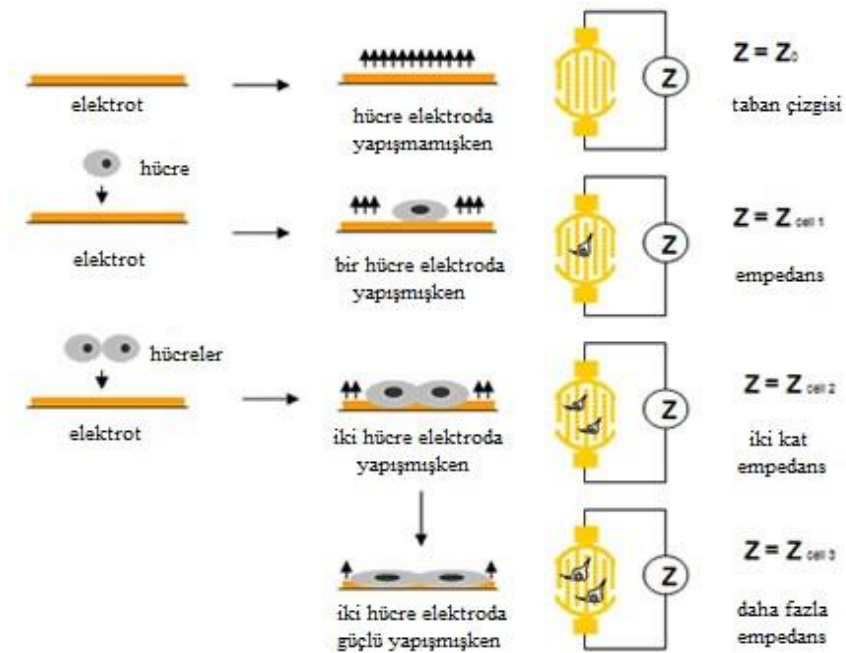
Formüldeki $R_{\text{cell}}(f_i)$ değeri, hücreler yüzeye bağlandığı anda mikro elektrotun frekansa bağımlı direnciyken, $R_b(f_i)$ ise elektrota hiç hücre bağlanmamışken ölçülen dirençtir. N, ölçüm alınan frekans noktalarıdır (Şekil 3.3) (86, 87).

$R_{\text{cell}}(f_i)$ ve CI değeri birbiriyle doğru orantılıdır. Hücre indeksindeki artış; hücre sayısının, adezyonunun veya yaygınlığının artışından; CI'deki azalma ise hücre

ölümünden veya tutunan hücrelerin morfolojik değişimlerinden kaynaklanmaktadır. Hücrelerin yokluğunda, elektrik akımı serbestçe kültür ortamı içinden akar ve elektrotlar arasındaki devre tamamlanır. Hücreler, elektroda yapışır ve çoğalırken, hücre sayısı, hücre boyutu/morfolojisi ve hücre-substrat bağlanma kalitesi son derece duyarlı bir okunuşla akım akışı engellenir (Şekil 3.4) (86, 87).



Şekil 3.4. Hücresel empedansa genel bakış

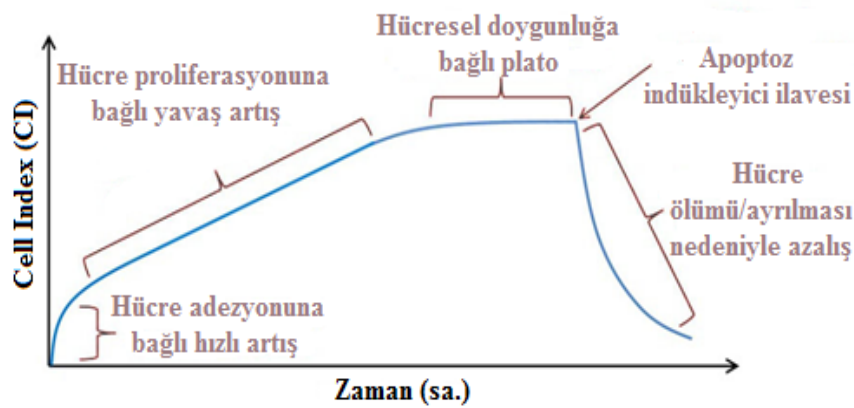


Şekil 3.5. Hücresel empedansın hücreyle ilişkili olarak değişimi

Bundan dolayı deneydeki yorumlar CI değişimi üzerinden yapılmaktadır. Test edilecek olan örneklerin uygulandığı kuyuların CI değeri kontrol CI'ne bölünerek % CI değişimini göstererek canlılık hakkında fikir verir (86, 87).

Genel bir apoptoz deneyinin kurulması ve yürütülmesi boyunca gerçek zamanlı empedans izinin genel bir örneği; empedans izinin her fazı ve ortaya çıkan hücresel davranışlarla (Şekil 3.5) açıklanmaktadır. Hücrelerin bir kuyuya eklenmesinden sonraki ilk birkaç saat boyunca, empedansta hızlı bir artış vardır. Buna hücrelerin süspansiyondan düşmesi, elektrotlara çökmesi ve fokal adezyonların oluşması neden olur. İlk eklenen hücre sayısı düşükse ve kuyu tabanında boş alan varsa hücreler çoğalır ve bu da CI'de kademeli ve istikrarlı bir artışa neden olur (86, 87).

Hücreler, doygunluğa ulaştıklarında, toplu ortam için erişilebilen elektrot yüzey alanının artık değişmediğini yansıtan CI değerini yayarlar. Bu noktada bir apoptoz indükleyici ilavesi, CI'de sıfıra düşüşe neden olur. Bu, hücrelerin yuvarlanması ve sonra da kuyu tabanından ayrılması sonucu oluşur. Empedansa dayalı deneyler son derece esnektir ve aynı zamanda elektrotlara ilk hücre yapışmasının hızını ve derecesini veya hücre proliferasyonunun hızını ve derecesini değerlendirebilir (Şekil 3.6) (86, 87).



Şekil 3.6. Genel bir apoptoz deneyi için gerçek zamanlı empedans izi değişimi

Bu deneyde; RL95-2 hücreleri istenilen ölçüde çoğaltılarak, hücre sayım cihazında sayılıp, elde edilen hücre sayısı/ml verisine dayanarak; 40.000, 20.000, 10.000, 5.000, 2.500 ve 1.250 hücre/kuyu olacak şekilde 96'lık e-plakanın kuyularına 100 µl besiyeri hacminde dağıtıldı. Besiyerinden kaynaklanan CI değişiminin kontrolü için hücre

içermeyen besiyeri kuyuları kontrol olarak kullanıldı. GZHA yazılımı aracılığıyla 15 dk.'da bir 120 sa. CI ölçümü yapılacak şekilde ayarlandı. Deneyler 8 paralel çalışıldı.

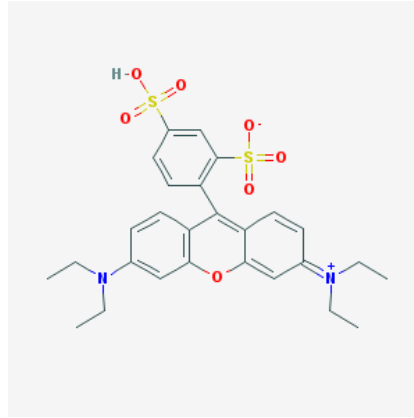
3.6. RL95-2 Hücresindeki Sitotoksik Etkinin Sülförodamin B (SRB) Deneyi ile Belirlenmesi ve IC₅₀ Hesaplanması

Sülförodamin B (SRB) (Santa Cruz sc-253615A) deneyi, hücre çoğalmasını değerlendirmede kullanılan majör bir sitotoksik tarama tekniğidir (88).

SRB (Şekil 3.7); iki sülfonik grup içeren, negatif yüklü, asidik ortamda temel aminoasit yapılarına bağlanan ve bazik ortamda ayrılabilen, aminoksanten yapıda koyu pembe renkli bir boyadır. Sülförodamin B deneyinde; SRB'nin hücre proteinlerinin temel aminoasitlerine stokiometrik olarak bağlanması sonucu, boyanmış hücrelerden elde edilen boya miktarı ile doğrudan total protein kütlesi hakkında dolayısıyla da hücre sayısı hakkında fikir veren kolorimetrik bir yöntemdir (89, 90).

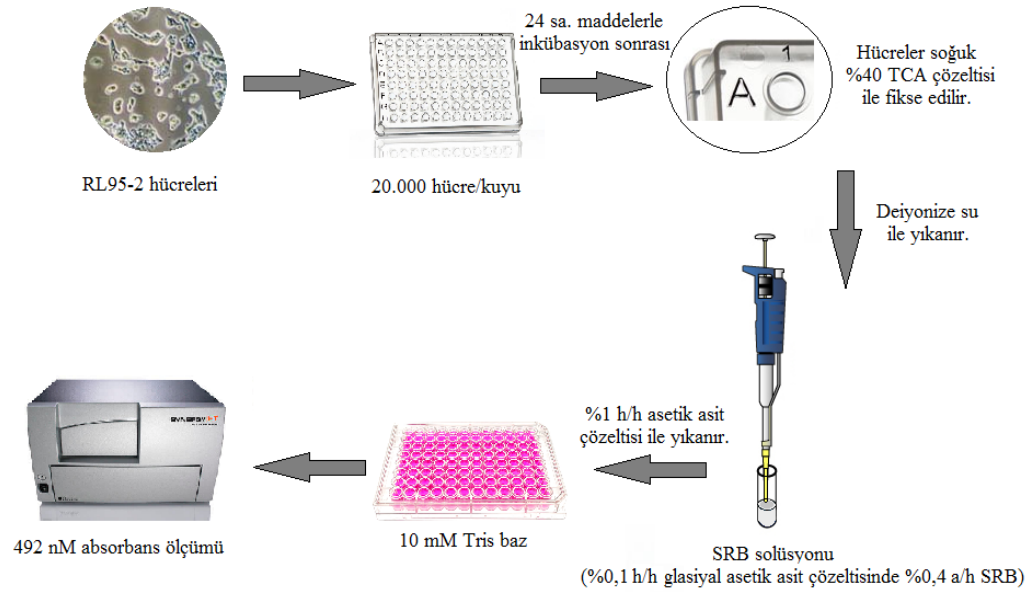
SRB deneyinin esası; trikloroasetik asit (TCA) (Sigma T6399) ile mikro plakaya fikse edilen hücrelerdeki makro moleküler karşıt iyonlara elektrostatik olarak bağlanması daha sonra bu bağlanmaların ve çözünürlüğün pH'daki değişiklikler tarafından kontrol edilmesidir. Bu boya kantitatif olarak hücrelerden zayıf bazlarla çıkarılabilir ve optik yoğunluk ölçümü için çözünür hale getirilebilir (89, 88, 91).

SRB deneyi; pahalı olmayan, hassas, basit, tekrarlanabilir ve formazan dayalı deneylere göre daha hızlıdır. Daha iyi bir linearite ve sinyal-gürültü oranı verir. Ayrıca zamana duyarlı ölçüm gerektirmeyen kararlı bir son noktaya sahiptir (89, 90).



Şekil 3.7. Sülforodamin B'nin 2D kimyasal yapısı (92)

GZHA büyüme profili deney sonucuna göre, RL95-2 hücrelerinin 96'lı mikro plakaya 20.000 hücre/kuyu dağıtılması en uygun hücre sayısı olarak belirlendi ve hücre ekimine bu sayıda devam edildi.



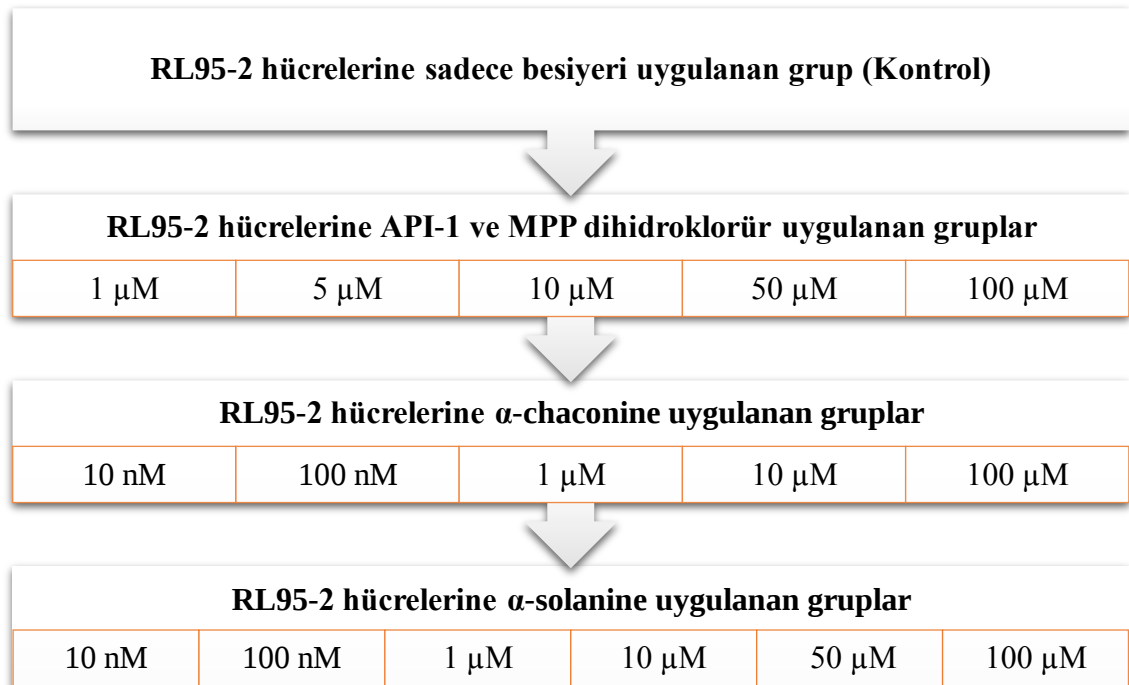
Şekil 3.8. SRB deney prosedürü

RL95-2 hücreleri DMEM:F12 besiyerinde çoğaltıldı. Flasktaki hücreler sayılarak 96 kuyulu mikro plakada (Greiner) 20.000 hücre/kuyu olacak şekilde 100 µl besiyerinde

ekildi. 24 sa. sonra örnekler belirlenen konsantrasyonlarda uygulandı. Daha sonra +4 °C'den alınan %40'lık soğuk TCA çözeltisi mikro plakanın kuyularına ilave edildi ve +4 °C'de 1 sa. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyuların içeriği uzaklaştırıldı ve 5 defa deiyonize su ile yıkandı. Kuyuların kurummasının ardından %1 asetik asit içerisinde hazırlanmış %0,4 SRB solüsyonu kuyulara 50 µl eklendi. Mikro plaka 30 dk. oda sıcaklığında bekletildi. SRB solüsyonu kuyulardan uzaklaştırıldı. Mikro plaka hızlı bir şekilde 5 defa %1 h/h asetik asit çözeltisi ile yıkandıktan sonra kuyular kurumaya bırakıldı. Daha sonra kuyulara 10 mM Tris bazı (pH 10,5) 100 µl eklendi ve 5 dk. çalkalayıcıda (PST-60 HL plus Biosan) 350 rpm'de çalkalandı. Mikro plaka okuyucuda (Biotek Synergy HT) 492 nm'da absorbanslar ölçüldü (Şekil 3.8). Maddelerin uygulandığı kuyuların absorbansları kontrol absorbansına bölündü ve % canlılık üzerinden hesaplama yapıldı. Deneyler 5 paralel çalışıldı.

Bu deneyde; çalışılacak maddelerin RL95-2 hücrelerinde canlılığa etkisi ilk önce genel doz taraması şeklinde SRB yöntemi ile değerlendirildi.

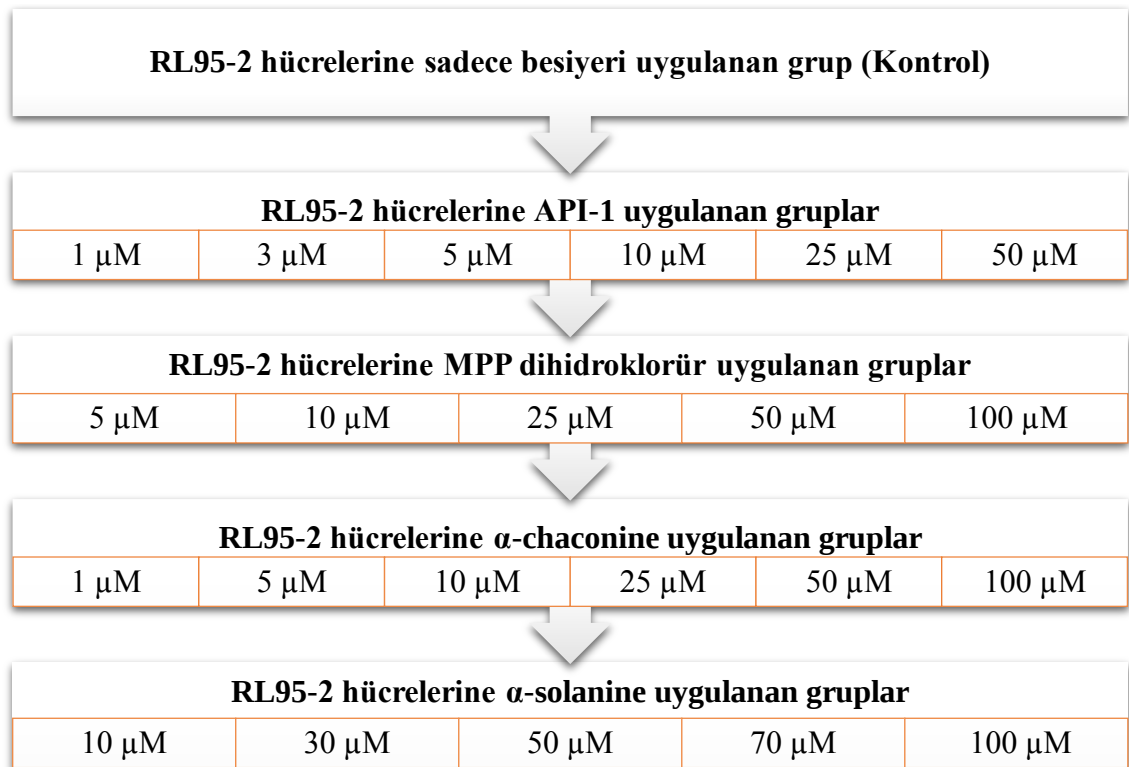
Genel doz taraması için deney grupları:



Genel doz taraması deney sonuçlarına göre; maddelerin sitotoksik etkilerini daha dar konsantrasyon aralıklarında değerlendirilebilmek ve IC₅₀ değerini hesaplayabilmek için yeni konsantrasyonlar belirlendi. Farklı hücreler üzerinde denenmiş API-1 (Tocris,

3897), MPP dihidroklorür (Tocris, 1991), α -chaconine (AppliChem, A9544) ve α -solanine (Sigma, S3757) uygulamalarının olduğu literatürlerin konsantrasyonları ve uygulama süreleri de göz göz önünde tutularak bir konsantrasyon gradyanı belirlenmiştir. Bu konsantrasyonların da RL95-2 hücrelerinde canlılığa etkisi SRB yöntemi ile değerlendirildi. Daha sonra GraphPad Prism 7.01 programı uygulanan konsantrasyon ve % hücre canlılık eğrisi belirlenerek Microsoft Excel programıyla da IC₅₀ değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

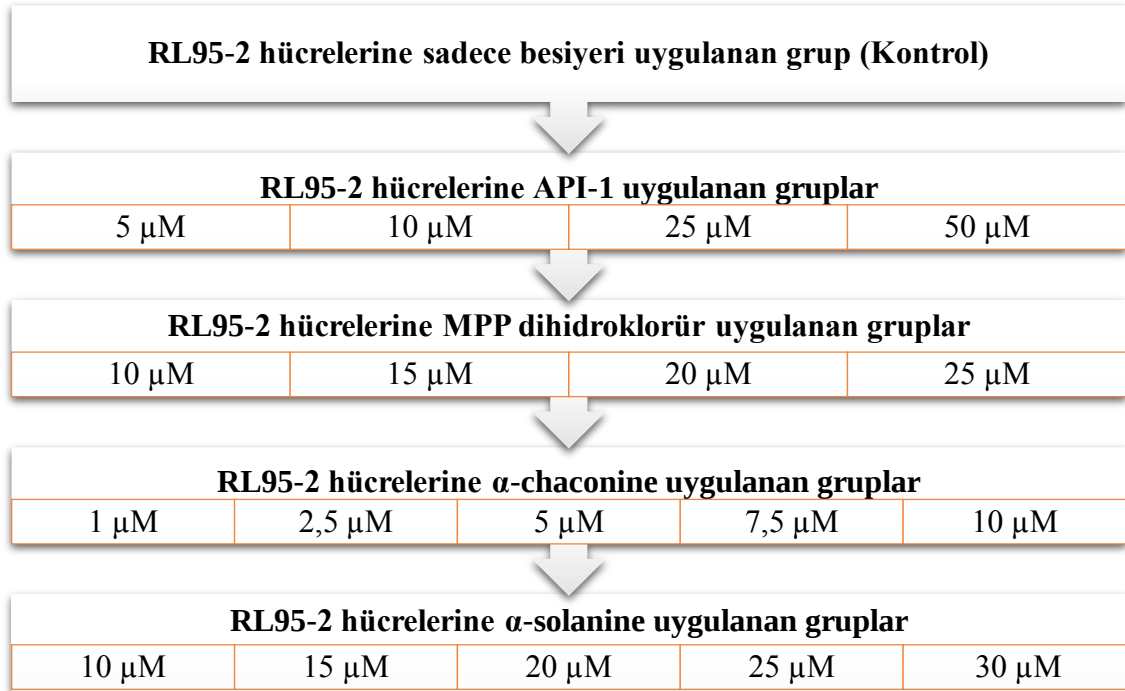
IC₅₀'yi belirlemek için deney grupları:



3.7. GZHA Canlılık Deneyi

SRB genel doz tarama ve IC₅₀'nin belirlendiği deneylerden elde edilen veriler moleküller üzerinde bir ön fikir sahibi olunmasını sağladı. Bu verilere dayanarak maddelerin yeni belirlenen dozlarda, gerçek zamanlı etkilerinin görülebilmesi amacıyla xCELLigence GZHA'da canlılık deneyi yapıldı. RL95-2 hücrelerinin büyüme profilinden elde edilen zamana bağlı CI verisi göz önüne alınarak maddelerin uygulama saati belirlendi. Deneyler 5 paralel çalışıldı.

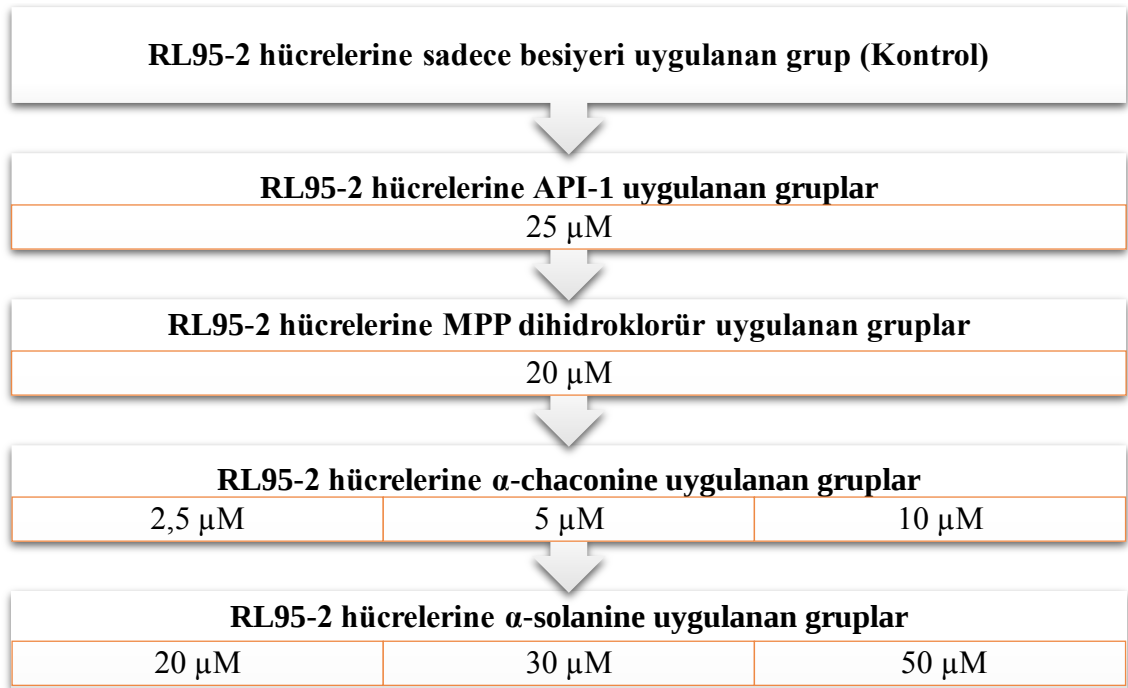
GZHA için deney grupları:



Maddeler RL95-2 hücrelerine belirlenen konsantrasyonlarda uygulandıktan sonra etkisi 90 sa. boyunca izlendi. Cihaz yazılımı aracılığıyla maddelerin uygulamasından 24 sa. sonundaki hücre indeksi verileri ile α -chaconine ve α -solanine'in IC_{50} değerleri hesaplandı.

3.8. Deney Grupları

Western blot, qPCR ve ölçüm kitlerinde çalışılacak konsantrasyonlar aşağıdaki gibi belirlenerek 9 deney grubu oluşturuldu. Maddeler ilgili hücre gruplarına uygulanarak 24 sa. süreyle muameleye bırakıldı.

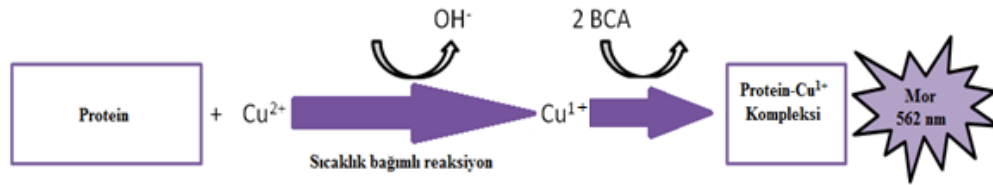


3.9. BCA ile Protein Miktar Tayini

Western blot deneyinde kullanılmak üzere izole proteinlerin hazırlanmasında, hücreler her bir kuyuda 1×10^6 hücre/1 ml olacak şekilde 6'lı plakalara (Greiner) ekildi. Hücreler yüzeye tutunduktan sonra besiyeri uzaklaştırılıp deney gruplarındaki madde konsantrasyonları 1 ml hacminde hücrelere uygulandı. Maddelerin 24 sa. uygulama sürelerinin sonlanmasını takiben hücrelerden protein izolasyonu işlemine geçildi. Hücrelerden izole edilen protein konsantrasyonu ölçümünde bikinkoninik asit (BCA) protein analiz kiti (Cell Signaling, 7780) (93) kullanıldı.

Bu deneyde; 9 deney grubundan elde edilen protein örneklerin konsantrasyon ölçümleri, BCA protein analiz kiti protokolüne uygun olarak, mikro plaka okuyucu cihaz ile yapıldı.

BCA protein tayin yöntemi; bakır sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili renk verir. Bu solüsyonun protein solüsyonuna ilavesi ile BCA, proteinlerden elektron alarak Cu^{+2} formundan Cu^{+1} formuna indirgenen bakır kanyonlarına bağlanır. Reaksiyon sonucu elma yeşili renk mor renge dönüşür ve mor renk 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (Şekil 3.9) (94).



Şekil 3.9. BCA protein tayin yöntemi mekanizması

BCA protein analiz kiti, aşağıdaki tampon maddeleri ile hazırlanan, mikro-plaka okuyucuda lizatların veya homojenatların protein konsantrasyonunun ölçülmesinde kullanılır. Kit protokolünde; redüktörler, şelatörler, deterjanlar ve lizis tamponunda bulunan diğer ortak bileşenlerin etkileşimini azaltmak için BCA Uyumluluk Reaktifi'nin (BCA Compatibility Reagent) kullanılması önerilmektedir.

Kit protokolüne ve ölçüm yapılacak deney grubu sayısına uygun şekilde hesaplama yapıldı. Protein standardı olarak sığır serum albümin (BSA) kullanıldı. Mikro plaka okuyucu cihazda ölçüm yapıldıktan sonra konsantrasyon sonuçları ' $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ' olarak alındı.

BSA standart eğri çözeltisi:

BSA standart eğrisini oluşturmak için 8 mg/ml olacak şekilde deiyonize su ile stok çözeltisi hazırlandı ve 1/2 katlı dilüsyonlar yapıldı.

Absorbansa karşılık konsantrasyon grafiği çizilerek bir eğri denklemi elde edildi.

Kit protokolüne göre re ajanların hazırlanması:

Çalışan Yeniden Yapılanma Tamponu (Working Reconstitution Buffer) için; Yeniden Yapılanma Tamponu (Reconstitution Buffer) 1:1 oranında dH_2O ile dilüe edildi.

Uyumluluk Reaktifi Solüsyonu (Compatibility Reagent Solution) için; 1 Uyumluluk Reaktifi (Compatibility Reagent) tüpüne 100 μl Çalışan Yeniden Yapılanma Tamponu ilave edildi ve 15-20 kez pipetaj yapıldı.

BCA Reaktifi A; 0,1 M sodyum hidroksitte sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, bikinkoninik asit ve sodyum tartarat, BCA Reaktifi B ise; %4 bakır sülfat içermektedir.

BCA Çalışma Reaktifi (BCA Working Reagent) için; BCA Reaktifi A 50:1 BCA Reaktifi B karışımı hazırlandı. Elma yeşili renk gözlemlendi.

Kit protokolüne göre deneyin yapılışı:

- Standart kontrol, protein standardı ve örneklerden mikro plakaya 9 µl eklendi.
- Dört µl Uyumluluk Reaktifi Solüsyonu her bir kuyuya eklendi.
- Plakanın üzeri kapatılıp çalkalayıcıda orta hızda yaklaşık 1 dk. kadar bırakılarak daha sonra 37°C 15 dk. inkübe edildi.
- 260 µl Çalışma Reaktifi her kuyuya eklendi.
- Plaka üzeri kapatılıp çalkalayıcıda orta hızda yaklaşık 1 dk. kadar bırakıldı daha sonra 37°C 30 dk. inkübe edildi.
- Plaka oda sıcaklığında 5 dk. bekletildi.
- Standart Kontrol kör olarak okutuldu. Standartların ve örneklerin 562 nm mikro plaka okuyucuda absorbansı ölçüldü.
- Örneklerdeki toplam protein konsantrasyonu belirlendikten sonra her bir örnekten eşit miktarda protein alınabilecek şekilde gerekli hesaplamalar yapıldı.

3.10. Western Blot Deneyi

BCA protein ölçüm kiti ile örneklerin protein konsantrasyonu ölçüldükten sonra gerekli hesaplamalar yapılarak western blot deneyinde kullanılacak jelin her bir kuyusuna yüklenecek protein için total proteinden alınması gereken hacim hesaplandı.

Western blot yöntemi ile de uygun antikorlar (Tablo 2.4) kullanılarak β -aktin, Akt, p-Akt (Ser473), ER α ve p-ER α proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi.

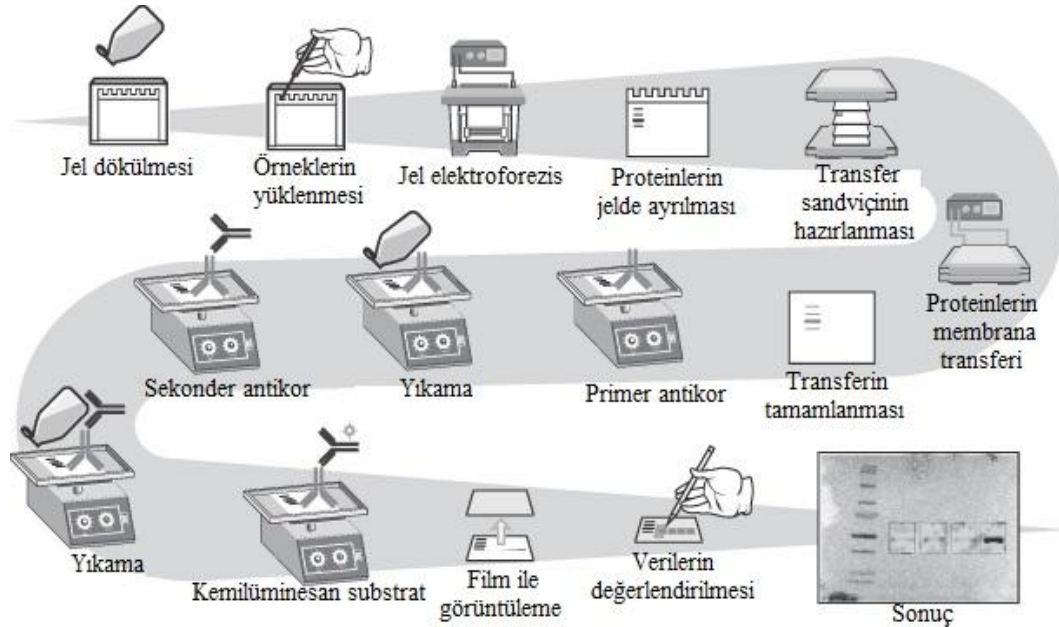
Tablo 2.4. Western blot yöntemi için kullanılan primer ve sekonder antikorlar

Kullanılan Primer Antikor	Kaynak	MA (kDa)	Dilüsyon Oranı	Çözücü	Marka
Akt	Tavşan	60	1:1000	1X TBS, %0,1 Tween® 20 içinde %5 a/h BSA	Cell Signaling
β -Aktin	Tavşan	45	1:1000	1X TBS, %0,1 Tween® 20 içinde %5 a/h BSA	Cell Signaling
ER α	Tavşan	66	1:1000	1X TBS, %0,1 Tween® 20 içinde %5 a/h BSA	Cell Signaling
p-Akt (Ser473)	Tavşan	60	1:1000	1X TBS, %0,1 Tween® 20 içinde %5 a/h BSA	Cell Signaling
p-ER α	Tavşan	66	1:1000	1X TBS, %0,1 Tween® 20 içinde %5 a/h BSA	Cell Signaling
Kullanılan Sekonder Antikor	Kaynak	MA (kDa)	Konsantrasyon	Çözücü	Marka
Goat anti rabbit	Keçi	-	1:1000-1:3000	1X TBS, %0,1 Tween® 20 içinde %5 a/h yağsız süt tozu	Cell Signaling

İmmünoiblottlama veya protein blottlama olarak da bilinen western blot, hücre biyolojisi ve moleküler biyolojide temel bir teknik olup hücrelerden ekstrakte edilen kompleks bir karışımdaki spesifik bir proteinin varlığını saptamak için kullanılan protein analiz yöntemidir. Western blot tekniği, protein ifadesi, protein lokalizasyonu, protein-protein etkileşimleri veya post translasyonel modifikasyon gibi moleküler olayları aydınlatmaya imkan verir. Boyutlarına göre ve bir antikorun bağlanması yoluyla spesifik bir proteinin varlığını açıkça gösterme yeteneği ve proteinlerin hücrelerdeki ekspresyon seviyelerini değerlendirmek için çok uygun bir yöntemdir. Aynı şekilde, çeşitli dokulardaki hedef proteinin ekspresyonunu karşılaştırmak veya belirli bir proteinin hastalık veya ilaç tedavisine nasıl tepki verdiğini görmek için yararlıdır (95-97).

Western blot temel anlamda; jel elektroforezi kullanılarak protein karışımlarının boyutuna göre ayrılması; ayrılmış proteinlerin katı bir desteğe verimli bir şekilde aktarılması ve uygun şekilde antikorlarla eşleşen bir hedef proteinin spesifik olarak

saptanması olarak 3 işlem basamağına ayrılır. Elde edilen sonuçların yorumlanması ve anlaşılması kolaydır. Bu yöntem spesifik proteinin tanınması ve bu protein hakkında kalitatif ve semi kantitatif veri elde edilmesinde kullanılır (95-97) (Şekil 3.10) .



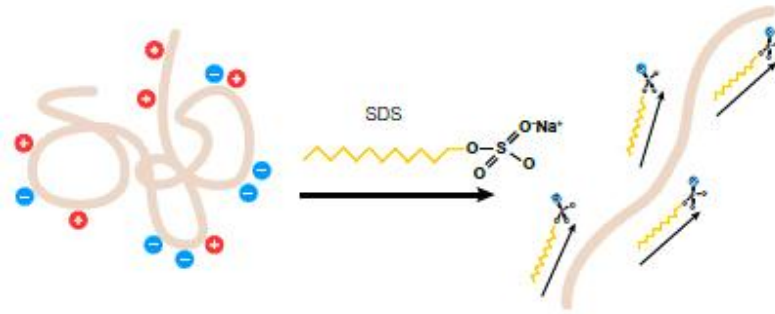
Şekil 3.10. Western blot aşamaları (98)

Bu çalışmada; farklı madde uygulamaları yapılan RL95-2 hücrelerinden elde edilen total proteinlerde β -aktin, Akt, p-Akt (Ser473), ER α ve p-ER α proteinlerinin ekspresyon düzeyleri western blot yöntemi ile belirlendi. Western blot deneyleri Bio-rad Mini-Protean Tetra Cell cihazı ile yapıldı ve 165-8000 katalog numaralı kullanım kılavuzu kullanıldı (84). İşlem 8 aşamada gerçekleştirildi:

3.10.1. Protein İzolasyonu

Lizis, hücre membranının bütünlüğünün bozulup parçalandığı ve hücrenin içeriğinin çözülebilir bir formda yeniden süspansiyon edildiği süreçtir. Lizis tamponundaki birincil aktif maddeler, iyonik veya non-iyonik deterjanlardır. SDS (Şekil 3.11) bir iyonik deterjanken Tween, Triton X ve NP-40 ise non-iyonik deterjandır. İyonik deterjanlar, protein yapısına müdahale edebilme özelliğinden dolayı iyonik olmayan deterjanlardan daha sert olarak kabul edilir. Bu nedenle, denatüre formlara veya hedef proteinin sentetik peptidlerine karşı yükseltelen antikorlar ile kullanımı önerilir. Eğer daha fazla

denatüre ihtiyaç duyulursa, S-S bağlarını parçalamak için indirgeyici bir madde (DTT veya β -merkaptoetanol) kullanılabilir. Non-iyonik deterjanlar daha az protein denatürasyonuna yol açar, bu nedenle eğer doğal proteinlere karşı geliştirilen birincil antikolar kullanılırsa önerilirler. Doğru lizis tamponunun kullanılması, düşük miktarda hedef proteinin saptanmasına olanak sağlar.



Şekil 3.11. Proteinlerin SDS bağlanması sonucu denatürasyonu (99)

Protein izolasyonu için Radyoimmünopresipitasyon (RIPA) lizis tampon sistemi (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948) kullanıldı. RIPA lizis tampon sistemi; lizis tamponu, proteaz inhibitör kokteyli, fenil metil sülfonil florür (PMSF), sodyum ortovanadat (Na_3VO_4) ve hücrenin parçalanmasına yardımcı non-iyonik ve iyonik deterjanlar içermesi nedeniyle çeşitli hücre tiplerinden protein ekstraksiyonu için oldukça etkilidir. Hazırlarken 970 μl RIPA tamponu, 10 μl PMSF, 10 μl Na_3VO_4 ve 10-20 μl proteaz inhibitör kokteyli ile hazırlandı (Tablo 3.1). Daha sonra fosfataz inhibitör kokteyli, proteolizi önlemek ve proteinlerin fosforilasyon durumunu korumak için kullanılmadan önce tampona eklendi.

Altılı plakalarda bulunan maddeleri içeren besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi, AppliChem A9177, Oxoid BR0014G) ile yıkanıp hücre kazıyıcı ile kaldırıldıktan sonra 10.000 rpm'de $+4^\circ\text{C}$ 'de 10 dk. santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar çekildi ve 1 ml PBS eklendi. 10.000 rpm'de $+4^\circ\text{C}$ 'de 10 dk. santrifüj edildi. Tüplerin dibinde kalan pelletler (izole edilen hücreler) ile protein izolasyonu yapıldı. Tüplere 50-100 μl hücre lizis tampon sistemi eklendi ve örnekler ultrasonikatör ile sonikasyon yapılarak $+4^\circ\text{C}$ 10.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.

Pelletlerinden arındırılmış karışımın süpernatant kısmı ayrı tüplere alındı ve protein konsantrasyonu bikinkonik asit (BCA) protein analiz kiti (Cell Signaling, 7780) ile belirlendi. Lizatlar daha sonra -80 °C’de saklandı.

Tablo 3.1. RIPA lizis tampon sistemi içeriği ve RIPA lizis tamponu

	RIPA lizis tampon sistemi içeriği	RIPA lizis tamponu (1 ml için)
Vial 1	50 ml 1X lizis tamponu (pH 7,4 ± 0,1)	970 µl
Vial 2	500 µl (200 mM) DMSO içinde PMSF	10 µl
Vial 3	500 µl DMSO içimde proteaz inhibitör kokteyli	10 µl
Vial 4	500 µl (100 mM) su içinde sodyum ortovanadat	10 µl

3.10.2. Poliakrilamit Jelin Hazırlanması ve Dökülmesi

Jel içerikleri Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell (katalog numarası 165-8001) kullanım kılavuzunda belirtildiği gibi yığılmalı ve ayırıcı olmak üzere 2 ayrı jel çözeltisi hazırlandı (84). Deneylerde kullanılan jel çözeltilerinin içerikleri Tablo 3.2’de verilmektedir.

Tablo 3.2. Yığılmalı ve ayırıcı jel çözeltileri içerikleri

Jel yüzdesi	Deiyonize su (ml)	%30 (ml)	Bisakrilamit (ml)	Jel tamponu* (ml)	%10 a/h SDS (ml)
%7	5,1	2,3	2,5	0,1	
%10	4,1	3,3	2,5	0,1	

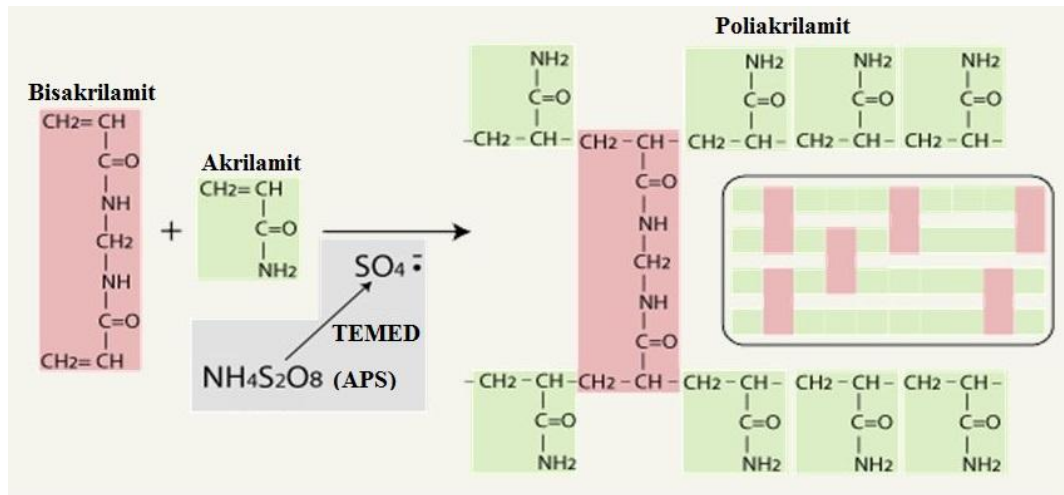
* Ayırıcı jel tamponu-1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

* Yığılmalı jel tamponu-0,5 M Tris-HCl pH 6,8



Şekil 3.12. Western blot gel dökme aparatı, elektroforez tankı ve güç kaynağı

İlk olarak SDS-PAGE jeller hazırlandı. Bunun için jel çözeltileri hazırlandıktan sonra jel hazırlama düzeneği (Şekil 3.12) kullanıldı. Camlar sırasıyla %70 etanol h/h ve dH₂O ile temizlenip oda sıcaklığında kurutuldu. Uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel hazırlama düzeneğine yerleştirildi. Hazırlanan jel karışımına polimerleşmeyi sağlayacak olan TEMED (Sigma, T9281) ve APS eklenip ayırıcı jel çözeltisi kısa camın üst kısmından 1 cm aşağısına gelecek ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Arta kalan jel baz alınarak polimerizasyonun tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edildi ve jel üst sınırının düzgün olması için hava ile temas eden yüzeyine temasın kesilmesi ve daha çabuk polimerizasyonu için butanol (Fluka, 19430) eklendi. Jel polimerleştikten sonra jelin üzerindeki butanol uzaklaştırıldı ve dH₂O ile yıkandı. Jel yüzeyindeki su uzaklaştırılıp yüzey kurulandıktan sonra hazırlanan yığınlayıcı jel çözeltisine TEMED ve APS eklenip camlar arasında kalan 1 cm'lik boşluğa aktarıldı ve kuyuların oluşması için 1 mm'lik tarak dikkatlice camlar arasına yerleştirildikten sonra polimerizasyon (Şekil 3.13) için bekledi.



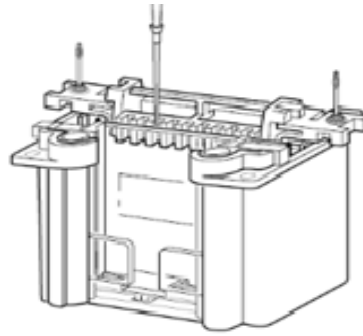
Şekil 3.13. Western blotta jel polimerizasyonu

3.10.3. Örneklerin Yüklenmek Üzere Hazırlanması

Kuyularda 30 µg protein olacak şekilde belirlenen hacimlerde lizat alınarak ependorflara koyuldu ve 6X protein yükleme tamponu hazırlanarak ependorflara eklendi. Örnek proteinlerin denatüre olup eksi yükle yüklenebilmeleri için ısıtıcı kuru

bloкта (CHB-202 Bioer) 95 °C’de 5 dk. kaynatıldı. Sonrasında buza gömüldü ve 1 kez spin (GmClab Gilson®) edildikten sonra yeniden buza gömüldü.

Polimerizasyonun tamamlanmasından sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve örneklerin yüklenmesi için hazır hale getirilmiştir kuyular yıkandı. Daha sonra vertikal elektroforez sistemi (Şekil 3.14) içerisine hazırlanan jeller dikkatlice yerleştirildi sonra da 1X elektroforez yürütme tamponu tankta belirtilen yere kadar ilave edildi.



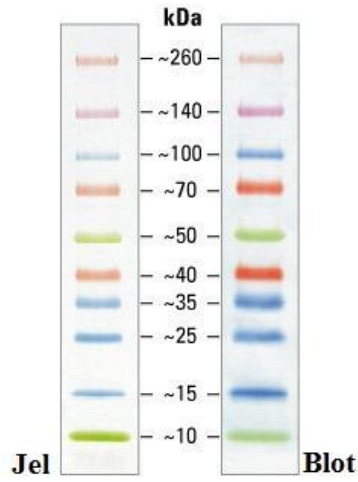
Şekil 3.14. Western blotta örneklerin kuyulara yüklenmesi (84)

Moleküler ağırlığı işaretleyicisi olarak spectra çok renkli geniş aralıklı protein merdiveni (Şekil 3.15) (Thermo Scientific, 26634-2) kullanıldı. Marker 15 µl ve diğer her bir kuyucukta 30 µg protein içeren homojenat kuyucuklara yüklendi.

Tablo 3.3. Western blot deney gruplarının kuyulara yüklenme sırası

1.ku yu	2.ku yu	3.kuyu	4.kuyu	5.kuyu	6.kuyu	7.kuyu	8.kuyu	9.kuyu	10.kuyu									
Marker	Kontrol	API-1	25 µM	MPP	dihidroklortür	20 µM	α-Chaconine	2,5 µM	α-Chaconine	5 µM	α-Chaconine	10 µM	α-Solanine	20 µM	α-Solanine	30 µM	α-Solanine	50 µM

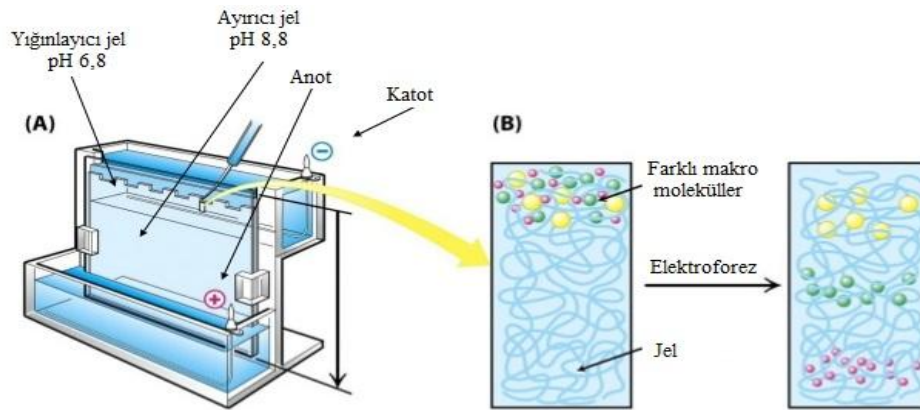
Western blot deneyi için deney grupları bütün deneylerde Tablo 3.3’te verildiği sıradadır ve ilk kuyuda her zaman geniş aralıklı marker bulunmaktadır.



Şekil 3.15. Geniş aralıklı çok renkli protein merdiveninin SDS-PAGE bant profili

3.10.3. Elektroforezin Yapılması

Elektroforez (Şekil 3.16) 70 V ile başlatıldı. Protein bantları yığılmalı jel den ayırıcı jele geçince elektroforez 100 V'a çıkarıldı. Bromfenol mavisi jelin en alt sınırına gelince elektroforez sonlandırıldı.

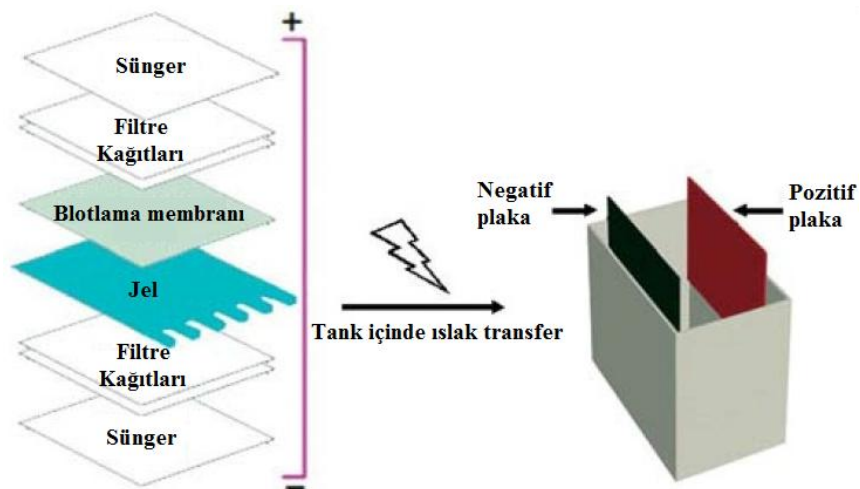


Şekil 3.16. Western blotta elektroforeze genel bir bakış (100)

3.10.4. Proteinlerin Membrana Transferi

Jeldeki proteinlerin tamamının jeldeki yerleri ve ayrılma derecelerini bozmadan protein tutucu bir membrana aktarılması işlemidir.

Elektroforez tamamlandıktan sonra camlar spatula yardımıyla ayrılarak jel ortaya çıkartılıp jelin protein bulunmayan yığılmalı jel kesilip atılmıştır. Transfer için PVDF membran (Bio-Rad, 162-0177) uygun boyutta (6 X 8 cm) kesilerek %100'lük metanol içinde 15 saniye bekletilerek aktive daha sonra transfer tamponunda 30 dk. hidrate edildi. Jel, kaset, sünger, filtre kağıdı içinde bir miktar transfer tamponu bulunan uygun bir kaba alındı. Daha sonra western sandviçi hazırlandı (Şekil 3.17). Kasetin siyah yüzü alt tarafa gelecek şekilde açıldı ve sırasıyla sünger-Watmann kağıdı-jel-membran-Watmann kağıdı-sünger yerleştirilerek hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edilerek kapatıldı Sandviç oluşturulurken tüm hava boşluklarının giderilmesi için yuvarlak bir silindir ile hafif basınç uygulandı. Kaset dikey olarak, renksiz yüzü elektrot modülünün kırmızı kısmına, siyah yüzü elektrot modülünün siyah kısmına bakacak şekilde yerleştirildi. Buz aküsü de tanka yerleştirildikten sonra transfer tamponu tankta belirtilen çizgiye kadar dolduruldu (Şekil 3.18). Tüm sistem buzun içerisine oturtuldu. Güç kaynağı 100 V'a ayarlanarak 1 sa. 20 dk. soğukta transfer yapıldı.



Şekil 3.17. Western blot transfer tankı ve aparatları



Şekil 3.18. Western blot transfer tankı ve transfer sandviçi hazırlanması (97)

3.10.5. Blokaj

Transfer sonlandıktan sonra sandviç açılarak membran ters çevrilerek uygun bir kaba alındı. Membran, üzerindeki non-spesifik bağlanma bölgelerinin bloke edilmesi için, 10 ml TBST çözeltisi içinde hazırlanan %5'lik süt tozu ile 1 sa. bloklamaya bırakıldı.

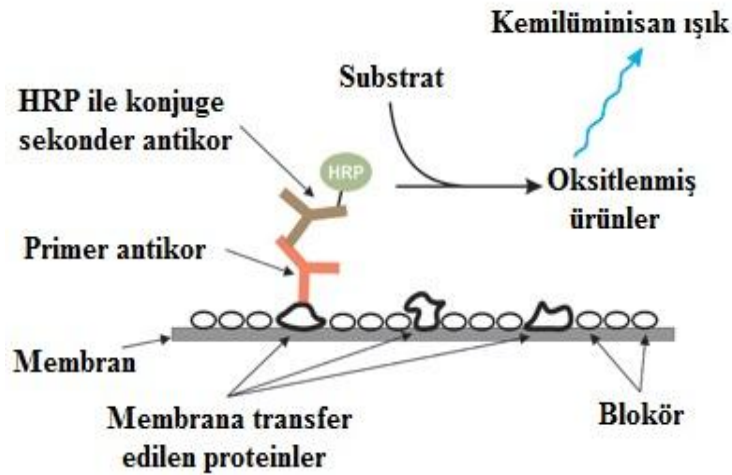
3.10.6. Membranların Primer ve Sekonder Antikor ile İnkübasyonu

Blotlama işleminden sonra membranlar %5 a/h BSA/TBST çözeltisinde hazırlanan primer antikor ile çalkalayıcıda 1 gece 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra 3 defa 10 dk. TBST ile yıkandı ve %5 a/h BSA/TBST çözeltisinde hazırlanan sekonder antikor ile 2 sa. oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra 2 defa 10 dk. TBST ile yıkandı.

3.10.7. Görüntüleme İşlemi

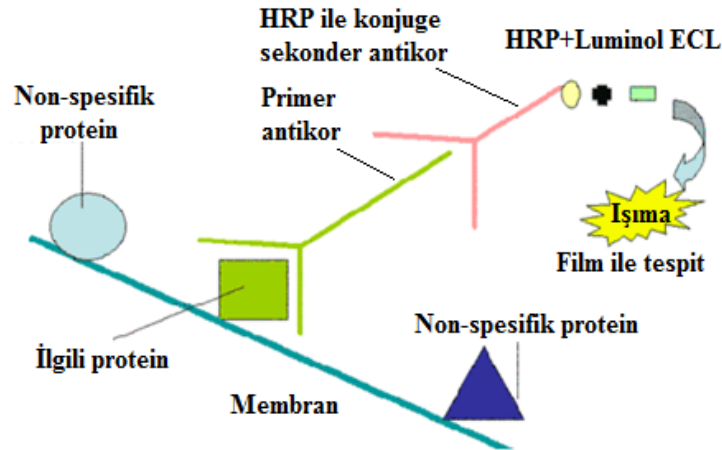
Görüntüleme işlemi karanlık odada yapıldı. Membran asetat kağıtlarının arasına koyuldu. Membranın koyulacağı hizaya karanlık odada görüntülemeye kolaylık sağlaması açısından fosforlu etiketler yapıştırıldı. Kemilüminesan substrat, enzim ile kombine olduğunda kimyasal reaksiyon ışık verir (Şekil 3.19). Bundan dolayı her bir PVDF Membranın görüntülenmesi için, karanlık odada kemilüminesan görüntüleme solüsyonu (Thermo Scientific 34080) içindeki reaktif solüsyonu (solüsyon A) ve tampon solüsyonu (solüsyon B) 500 µl 1:1 oranında karıştırılarak membranın üzerine

eklendi. Işıma meydana geldiğinde film asetat kağıdının üzerine kapatıldı ve yeterli sürede bekletildi (Şekil 3.20). Filmin banyo işlemi sırasıyla developer solüsyonu, su ve fixer solüsyonunda bekletmek suretiyle yapıldı. Film banyosu sonrası filmde siyah bantlar izlendi.



Şekil 3.19. Western blot görüntüleme işleminde kimyasal ışımının mekanizması-I

Röntgen filmindeki bantların alanları ve optik dansiteleri (OD) ImageJ (ImageJ, ABD) programı aracılığıyla belirlendi. İlgilenilen protein ölçümleri [alan (mm^2) x optik dansite (OD/mm^2)] formülünden hesaplanarak kantite edildi. Her protein için yapılan bu ölçümlerden sonra aynı örneklerle ait β -aktin ekspresyonları aynı şekilde belirlendi. Elde edilen protein bantlarının Akt aktivasyon seviyesi p-Akt (Ser473)/Akt, ER α aktivasyon seviyesi p-ER α /ER α oranı olarak ifade edildi.



Şekil 3.20. Western blot görüntüleme işleminde kimyasal ışımının mekanizması-II

3.11. RNA İzolasyonu, Revers Transkripsiyon ile cDNA Oluşturulması ve qPCR Deneyi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) DNA molekülünün kısa bir bölgesinin DNA polimeraz enzimi ile birçok kez kopya edilmesidir. Moleküler araştırmaların temel yöntemlerindendir ve gerçek zamanlı PCR ise tekniğin potansiyelini en üst yüzeye çıkaran gelişmiş bir PCR'dir. Temel olarak; denatürasyon, annealing (bağlanma) ve uzama olarak 3 aşaması vardır (101).

PCR temel olarak tek bir test tüpünde bir takım reaktiflerle DNA'yı karıştırmak ve karışımı programlı bir tarzda değişen bir seri sıcaklıkta inkübe etmeyi sağlayan bir PCR cihazına tüpü yerleştirmekle gerçekleştirilir (101).

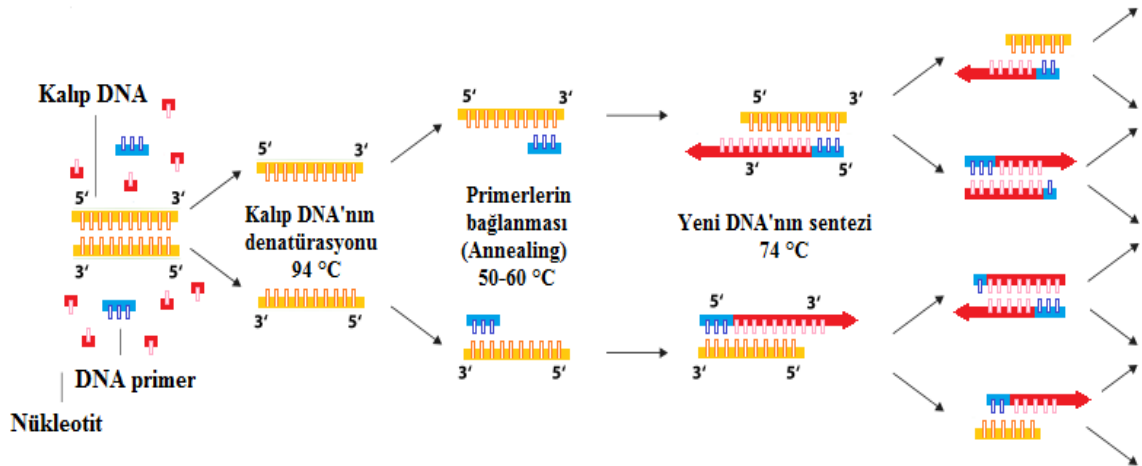
PCR'da en çok kullanılan enzim *Taq* DNA polimeraz, 5'-3' nükleaz aktivitesine sahiptir. Herhangi bir DNA zincirine tamamlayıcı bir baz dizisinin sentezlenmesini sağlar. *Taq* polimeraz, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen ve yüksek sıcaklıklara dayanıklı bir DNA polimeraz enzimidir. PCR sırasında, polimerazın aktivitesini ve primerlerin bağlanmasını kontrol etmek için sıcaklık değişimleri kullanılır (102).

Bir PCR deneyindeki temel basamaklar aşağıdaki gibidir (Şekil 3.21) (101). Karışım, ikili sarmal DNA molekülünün 2 ipliğini bir arada tutan hidrojen bağlarını kırıp, molekülün denatüre olmasına yol açan bir sıcaklık olan 94 °C'ye ısıtılır.

Karışım 50-60 °C'ye soğutulur. Bu primerlerin ilgili gene bağlanmasını sağlar. Her bir molekülün 2 ipliği bu sıcaklıkta birbiri ile tekrar birleşir, ancak çoğu birleşmez, çünkü karışım, spesifik pozisyonlarda DNA moleküllerine bağlanan (anneal) oligonükleotit ya da primer denilen çok fazla kısa DNA molekülleri içerir.

Sıcaklık 74 °C'ye çıkarılır. Bu karışımda bulunan *Taq* DNA polimeraz için optimum çalışma sıcaklığıdır. *Taq* DNA polimeraz, *Thermus aquaticus* bakterisinin DNA polimeraz I enzimidir. Bu organizma kaplıcalarda yaşar ve çoğu sıcaklık muamelesi ile denatürasyona dirençli anlamında ısıya dayanıklıdır. Bu *Taq* DNA polimerazı PCR için uygun kılan yegâne özelliğidir, çünkü DNA'yı denatüre etmek için reaksiyonun sıcaklığı 94 °C'ye çıkarıldığında inaktif olmaz. PCR'ın bu basamağında *Taq* DNA polimerazın her bir primerin ucuna bağlandığı ve kalıp DNA molekülüne komplementer olan yeni DNA ipliklerini sentezlediğidir. Başlangıçtaki 2 iplik yerine artık 4 DNA ipliği vardır.

Sıcaklık tekrar 94 °C'ye çıkarılır. Bu aşamada 8 DNA ipliği ile sonlanan denatürasyon-bağlanma-sentezinin 2. Döngüsü başlar. Döngüyü 25 kez tekrarlayarak başladığımız 2 iplikli DNA molekülü, her biri 2 primerin bağlanma yeri ile belirlenen başlangıç molekül bölgesinin bir kopyası olan, 50 milyonun üzerinde yeni 2 iplikli moleküllere dönüştürülür. DNA kopyası 2^n şeklinde artmaktadır.

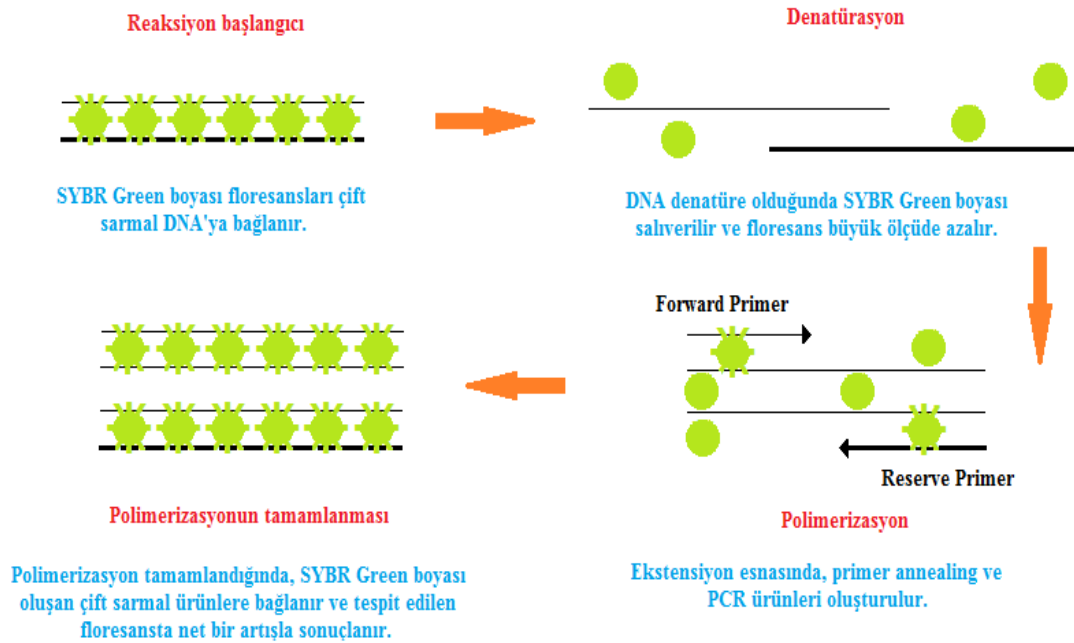


Şekil 3.21. Polimeraz zincir reaksiyonunun temel basamakları

Gerçek zamanlı PCR (qPCR), PCR reaksiyonun floresan dedeksiyon yöntemi ile gerçek zamanlı izlenmesine olanak sağlayan bir yöntemdir ve kantitatif olarak yapılmasını sağlayan bir teknolojidir. Teorik olarak başlanılan hedef dizisi miktarı ve herhangi bir döngüde elde edilen qPCR ürün miktarı arasında kantitatif bir ilişki vardır. qPCR’de sonuçlar anında alınmakta ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir (103-107).

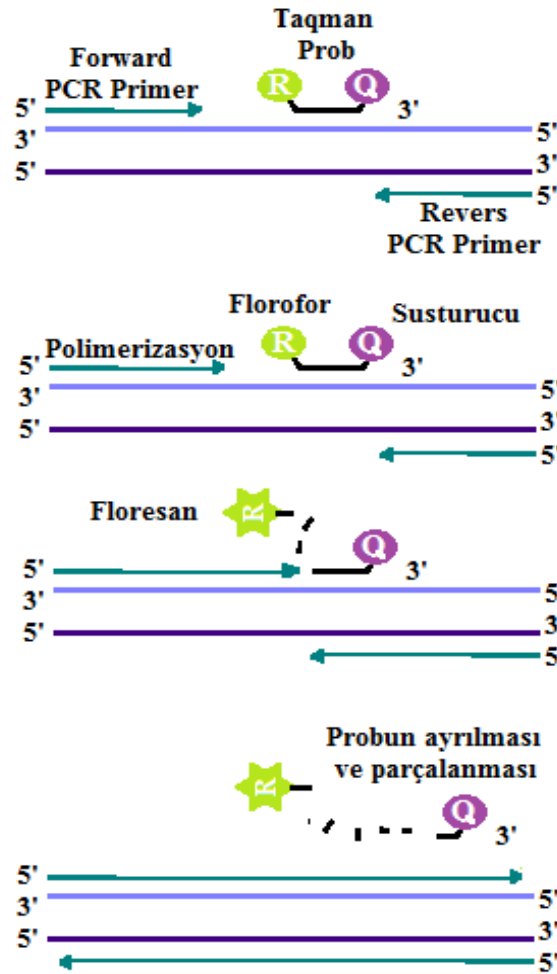
qPCR deneyi tasarlarırken, 2 ayrı dedeksiyon teknolojisinden olan hidrolizasyona dayalı Taqman prob ya da DNA’ya bağlanan ajan SYBR Green’den uygun olan seçilmelidir. Her iki teknoloji de PCR esnasında floresan üretmek üzere tasarlanmış olup PCR cihazıyla reaksiyonun “gerçek zamanlı” olarak görüntülenmesini sağlar (103-107).

SYBR Green (interkalasyon boyası) oldukça basit bir mekanizmayla çalışır. Boyanın kendisi de floresandır ancak çift sarmallı DNA’nın varlığında boya DNA heliks yapısı içine bağlanarak yapısının değişimi sonucu daha fazla floresan oluşturmasını sağlar (Şekil 3.22). DNA çoğaltımı floresan sinyalin artışına neden olduğundan, her döngüde artan DNA miktarı reaksiyon süresince hassas olarak ölçülür. Floresan ışımının çokluğu eksponansiyel çoğaltma sırasında ortamda bulunan PCR ürünüyle doğru orantılıdır. İnterkalasyon boyalarının dezavantajı spesifik olmamalarıdır. Bu durumda da sonuçların kesin olması için ek bir analiz gerekir (103-107).



Şekil 3.22. SYBR Green boyasının çalışma prensibi

Prob; spesifik bir nükleik asit dizisini, hibridizasyon prensibine göre tespit etmeye yarayan değişik uzunluklardaki radyoaktif ya da floresan işaretli tek zincirli nükleotit polimerleridir. Hidroliz probları; floresan olarak işaretlenmiş DNA oligonükleotitleridir. PCR reaksiyonu sırasında primerlerden birinin akışının aşağısına bağlanacak olup bir floresan sinyali verecek şekilde tasarlanmıştır. Probun 5' ucu floresan molekülü ile etiketlenmiştir. Probun 3' ucunda susturucu bir molekül bulunur. Susturucu, raportörün çıktısını etkili bir şekilde söndüren bir moleküldür. Bu nedenle fiziksel olarak birbirine yakın olduklarında floresan çıktısının genel seviyesi düşüktür. PCR sırasında prob primerin akışının aşağısına bağlanıp reaksiyon sırasında polimeraz enzimi tarafından parçalanır. Susturucu artık raportör üzerinde etki yapamaz ve bu sayede floresan seviyesi artar (Şekil 3.23). Hidroliz probları, araya giren boyalardan daha uygun veri verir. Bunun nedeni, ilgili bölgeye bağlanmaya olan özgüllükleridir. Hidroliz probundan alınan sinyalin hedef sekansın gerçek amplifikasyonundan geldiği kesindir (103-107).

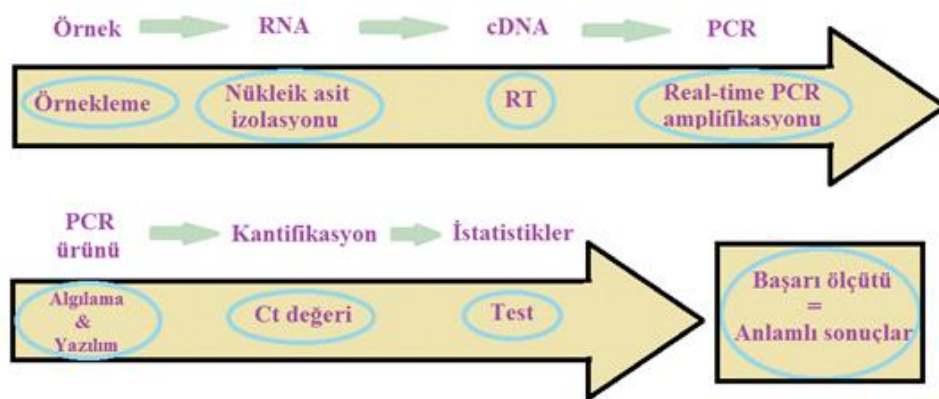


Şekil 3.23. Hidroliz prob ışıma mekanizması

Revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR), hücrelerden izole edilen tanımlanmış bir RNA dizisinin, revers transkriptaz enziminin yardımı ile komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu gen ekspresyon analizlerinin yapılabildiği *in vitro* bir metottur (Şekil 3.24). Ölçüm metotlarının en duyarlı ve esnek olanlarından biridir. Moleküler çalışma alanlarında çok sayıda uygulamalara sahip olan, karmaşık olmayan bir tekniktir. Değişik örnek gruplarındaki mRNA düzeylerini karşılaştırmak, mRNA'lar arasında ayırım yapmak ve RNA yapısını araştırmak için kullanılabilir. RNA kalıbından sentezlenen DNA'ya cDNA denir. RNA polimeraz zincir reaksiyonu için bir kalıp (template) olamayacağı için, ilk adım RNA kalıbının revers transkripsiyon yöntemi ile cDNA'ya dönüştürülmesi akabinde PCR reaksiyonu ile eksponansiyel olarak çoğaltımıdır. Bu işlemler için özel RNA- ve DNA- bağımlı

polimerazlar kullanılır. Deoksioligonükleotitler (oligo(dT) polimerleri, rastlantısal bir DNA dizi kolleksiyonu ya da özgül bir dizi) RNA kalıplarından özgül olarak sentez için primer olarak kullanılırlar. Revers transkripsiyon adımı özgül primerler, rastlantısal hekzamerler veya oligo(dT) primerleri kullanılarak gerçekleştirilir. Primerlerin seçimi önemlidir. mRNA dizisine özgül primerlerin kullanılması “background” primer bağlanmasını önler ama rastlantısal ve oligo(dT) primerlerinin kullanılması da küçük bir örnekten analiz edilebilecek mRNA moleküllerinin sayısını artırır. Genellikle oligo(dT), poli-A RNA primer olarak tercih edilmez. Bunun sebebi, histon mRNA’ları ve bazı interferonlar poli-A içermediğinden, RNA izolasyonu sırasında örnekler arasında mRNA içeriği farklılaşır (103-107).

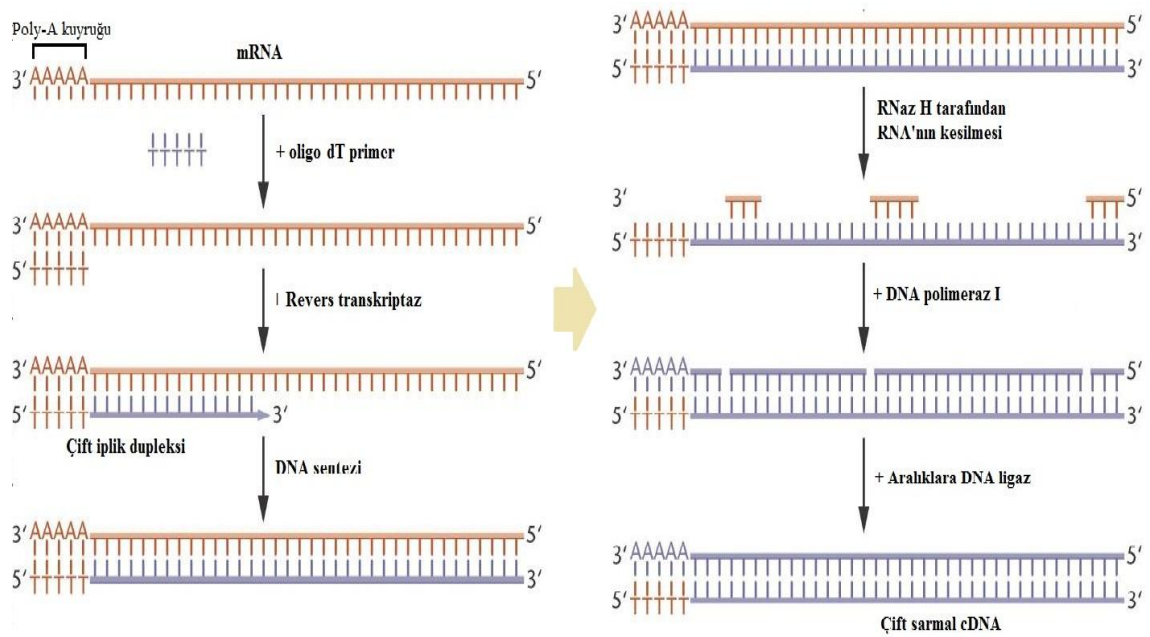
Revers transkriptaz mRNA’yı komplementer DNA ipliğinin (cDNA) sentezi için bir kalıp olarak kullanır ve mRNA/cDNA çift iplikli dupleks oluşur. Tersine bir transkripsiyon olduğu için “Revers transkripsiyon” olarak adlandırılır. cDNA, mRNA’nın analizi için sentez edilir. Çünkü DNA RNA’dan daha stabildir. cDNA sentezi RNaz olmayan bir ortamda revers transkriptaz, dNTP (deoksiribonükleotid trifosfat) ve primerler yardımı ile yapılır. Daha sonra bu cDNA PCR’de kalıp olarak kullanılıp çoğaltılır ve böylece analiz edilmek istenen mRNA kopya sayısı çoğaltılmış olur (103-107).



Şekil 3.24. qPCR deney basamakları

RNA’ların bir takım avantajları vardır. Belirli 5’ ve 3’ uçları olan nispeten kısa moleküllerdir ve çoğu kez uçların dizileri tanımlanmıştır. Tanımlanmış uca en belirgin

örnek ökaryotik mRNA'ların bir çoğunun 3' ucunda bulunan poli-A kuyruğudur (Şekil 3.25). Bu özellikler olgonükleotit primerlerin tasarımında kullanılabilir. Çoğaltımın özgüllüğü ve verimini etkileyen parametreler Mg^{2+} ve primer konsantrasyonu, annealing sıcaklığı ve döngü sayısıdır. PCR'ın özgüllüğü esas olarak primerlere bağımlı olduğu için reaksiyon koşulları başka bir enzim kullanıldığında yeniden optimize edilmelidir. Ayrıca Mg^{2+} enzim aktivitesini, dNTP ise polimerazın doğruluğunu etkilediği için konsantrasyonları önemlidir (103-107).



Şekil 3.25. mRNA'dan cDNA sentezinin şematik gösterimi

PCR ürünlerinin toplam sinyalinin background sinyalini geçtiği an C_t (cycle threshold) değeridir. qPCR yaparken her zaman bir referans gen (housekeeping gen) kullanılır. Hedef genin C_t değeri, referans genin C_t değerine normalize edilerek hesaplamalar yapılır. qPCR'ında rölatif miktar belirtiminde, hedef gen referans gene göre normalize edilir. Eğer başlangıçta ortama konan hedef DNA miktarı fazla ise C_t daha erken bir döngüde, az ise ışıma daha ileri döngülerde alınır (103-107).

Bu çalışmada Taqman metodolojisine dayanan qPCR ile; kantitatif β -aktin, Akt ve ER α proteinlerinin üretiminde görevli mRNA düzeyleri ölçüldü. Her örnekteki transkript

miktarındaki relatif değışiklikler β -aktin mRNA seviyeleriyle normalize edilerek belirlendi. Deneyler 3 tekrarlı çalışıldı. İşlemler 3 aşamada gerçekleştirildi:

3.11.1. RNA İzolasyonu ve Absorbsiyon Spektroskopisi ile RNA Örneklerinin Ölçülmesi

Gen ekspresyonunun belirlenmesinde kullanılan tekniklerde RNA kalitesi ve miktar analizi çok önemli bir parametredir. RNA kalite ve miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür. “NanoDrop” bir spektrofotometrik bir teknolojidir ve gelişmiş RNA ölçüm tekniğidir. Nükleik asitlerin saflığı ve konsantrasyonu değerlendirmek için ölçüm birkaç dalga boyunda yapılır. Absorbans ölçümlerinde 260 ve 280 nm’deki absorbansların oranı örneklerin saflığını gösterir. Örneğin, 280 nm’de absorbans piki veren proteinler A_{260}/A_{280} değerini düşüreceklerdir. Fenol ya da üre kontaminasyonları 230 nm’de absorbansa yol açar. RNA için, 1,9-2,0 arası bir A_{260}/A_{280} oranı beklenir.

Hücrelerden RNA izolasyonu için RNAzol[®] reaktifi (Sigma, R4533) kullanıldı. RNAzol[®] hücrelerden tek aşamalı total RNA izolasyonunda kullanılan hazır bir reaktiftir. Prosedür; büyük nükleer RNA, rRNA, mRNA, küçük RNA ve mikro RNA moleküllerinin izole edilmesi için oldukça etkilidir. Monofaz bir solüsyonda; guanidin, tiyosiyanat ve fenol karışımıdır. Örnek homojenizasyonu veya lizisi sırasında hücrelerin parçalanmasına neden olup hücre bileşenlerini dağıtırken RNA’nın bütünlüğünü korur. Kısa sürede sonuç alınır. Kullanışlı tek aşamalı likit faz ayrımı; RNA’nın DNA, protein, polisakkaritler ve diğer moleküllerden izole edilmesini sağlar. Karışıma su ilavesi RNA dışı moleküllerin presipitasyonuna olanak sağlar ve sonrasında santrifüj ile uzaklaştırılır. RNA alkolle presipitasyon, yıkama ve çözündürme yoluyla izole edilir. Kloroformla indüklenen faz ayrımı gerekli değildir (108).

Bu deneyde, 6’lı plakalara 1×10^6 hücre/1 ml hücre dağıtıldı. Belirlenmiş konsantrasyonlardaki maddeler 24 sa. boyunca hücre ile muamele edildi. Besiyerler çekildikten sonra 1.000 μ l RNAzol[®] reaktifi ilave edildi. Kuyuların içeriği 2 ml’lik ependorflara aktarıldı. 400 μ l dH₂O eklendi. 15 sn. ters düz edildi. 5-15 dk. oda sıcaklığında beklendi. 15 dk. 12.000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatantlar 1.500 μ l’lik ependorflara alındı. 400 μ l etanol eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk. beklendi. 12.000 rpm’de 8 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant çekildi. Pelletler 500 μ l %75 etanol ile yıkandı. Üç dk. 8.000 rpm’de santrifüj edildi. Tekrar aynı şekilde yıkama

işlemi yapıldı. Süpernatant steril şırınga ile çekildi. Ependorfların kapağı açık şekilde etanol uçuruldu. 400 µl %70 etanol eklendi ve 3 dk. 8.000 rpm’de santrifüj yapıldı. Süpernatant çekildi ve kalan etanol ependorfların kapağı açık şekilde uçuruldu. Uçurma işleminden sonra 60 µl RNAaz içermeyen su ilave edildi.

RNA konsantrasyonlarının ölçümü “NanoDrop” cihazı ile yapıldı. Önce 1 µl RNAaz içermeyen su ile kör okutuldu. Daha sonra örnek, örnek haznesine bir damla halinde yüklendi. Daha sonra örnek aparatı kapatılarak bir damla halinde bulunan örneğe, aparat tarafından hafifçe bir baskı uygulandı. Oluşan bu yüzey gerilimi ile örneğin yerinde kalması sağlanarak, örnek spektrofotometrik olarak okundu. Cihazdaki program ile örnekler 230, 260 ve 280 nm’de okundu.

3.11.2. RNA’dan cDNA Elde Edilmesi

cDNA eldesi üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleşir. Bu işlem için amaca yönelik olarak hazırlanmış otomatize sistemden (Şekil 3.26) (Biorad Thermal Cycler) ve cDNA sentez kitinden (Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti) yararlanıldı (Tablo 3.4). Deney gruplarının 1.000 ng olan total RNA miktarı, anchored-oligo(dT) 18 primer (1 µl) ve PCR grade H₂O (son hacim 11,4 µl olacak şekilde) tüplere sırasıyla su, total RNA ve primer olarak ilave edildi. 65 °C’de 10 dk. denatürasyondan sonra +4 °C’de beklemeye alındı. Daha sonra tüplere son hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmış olan cDNA sentez karışımı ilave edildi. 10 dk. 29 °C’de, 60 dk. 48 °C’de, 5 dk. 85 °C’de cDNA sentezi gerçekleştirildi ve +4 °C’de beklemeye alındı. cDNA’lar 1/5 olacak şekilde RNAaz içermeyen su dilüe edildi. cDNA’lar -80 °C’de saklandı. Daha sonra cDNA sentez kiti kullanılarak reaksiyon için gerekli maddeler hazırlandı.

Tablo 3.4. cDNA sentezinde kullanılan maddeler ve 1 reaksiyon için gerekli miktarları

Maddeler	1 Reaksiyon miktarı
RNA	1.000 ng
Random primer	1 µl
Oligo(dT)	1 µl
RNAaz inhibitörü	0,5 µl
dNTP (deoksiniükleotit mix)	2 µl
RT buffer	4 µl
RT (Revers Transkriptaz) enzimi	1,1 µl
DTT	1 µl
RNAaz içermeyen su	Değişkendir.
	Total hacim 20 µl’ye su ile tamamlanır.

Elde edilen bu cDNA 1/5 oranında RNAaz içermeyen su ile dilüe edilerek *ACTB*, *AKTB* ve *ESR1* genlerinin qPCR cihazı ile mRNA ekspresyonlarına bakıldı.



Şekil 3.26. Thermal cycler cihazı

AKTB ve *ESR1* ve bir referans gen olan *ACTB* primer ve hidroliz problemleri, universal prob kütüphanesi veri tabanından (UPL-universal probe library database-, Roche Diagnostics) alındı (Tablo 3.5) (109-111).

Tablo 3.5. Hedef genlerin amplifikasyonu için kullanılan primerler dizileri

Gen	Assay ID	Primer (Forward)	Primer (Reverse)	Prob No.
<i>ACTB</i>	143636	TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA	CGTGGATGCCACAGGACT	27
<i>AKT1</i>	100816	GCAGCACGTGTACGAGAAGA	GGTGTCTAGTCTCCGACGTG	45
<i>ESR1</i>	102495	TTACTGACCAACCTGGCAGA	ATCATGGAGGGTCAAATCCA	24

3.11.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

Bu çalışmada qPCR cihazı (Şekil 3.27) (Roche LightCycler® 480 Instrument II), Roche LightCycler® 480 Probes Master ve LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (Roche 04 729 692 001) kullanıldı. Reaksiyon karışımı Tablo 3.4'te belirtildiği şekilde hazırlandı. qPCR ile cDNA'nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımına; çoğaltılacak olan kalıp cDNA, bu cDNA'da çoğaltılması planlanan bölgedeki cDNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan primerler, RNAaz ve DNAaz içermeyen su ve 480 probe master mix eklendi. Kontaminasyonun kontrolü cDNA içermeyen negatif kontrol ile yapıldı. Reaksiyon hacmi 20 µl'ye ayarlandı (Tablo 3.6). Her seferinde normalizasyon için *ACTB* ölçüldü. qPCR için program aracılığıyla hidroliz prob yöntemi kullanıldı.



Şekil 3.27. Roche LightCycler® 480 Instrument II qPCR cihazı

qPCR için kullanılan cihazın programı aracılığıyla (LightCycler® 480 SW 1.5.1) denarütasyon için 95°C de 600 saniye 1 döngü ve 3 aşamalı amplifikasyon da 95°C de 10 saniye 60°C de 30 saniye 72°C’de 1 saniye; soğutmada da 40 °C de 30 saniye 1 döngü olacak şekilde 45 kez reaksiyon yürütüldü.

Her bir gen için, her bir örnekte belirlenen C_t değerleri ile belirlenen referans gen arasındaki C_t farkı ile ΔC_t , kontrol grubu ile ΔC_t değeri arasındaki fark ile de $\Delta\Delta C_t$ değeri elde edilir. Rölatif gen ekspresyonları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri örnek gruplarının kontrole göre kaç kat arttığı ya da azaldığını gösteren değerdir.

$$\Delta\Delta C_t = \frac{[(C_t \text{ hedef}) - (C_t \text{ hedef housekeeping})]}{[(C_t \text{ kontrol}) - (C_t \text{ kontrol housekeeping})]}$$

Tablo 3.6. qPCR tepkime karışımı

Maddeler	1 Reaksiyon için gerekli miktar
480 probe master mix	10 µl
RNAaz ve DNAaz içermeyen su	4 µl
Gen	1 µl
cDNA	5 µl

3.12. Hücre Migrasyon Deneyi

Hücre migrasyonu; embriyonik morfogenez, doku tamirini ve yenilenmesini düzenleyen oldukça entegre ve çok adımlı bir süreçtir. Kanserin metastazı dolayısıyla progresyonunda önemli bir rol oynar. Migrasyonu tetikleyen bir ajana başlangıç cevabı, polarize olması ve göçü sağlayan ajan yönünde protrüzyon oluşturmaktır. Bu protrüzyon büyük, geniş lamellipodia veya sivri uca benzer filopodi içerebilir. Her iki

durumda da, bu protrüzyon aktin polimerizasyonu ile yönlendirilir ve ekstraselüler matriksin (ECM) yapışması veya hücre-hücre etkileşimleri (zar-zar alıcıları vasıtasıyla) ile stabilize edilebilir. Kanser hücreleri, tümör büyümesinin başlangıç alanından yayılması için tek hücreler halinde veya küçük gruplar halinde göç ederler. Bu hücrelerin migrasyonu tipik olarak integrinler, matris bozucu enzimler ve hücre-hücre adezyon molekülleri tarafından düzenlenir. Birçok sitokin ve büyüme faktörünün, işgali uyardığı ve çeşitli tümör tiplerinde upregüle olduğu gösterilmiştir. Hem hücre-hücre etkileşimlerinin kaybı hem de artmış hücre hareketliliği ile karakterize invaziv bir fenotip kazanırlar. Bu hücreler, kan veya lenf damarlarına girebilir ve damar yatağı için damar duvarını geçip (ekstravazasyon) distal organlarda çoğalmaya devam edebildikleri yerde ikinci bir tümör kitlesi oluştururlar (112).

Bu çalışmada; hücre migrasyon deneyi Cell Biolabs 'CytoSelect™ (Cell Biolabs, CBA-100-T) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre Geçiş Testi Kiti, hücrelerin göç özelliklerini test etmek için polikarbonat membran ek parçası (insert) (8 µm por büyüklüğü) kullanıldı. Epitelyal ve fibroblast hücre migrasyonu için optimum por boyutu 8 µm'dir (113).

3.12.1. Deney Esası

CytoSelect™ Hücre Geçiş Testi Kiti, 24 kuyulu bir plaka ve polikarbonat membran ek parçaları (insert) (8 µm por boyutu) içerir. Zar, göç hücreleri göç etmeyen hücrelerden ayırmak için bir bariyer görevi görür. Göç hücreleri protrüzyonunu kemoatraktanlara (aktin sitoskeleton yeniden organizasyonu yoluyla) uzatma yeteneğine sahiptir ve sonuç olarak polikarbonat zarın porlarından geçebilir. Son olarak, hücreler zarın üstünden çıkarılır ve göç eden hücreler boyanır ve miktarı belirtilir (Şekil 3.28).

3.12.2. Kit İçeriği

24-Kuyulu Migrasyon Plakası (Parça No. 10001-T): 4 hücre kültür eklentisi (insert) (8 μ m por boyutu) içeren bir adet 24 kuyulu plaka

Hücre Boyama Solüsyonu (Part No. 11002-T): 1 adet 4 ml'lik şişe

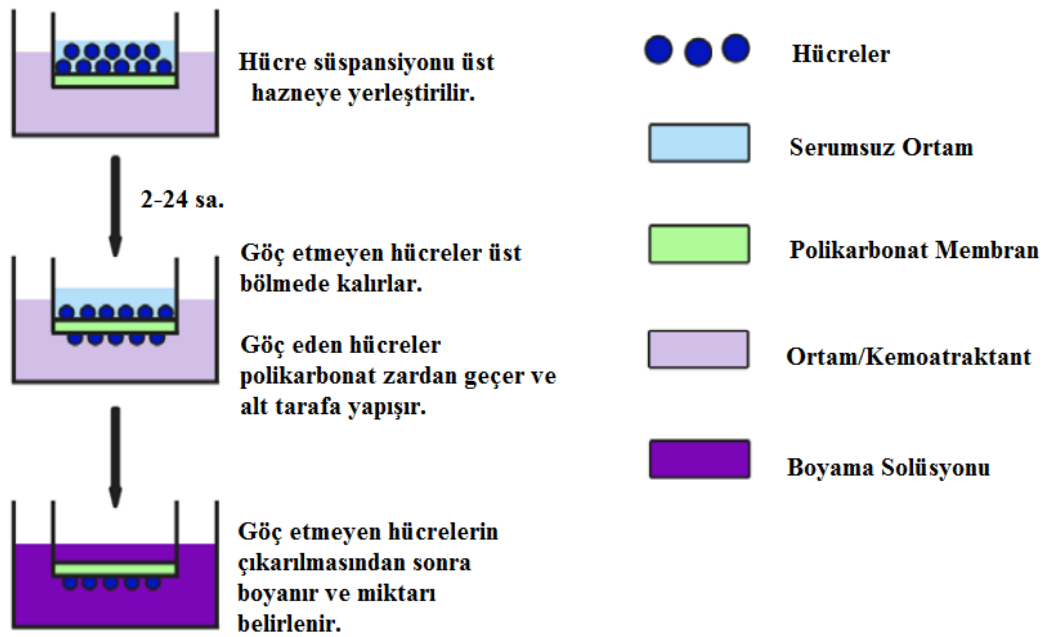
Ekstraksiyon Solüsyonu (Parça No. 11003-T): 1 adet 4 ml'lik bir şişe

Pamuklu ubuklar (Part No. 11004): 40 adet

Forseps (Parça No. 11005): 1 adet

3.12.3. Deney Prosedürü

- İnsert, 400 μ l hücre boyama solüsyonu içeren temiz bir kuyuya transfer edildikten sonra 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Boyalı insertler beherde birkaç kez nazikçe yıkandı.
- İnsertlerin uçlarının kuruması beklendi.
- (Opsiyonel olarak) Göç eden hücreleri, ışık mikroskopunda yüksek büyütme objektifinde az 3 alan olacak şekilde sayıldı.
- Her bir insert boş kuyuya aktarılır, kuyu başına 200 μ l ekstraksiyon solüsyonu eklendi ve ardından 10 dk. Çalkalayıcıda inkübe edildi.
- Her numuneden 100 μ l, 96 kuyulu mikrotitrasyon plakasına transfer edildi ve plaka okuyucuda kolorimetrik olarak 560 nm'de okundu.



Şekil 3.28. Migrasyon kiti deney prensibi (113)

3.13. İstatistiksel Analizler

Çalışma gruplarından elde edilen sonuçlar, GraphPad Prism 7.00 (San Diego-California, ABD) bilgisayar yazılımı kullanılarak analiz edildi. Sonuçların analizinde, deney ve kontrol grupları arasındaki anlamlılığı saptamada farklılıklara uygun olarak tek yönlü varyans analizi (114) ile istatistiksel farklılığa sahip parametreleri saptamada *post-hoc* test olarak Dunnet testi kullanıldı. Veriler, en az 3 ayrı deneyden hesaplanan ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verildi. Hata çubukları, yinelenen denemelerdeki ölçümler arasındaki standart sapmaları temsil etmektedir. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve anlamlılık aralıkları $* < 0,05$; $** < 0,01$ ve $*** < 0,001$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

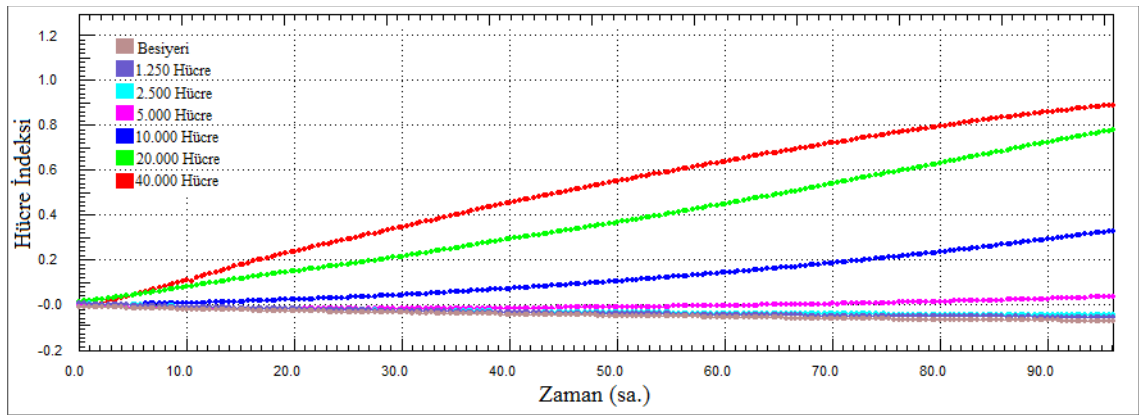
4.1. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (GZHA) Deney Sonuçları

RL95-2 hücrelerinin büyüme profili:

	1	2	3	4	5	6	7
A	RL95-2 (40000)	RL95-2 (20000)	RL95-2 (10000)	RL95-2 (5000)	RL95-2 (2500)	RL95-2 (1250)	DMEM:F12
B	RL95-2 (40000)	RL95-2 (20000)	RL95-2 (10000)	RL95-2 (5000)	RL95-2 (2500)	RL95-2 (1250)	DMEM:F12
C	RL95-2 (40000)	RL95-2 (20000)	RL95-2 (10000)	RL95-2 (5000)	RL95-2 (2500)	RL95-2 (1250)	DMEM:F12
D	RL95-2 (40000)	RL95-2 (20000)	RL95-2 (10000)	RL95-2 (5000)	RL95-2 (2500)	RL95-2 (1250)	DMEM:F12
E	RL95-2 (40000)	RL95-2 (20000)	RL95-2 (10000)	RL95-2 (5000)	RL95-2 (2500)	RL95-2 (1250)	DMEM:F12
F	RL95-2 (40000)	RL95-2 (20000)	RL95-2 (10000)	RL95-2 (5000)	RL95-2 (2500)	RL95-2 (1250)	DMEM:F12
G	RL95-2 (40000)	RL95-2 (20000)	RL95-2 (10000)	RL95-2 (5000)	RL95-2 (2500)	RL95-2 (1250)	DMEM:F12
H	RL95-2 (40000)	RL95-2 (20000)	RL95-2 (10000)	RL95-2 (5000)	RL95-2 (2500)	RL95-2 (1250)	DMEM:F12

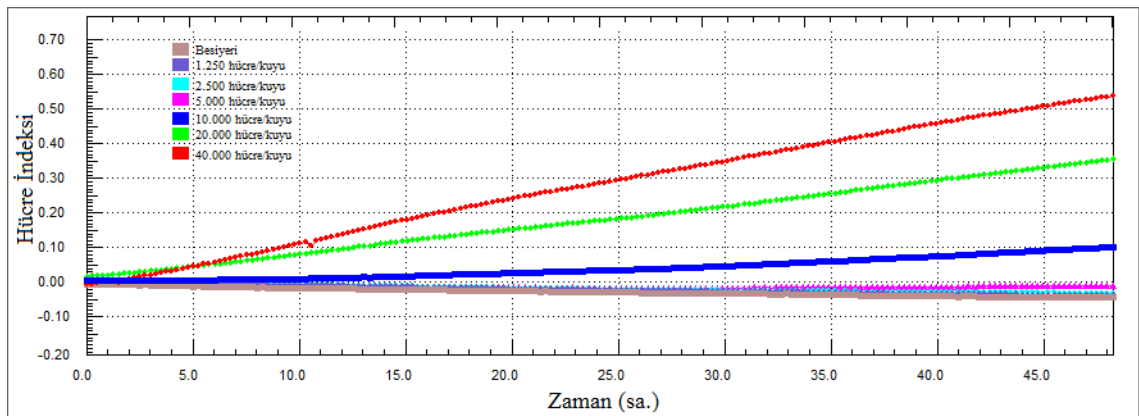
Şekil 4.1. RL95-2 hücreleri büyüme profili e-plakaya ekim şeması

RL95-2 hücre büyüme profillerini elde etmek için, hücrelerin 3. pasajından 40.000, 20.000, 10.000, 5.000, 2.500 ve 1.250 hücre/kuyu ile 100 µl besiyerinde 8 tekrarlı (Şekil 4.1) olarak çalışıldı.



Şekil 4.2. E-Plakaya ekimi yapılan RL95-2 hücrelerinin 96 sa. verileri

Profil incelendiği zaman, hücrelerin CI değerlerinin düşük olduğu ancak 96. saate kadar hücre sayısına bağımlı CI değerlerinde artış olduğu görüldü. CI değeri, 20.000 hücre/kuyu'da 24. saatte 0,20'ye yakındır. 96 sa. (Şekil 4.2) sonunda ise bu değerin, 0,80'e yaklaştığı görülmektedir. Büyüme profiline bakıldığında zaman 40.000 hücre/kuyu ise çoğalma açısından 20.000 hücre/kuyu'ya göre platoya daha yakın bir eğri çizdiği görülmektedir. E-plakanın her bir kuyusunun yüzey alanı yaklaşık $0,2 \text{ cm}^2$ 'dir (115). $0,20 \text{ cm}^2$ yüzey alanına en uygun hücre sayısının 20.000 olduğuna karar verildi .



Şekil 4.3. E-plakaya ekimi yapılan RL95-2 hücrelerinin 48 sa. hücre indeksi verileri

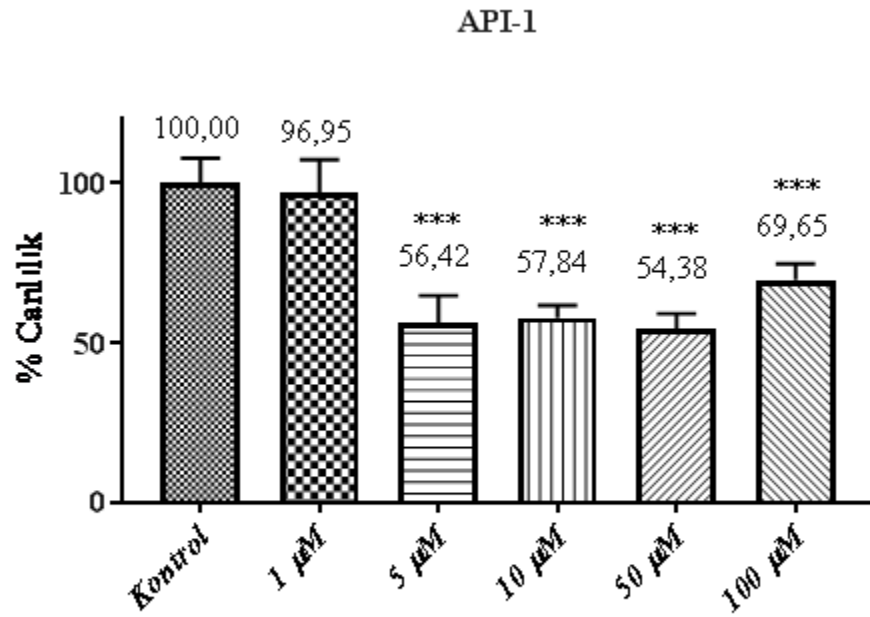
GZHA ile RL95-2 hücrelerinin elde edilen büyüme profili incelediği zaman hücrelerin CI değerlerinin ve değişimlerinin düşük olduğu görüldü. Hücrelere ait büyüme profiline

bakıldığında 48. sa. (Şekil 4.3) sonunda dahi, 20.000 sayıdaki hücrenin platoya ulaşmadığı ve sabit bir hızla çoğalmaya devam ettiği görüldü.

4.2. RL95-2 Hücresindeki Sitotoksik Etkinin Sülförödamın B (SRB) Deneyi İle Belirlenmesi ve IC₅₀ Hesaplanması

4.2.1. Genel Doz Tarama SRB Deneyi Sonuçları

RL95-2 hücrelerinde, kontrol grubuna karşı API-1, MPP dihidroklorür, α -chaconine ve α -solanine'in farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla genel doz taraması yapıldı.

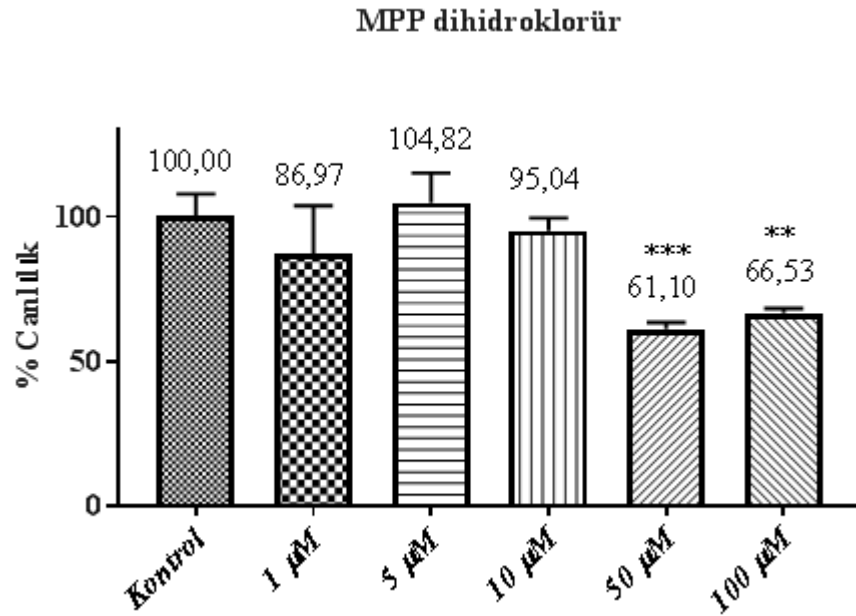


Şekil 4.4. RL95-2 hücrelerine ait API-1 genel doz tarama SRB deneyi sonuçları

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=4). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

API-1'in RL95-2 hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.4'te verildi. API-1, 1; 5; 10; 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda 24 sa. süre ile uygulandı. Canlılığı 5 (p<0,001); 10

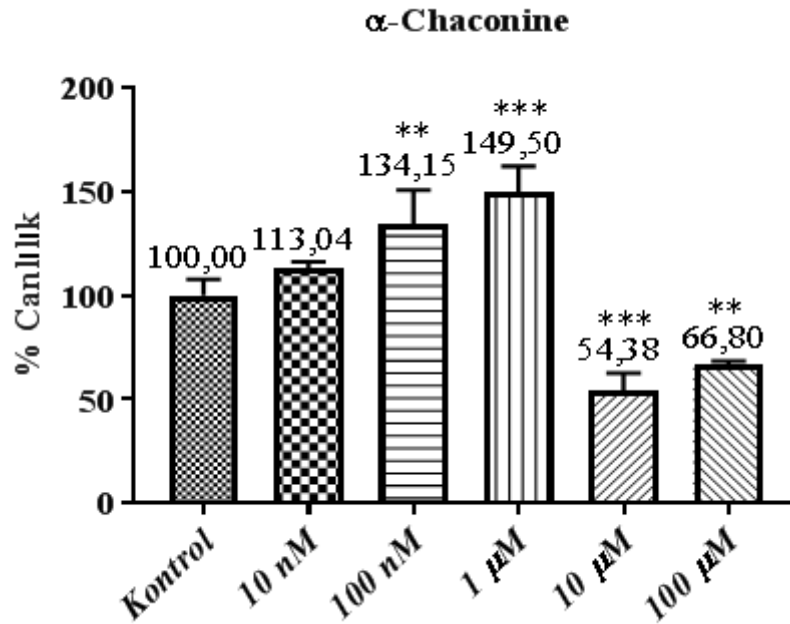
($p<0,001$); 50 ($p<0,001$) ve 100 μM ($p<0,001$) konsantrasyonlarda %70'in altına düşürdüğü görüldü. Bu konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık 1 μM ($p>0,05$) konsantrasyonda için kontrole göre aynı anlamlılık aralığında bulundu.



Şekil 4.5. RL95-2 hücrelerine ait MPP dihidroklorür genel doz tarama SRB deneyi sonuçları

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri $<0,05$. Anlamlılık aralığı; ** $<0,01$ ve *** $<0,001$ ($n=4$). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

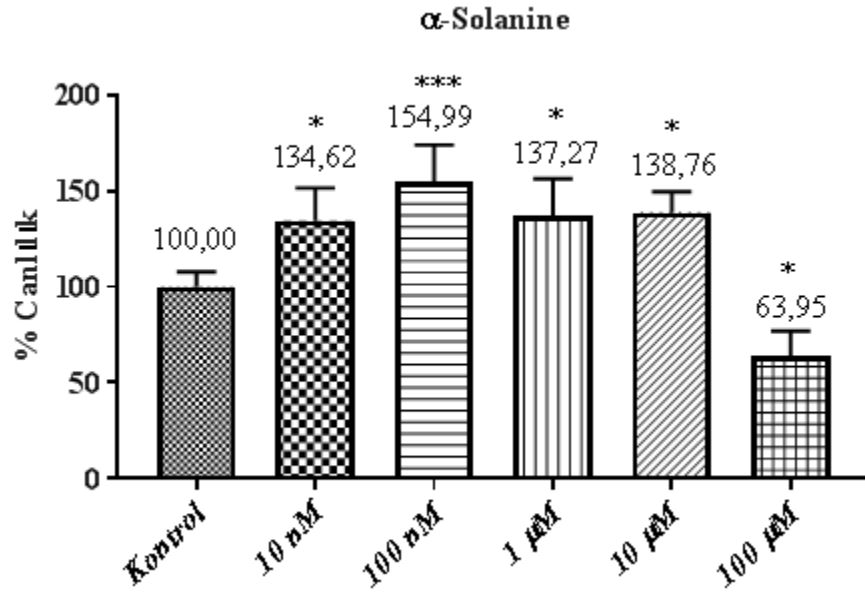
MPP dihidroklorürün RL95-2 hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.5'te verildi. MPP dihidroklorür, 1; 5; 10; 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda 24 sa. süre ile uygulandı. MPP dihidroklorürün, 1; 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında anlamlı bir değişim gözlenmedi. Canlılığı 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda %70'in altına düşürdüğü görüldü. Bu konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık 50 μM ($p<0,001$) ve 100 μM ($p<0,01$) konsantrasyonları için kontrole göre anlamlı bulundu.



Şekil 4.6. RL95-2 hücrelerine ait α -chaconine genel doz tarama SRB deneyi sonuçları

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; **<0,01 ve ***<0,001 (n=4). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

α -Chaconine'nin RL95-2 hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.6'da verildi. α -Chaconine, 10^{-8} - 10^{-4} M konsantrasyon aralığında logaritmik katları şeklinde 24 sa. süre ile uygulandı. Canlılığın 10 nM ($p>0,05$); 100 nM ($p<0,01$) ve 1 μ M ($p<0,001$) konsantrasyonlarda arttığı, 10; 100 μ M konsantrasyonlarda %70'in altına düştüğü görüldü. Bu konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık 10 μ M ($p<0,001$) ve 100 μ M ($p<0,01$) konsantrasyonları için kontrole göre anlamlı bulundu.



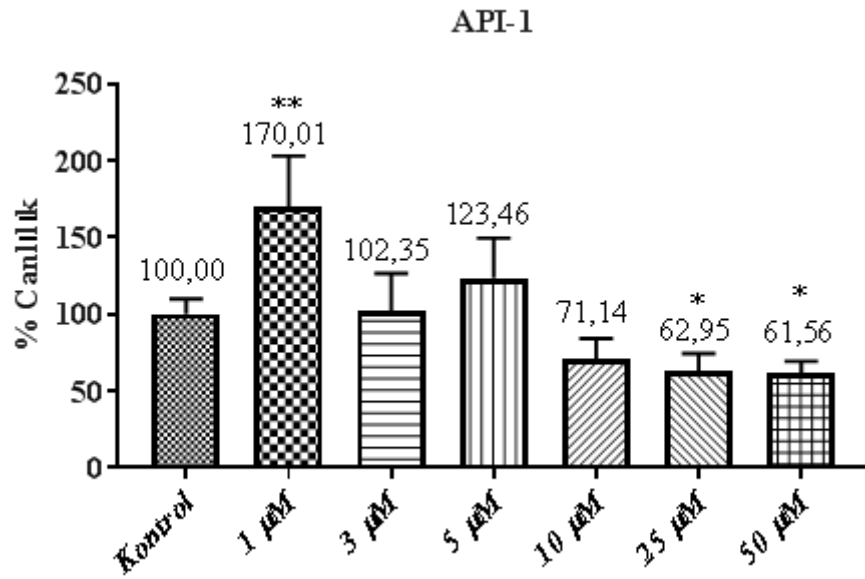
Şekil 4.7. RL95-2 hücrelerine ait α -solanine genel doz tarama SRB deneyi sonuçları

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; *<0,05 ve ***<0,001 (n=4). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

α -Solanine'nin RL95-2 hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.7'de verildi. α -Solanine, 10^{-8} - 10^{-4} M aralığında logaritmik katlar şeklinde 24 sa. süre ile uygulandı. Canlılığın 10 nM (p<0,05); 100 nM (p<0,001) ve 1 μ M (p<0,05); 10 μ M (p<0,05) konsantrasyonlarda arttığı, 100 μ M konsantrasyonda %70'in altına düştüğü görüldü. Bu konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık 100 μ M (p<0,05) için kontrole göre anlamlı bulundu.

4.2.2. SRB Deneyi Sonuçları

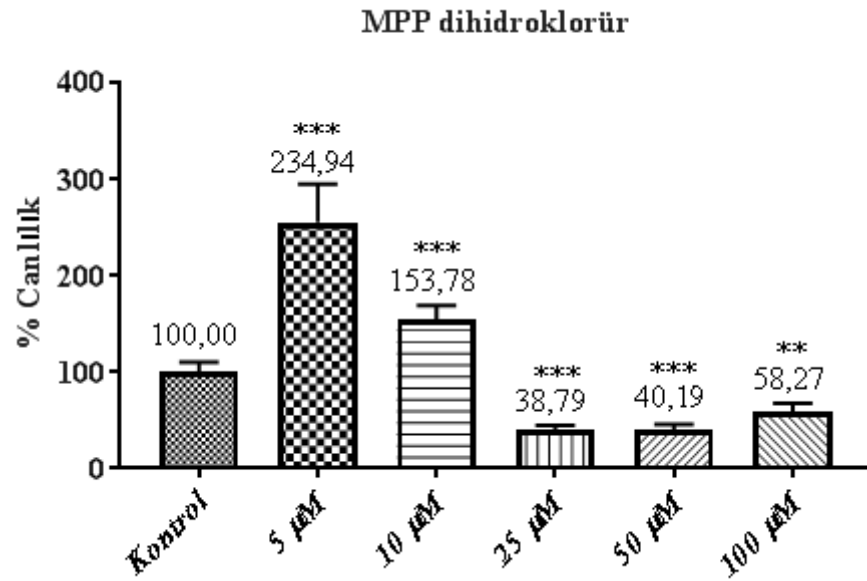
RL95-2 hücrelerinde, kontrol grubuna karşı API-1, MPP dihidroklorür, α -chaconine ve α -solanine'in genel hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan genel doz tarama çalışmalarındaki konsantrasyonlar esas alınarak yeni konsantrasyonlar belirlendi.



Şekil 4.8. RL95-2 hücrelerine ait API-1 SRB deney sonuçları

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; *<0,05; **<0,01 (n=4). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

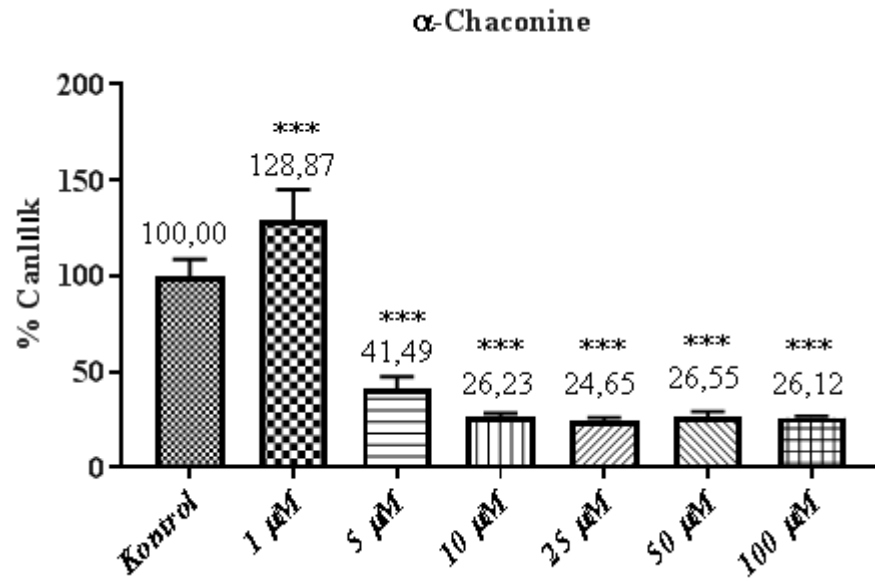
API-1'in RL95-2 hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.8'de verildi. API-1, 1; 3; 5; 10; 25 ve 50 µM konsantrasyonlarda 24 sa. süre ile uygulandı. Canlılığın 1 (p<0,01); 3 (p>0,05) ve 5 µM (p>0,05) konsantrasyonlarda arttığı, 10 µM (p>0,05) konsantrasyonda azaldığı, 25 ve 50 µM konsantrasyonlarda %70'in altına düştüğü görüldü. Bu konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık 25 (p<0,05) ve 50 (p<0,05) µM konsantrasyonları için kontrole göre anlamlı bulundu.



Şekil 4.9. RL95-2 hücrelerine ait MPP dihidroklorür SRB deney sonuçları

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. *p* değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; **<0,01 ve ***<0,001 (n=6). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

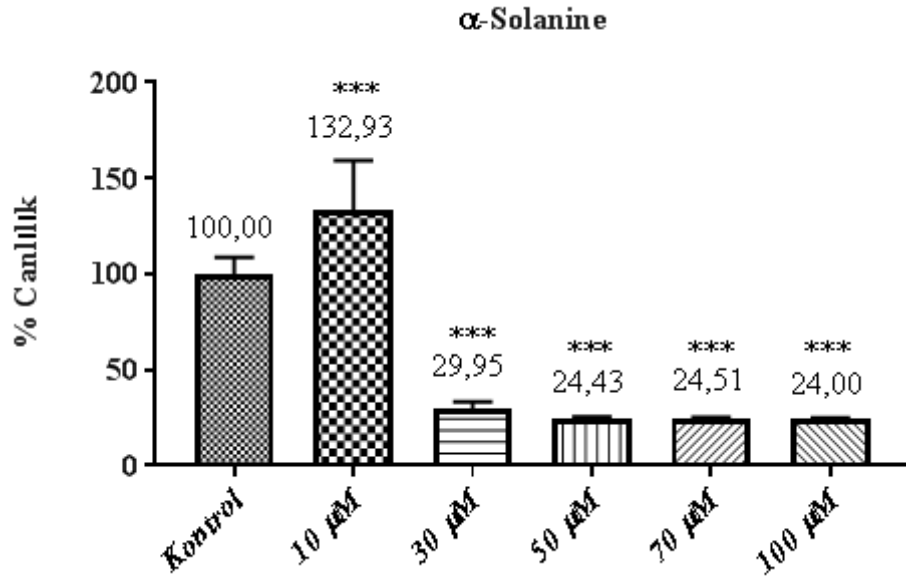
MPP dihidroklorürün RL95-2 hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.9’da verildi. MPP dihidroklorür; 5; 10; 25; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda 24 sa. süre ile uygulandı. Canlılığın 5 ($p<0,001$) ve 10 ($p<0,001$) µM konsantrasyonlarda anlamlı olarak arttığı, 25; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda %70’in altına düştüğü görüldü. Bu konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık 25 ($p<0,001$); 50 ($p<0,001$) ve 100 ($p<0,01$) µM konsantrasyonları için kontrole göre anlamlı bulundu.



Şekil 4.10. RL95-2 hücrelerine ait α -chaconine SRB deney sonuçları

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=6). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

α -Chaconine'nin RL95-2 hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.10'da verildi. α -Chaconine, 1; 5; 10; 25; 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda 24 sa. süre ile uygulandı. Canlılığın 1 μ M (p<0,001) konsantrasyonda anlamlı olarak arttığı, 5; 10; 25; 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda %50'in altına düştüğü görüldü. Bu konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık 5; 10; 25; 50 ve 100 μ M konsantrasyonları için kontrole göre anlamlı (p<0,001) bulundu.



Şekil 4.11. RL95-2 hücrelerine ait α -solanine SRB deney sonuçları

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=6). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

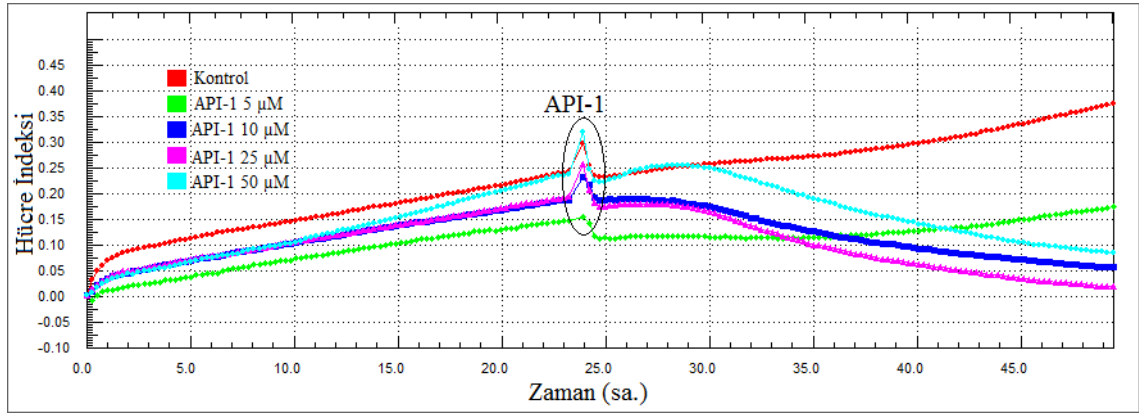
α -Solanine'nin RL95-2 hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.11'de verildi. α -Solanine, 10; 30; 50; 70 ve 100 μ M konsantrasyonlarda 24 sa. süre ile uygulandı. Canlılığın 10 μ M konsantrasyonda anlamlı ($p < 0,001$) olarak arttığı, 30; 50; 70 ve 100 μ M konsantrasyonlarda %50'in altına düştüğü görüldü. Bu konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık 30; 50; 70 ve 100 μ M konsantrasyonları için kontrole göre anlamlı ($p < 0,001$) bulundu.

RL95-2 hücrelerine uygulanan maddelerin 24 sa.'lik IC_{50} değerleri Tablo 3.7'de yer almaktadır. IC_{50} değerleri, Microsoft Excel programı ve Xcelligence cihazı yazılımı aracılığı ile hesaplandı.

Tablo 3.7. RL95-2 hücrelerinin 24 sa.'lik IC_{50} değerleri

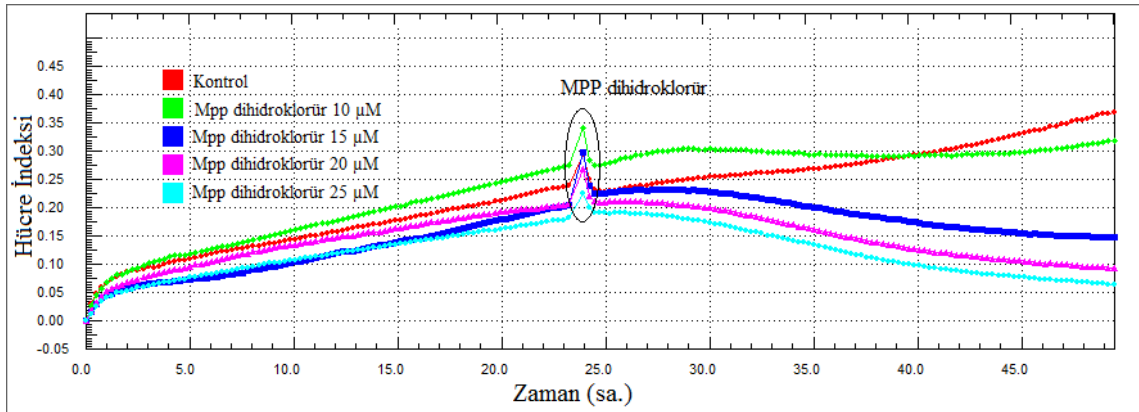
Maddeler	IC_{50} değeri
API-1	56,67 μ M
MPP dihidroklorür	20,01 μ M
α -Chaconine	4,72 μ M
α -Solanine	26,27 μ M

4.3. GZHA Canlılık Deney Sonuçları



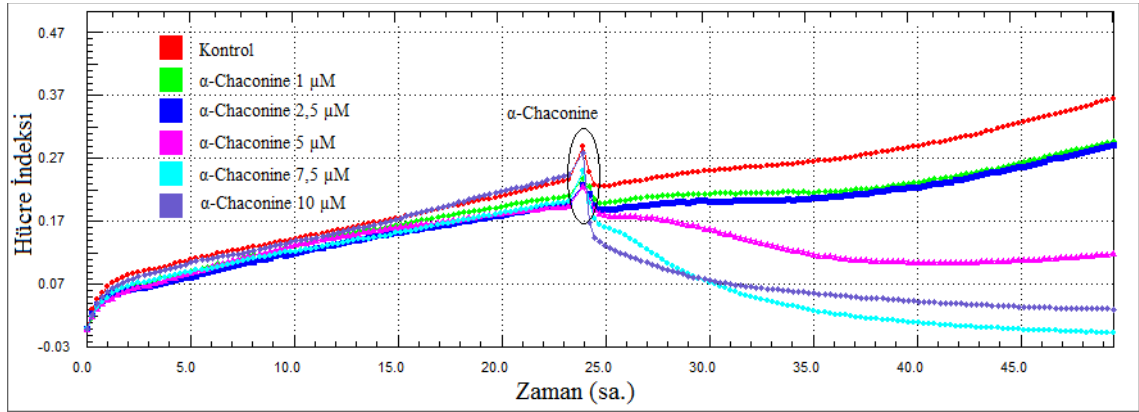
Şekil 4.12. API-1 uygulanmasından sonraki ilk 24. sa. hücre indeksi verileri

API-1'in 24 sa. uygulamada 5 μM konsantrasyonu antiproliferatif etki gösterirken, 10, 25 ve 50 μM konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığı ve 25 μM konsantrasyonda CI değerinin 0,05'in altına düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.12). Bu sonuç SRB deneyi ile de doğrulandı.



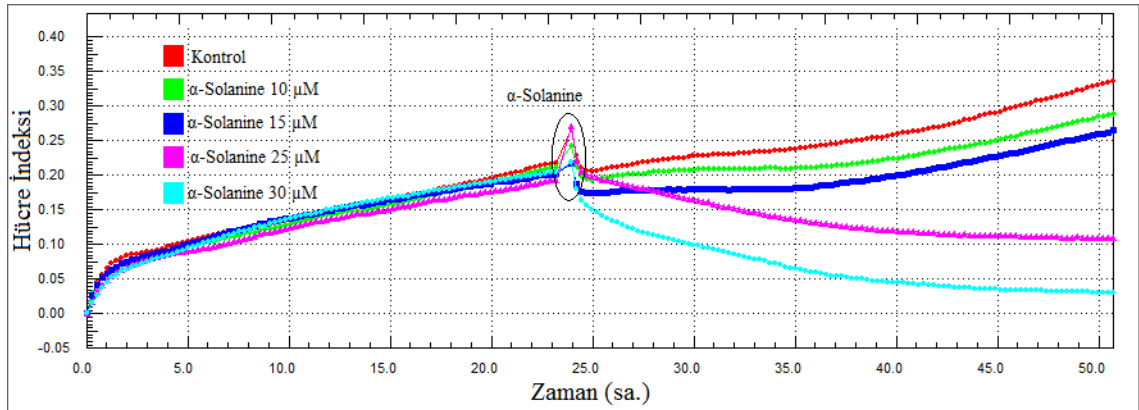
Şekil 4.13. MPP dihidroklorür uygulanmasından sonraki ilk 24. sa. hücre indeksi verileri

MPP dihidroklorürün 24 sa. uygulamada 10 μM konsantrasyonu antiproliferatif etki gösterirken, 15, 20 ve 25 μM konsantrasyonlarda, konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı görüldü (Şekil 4.13). Bu sonuç SRB deneyi ile de doğrulandı.



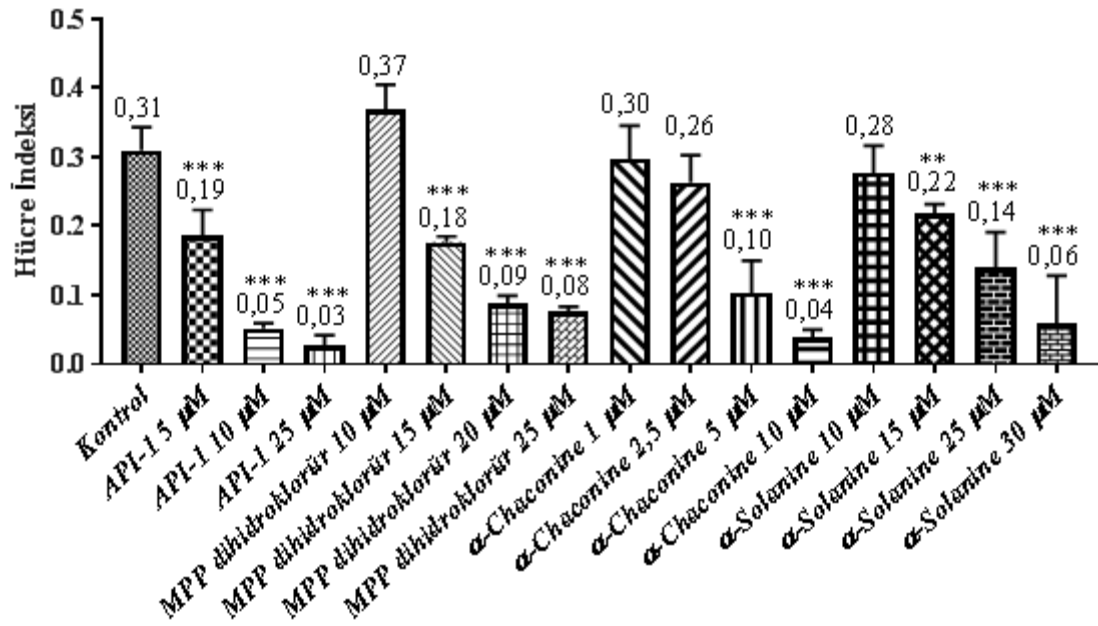
Şekil 4.14. α -Chaconine uygulanmasından sonraki ilk 24. sa. hücre indeksi verileri

α -Chaconine'in 24 sa. uygulamada 1 ve 2,5 μ M konsantrasyonu antiproliferatif etki gösterirken, 5; 7,5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda, hücre canlılığını azalttığı görüldü (Şekil 4.14) ve 7,5; 10 μ M konsantrasyonda CI 0'a yaklaşmıştır. Bu sonuç SRB deneyi ile de doğrulandı.



Şekil 4.15. α -Solanine uygulanmasından sonraki ilk 24. sa. hücre indeksi verileri

α -Solanine'in 24 sa. uygulamada 10 ve 15 μ M konsantrasyonu antiproliferatif etki gösterirken, 25 ve 30 μ M konsantrasyonlarda, konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı görüldü (Şekil 4.15). Bu sonuç SRB deneyi ile de doğrulandı.



Şekil 4.16. RL95-2 hücrelerinde maddelerin uygulanmasından sonraki 24. sa. hücre indeksi verileri

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; **<0,01 ve ***<0,001 (n=5). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

MPP dihidroklorür 10 µM ($p>0,05$) konsantrasyonda CI değerinde artış gözlemlendi. α-Chaconine 1 ($p>0,05$) ve 2,5 µM ($p>0,05$); α-solanine 10 µM ($p>0,05$) gruplarında kontrole göre CI'de anlamlı bir düşüşe neden olmadığı görüldü. API-1 5 ($p<0,001$), 10 ($p<0,001$) ve 25 ($p<0,001$) µM; MPP dihidroklorür 15 ($p<0,001$), 20 ($p<0,001$) ve 25 ($p<0,001$) µM; α-chaconine 5 ($p<0,001$) ve 10 ($p<0,001$) µM; α-solanine 15 ($p<0,01$); 25 ($p<0,001$) ve 30 ($p<0,001$) µM konsantrasyonlarda, doza bağımlı olarak CI'nın azaldığı görüldü (Şekil 4.16).

Curve Data	Calculation Results	Curve Data	Calculation Results
Curve1		Curve1	
Curve Type	DRC (CI vs conc)	Curve Type	DRC (CI vs conc)
Formula	Sigmoidal dose-respon	Formula	Sigmoidal dose-respon
Compound Name	CHACONINE	Compound Name	SOLANINE
Time	48:57:56	Time	48:57:56
Wells	D3,D4,D5,D6,D7;E3,E4,E5	Wells	D1,E1,F1,G1,H1;D2,E2,F2
IC50	4,71472E-006M	IC50	2,62674E-005M
Square R	0,98892	Square R	1

Şekil 4.17. α -Chaconine ve α -solanine uygulanmasından sonraki 24 sa.'lık IC₅₀ değerleri

GZHA yazılımı aracılığıyla hesaplanan α -chaconine ve α -solanine uygulamasından sonraki 24. sa. IC₅₀ değerleri, α -chaconine ve α -solanine için sırasıyla 4,72 ve 26,27 μ M olarak saptandı (Şekil 4.17).

4.4. BCA ile Protein Miktar Tayin Sonuçları

BCA protein ölçüm kiti ile bikinkoninik asit yöntemine göre her örnek için protein miktarı ölçüldü ve western blot deneyinde, poliakrilamit jelde 1 kuyuya yüklenen protein konsantrasyonu 30 μ g/ μ l olacak şekilde hesaplama yapıldı. Sonuçlar ve hesaplama Tablo 3.8'de yer almaktadır.

Tablo 3.8. RL95-2 hücre lizatında protein miktarları ve jele yüklenen örnek hacimleri

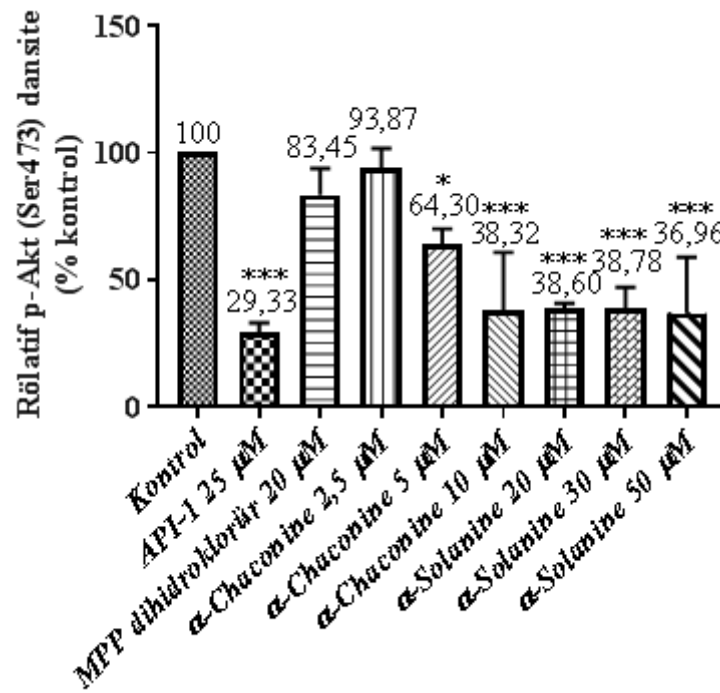
Örnek	Protein konsantrasyonu (μ g/ μ l)	30 μ g/kuyu (μ l)
Kontrol	5,81	5,16
API-1 25 μ M	4,00	7,50
MPP dihidroklorür 20 μ M	5,20	5,77
α -Chaconine 2,5 μ M	5,80	5,17
α -Chaconine 5 μ M	6,90	4,35
α -Chaconine 10 μ M	5,80	5,17
α -Solanine 20 μ M	6,80	4,41
α -Solanine 30 μ M	6,30	4,76
α -Solanine 50 μ M	7,60	3,95

4.5. Western Blot Deney Sonuçları

Etkili konsantrasyonu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 sa. boyunca API-1, MPP dihidroklorür, α -chaconine ve α -solanine uygulamaları sonucunda elde edilen protein örneklerinde western blot yöntemi ile farklı uygulamalar

yapılan gruplarda elde edilen total proteinlerde β -aktin, Akt, p-Akt (Ser473), ER α ve p-ER α ekspresyon düzeyleri belirlendi.

Western blot deneyleri yapıldıktan sonra elde edilen röntgenlerdeki bantların koyuluğu Image J programı ile hesaplandı.

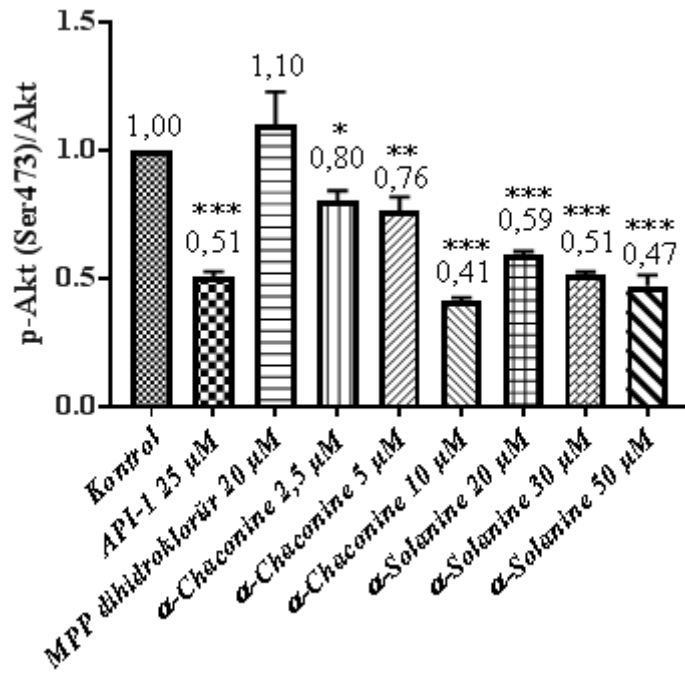


Şekil 4.18. RL95-2 hücrelerinde rölatif p-Akt (Ser473) protein düzeyi

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; *<0,05 ve ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

RL95-2 hücrelerinde rölatif p-Akt (Ser473) protein düzeyine (Şekil 4.18) bakıldığı zaman, API-1 25 μ M (p<0,001) ile α -chaconine 10 μ M (p<0,001), α -solanine 20 (p<0,001), 30 (p<0,001) ve 50 (p<0,001) μ M konsantrasyonlarında kontrole göre aynı anlamlılıkta p-Akt (Ser473) inhibisyonu görüldü. α -Chaconine 2,5 (p>0,05); 5 (p<0,05) ve 10 μ M (p<0,001) konsantrasyonlarında doza bağımlı olarak p-Akt (Ser473) dansitesini kontrole göre azalttı. α -Solanine 20 (p<0,001), 30 (p<0,001) ve 50 (p<0,001) μ M konsantrasyonlarında inhibisyon dozdan bağımsız olarak aynı anlamlılık seviyesinde olduğu gösterildi. Ayrıca MPP dihidroklorür 20 μ M (p>0,05)

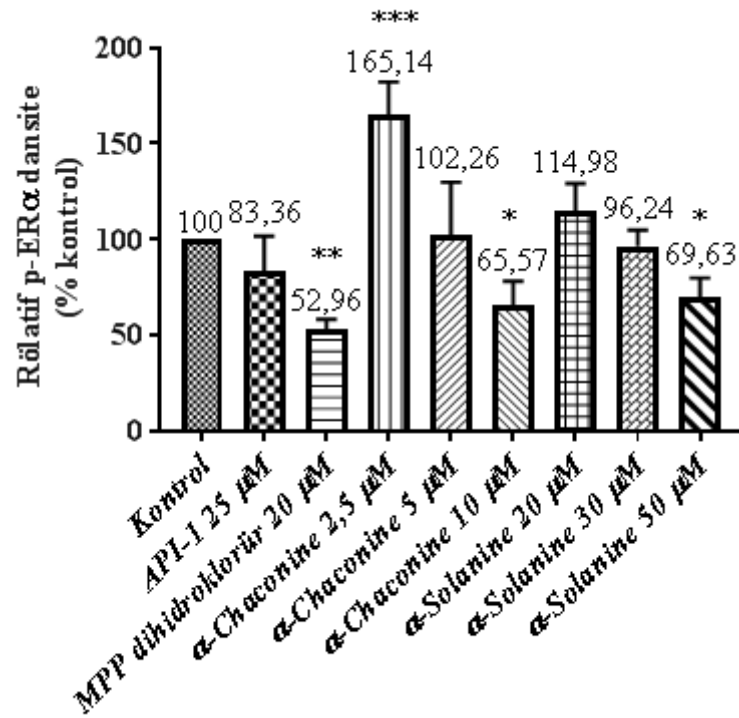
konsantrasyonda rölatif p-Akt (Ser473) dansitesini azalttı, ancak diğ r deney grupları içerisinde kontrole göre anlamlı bulunmadı.



Şekil 4.19. RL95-2 hücrelerinde p-Akt (Ser473)/Akt oranı

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; *<0,05; **<0,01 ve ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama   ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

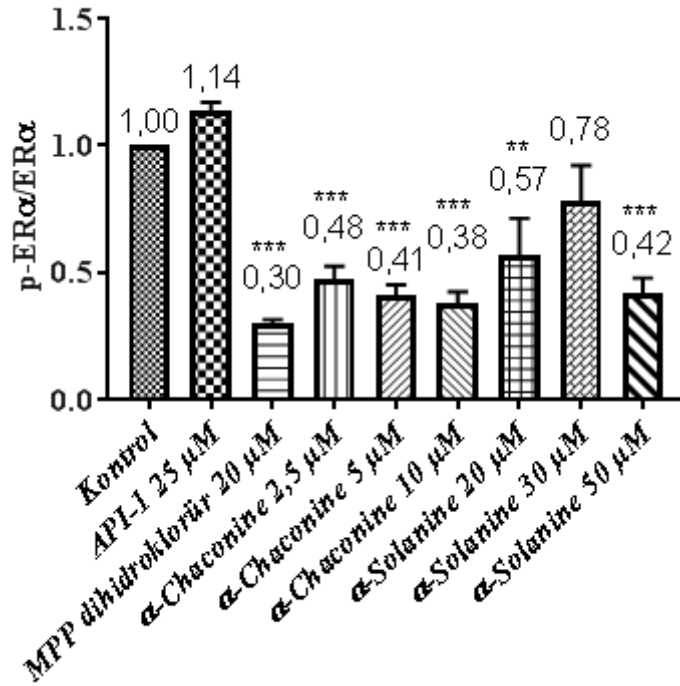
RL95-2 hücrelerinde p-Akt (Ser473)/Akt oranına ( ekil 4.19) bakıldığı zaman, API-1 25  M (p<0,001),  -chaconine 10  M (p<0,001),  -solanine 20 (p<0,001), 30 (p<0,001) ve 50 (p<0,001)  M konsantrasyonlarında p-Akt (Ser473)/Akt oranını kontrole göre aynı anlamlılıkta azalttığı görüldü.  -Chaconine 2,5 (p<0,05) ve 5  M (p<0,01) konsantrasyonlarında doza bağımlı olarak p-Akt (Ser473)/Akt oranını kontrole göre azalttı.  -Chaconine ve  -solanine'in p-Akt (Ser473)/Akt oranını doza bağımlı olarak azalttı. Ayrıca MPP dihidroklorür 20  M (p>0,05) konsantrasyonda p-Akt (Ser473)/Akt oranını artırdı ancak kontrole göre anlamlı bulunmadı.



Şekil 4.20. RL95-2 hücrelerinde p-ERα protein düzeyi

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; *<0,05; **<0,01 ve ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

RL95-2 hücrelerinde rölatif p-ERα protein düzeyine bakıldığı zaman, MPP dihidroklorür 20 µM (p<0,01) konsantrasyondaki azalma kadar olmamakla birlikte; α-chaconine 10 µM (p<0,05) ve α-solanine 50 µM (p<0,05) konsantrasyonlarda p-ERα seviyesinde kontrole göre anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 4.20). α-Chaconine 2,5 µM (p<0,001); 5 µM (p>0,05) ve α-solanine 20 µM (p>0,05) konsantrasyonlarında p-ERα düzeyleri kontrole göre artış göstermiş olup, α-chaconine 2,5 µM (p<0,001) konsantrasyonundaki artış kontrole göre anlamlı bulundu. Ayrıca API-1 25 µM (p>0,05) konsantrasyonda rölatif p-ERα dansitesini azalttı, ancak diğer deney grupları içerisinde kontrole göre anlamlı bulunmadı.

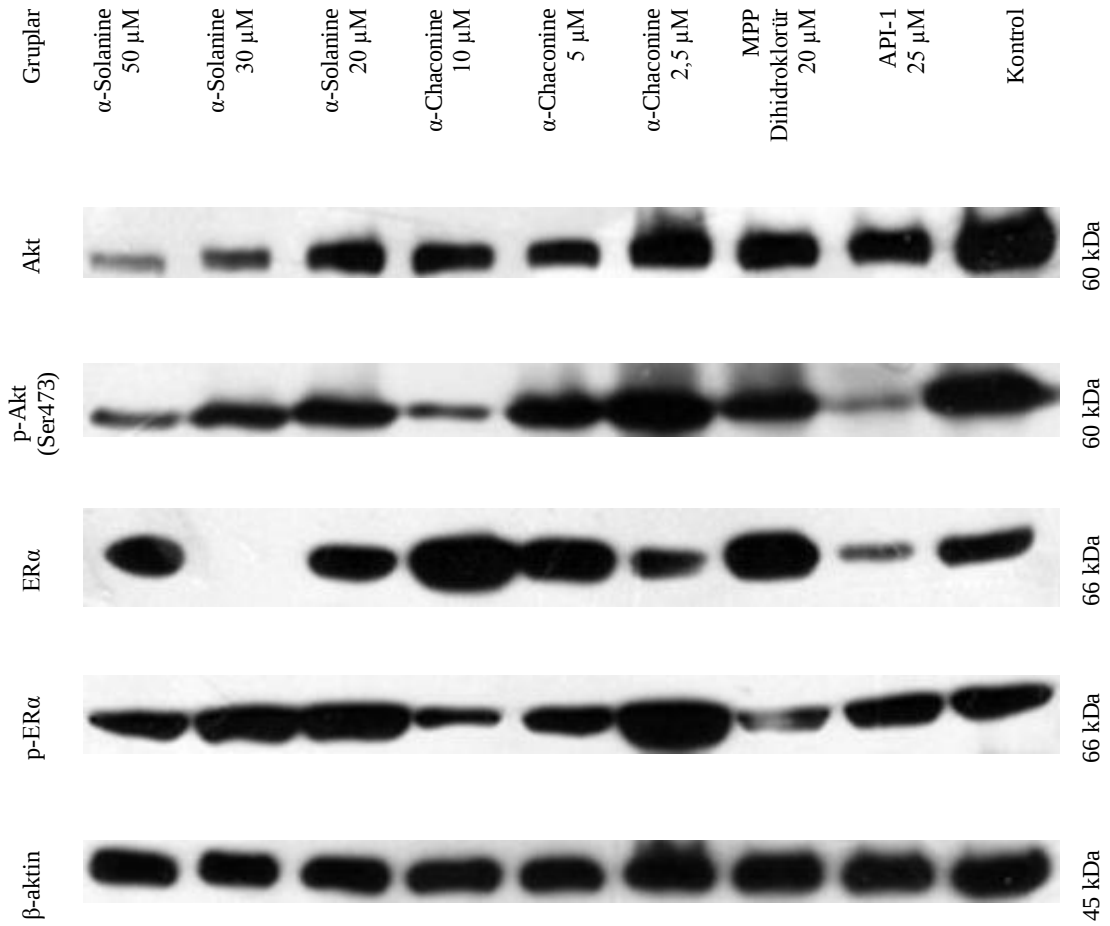


Şekil 4.21. RL95-2 hücrelerinde p-ERα/ERα oranı

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; **<0,01 ve ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

RL95-2 hücrelerinde p-ERα/ERα oranına (Şekil 4.21) bakıldığı zaman, MPP dihidroklorür 20 μM (p<0,001) ile α-chaconine; 2,5 (p<0,001); 5 μM (p<0,001); 10 μM (p<0,001) ve α-solanine 50 (p<0,001) μM konsantrasyonlarında p-ERα/ERα oranını kontrole göre aynı anlamlılıkta azalttığı görüldü. α-Solanine 20 μM (p<0,05) ve 30 μM (p>0,05) konsantrasyonlarında p-ERα/ERα oranını kontrole göre azalttı. α-Chaconine artan konsantrasyonlarında p-ERα/ERα oranını doza bağlı olarak azalttığı görüldü. Ayrıca API-1 25 μM (p>0,05) konsantrasyonda p-ERα/ERα oranını azalttı, ancak diğer deney grupları içerisinde kontrole göre anlamlı bulunmadı.

RL95-2 hücrelerinde Akt, p-Akt (Ser473), ERα, p-ERα ve β-aktin'in western blot analizi ile elde edilen görüntü bantları Şekil 4.22'de verildi.



Şekil 4.22. RL95-2 hücrelerinde Akt, p-Akt, ERα, p-ERα ve β-aktin'in western blot analizi ile elde edilen görüntü bantları.

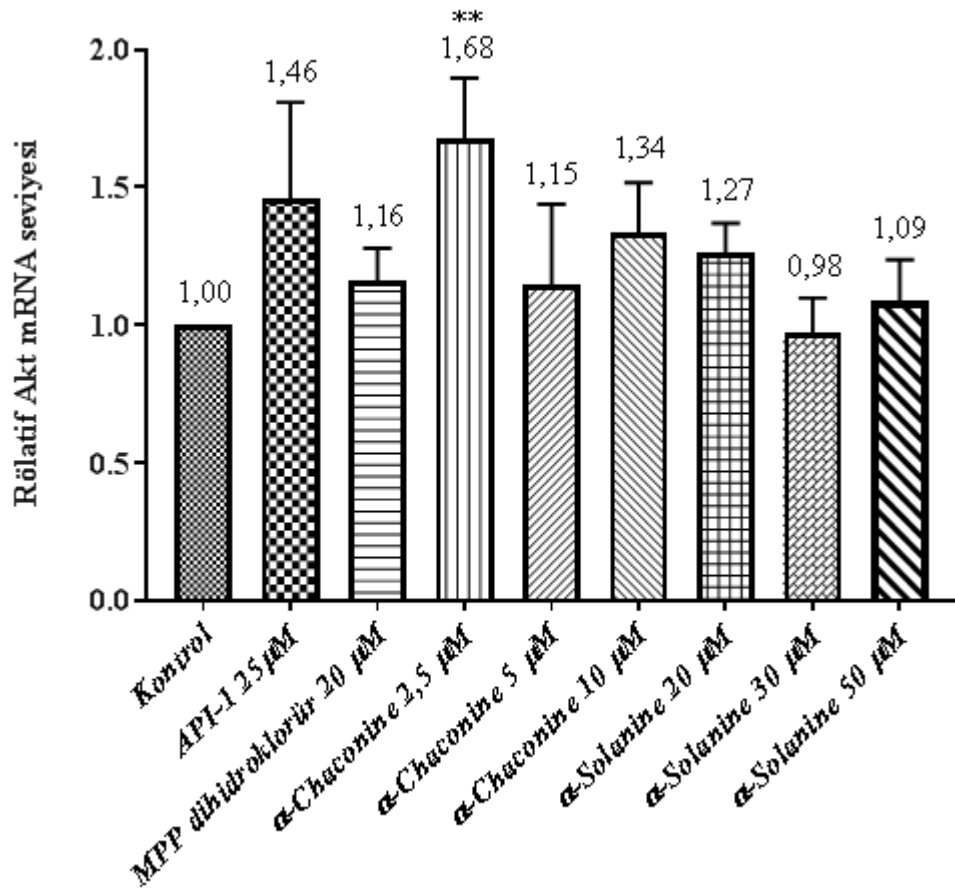
4.6. RNA İzolasyonu ve qPCR Deney Sonuçları

RNA izolasyonu sonunda örneklerden spektral ölçüm sonuçları Tablo 3.9'da verildi.

Tablo 3.9. RNA izolasyonu sonucu örneklerin konsantrasyon ve saflık verileri

Örnek	Konsantrasyon (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
Kontrol	303,280	1,910
API-1 25 μM	166,640	1,910
MPP dihidroklorür 20 μM	456,440	1,990
α-Chaconine 2,5 μM	223,280	1,890
α-Chaconine 5 μM	426,960	1,870
α-Chaconine 10 μM	164,200	1,920
α-Solanine 20 μM	537,520	1,980
α-Solanine 30 μM	491,600	1,990
α-Solanine 50 μM	460,280	1,950

qPCR deneyi için etkili konsantrasyonu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 sa. boyunca API-1, MPP dihidroklorür, α -chaconine ve α -solanine uygulamaları sonucunda hücrelerden izole edilen mRNA'lar cDNA'ya dönüştürüldükten sonra *ACTB*, *AKTB* ve *ESR1* gen ifadelerinin analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları değerlendirilirken referans gen olarak *AKTB*, kalibratör olarak ise kontrol örneği kullanıldı.

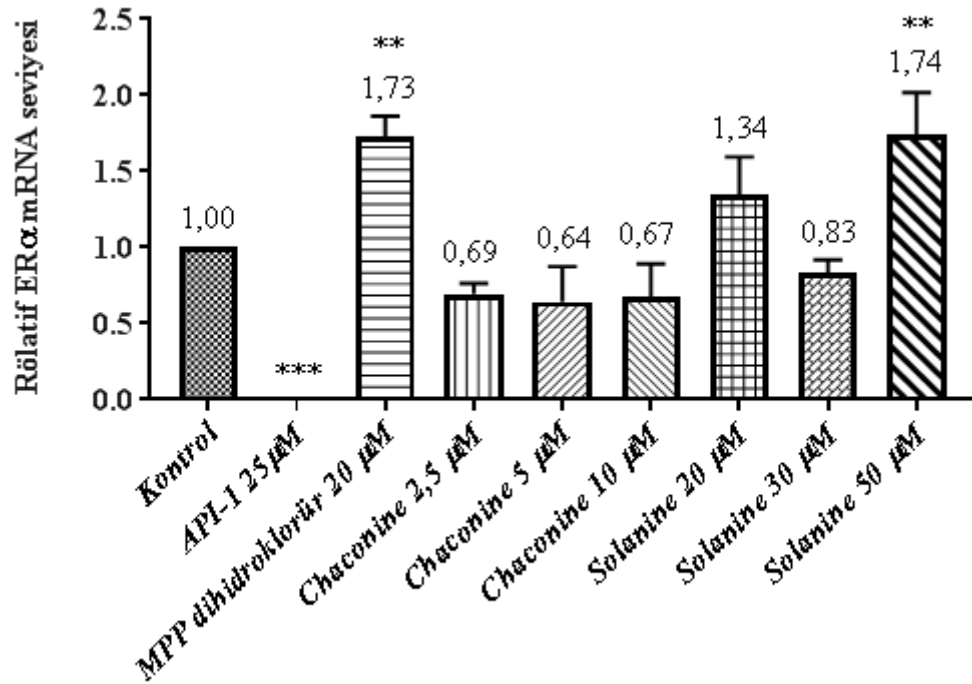


Şekil 4.23. RL95-2 hücrelerinde Akt'nin rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; **<0,01 (n=3). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

α -Solanine 30 µM konsantrasyonu 24 sa. sonunda Akt mRNA ekspresyon düzeyinde bir azalış, bununla birlikte diğer deney gruplarında bir artış meydana getirdiği saptandı. α -

Chaconine 2,5 μ M konsantrasyonda Akt mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) bir artış meydana getirdiği belirlendi (Şekil 4.23).

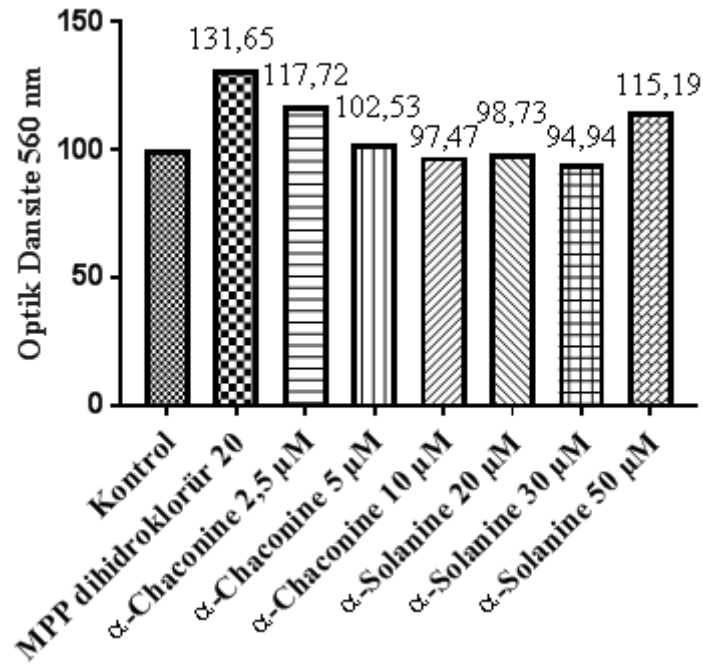


Şekil 4.24. RL95-2 hücrelerinde ERα'nın rölatif mRNA ekspresyon seviyeleri

Gruplar kontrole göre kat değişimi olarak verildi. Değerler GraphPad Prism 7.01 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. p değeri $<0,05$. Anlamlılık aralığı; ** $<0,01$ ve *** $<0,001$ ($n=3$). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

MPP dihidroklorür'ün 20 μ M, α -solanine'in 20 ve 50 μ M konsantrasyonu 24 sa. sonunda ERα mRNA ekspresyon düzeyinde bir artış, bununla birlikte diğer deney gruplarında bir azalış meydana getirdiği saptandı. API-1 25 μ M ($p<0,001$), MPP dihidroklorür 20 μ M ($p<0,01$) ve α -Solanine 50 μ M ($p<0,01$) konsantrasyonlarında ERα mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.24).

4.7. Hücre Migrasyon Deneyi Sonuçları



Şekil 4.25. RL95-2 hücrelerinde migrasyon deneyi sonuçları

MPP dihidroklorür 20 µM; α-chaconine 2,5; 5 µM ve α-solanine 50 µM konsantrasyonlarda hücre migrasyonunu kontrole göre artırmış olup, α-chaconine 10 µM ve α-solanine 10; 20 µM konsantrasyonlarda ise kontrole göre hücre migrasyonunu azalttığı bulundu. α-chaconine'in farklı konsantrasyonlarda doza bağımlı olarak azalma gözlemlendi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasının amacı, RL95-2 insan endometriyum kanser hücrelerinde, α -chaconine ve α -solanine'in 24 sa.'lik etkilerini araştırmaktır. Bu kapsamda; östrojen reseptör pozitif RL95-2 hücrelerine, α -chaconine ve α -solanine muamelesinin Akt ile ER α ekspresyon düzeyleri ve migrasyon yeteneği üzerindeki rolü ve Akt inhibitörü olan API-1 ile ER α antagonisti MPP dihidroklorürün bu sinyal yolağı ile ER α üzerindeki etkileri ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

Glikoalkaloitler, *S. tuberosum*, *S. esculentum* ve *S. melongena* gibi pek çok bitki içerisinde bulunan biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlerdir. α -Chaconine ve α -solanine, patates bitkisinde bulunan en temel steroidal trisakkarit glikoalkaloitlerdir (11, 12). α -chaconine ve α -solanine'in aglikonu; solanidin steroidal hormonların prekürsörü olan diosgenin ile yapısal benzerlikler göstermektedir. Solanidine, diosgeninin (steroidal saponin) nitrojen içeren ekivalanıdır (21). α -Chaconine ve α -solanine'in; potansiyel toksisiteleri iyi bilinse de, doz ve kullanım koşullarına bağlı olarak antikolinesteraz (116), antiinflamatuvar (117), antibakteriyel (72), antiviral (73), antifungal (118), antimalaryal (71) ve antikanser (14) gibi faydalı etkilere sahip olduklarını gösteren çalışmalar literatürde yer almaktadır.

α -Chaconine ve α -solanine, fizyolojik fonksiyonlarda fare ve normal insan karaciğer hücrelerinde toksisite geliştirebilmektedir (119, 5). Buna ek olarak, antikarsinojenik etki potansiyeline, hücre büyümesinin inhibisyonu yoluyla sahip oldukları, insan; akciğer (10), pankreas (13), cilt (12), prostat (19), servikal (5), karaciğer (20), lenfosit (21), mide (22), kolorektal (23) ve meme (22) kanseri hücre hatlarında birçok çalışmada gösterilmiştir. Ancak endometriyum kanserinde etkili olup olmadığı ile ilgili literatürde herhangi bir bilgiye rastlanamamıştır ve endometriyum kanserindeki etkileri ilk kez bu çalışma ile araştırılmıştır.

α -Chaconine'in sığır aortik endotelial hücre proliferasyon, migrasyon ve invazyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etkilerini ise JNK ile PI3K/Akt sinyal yolağının ve NF- κ B aktivitesinin inaktive ederek, antianjiyogenik etkinlik üzerinden gösterdiği bulunmuştur (12). α -Chaconine ayrıca insan akciğer kanser hücrelerinde (A549) antimetastatik etki göstermiştir. Bu etkiyi ise MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini azaltarak göstermiştir (7). Diğer bir çalışmada ise α -chaconine'in, prostat kanser hücre (LNCaP ve PC-3) proliferasyonunu, p27 seviyelerini artırarak ve siklin D1'i downregüle etmek suretiyle inhibe ettiği ve bu hücrelerde apoptozun kaspaz-bağımlı ve bağımsız yollarla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca söz konusu çalışmada kaspaz-bağımlı apoptozisin, JNK aktivasyonu aracılığı ile indüklendiği ortaya konmuştur (19).

α -Solanine'in insan melanoma hücrelerinde (A2058) metastaz, migrasyon ve invazyonu önleyici etkilerini; JNK, PI3K, Akt fosforilasyon ve NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla ve MMP-2/9 aktivitesi/ekspresyonunu azaltarak gerçekleştirdiği literatürde mevcuttur (12). Yapılan başka bir çalışmada; α -solanine'in, insan prostat kanser hücre (PC-3) invazyonunu baskıladığı; ERK ve PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden MMP-2/9 ekspresyonunu azaltarak, onkojenik mikroRNA-21 downregüle ettiği ve tümör supresör mikroRNA-138 (miR-138) ekspresyonunu upregüle ettiği gösterilmiştir (14). Akciğer kanser hücrelerinde (A549 ve H1299); miR138 ve fokal adezyon kinaz (FAK) ekspresyonunu azaltarak radyosensitivite ve kemosenitiviteyi arttığı bulunmuştur (120). α -Solanine'in sağlıklı hücrelerde toksik olmayan konsantrasyonlarda pankreatik kanser hücrelerinde (PANC-1); Wnt/ β -katenin, Akt/mTOR, Stat3 ve NF- κ B yollarının inhibisyonu ile antitümör etki sağladığı bulunmuştur (13). α -Solanine'in insan hepatokarsinoma hücrelerinde (HepG₂); kaspaz ailesinin enzimatik aktivitesindeki değişime neden olabilen hücre içi $[Ca^{2+}]_i$ artışıyla sonuçlanan Bcl-2/Bax oranını azaltarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (20). α -Solanine'in HepG2 hücrelerindeki mitokondriyal membran potansiyelinin ve hücre içi $[Ca^{2+}]_i$ 'a etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; α -solanine, membran potansiyelini düşürür ve mitokondrideki PT (permeability transition) kanallarını açılmasını kolaylaştırarak, organellerdeki Ca^{2+} konsantrasyonunu azaltır sonucuna varılmıştır. Bunun da hücre içindeki Ca^{2+} konsantrasyonunun yükselmesine dolayısıyla apoptoz mekanizmasının tetiklenmesine yol açtığı gösterilmiştir (121).

Sonuç olarak, α -chaconine ve α -solanine'in; sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alabileceği ayrıca apoptozise bağımlı veya bağımsız olarak hücrenin çoğalma işlevlerinin kontrolünde etkin rol oynayabileceği yukarıdaki çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak endometriyum kanserindeki etkinliği ve etki mekanizmaları henüz aydınlatılmamıştır.

Endometriyum kanseri kadınlar arasında en sık karşılaşılan jinekolojik kanserdir. Östrojen, endometrial doku üzerinde mitojenik ve mutajenik ekspansiyona neden olmaktadır ve karşılanmamış östrojene maruziyet, endometriyum kanseri için en iyi bilinen risk faktörüdür. Menopozal semptomları gidermek amacıyla verilen östrojen replasman tedavisi, süreye de bağlı olarak endometriyum kanser riskini yaklaşık 2-20 kat arasında artırmaktadır (122). Endometrial kanser, 2012 yılında dünyada kadınlarda 5. en sık rastlanılan kanser türü olup bu hastalığa yakalanma riski 75 yaşına kadar yükselmektedir. 2012'de dünya çapında 320.000 yeni endometrial kanser vakası teşhisi konulmuştur. Mortalitesine bakılırsa 76.000 ölüm ile 14. sırada yer almaktadır (30). Türkiye'de endometriyum kanseri 2012 yılı verilerine göre non-melanoma deri kanserleri hariç diğer kanser türleri arasında, 5. en sık görülen kanser türüdür ve 15 yaş üstü için insidans ve mortalite verileri sırasıyla 3.787 ve 951 olup 5 yıllık prevalansı 13.987'dir (31).

Endometriyum kanseri için öngörülen tedavi, cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapidir (123). Günümüzde tek ajan kemoterapisinde kullanılan ajanlar; doksorubisin, paklitaksel, bevacizumab, ifosfamid, iksabepilon, dosetaksel, topotekan, oxaliplatin, etoposide ve lipozomal doksorubisindir. Kombine tedavilerde; paklitaksele ek olarak sisplatin veya karboplatin iyi bir tercihtir. Agresif karakterde lokal ileri olgularda; doksorubisin, sisplatin ve paklitaksel kombinasyonu kullanılmaktadır. Çeşitli moleküler ajanlar ise endometriyum kanserindeki sağkalım oranlarını arttırmak amacıyla hedefe yönelik etki mekanizmaları ile klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Anjiyogenezi durdurmak amacıyla kullanılan anjiyokinaz inhibitörleri; brivanib ve BIBF 1120'dir. HER2'ye yönelik olarak trastuzumab ve lapatinib; P13K/PTEN/Akt/mTOR yolaklarında inhibitör etkili olan temsirolimus, deforolimus ve everolimus gibi hedeflendirilmiş tedaviler denenmektedir. Sitotoksik kemoterapiyi kabul etmeyen hastalarda hormonal tedaviler uygulanabilir (124). Histerektominin tercih edilmediği, fertilitenin devamı istenilen veya metastazın önlenmesi gereken

hastalarda hormonal tedavi amacıyla medroksiprogesteron asetat gibi bir progestin uygulanır (17). Endometriyal kanserde, özellikle hem ekstrinsik (Fas proteinleri) hem de intrinsik (Bcl-2 protein ailesi) apoptoz yolağının inhibisyonu, PI3K/Akt yolağındaki değişiklikler ve p53 mutasyonu bilinen direnç mekanizmalarındandır. İlerlemiş ve tekrarlayan endometriyal karsinomalar, çok faktörlü kemoterapi direncinin yüksek oranda olduğu, zorlayıcı bir tümör grubu olmaya devam etmektedir. İlaç akışı efluks proteinlerinin aşırı ekspresyonundan kaynaklanan kemoterapi direnci ve hem primer hem de tekrarlayan hastalıkta β -tubulin izoformlarındaki mutasyonlar, tedavi zorluklarını oluşturmaktadır. Bu nedenle bilinen direnç yollarına daha az duyarlı yeni ajan ihtiyacını doğmaktadır (125). Bu ilaçlara karşı direnç gelişimi ve yüksek dozlarında oluşan ciddi toksik etkiler araştırmacıları farklı ilaç molekülleri aramaya yönlendirmektedir.

α -Chaconine ve α -solanine'in kanser hücrelerindeki etkileri az bilinse de, antikarsinojenik etki potansiyeline sahip olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (7, 8, 11, 14, 126). Gerek farklı kanser türlerinde gösterilen hücre proliferasyonunu azaltıcı ve apoptozu indükleyici etkileri gerekse endometriyum kanserinde bu etkileri gösteren araştırma olmaması nedeniyle, çalışmamızda; östrojen pozitif RL95-2 insan endometriyum kanser hücrelerinde α -chaconine ve α -solanine'in hücre migrasyonuna etkileri, Akt ve ER α ekspresyon ve aktivitesinin düzenlenmesinde Akt sinyalizasyonunun olası rolü, Akt inhibitörü olan API-1'in ve ER α antagonisti MPP dihidroklorürün bu sinyal yolağı ile ER α ekspresyonuna etkileri aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu tez çalışmasında, öncelikle literatürde yer almayan, RL95-2 hücrelerinin hücre sayısına bağlı büyüme eğrilerini profillemek amacıyla yapılan gerçek zamanlı hücre analizi sonuçlarına göre kuyu başına ideal hücre sayısının 20.000 olduğu düşünüldü. İlacı uyguladıktan sonra 24. sa. sonuçları değerlendirileceği için minimum 48 sa.'lik sürede logaritmik çoğalma fazında olup platoya geçmemesi sebebiyle (Şekil 4.3) 20.000 hücre/kuyu ile çalışılmaya karar verildi. Bununla birlikte 96'lı e-plakanın kuyu başına yüzey alanı ortalama 0,2 cm² (115) olduğundan bu yüzey alanı için 20.000 hücre/kuyu ile çalışılması uygun bulundu. E-plakaya ekimi yapılan RL95-2 hücrelerinin CI değerinin birin altında ve CI değişiminin düşük olduğu görüldü. CI değerinin düşük olma nedeni, hücre sayısı ve canlılığı normal iken; hücrenin boyutu, morfolojisi ve

hücre-substrat bağlanma kalitesi (86, 87) gibi CI değerini etkileyen hücreye spesifik diğer faktörlerden kaynaklı olabileceği sonucuna varıldı.

Bu çalışmada, α -chaconine ve α -solanine'in RL95-2 hücrelerinde canlılığa etkisini belirlemek ve değerlendirmek amacıyla SRB deneyinin seçilme nedeni; ucuz, hassas, basit, tekrarlanabilir ve formazan dayalı deneylere göre daha hızlı olup iyi bir linearite ve sinyal-gürültü oranı vermesidir (89). Maddelerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini geniş bir aralıkta değerlendirmek amacıyla; API-1 (Şekil 4.4), α -chaconine (Şekil 4.6) ve MPP dihidroklorürün (Şekil 4.5) 5, α -solanine'in (Şekil 4.7) 6 farklı konsantrasyonu seçildi ve 24. sa. hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelendi.

SRB genel doz tarama deneyinde RL95-2 hücrelerinde API-1'in canlılığa olan etkisine (Şekil 4.8) bakıldığı zaman, 1 μ M konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı bir azalma görülmedi. API-1'in 5 μ M ve daha yüksek konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksitenin doza bağlı olarak artmadığı tespit edildi. Daha dar bir konsantrasyon aralığında canlılığa olan etkisi değerlendirildiğinde; 1, 3, 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı bir azalma görülmedi. API-1'in 25 ve 50 μ M konsantrasyonda kontrole göre aynı anlamlılıkta canlılığı azalttığı için daha düşük bir konsantrasyon olan 25 μ M ile çalışılmaya karar verildi. Ayrıca GZHA canlılık deney sonuçlarında (Şekil 4.12) 10 ve 25 μ M konsantrasyonları benzer bir profil sergilemesi de SRB deney sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, 25 μ M konsantrasyonunun seçilmesini destekler niteliktedir. Literatürde bu bulgumuzla birebir karşılaştırabileceğimiz başka bir çalışma bulunmamaktadır.

SRB genel doz tarama deneyinde RL95-2 hücrelerinde MPP dihidroklorürün canlılığa olan etkisi (Şekil 4.9) değerlendirildiğinde; 1, 5 ve 10 μ M konsantrasyonda kontrole göre anlamlı bir azalma görülmedi. MPP dihidroklorürün 50 μ M ve daha yüksek konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksitenin doza bağlı olarak artmadığı tespit edildi. Daha dar bir konsantrasyon aralığında canlılığa olan etkisi değerlendirildiğinde, MPP dihidroklorürün 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı bir azalma görülmedi. MPP dihidroklorürün 25 ve 50 μ M konsantrasyonda kontrole göre aynı anlamlılıkta canlılığı azalttığı görüldü. Ayrıca GZHA canlılık deney sonuçlarında (Şekil 4.13) 10 ve 25 μ M konsantrasyonları benzer bir profil sergilemesi de SRB deney sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde; 15, 20 ve 25 μ M konsantrasyonları benzer

profiller sergiledi. Ancak 15 μM 'da CI değeri %50 değişim göstermediği için, 20 ve 25 μM konsantrasyonlardan daha düşük olan aynı zamanda IC_{50} değeri olarak hesaplanan 20 μM konsantrasyon ile çalışılmaya karar verildi. Literatürde bu bulgumuzla birebir karşılaştırabileceğimiz başka bir çalışma bulunmamaktadır.

SRB genel doz tarama deneyinde RL95-2 hücrelerinde α -chaconine'in canlılığa olan etkisi (Şekil 4.10) değerlendirildiğinde; 10, 100 nM ve 1 μM konsantrasyonunda kontrole göre canlılığı doza bağlı olarak artırdığı görüldü. α -Chaconine'in 10 μM ve daha yüksek konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksitenin doza bağlı olarak artmadığı tespit edildi. Daha dar bir konsantrasyon aralığında canlılığa olan etkisi değerlendirildiğinde, α -chaconine'in 1 μM konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı bir artış görüldü. α -Chaconine'in 5 μM ve üzeri konsantrasyonlarında kontrole göre aynı anlamlılıkta canlılığı azalttığı görüldü. Ancak 10 μM ve daha yüksek konsantrasyonlarda canlılığı %70'den daha fazla azalttığı için sitotoksik kabul edildi. α -Chaconine'in 5 μM konsantrasyonda kontrole göre canlılığı yaklaşık %50 azalttığı görüldü. Ayrıca GZHA canlılık deney sonuçları (Şekil 4.14) 7,5 ve 10 μM konsantrasyonlarda benzer profiller sergilerken 7,5 μM α -chaconine'in canlılığı en az %70 azalttığı gösterildi. CI değeri 5 μM 'da %50 değişim gösterdiği için ve IC_{50} değeri olarak hesaplanan 4,71'e yakın bir değer olduğu için bu konsantrasyon ile çalışılmaya karar verildi. Literatürde bu bulgumuzla birebir karşılaştırabileceğimiz başka bir çalışma bulunmamaktadır.

SRB genel doz tarama deneyinde RL95-2 hücrelerinde α -solanine'in canlılığa olan etkisi (Şekil 4.11) değerlendirildiğinde; 10 μM konsantrasyona kadar kontrole göre canlılığı anlamlı olarak artırdığı görüldü. Bu artış literatürde yer alan α -solanidine'in 10 μM konsantrasyonda MCF-7 proliferasyonunu artırması (127) sonucu ile benzer bulundu ve bu durumun aglikon aracılı etkisinden kaynaklandığı doğrulandı. α -Solanine'in 50 μM ve daha yüksek konsantrasyonlarda oluşturduğu sitotoksitenin doza bağlı olarak artmadığı tespit edildi. Daha dar bir konsantrasyon aralığında canlılığa olan etkisi değerlendirildiğinde, α -solanine'in 10 μM konsantrasyonda kontrole göre anlamlı bir artışa, 30 μM ve üzeri konsantrasyonlarda ise kontrole göre aynı anlamlılıkta canlılığı azalmaya neden olduğu görüldü. Ancak kontrole göre 10 μM konsantrasyonda anlamlı artış ve 30 μM konsantrasyonunda anlamlı azalış sebebiyle GZHA canlılık deneyinde bu konsantrasyon çalışıldı. GZHA canlılık deney sonuçlarına (Şekil 4.15)

göre 10 ve 15 μM konsantrasyonlarda kontrole benzer profiller sergiledi. α -Solanine 25 μM konsantrasyonda %50'lik bir CI değişimi sağlamadığı ve IC_{50} değeri olarak hesaplanan 26,27 değerine yakın bir konsantrasyon olduğu için 30 μM konsantrasyon ile çalışılmaya karar verildi. Literatürde bu bulgumuzla birebir karşılaştırılabileceğimiz başka bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, α -chaconine ve α -solanine'in RL95-2 hücrelerinde, hücre canlılığını azalttığı ve sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. α -Chaconine ve α -solanine'in hücre canlılığına etkileri ile ilgili literatür bilgisi incelendiğinde, çalışmaların çoğu çeşitli hücre kültürü hatları üzerinde gerçekleştirilmiş olup bulgularımızı doğrular niteliktedir (7, 10, 12, 20).

α -Solanine'in HepG₂, insan gastrik karsinoma (SGC-7901) ve insan kalın bağırsak kanseri (LS-174) hücrelerinde IC_{50} değeri sırasıyla, 14,47; >50 ve >50 $\mu\text{g/ml}$ bulunmuş ve HepG₂ hücrelerinin α -solanine'e daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır (128). α -Solanine'in IC_{50} değeri fare meme karsinoma hücrelerinde (4T1) 34 μM , insan hepatosellüler karsinoma hücrelerinde (HuH-7) 30 μM bulunmuştur (8). Bu bulgular, α -solanine'in çalışmamızdaki IC_{50} değeri ile paralellik göstermektedir.

Glikoalkaloitlerin kolesterol ile güçlü kompleksler oluşturduğu *in vitro* gösterilmiştir (129). Glikoalkaloitlerin sitotoksisite özelliklerinin kolesterol içeren hücre zarlarını bağlama kabiliyeti ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. α -Chaconine ve α -solanine'in hücre membranını parçalaması üzerine, sinerjistik etkilerini gösteren bir dizi *in vitro* çalışma literatürde yer almaktadır (130-132). Bu çalışmamızda glikoalkaloitler kombine edilmemiştir. Ancak α -chaconine'in α -solanine'e göre RL95-2'de daha akut bir toksisiteye sahip olduğu gösterilmektedir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre, α -chaconine'in 1 μM ve daha düşük konsantrasyonlarda doza bağlı şekilde ve α -solanine'in 10 μM ve daha düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığını artırması, bu glikoalkaloitlerin aglikonu olan solanidine'in yapıcı steroidallı hormonlara benzerlikleriyle (127) bu etkiden sorumlu olabilecekleri yönünde değerlendirildi. Ayrıca, bu α -chaconine'in 2,5 μM konsantrasyonda hem hücre canlılığındaki artış, hem de kontrole göre Akt'nin mRNA aşırı ekspresyonu, ortamdaki büyüme faktörleri seviyesinin artmasına neden olan bir

cevaba yol açmış olabileceği ancak detaylı olarak farklı parametrelerle araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Akt fosforilasyonunun oldukça hassas ve spesifik bir inhibitörü olan API-1'in hücredeki önemli Ras-bağımlı hücre dışı sinyal ile düzenlenen protein kinazları (ERK1/2), MAPK, JNK, protein kinaz C, serin/treonin-protein kinaz veya protein kinaz A gibi önemli hücresel kinazları inhibe etmediği literatürde yer almaktadır (133). RL95-2 hücrelerinin Akt ekspresyonlarının incelenmesi amacıyla tercih edilme sebebi mutasyon geçirmiş PTEN insan endometriyal kanser hücrelerinde aktif Akt varlığıdır (134). Çalışmamızda, API-1 25 μ M'in güçlü bir şekilde p-Akt (Ser473) seviyesini düşürdüğü, sonucunda da RL95-2 hücrelerinin API-1'e duyarlı olduğu bulundu. Bununla birlikte, α -chaconine 10 μ M; α -solanine 20, 30 ve 50 μ M konsantrasyonlarında, rölatif p-Akt (Ser473) protein düzeyi sonuçlarının spesifik Akt inhibitörü olan API-1'in 25 μ M dozundaki azalmayla aynı anlamlılık düzeyinde olduğu gösterildi. Böylece, uygulanan bu konsantrasyonlarda α -chaconine ve α -solanine'in, Akt fosforilasyonunun inhibisyonunda saf Akt inhibitörü olan API-1 kadar güçlü olduğu bulundu.

RL95-2 hücrelerinde p-Akt (Ser473)/Akt oranları (Şekil 4.19) değerlendirildiğinde, α -chaconine'in 10 μ M, α -solanine'in 20, 30 ve 50 μ M konsantrasyonlarında p-Akt (Ser473)/Akt oranını kontrole göre azaltmada spesifik Akt inhibitör API-1 25 μ M kadar etkili oldukları gözlemlendi ve bu konsantrasyonlarda API-1 gibi Akt'nin fosforilasyonunu azaltarak etki gösterdikleri ortaya konuldu. α -Chaconine ve α -solanine'in bu etkisini doza bağlı olarak gösterdi ve bu bulgular literatürdeki α -chaconine'in A549 (7) ve α -solanine'in PANC-1 (13) hücrelerindeki Akt fosforilasyonunu azaltıcı etkisini RL95-2 hücresinde de doğrular nitelikteydi.

RL95-2 hücrelerinde rölatif p-ER α protein düzeyine bakıldığı zaman, MPP dihidroklorür 20 μ M konsantrasyondaki azalma kadar olmamakla birlikte; α -chaconine 10 μ M ve α -solanine 50 μ M konsantrasyonlarda p-ER α seviyesinde kontrole göre anlamlı bir azalma görülmesi (Şekil 4.20), bu konsantrasyonlarda ER α fosforilasyonu üzerine MPP dihidroklorür benzeri inhibitör etkisinin olduğunu düşündürdü.

RL95-2 hücrelerinde p-ER α /ER α oranları (Şekil 4.21) değerlendirildiğinde, α -chaconine'in; 2,5; 5; 10 μ M ve α -solanine'in 50 μ M konsantrasyonlarında p-ER α /ER α oranını kontrole göre azaltmada spesifik ER α inhibitörü olan MPP dihidroklorür 20 μ M

kadar etkili oldukları gözlemlendi ve bu konsantrasyonlarda MPP dihidroklorür gibi ER α 'nın fosforilasyonunu azaltarak etki gösterdikleri ortaya konuldu. Östrojen bağımlı yollara etkili olabileceği ve bununla taşıdıkları steroidal aglikon solanidine yapısıyla ilişkili olabileceği ilk kez taafımızdan gösterildi. α -Chaconine bu etkisini doza bağılı olarak gösterdi. Literatürde bu bulgumuzla birebir karşılaştırılabileceğimiz başka bir çalışma bulunmamaktadır.

E₂ pek çok kanser hücrelerinin büyümesini stimüle etmektedir. Bu etkisinin altındaki mekanizmaların başlıcaları, membranla başlayan erken dönem etkilerdir. MAPK/ERK ve PI3K/Akt yollarının blokajı, E₂ ile indüklenen DNA sentezini engeller (48). Östrojen aracılı sinyal yolları ER-bağımlı olanlar transkripsiyonel regülasyonun olup olmadığına bağılı olarak, genomik ve nongenomik olarak sınıflandırılır (135). α -Chaconine'in 2,5; 5 μ M ve α -solanine'in 20 μ M konsantrasyonlarında p-ER α düzeyleri kontrole göre artış (Şekil 4.20) göstermiş olup, α -chaconine'in 2,5 μ M konsantrasyonundaki artış kontrole göre anlamlı bulundu. Bu sonuç ise GZHA sonuçlarıyla da (Şekil 4.14) uyumlu olup, α -chaconine'in 2,5 μ M ve daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermezken aksine ER α fosforilasyonunu artırması (Şekil 4.6) östrojen reseptörü bağımlı bir sinyal yolu üzerinden etki gösterebileceği sonucuna varıldı. Ancak protein ekspresyonunun aksine kontrole göre rölatif mRNA seviyesindeki bu düşüşün, α -chaconine'in ER α etkileşim proteinleri ve ikincil habercileri kullanarak nongenomik yolk üzerinden non-transkripsiyonel aktivite ile göstermiş olabileceği düşünüldü. Bu etkisinin de steroidal molekül yapısına bağılı olarak östrojen benzeri etkisinden kaynaklanabileceği sonucuna varıldı. RL95-2 hücrelerinin de ER pozitif olması bu sonuçları doğrular niteliktedir. Ayrıca API-1 25 μ M konsantrasyonda rölatif p-ER α dansitesini azalttı, ancak diğer deney grupları içerisinde kontrole göre anlamlı bulunmadı.

ER, üreme organlarının ve diğer dokuların gelişiminde ve normal fizyolojik işlevlerinde önemli rol oynamaktadır. ER α ve ER β 'nin biyolojik rollerinin bir kısmı farklıdır, ancak bu farklılıkların doğası ve önemi tamamen aydınlatılmamıştır. ER α ve ER β 'nin önemli biyolojik rollerinin iyi anlaşılması, östrojenin farklı dokulardaki hareketini anlamak ve endokrin tedavideki ajanların geliştirilmesi için önemlidir.

Bir çok E₂ sinyal yolağının varlığı antiöstrojenlerin daha kompleks mekanizmalara sahip olduğunu gösterir (48). Östrojenin endometriyum dışı dokulardaki protektif etkisine karşın rahimdeki proliferatif etkisi bilinmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, α -Chaconine'in <1 μ M (Şekil 4.6) ile α -solanine'in <10 μ M; Şekil 4.7 ve Şekil 4.15'te yer alan konsantrasyonlarının proliferatif etkisinin; steroidal yapı benzerliğiyle ilgili olabileceği ayrıca 2,5 μ M konsantrasyonda migrasyonu artırıcı etkisinin östrojen benzeri yapısı sebebiyle ER α reseptörü ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Migrasyon deneyi sonuçlarına göre, MPP dihidroklorür ile α -chaconine 2,5 μ M ve α -solanine 50 μ M'ın p-ER α / ER α (Şekil 4.21) ve rölatif ER α mRNA seviyesi sonuçlarına (Şekil 4.24) bakıldığı zaman sonuçların birbirini destekler nitelikte olduğunu ve bu konsantrasyonlarda bu glikoalkaloitlerin benzer etkiye sahip olabileceği sonucuna varıldı.

Çalışmamızdaki steroidal glikoalkaloitlerin benzer etkileri farklı konsantrasyonlarda göstermesi ve farklı etkilere sahip olması aglikonlarının aynı olmasına rağmen glikon grubundaki farklılıklara bağlı olabilir. Ayrıca kimyasal türevlerinin de sentezlenerek daha etkin moleküllerin keşfedilmesi mümkündür.

Çalışmamız α -chaconine ve α -solanine'in RL95-2 insan endometriyum kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiğini, hücrel sinyal yollarını etkilediğini, Akt ve ER α 'nın fosforilasyonunu azalttığını göstermektedir. α -Chaconine ve α -solanine'in RL95-2 insan endometriyum kanser hücrelerindeki etki mekanizmasının aydınlatılması tez çalışmasının başarısı adına bir ölçüdür. Ancak, olası etki mekanizmalarından birkaçının mevcut etkiden aslında sorumlu olmadıklarının aydınlatılmasıyla da çalışmanın ileri bir noktaya taşındığı kabul edilebilir ve ileri araştırmalar için de bir başlangıç çalışma rolü üstlenmektedir. Bu etkilerin meydana gelmesinde hangi mekanizmalar ile ilişkisinin olduğunun tam olarak aydınlatılabilmesi için başka bilimsel çalışmalara da gereksinim olduğu açıktır. Ayrıca bu konudaki araştırmaların kapsamı genişletilmeli; *in vivo*, *in vitro* ve klinik çalışmalarla desteklenmelidir. Bu açıdan α -chaconine ve α -solanine'in endometriyum kanseri tedavisi araştırmalarında kullanılabilecek potansiyel adaylardan olabileceği düşünülmektedir. Buna ek olarak,

daha etkili bir şekilde terapötik bir ajana dönüştürülebilmesi için kimyasal olarak modifiye ve optimize edilebilir.

Sonuç olarak, RL95-2 insan endometriyum kanseri hücrelerinde α -chaconine ve α -solanine'in Akt sinyal yolağı ve ER α ekspresyon ve aktivitesini, dolayısıyla hücre proliferasyonunu azaltılabileceğı ilk kez tarafımızdan gösterilmiştir. Ayrıca, RL95-2 hücrelerinde, gerçek zamanlı hücre analizi ile hücre sayısına bağılı büyüme profil eğrilerinin oluşturulması, α -chaconine ve α -solanine sitotoksitesinin SRB deneyi ile tespiti; Akt ve ER α ekspresyonuna etkilerinin western blot ve qPCR ile ve migrasyona etkilerinin gösterilmesi de bu tez çalışmasıyla bir ilk teşkil etmektedir.

Bundan sonraki çalışmalarda, RL95-2 hücrelerinde α -chaconine ve α -solanine'in ER β ve progesteron reseptörlerine etkisi araştırmaya açıktır. Bu amaçla ER β ve progesteron reseptörlerinin spesifik antagonistleri kullanılabilir. Öte yandan bu glikoalkaloitlere pre ve kombine östradiol uygulamasının Akt ve ER ekspresyonlarındaki değişime yol açıp açmadığı ve diğer endometriyum kanser hücre hatları olan Ishikawa ve HEC-1A'da nasıl etkilere sahip olduğu araştırılabilir. PI3K/Akt'nin endometriyum kanserinde majör sinyal yolaklarından biri olduğu düşünöldüğünde bu yolak ile ilişkili diğer sinyal proteinlerinin araştırılması mümkündür. Ayrıca bu glikoalkaloitlerin, hücre migrasyonu üzerine etkilerinin steroidal yapı benzerliğı ile ilişkili olup olmadığı araştırmaya açıktır.

6. KAYNAKLAR

1. Sawai S, Ohyama K, Yasumoto S, Seki H, Sakuma T, Yamamoto T, et al. Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. *Plant cell* 2014; 26(9): 3763-74.
2. Jiang QW, Chen MW, Cheng KJ, Yu PZ, Wei X, Shi Z. Therapeutic Potential of Steroidal Alkaloids in Cancer and Other Diseases. *Med Res Rev* 2016; 36(1): 119-43.
3. Milner SE, Brunton NP, Jones PW, O'Brien NM, Collins SG, Maguire AR. Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *Solanum* species. *J Agric Food Chem* 2011; 59(8): 3454-84.
4. Yang SA, Paek SH, Kozukue N, Lee KR, Kim JA. Alpha-chaconine, a potato glycoalkaloid, induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells through caspase-3 activation and inhibition of ERK 1/2 phosphorylation. *Food Chem Toxicol* 2006; 44(6): 839-46.
5. Friedman M, Lee KR, Kim HJ, Lee IS, Kozukue N. Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potatoes against human cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells. *J Agric Food Chem* 2005; 53(15): 6162-9.
6. Lee KR, Kozukue N, Han JS, Park JH, Chang EY, Baek EJ, et al. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG₂) cancer cells. *J Agric Food Chem* 2004; 52(10): 2832-9.
7. Shih YW, Chen PS, Wu CH, Jeng YF, Wang CJ. Alpha-chaconine-reduced metastasis involves a PI3K/Akt signaling pathway with downregulation of NF-kappaB in human lung adenocarcinoma A549 cells. *J Agric Food Chem* 2007; 55(26): 11035-43.
8. Mohsenikia M, Alizadeh AM, Khodayari S, Khodayari H, Karimi A, Zamani M, et al. The protective and therapeutic effects of alpha-solanine on mice breast cancer. *Eur J Pharmacol* 2013; 718(1): 1-9.

9. Langkilde S, Mandimika T, Schroder M, Meyer O, Slob W, Peijnenburg A, et al. A 28-day repeat dose toxicity study of steroidal glycoalkaloids, alpha-solanine and alpha-chaconine in the Syrian Golden hamster. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2009; 47(6): 1099-108.
10. Lu MK, Chen PH, Shih YW, Chang YT, Huang ET, Liu CR, et al. alpha-Chaconine inhibits angiogenesis in vitro by reducing matrix metalloproteinase-2. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(4): 622-30.
11. Lu MK, Chen P-H, Shih YW, Chang YT, Huang ET, Liu CR, et al. . Alpha-Chaconine Inhibits Angiogenesis *in vitro* by Reducing Matrix Metalloproteinase-2. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(4): 622-30.
12. Lu MK, Shih YW, Chang Chien TT, Fang LH, Huang HC, Chen P-S. Alpha-Solanine Inhibits Human Melanoma Cell Migration and Invasion by Reducing Matrix Metalloproteinase-2/9 Activities. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(10): 1685-91.
13. Lv C, Kong H, Dong G, Liu L, Tong K, Sun H, et al. Antitumor efficacy of α -solanine against pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*. *PloS one*. 2014; 9(2): e87868.
14. Shen KH, Liao ACH, Hung JH, Lee WJ, Hu KC, Lin PT, et al. α -Solanine inhibits invasion of human prostate cancer cell by suppressing epithelial-mesenchymal transition and MMPs expression. *Molecules* 2014; 19(8): 11896-914.
15. Lavie Y, Harel-Orbital T, Gaffield W, Liscovitch M. Inhibitory effect of steroidal alkaloids on drug transport and multidrug resistance in human cancer cells. *Anticancer Res* 2001; 21(2A): 1189-94.
16. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer control* 2009; 16(1): 8.
17. Merck research laboratories. The merck manual of diagnosis and therapy (18th ed.) Whitehouse Station, NJ: 2006: 1143-50.
18. Karabulut S, Saip PM. Endometrium Kanserinde Kemoterapi. *Türkiye Klinikleri Journal of Gynecology and Obstetrics Special Topics*. 2014; 7(3): 100-6.
19. Reddivari L, Vanamala J, Safe SH, Miller JC, Jr. The bioactive compounds alpha-chaconine and gallic acid in potato extracts decrease survival and induce apoptosis in LNCaP and PC3 prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 2010; 62(5): 601-10.

20. JI Y-b, GAO S-y. Antihepatocarcinoma effect of solanine and its mechanisms. *Chin J Nat Med* 2012; 4(2): 126-35.
21. Kenny OM, McCarthy CM, Brunton NP, Hossain MB, Rai DK, Collins SG, et al. Anti-inflammatory properties of potato glycoalkaloids in stimulated Jurkat and Raw 264.7 mouse macrophages. *Life Sci* 2013; 92(13): 775-82.
22. Nakamura T, Komori C, Lee Y, Hashimoto F, Yahara S, Nohara T, et al. Cytotoxic activities of Solanum steroidal glycosides. *Biol Pharm Bull* 1996; 19(4): 564-6.
23. Kenny OM, Brunton NP, Rai DK, Collins SG, Jones PW, Maguire AR, et al. Cytotoxic and apoptotic potential of potato glycoalkaloids in a number of cancer cell lines. *J Agr Sci* 2013; 2(4): 184-92.
24. WEB_1. (2017). Cancer 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Şubat 2017).
25. Markowska A, Pawałowska M, Lubin J, Markowska J. Signalling pathways in endometrial cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2014; 18(3): 143-8.
26. Gibson DA, Saunders PT. Estrogen dependent signaling in reproductive tissues—a role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 348(2): 361-72.
27. A Companion to the Seventh Editions of the AJCC Cancer Staging Manual and Handbook Second Edition. ERGÜNEY S, editor. Nobel Tıp Kitabevleri. 477-93 p.
28. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983; 15(1): 10-7.
29. Liu F-S. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007; 46(1): 26-32.
30. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. *Lancet*. 2016; 387(10023): 1094-108.
31. WEB_2. (2017). Present current national estimates of cancer incidence, mortality, and prevalence. <http://gco.iarc.fr/today/home> (Mart 2017).
32. WEB_3. (2017) World cancer report 2014. http://www.who.int/cancer/publications/WRC_2014/en/ (11.03.2017).
33. Burke WM, Orr J, Leita M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, et al. Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part II. *Gynecol Oncol* 2014; 134(2): 393-402.

34. Colombo N, Preti E, Landoni F, Carinelli S, Colombo A, Marini C, et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24(suppl 6): vi33-vi8.
35. Soini T, Hurskainen R, Grénman S, Mäenpää J, Paavonen J, Pukkala E. Cancer risk in women using the levonorgestrel-releasing intrauterine system in Finland. *Obstet Gynecol* 2014; 124(2, Part 1): 292-9.
36. Murali R, Soslow RA, Weigelt B. Classification of endometrial carcinoma: More than two types. *Lancet Oncol* 2014; 15(7): e268-78.
37. WEB_4. (2017) RL95-2 hücre hattı. www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1671.aspx#characteristics (19.04.2017).
38. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(4): 271-89.
39. Kurose K, Zhou X-P, Araki T, Cannistra SA, Maher ER, Eng C. Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 2001; 158(6): 2097-106.
40. Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 2004; 35(6): 649-62.
41. Terakawa N, Kanamori Y, Yoshida S. Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10(2): 203-8.
42. Pavlidou A, Vlahos NF. Molecular alterations of PI3K/Akt/mTOR pathway: a therapeutic target in endometrial cancer, *The Scientific World Journal* (2014), <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/709736/> (17.03.2017).
43. Brown Jones M, Neuper C, Clayton A, Mariani A, Konecny G, Thomas MB, et al. Rationale for folate receptor alpha targeted therapy in “high risk” endometrial carcinomas. *Int J Cancer* 2008; 123(7): 1699-703.
44. Ganong WF. Review of medical physiology. (20. ed.), Mc-Graw Hill, 2002: 425-30.
45. Richard D. Howland MJM. Lipincott's Illustrated Reviews: Farmakoloji. Editör: Richard A. Harvey PCC, Nobel tıp kitabevleri, 2009: 295-9.
46. Dedes KJ, Wetterskog D, Ashworth A, Kaye SB, Reis-Filho JS. Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(5): 261-71.

47. Pamela C, Champe RAH, Denise RF. Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry. (3. ed.) Editör: Richard AH, 2007.
48. Marino M, Acconcia F, Ascenzi P. Estrogen receptor signalling: Bases for drug actions. *Rev Endocr Metab Disord* 2005; 5(3): 305-14.
49. Harrington WR, Sheng S, Barnett DH, Petz LN, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Activities of estrogen receptor alpha-and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 206(1): 13-22.
50. Kreizman-Shefer H, Pricop J, Goldman S, Elmalah I, Shalev E. Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer. *Diagn Pathol* 2014; 9(1): 77.
51. Guo RX, Wei LH, Tu Z, Sun P-M, Wang JL, Zhao D, et al. 17 β -Estradiol activates PI3K/Akt signaling pathway by estrogen receptor (ER)-dependent and ER-independent mechanisms in endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 99(1): 9-18.
52. Harris HA. Estrogen receptor- β : Recent lessons from *in vivo* studies. *Mol Endocrinol* 2007; 21(1): 1-13.
53. Morissette M, Al Sweidi S, Callier S, Di Paolo T. Estrogen and SERM neuroprotection in animal models of Parkinson's disease. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 290(1): 60-9.
54. Deschamps AM, Murphy E, Sun J. Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med* 2010; 20(3): 73-8.
55. Carlson MJ, Thiel KW, Leslie KK. Past, present, and future of hormonal therapy in recurrent endometrial cancer. *Int J Womens Health* 2014; 6: 429-35.
56. Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: A dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 51(1): 55-67.
57. Zhang Z, Zhou D, Lai Y, Liu Y, Tao X, Wang Q, et al. Estrogen induces endometrial cancer cell proliferation and invasion by regulating the fat mass and obesity-associated gene via PI3K/AKT and MAPK signaling pathways. *Cancer Lett* 2012; 319(1): 89-97.
58. WEB_6. (Aralık 2016) MPP dihidroklorür. <https://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=90908#.WMoyqFWLTX4> (2017).

59. Sun J, Huang YR, Harrington WR, Sheng S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Antagonists selective for estrogen receptor α . *Endocrinology* 2002; 143(3): 941-7.
60. WEB_7. (2017) API-I. <https://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=250779#.V-DoLk2LTX4> (2017).
61. Kim D, Sun M, He L, Zhou QH, Chen J, Sun XM, et al. A small molecule inhibits Akt through direct binding to Akt and preventing Akt membrane translocation. *J Biol Chem Discipline* 2010; 285(11): 8383-94.
62. Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, Vignali M, Vigano P, Di Blasio A. PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17 β -estradiol and growth factors. *Mol Hum Reprod* 2007; 13(5): 317-22.
63. Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18(21): 5856-64.
64. Hara S, Oya M, Mizuno R, Horiguchi A, Marumo K, Murai M. Akt activation in renal cell carcinoma: Contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor. *Ann Oncol* 2005; 16(6): 928-33.
65. WEB_8. (2017) *Solanum tuberosum* L. <https://www.ars.usda.gov/news-events/news/research-news/2009/golden-success-for-yukon-gem-yellow-fleshed-potato/> (2017).
66. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: Role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16(sup2): 17-27.
67. Cárdenas PD, Sonawane PD, Heinig U, Bocobza SE, Burdman S, Aharoni A. The bitter side of the nightshades: Genomics drives discovery in Solanaceae steroidal alkaloid metabolism. *Phytochemistry* 2015; 113: 24-32.
68. Heftmann E. Biogenesis of steroids in Solanaceae. *Phytochemistry* 1983; 22(9): 1843-60.
69. Keukens EAJ, de Vrije T, van den Boom C, de Waard P, Plasman HH, Thiel F, et al. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1240(2): 216-28.

70. McGehee DS, Krasowski MD, Fung DL, Wilson B, Gronert GA, Moss J. Cholinesterase inhibition by potato glycoalkaloids slows mivacurium metabolism. *Anesthesia* 2000; 93(2): 510-9.
71. Chen Y, Li S, Sun F, Han H, Zhang X, Fan Y, et al. *In vivo* antimalarial activities of glycoalkaloids isolated from Solanaceae plants. *Pharm Biol* 2010; 48(9): 1018-24.
72. Gubarev MI, Enioutina EY, Taylor JL, Visic DM, Daynes RA. Plant-derived glycoalkaloids protect mice against lethal infection with *Salmonella typhimurium*. *Phytother Res* 1998; 12(2): 79-88.
73. Thorne H, Clarke G, Skuce R. The inactivation of herpes simplex virus by some Solanaceae glycoalkaloids. *Antiviral Res* 1985; 5(6): 335-43.
74. Bell DP, Gibson J, McCarroll AM, McClean GA. Embryotoxicity of solanine and aspirin in mice. *Reprod Fertil* 1976; 46(1): 257-9.
75. Alexander R, Forbes G, Hawkins E. A fatal case of solanine poisoning. *BMJ* 1948; 2(4575): 518.
76. Lachman J, Hamouz K, Orsák M, Pivec V. Potato glycoalkaloids and their significance in plant protection and human nutrition-review. *Rostlinna Vyroba-UZPI* 2001.
77. Giesbrecht E, Lee M, Thompson M, Verjee Z, Dunn E. Investigating a probable case of solanine poisoning. *Therapeutic Drug Monitoring* 2003; 25(4): 492.
78. Korpan YI, Nazarenko EA, Skryshevskaya IV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Anna V. Potato glycoalkaloids: true safety or false sense of security? *Trends Biotechnol* 2004; 22(3): 147-51.
79. Smith DB, Roddick JG, Jones JL. Potato glycoalkaloids: some unanswered questions. *Trends in Food Science & Technology*. 1996; 7(4): 126-31.
80. Morris S, Lee T. The toxicity and teratogenicity of Solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (*Solanum tuberosum*): A review. *Food Technology in Australia* 1984.
81. Hellenäs K-E, Nyman A, Slanina P, Löf L, Gabrielsson J. Determination of potato glycoalkaloids and their aglycone in blood serum by high-performance liquid chromatography: Application to pharmacokinetic studies in humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1992; 573(1): 69-78.
82. WEB_9. (2017). Glycoalkaloids. 2017. <http://www.foodsafetywatch.org/factsheets/glycoalkaloids/> (2016).

83. Mensinga TT, Sips AJ, Rompelberg CJ, van Twillert K, Meulenbelt J, van den Top HJ, et al. Potato glycoalkaloids and adverse effects in humans: an ascending dose study. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005; 41(1): 66-72.
84. WEB_10. (2016) Mini-PROTEAN^R Tetra Cell Instruction Manual <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf> (20.05.2017).
85. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*. 2001: A3. B. 1-A3. B.
86. WEB_11. (2016) RTCA SP Instrument Operator's Manual <http://sydney.edu.au/medicine/bosch/facilities/molecular-biology/live-cell/RTCA%20SP%20Instrument%20Operator%20Manual%20v4.pdf> (20.05.2017)
87. WEB_12. (2016) RTCA Software Manual Software Version 1.2. <http://sydney.edu.au/medicine/bosch/facilities/molecular-biology/live-cell/RTCA%20SP%20Instrument%20Operator%20Manual%20v4.pdf> (20.05.2017)
88. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82(13): 1107-12.
89. Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1991; 27(7): 897-900.
90. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 2006; 1(3): 1112-6.
91. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Nat Methods* 2007; 4(4): 377-87.
92. WEB_13. (2016). Sülforodamin B'nin 2D yapısı. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65191#section=Top> (20.05.2016).
93. WEB_13. (2016). BCA protein analiz kiti. (20.05.2016).
94. Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. Colorimetric protein assay techniques. *Appl Biochem Biotechnol* 1999; 29(2): 99-108.
95. Dennis-Sykes CA, Miller WJ, McAleer WJ. A quantitative Western Blot method for protein measurement. *Biologicals* 1985; 13(4): 309IN1311-310IN2314.
96. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*. 2006; 38(4): 283-93.

97. Mahmood T, Yang PC. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci 2012; 4(9): 429.
- 98.WEB_14. (2016).Western blot aşamaları. <https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1381825/000119312514175630/d685826ds1.htm> (20.05.2017).
- 99.WEB_15. (2016). Protein Electrophoresis Methods. <http://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods>. (20.05.2017).
- 100.WEB_16. (2016).Western Blot Gel Electrophoresis. http://cbc.arizona.edu/classes/bioc460/spring/460web/lectures/LEC8-9_ProteinPurChar/StryFig4_7PolyacrylGelElect.gif (20.05.2017).
101. Brown TA. Gene Cloning & DNA Analysis: An Introduction. (5 ed.) Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, 2009: 181-93.
102. Lüleyp Ü. Moleküler Genetiğin Esasları. Nobel Kitabevi, 2008: 190-3.
103. Gibson U, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res 1996; 6(10): 995-1001.
104. Bustin S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. J Mol Endocrinol 2002; 29(1): 23-39.
105. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of molecular endocrinology. 2000;25(2):169-93.
- 106.WEB_18. (2016) Quantification strategies in real-time PCR <http://gene-quantification.eu/chapter-3-pfaffl.pdf> (20.05.2017).
107. Bartlett JM. Approaches to the analysis of gene expression using mRNA. Mol Biotechnol 2002; 21(2): 149-60.
108. Chomczynski P, Wilfinger W, Kennedy A, Rymaszewski M, Mackey K. RNazol [reg] RT: A new single-step method for isolation of RNA. Nat Methods 2010; 7(12).
- 109.WEB_19. (2017). ACTB actin beta [Homo sapiens (human)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/60> (20.05.2017).
- 110.WEB_20. (2017). ESR1 estrogen receptor 1 [Homo sapiens (human)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2099> (20.05.2017).
- 111.WEB_21. (2017). AKT1 AKT serine/threonine kinase 1 [Homo sapiens (human)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/207> (20.05.2017).

112. WEB_22. (2017). Cell Migration Consortium. <http://www.cellmigration.org/science/> (20.05.2017).
113. WEB_23. (2017). CytoSelect™ 24-Well Cell Migration Assay web site (8 µm, Colorimetric Format) Trial Size. (20.05.2017).
114. Dossus L, Lukanova A, Rinaldi S, Allen N, Cust AE, Becker S, et al. Hormonal, metabolic, and inflammatory profiles and endometrial cancer risk within the EPIC cohort—a factor analysis. *Am J Epidemiol* 2013; 177(8): 787-99.
115. WEB_24. (2017). E-plate Surface web site. https://aceabio.com/wp-content/uploads/Consumables_Spec_Sheet.pdf. (20.05.2017)
116. Roddick JG. The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. *Phytochemistry* 1989; 28(10): 2631-4.
117. Lee KG, Lee SG, Lee HH, Lee HJ, Shin JS, Kim NJ, et al. α -Chaconine isolated from a *Solanum tuberosum* L. cv Jayoung suppresses lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory mediators via AP-1 inactivation in RAW 264.7 macrophages and protects mice from endotoxin shock. *Chem Biol Interact* 2015; 235: 85-94.
118. Fewell AM, Roddick JG. Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine. *Phytochemistry* 1993; 33(2): 323-8.
119. Friedman M. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *J Chromatogr A* 2004; 1054(1-2): 143-55.
120. Zhang F, Yang R, Zhang G, Cheng R, Bai Y, Zhao H, et al. Anticancer function of α -solanine in lung adenocarcinoma cells by inducing microRNA-138 expression. *Tumour Biol* 2016; 37(5): 6437-46.
121. Gao SY, Wang QJ, Ji YB. Effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in HepG₂ cells and $[Ca^{2+}]_i$ in the cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12(21): 3359.
122. Ülker V, Dursun P, Ayhan A. Endometrium Kanserinin Dünü, Bugünü, Yarını. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2014; 7(3): 1-12.
123. Arvas MM, Tokgözoğlu N. Erken Evre Endometrium Kanserinde Yönetim. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2014; 7(3): 59-66.
124. Ortaç UF, Varlı B, Taşkın S. Endometrium Kanseri: İleri Evre ve Nüks Olgularda Yönetim. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2014; 7(3): 84-90.

125. Moxley KM, McMeekin DS. Endometrial carcinoma: A review of chemotherapy, drug resistance, and the search for new agents. *Oncologist* 2010; 15(10): 1026-33.
126. Zhang J, Shi G. Inhibitory effect of solanine on prostate cancer cell line PC-3 *in vitro*. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2011; 17(3): 284-7.
127. Friedman M, Henika PR, Mackey BE. Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice. *Food Chem Toxicol* 2003; 41(1): 61-71.
128. Ji Y, Gao S, Ji C, Zou X. Induction of apoptosis in HepG₂ cells by solanine and Bcl-2 protein. *J Ethnopharmacol* 2008; 115(2): 194-202.
129. Roddick JG. Complex formation between solanaceous steroidal glycoalkaloids and free sterols *in vitro*. *Phytochemistry* 1979; 18(9): 1467-70.
130. Phillips B, Hughes J, Phillips J, Walters D, Anderson D, Tahourdin C. A study of the toxic hazard that might be associated with the consumption of green potato tops. *Food Chem Toxicol* 1996; 34(5): 439-48.
131. Roddick JG, Rijnenberg AL, Osman SF. Synergistic interaction between potato glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in relation to destabilization of cell membranes: Ecological implications. *J Chem Ecol* 1988; 14(3): 889-902.
132. Roddick JG, Rijnenberg AL. Synergistic interaction between the potato glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine in relation to lysis of phospholipid/sterol liposomes. *Phytochemistry* 1987; 26(5): 1325-8.
133. Henning RJ, Sanberg P, Jimenez E. Human cord blood stem cell paracrine factors activate the survival protein kinase Akt and inhibit death protein kinases JNK and p38 in injured cardiomyocytes. *Cytotherapy* 2014; 16(8): 1158-68.
134. Lilja JF, Wu D, Reynolds RK, Lin J. Growth suppression activity of the PTEN tumor suppressor gene in human endometrial cancer cells. *Anticancer Res* 2000; 21(3B): 1969-74.
135. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. *Trends Mol Med* 2013; 19(3): 197-209.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Ayşe Kübra Karaboğa Arslan

Uyruğu : T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri : 12 Eylül 1988, Kayseri

Medeni Durumu : Evli

Telefon Numarası : 0352 207 66 66/28178

E-posta : aysekubrakaraboga@gmail.com

Yazışma Adresi : Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji

A.B.D. 38039 Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kayseri	2012
Lise	Nuh Mehmet Küçükçalık Anadolu Lisesi, Kayseri	2006

MESLEKİ DENEYİM

Yıl	Kurum	Görev
2013-Halen	Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİLLER

İngilizce, İyi

YAYINLAR

SERTİFİKALAR

İş sağlığı ve Güvenliği Eğitimi, ERSEM, 2014

Araştırmacılar İçin Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Programı, Erciyes Üniversitesi, Dekan, 2013

1st Predictive And Personalized Med./Healthcare In Daily Modern Medicine and Pharmacy, Anadolu University, Faculty of Pharmacy, 2012

Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Öztürk E., Karaboğa Arslan A.K., Dokumacı A.H., Yerer M.B., "Real-time analysis of impedance alterations by the effects of vanadium pentoxide on several carcinoma cell lines", Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017 (baskıda).

Karaboğa Arslan A.K., Öztürk E., Yerer M.B., Koşar M., "Zeytin yaprağındaki oleuropein ve farmakolojik etkileri", Journal of Health Sciences, 2017 (baskıda).

Karaboğa Arslan A.K., Öztürk E., Aycan M.B., "Monitoring the Effectiveness and Time Dependency of Vanadium Pentoxide Cytotoxicity on A549 and Beas-2bcell Lines", Journal of Cancer Biology & Research , vol.5, no.1097, pp.1-6, 2017.

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

Öztürk E., Dokumacı A.H., Arslan A.K., Aycan M.B., "Evaluation of possible cytotoxic effects of Vanadium pentoxide on colon carcinoma cellline with a real time analyse", 7th European Congress of Pharmacology, İstanbul, Türkiye, 26-30 Haziran 2016, pp.461-461.

Arslan A.K., Aycan M.B., "Real-time xCELLigence cell analysis of RL95-2 human endometrial adenocarcinoma cells and the cytotoxicity of alpha-chaconine and alpha-

solanine compounds on RL95-2 cells", 7th European Congress of Pharmacology (EPHAR2016), İstanbul, Türkiye, 26-30 Haziran 2016, pp.567-567.

Dokumaci A.H., Arslan A.K., Öztürk E., Aycan M.B., " Evaluation of vanadium pentoxide cytotoxicity on A549 cell line with a novel realtime method: Xcelligence (RTCA)", 7th European Congress of Pharmacology (EPHAR2016), İstanbul, Türkiye, 26-30 Haziran 2016, pp.563-563

Arslan A.K., Öztürk E., Dokumaci A.H., Aycan M.B., "Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of vanadium pentoxide on normal human fibroblast and MCF-7 cells", 7th European Congress of Pharmacology (EPHAR2016), İstanbul, Türkiye, 26-30 Haziran 2016, pp.462-462

Dokumaci A.H., Arslan A.K., Aycan M.B., "Kersetin ve kurkumin bileşiklerinin SHSY-5Y hücrelerine etkilerinin gerçek zamanlı profillenmesi", 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Konya, Türkiye, 30 Nisan - 3 Mayıs 2015, cilt.1, no.9, ss.60-61

Karaboğa A.K. , Dokumaci A.H., Demirpolat E., Yerer Aycan M.B., "Bazı flavonoidlerin A549 hücrelerinde canlılığa ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna etkisinin değerlendirilmesi", 21. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Nevşehir, Türkiye, 28 Mayıs - 1 Haziran 2014, ss.P-51-P-51

Karaboğa A.K., Dokumaci A.H., Yerer Aycan M.B., "IL1 β ile mPGES-1 enzimi indüklenmiş küçük hücreli olmayan akciğer kanser epitel (A549) hücrelerinde kemferol'ün canlılığa etkisi", Ulusal Kanser Haftası Sempozyumu, Ankara, Türkiye, 2-4 Nisan 2014, ss.0159-0159.

Demirpolat E., Karaboğa A.K., Yerer Aycan M.B., Mazicioğlu M.M., "Hekimlerimiz tarafından 1962 yılında kayseri'de reçete edilen majistral formüllerden örnekler", XI. Türk Eczacılık Tarihi Toplantısı, Kayseri, Türkiye, 25-28 Mayıs 2014, ss.90-90.

Demirpolat E., Karaboğa A.K. , Yerer Aycan M.B., "IL1 β ile mPGES-1 enzimi indüklenmiş A549 hücrelerinde 6-gingerol ve 6- shogaol'un canlılığa etkisi", 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 4-7 Kasım 2013, ss.387- 387.

Karaboğa A.K., Demirpolat E., Yerer Aycan M.B., "Kersetin ve apigenin'in A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi", 22. Ulusal farmakoloji kongresi, Antalya, Türkiye, 4-7 Kasım 2013, ss.386-386.

Yılmaz S.A.K., Karaboğa A.K., Koşar M., "Quality controls of flaxseed oils in Turkey market", 10th International Symposium On Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Türkiye, 26-29 Haziran 2012, pp.368-368.

Karaboğa A.K., Yılmaz S.A.K., Koşar M., "Türkiye'de Kahranmanmaraş'ta halk tarafından kullanılan bitkiler", XX. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı (BİHAT-2012), Antalya, Türkiye, 10-13 Ekim 2012, ss.92-92.

Desteklenen Projeler

"a-Chaconine ve a-Solanine'in Antikanserojen Etkilerinin RL95-2 Hücrelerinde Araştırılması", BAP Doktora, TDK-2014-5446, Araştırmacı, 2017

"Yeni N-Heteroaril substituted tiyazol N-Aril Üre Türevlerinin Sentezi ve p38 MAPK İnhibitör Aktivitelerinin İncelenmesi ve Teorik Yapı Aktivite Çalışmaları", BAP Arastırma Projesi, TCD-2015-5602, Araştırmacı, Devam Ediyor

"1st International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy", BAP Diğer, TSS-2015-5717, Araştırmacı, 2016

Bilimsel Dernek, Organizasyon ve Kuruluşlardaki Üyelikler/Görevler

Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunlar Derneği, Yönetim Kurulu Üyesi, Sekreter, 06.04.2017 - Devam Ediyor

Katıldığı Bilimsel Kongre/Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar

XXVI. Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, Ankara, Mart 2017

7th European Congress of Pharmacology (EPHAR), İstanbul, Haziran 2016

XXIV. Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Ekileşme Semineri, Kayseri, Mart 2015

XI. Türk Eczacılık Tarihi Toplantısı (TETT), Kayseri, Mayıs 2014

21. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT), Ürgüp, Mayıs 2014

Ulusal Kanser Haftası Sempozyumu, Ankara, Nisan 2014

10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Haziran 2012

International Certificate Program on Predictive and Personalized Medicine/Healthcare in Daily Modern Medicine and Pharmacy (P4 MEDICINE), Eskişehir, Eylül 2012

XX. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT), Antalya, Ekim 2012

Etkinlik Organizasyonu

21. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT), Düzenleme Kurulu Üyesi, Nevşehir, Türkiye, Mayıs 2014

XI. Türk Eczacılık Tarihi Toplantısı (TETT), Düzenleme Kurulu Üyesi, Kayseri, Türkiye, Mayıs 2014

1st International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy (NPCPT), Düzenleme Kurulu Üyesi, Türkiye, Ağustos 2015

2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy (NPCPT), Düzenleme Kurulu Üyesi, Türkiye, Kasım 2017

Ödüller ve Burslar

2211-Yurt İçi Doktora Bursu, TÜBİTAK, Ekim 2012