



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE SOYUNDA POTASYUM
KANAL BLOKERİ VE VİSKOTOKSİN A3
KULLANILARAK PAKLİTAKSEL'İN ETKİNLİĞİNİN
ARTTIRILMASI**

ESRA MÜNİRE AYDOĞMUŞ
DOKTORA TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. G. AYŞE İNHAN GARİP

2019 - İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : BİYOFİZİK
Tez Sahibi : Esra Münire Aydoğmuş
Tez Başlığı : **MEME KANSERİ HÜCRE SOYUNDA POTASYUM KANAL BLOKERİ VE VİSKOTOKSİN A3 KULLANILARAK PAKLİTAKSEL'İN ETKİNLİĞİNİN ARTTIRILMASI**
Sınav Yeri : Tıp Fakültesi , Biyofizik Anabilim Dalı Oda No.
Sınav Tarihi : 19/ 07/ 2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Doç. Dr. Ayşe İnhan Garip

Kurumu

Marmara Üniv. Tıp Fak.
Biyofizik ABD

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Doç.Dr.Şule Öncül

Dr.Öğr.Üyesi Filiz Kısaayak Çollak

Prof.Dr. Oya Orun

Doç. Dr. Pınar Mega Tiber

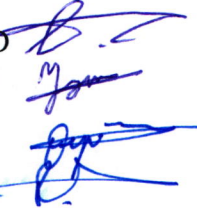
Medeniyet Üniv. Tıp Fak. Biyofizik ABD

Medeniyet Üniv. Müh.ve Doğa Bilimleri

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Marmara Üniv. Tıp Fak. Biyofizik ABD

Marmara Üniv. Tıp Fak. Biyofizik ABD



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun~~31~~...~~temmuz~~...2019 tarih ve 147 sayılı kararı ile onaylanmıştır



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Y

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Esra Münire Aydoğmuş

İTHAF

Sevgili anneme...

TEŞEKKÜR

Doktora süreci boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, yol arkadaşlığı ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Doç. Dr. G.Ayşe İnhan Garip'e,

Tez çalışmam boyunca tecrübeleri ve arkadaşlığı ile yanımda olan Medeniyet Üniversitesi Biyofizik A.B.D. Öğr. Üyesi Doç. Dr. Şule Öncül'e,

Doktora tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen sayın bölüm başkanı Prof. Dr. Hülya Cabadak'a,

Bu süreçte her ihtiyaç duyduğumda yardımları ve destekleri ile yanımda olan Prof. Dr. Oya Orun, Doç. Dr. Pınar Mega Tiber, Öğr. Gör. Dr. Cevdet Nacar, Öğr. Gör. Dr. Burak Aksu ve Arş. Gör. Dr. Banu Aydın'a,

Hem dostlukları hemde yardımlarıyla yanımda olan değerli arkadaşlarım Öğr. Gör. Sibel Deniz'e, Arş. Gör. Sevgi Koçyiğit'e, Arş. Gör. Olca Kılınç'a ve YL öğr. Pınar İyiöl'a,

Tez çalışmalarımnda imkanlarından yararlandığım GEMHAM'a ve yardımlarından dolayı sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Ayşe Mine Yılmaz'a,

Ve bütün öğrenim hayatım boyunca ideallerimin peşinden koşmama en büyük desteği veren ve her zaman yanımda olduğunu bildiğim annem Sevgi Üren'e ve kardeşlerim Eda Cüce, Esin Cüce ve Ela Cüce'ye,

Sabrı, sevgisi ve desteği ile hayatımdaki varlığı için minnettar olduğum eşim Emre Aydoğmuş'a teşekkür ederim.

TÜBİTAK 2211-C Yurtiçi Doktora Burs Programı'na doktora sürecim boyunca verilen burstan dolayı teşekkürü borç bilirim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-080715-0327 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
RESİM LİSTESİ.....	viii
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Kanser.....	7
4.1.1. Kanserin tanı ve tedavisi	11
4.1.2. Meme kanseri.....	12
4.1.2.1. Meme kanseri çeşitleri	14
4.1.2.2. Meme kanserinin nedenleri.....	15
4.1.2.3. Meme kanseri belirtileri, tanı ve tedavi yöntemleri	15
4.2. Paklitaksel.....	16
4.2.1. Etki mekanizması ve direnç.....	18
4.3. Hücre Döngüsü ve Membran Potansiyeli.....	20
4.4.4. Aminopiridin yapısı ve etki mekanizması	24
4.5. Tamamlayıcı ve Alternatif Tıpta Ökse Otu.....	27
4.5.1. Ökse otu preparatlarının içeriği	29
4.5.1.1. Viskotoksin.....	29
5. GEREÇ VE YÖNTEM	31
5.1. Gereçler	31
5.1.1. Kullanılan malzemeler ve cihazlar	31
5.1.2. Hücre hatları	31
5.2. Yöntemler	32
5.2.1. Hücre kültürü.....	32

5.2.2. İlaç çözeltilerinin hazırlanması.....	32
5.2.3. Sitotoksosite.....	33
5.2.4. Apoptoz ölçümleri	33
5.2.5. Hücre içi Potasyum Miktarının Belirlenmesi	34
5.2.6. Hücre içi kalsiyum değişiminin belirlenmesi	34
5.2.7. Membran potansiyeli	35
5.2.8. Hücre döngüsü analizleri	35
5.2.9. İstatistiksel analiz.....	36
6. BULGULAR	37
6.1. IC50 Belirlemeleri ve Sitotoksosite Sonuçları	37
6.2. Apoptoz Belirlemeleri	47
6.3. Hücre İçi K Değişiminin Belirlenmesi.....	49
6.4. Hücre İçi Ca ⁺² Belirlemeleri	51
6.5. Membran Potansiyeli Ölçümleri.....	53
6.6. Hücre Döngüsü Analizleri	56
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	58
8. KAYNAKÇA.....	66
9. EKLER.....	84
EK 1. Yayın.....	84
EK 2. Kongre Bildirileri.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	86

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

4-AP	4- Aminopiridin
AB	Alamar Mavisi (Alamar Blue)
Ca ⁺²	Kalsiyum
CAM	Tamamlayıcı Alternatif Tıp (Complementary Alternative Medicine)
Cdk2	Siklin Bağımlı Kinaz 2 (Cyclin Dependent Kinase 2)
Cl ⁻	Klor
CO ₂	Karbondioksit
DiBaC ₄ (3)	Bis-(1,3- dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle's
DMSO	Dimetilsülfoksit
EAG1	Eater-go-go K Kanalları
Edta	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ER	Östrojen Reseptörü
FBS	Fetal Sığır Serumı (Fetal Sovine Serum)
H3	Histon 3
HBSS	Hank's Dengelenmiş Tuz Solüsyonu (Hank's Balanced Salt Solution)
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2
IC50	Popülasyonun % 50'sinin Büyümesini İnhibe Eden Konsantrasyon
Değeri	
Isc A	Iscador A
K ⁺	Potasyum
KATP	ATP'ye Duyarlı K Kanalları
KCa	Kalsiyum ile aktive edilen K kanalları

MAPK	Mitojen Uyarılmış Protein Kinazlar
ML	Ökseotu Lektin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
Na ⁺	Sodyum
NK	Doğal Öldürücü Hücre (Natural killer cell)
NSCC	Seçici olmayan katyon kanalları (Non Selective Cation Channel)
PBFI-AM	Potasyum Bağlayıcı Benzofuran İsophthalate-AM
PBS	Fosfat içeren Tuzlu Tampon Çözelti (Phosphate Buffer saline)
PR	Progesteron Reseptörü
PTX	Paklitaksel
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
RPM	Dakika Başına Dönüş Sayısı (Revolutions Per Minute)
SAC	İğ Birleşme Kontrol Noktası (Spindle assembly checkpoint)
TNF α	Tümör Nekroz Faktör α
VA	Viscum Album
VGCC	Voltaj Kapılı Katyon Kanalı (Voltage gated cation channel)
VGIC	Voltaj Kapılı İyon Kanalı (Voltage gated ion channel)
VGPC	Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları
Vmem	Membran Potansiyeli
VtA3	Viskotoksin A3
VtB	Viskotoksin B

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. L929 4-AP Uygulaması	38
Şekil 2. MCF7 4-AP Uygulaması	39
Şekil 3. MDA-MB 231 4-AP Uygulaması	39
Şekil 4. L929 PTX Uygulaması	40
Şekil 5. MCF7 PTX Uygulaması	41
Şekil 6 MDA-MB 231 PTX Uygulaması	41
Şekil 7. L929 Isc A Uygulaması	42
Şekil 8. MCF7 Isc A Uygulaması	42
Şekil 9 MDA-MB 231 Isc A Uygulaması	43
Şekil 10. L929 24 saat 4-AP+PTX Uygulaması	44
Şekil 11. MCF7 24 saat 4-AP+PTX Uygulaması	44
Şekil 12. MDA-MB 231 24 saat 4-AP ve PTX Uygulaması	45
Şekil 13. L929 Isc A + 4-AP + PTX Uygulaması	45
Şekil 14. MCF7 Isc A + 4-AP + PTX Uygulaması	46
Şekil 15. MDA-MB 231 Isc A + 4-AP + PTX Uygulaması	46
Şekil 16. L929 Apoptoz Değerleri	47
Şekil 17. MCF7 Apoptoz Değerleri	48
Şekil 18. MDA MB 231 Apoptoz Değerleri	48
Şekil 19. L929 K ⁺ Değişimi	49
Şekil 20. MCF7 K ⁺ Değişimi	50
Şekil 21. MDA MB 231 K ⁺ Değişimi	50
Şekil 22. L929 Ca ⁺² Değişimi	52
Şekil 23. MCF7 Ca ⁺² Değişimi	52
Şekil 24. MDA MB 231 Ca ⁺² Değişimi	53
Şekil 25. L929 Membran Potansiyeli	54
Şekil 26. MCF7 Membran Potansiyeli	55
Şekil 27. MDA MB 231 Membran Potansiyeli	55

Şekil 28. L929 Hücre Döngüsü	56
Şekil 29. MCF7 Hücre Döngüsü	57
Şekil 30. MDA MB 231 Hücre Döngüsü	57

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Kanseri gelişimi için gerekli mekanizmalar.....	10
Resim 2. Kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türlerinin istatistiksel verileri..	13
Resim 3. Paklitaksel'in kimyasal yapısı.	17
Resim 4. Hücre döngüsü boyunca membran potansiyelindeki değişimler	22
Resim 5. 4-Aminopiridin'in kimyasal yapısı.	24
Resim 6. Ökse otu.	28

Meme kanseri hücre soyunda potasyum kanal blokeri ve viskotoksin A3 kullanılarak paklitaksel'in etkinliğinin arttırılması

Öğrencinin Adı: Esra Münire Aydoğmuş

Danışmanı: Doç. Dr. G. Ayşe İnhan Garip

Anabilim Dalı: Biyofizik

1. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan ancak periferik nötrojeni gibi yan etkileri olan Paklitaksel'in (PTX) etkinliğinin potasyum kanal blokeri 4-Aminopiridin (4-AP) ve membranda geçirgenlik sağlayan katyonik peptid viskotoksin A3 (Iscador A) kullanılarak arttırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, östrojen pozitif MCF-7 (ATCC HTB- 22), östrojen negatif (üçlü negatif) MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) ve kontrol olarak fibroblast L-929 (ATCC CCL-1) hücre hatları kullanılmıştır. PTX, 4-AP ve Iscador A'nın (Isc A) ayrı ve beraber kullanımının canlılık üzerinde meydana getirdiği değişimler tripan mavisi ile hücreler sayılarak, akış sitometresinde apoptoz belirlenerek gerçekleştirilmiştir. Hücre döngüsü değişimleri akış sitometresinde, hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) değişimleri Fura-2-AM floresan boya ile, hücre içi potasyum (K^{+}) değişimi floresan PBFI-AM ile ve membran potansiyeli değişimleri DiBAC₄(3) ile floresan spektrofotometrede belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler one way ANOVA yöntemi ile yapılmıştır ve p değeri 0.05'ten küçük olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: 4-AP'nin PTX ile beraber kullanımının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde PTX'in sitotoksitesini arttırdığı belirlenmiştir. Viskotoksin ile üçlü kullanım sağkalımı %5'e düşürmüştür. 4-AP ve PTX tek başlarına tüm hücre hatlarında hücre içi Ca^{+2} artışına neden olurken beraber kullanımlarında sadece MCF-7 ve L929 hücrelerinde artış gerçekleşmiş MDA-MB231 hücrelerinde bir değişim gözlenmemiştir. 4-AP tek başına hücre içi K miktarında artışa neden olmuştur. Paklitaksel ise sadece MDA-MB 231 hücrelerinde potasyum artışı meydana getirmiştir. İki ajanın beraber kullanımında K^{+} artışı görülmüştür. Her hücre hattı ve her uygulama için depolarizasyon gözlemlenmiştir. Hücre döngüsü analizlerinde S fazında yığılma saptanmıştır.

Sonuçlar: Meme kanseri hücre hatlarında 4-AP ve Isc A'nın PTX etkinliğini arttırdığı belirlenmiştir. Bu bulgular klinikte kullanım açısından umut vaat etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Meme kanseri, Paklitaksel, 4-Aminopiridin, Iscador A, Membran potansiyeli.

Increase of Paclitaxel efficacy in breast cancer cell lines with potassium channel blocker 4-aminopyridine and viscotoxin A3

Student name: Esra Münire Aydoğmuş

Adviser: Assoc. Prof. Dr. G. Ayşe İnhan Garip

Department: Biophysics

2. SUMMARY

Objective: This thesis aimed to increase the efficacy of Paclitaxel (PTX), used in treatment of breast cancer albeit its side effect like peripheral neutropenia by a combination with potassium channel blocker 4-aminopyridine (4-AP) and the cationic peptide viscotoxin A3 which increases membrane permeability.

Materials and Methods: Estrogen positive MCF-7 (ATCC HTB- 22) and triple negative MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) and fibroblast (as control) L-929 (ATCC CCL-1) cell lines were used. Cell survival upon application of single and combination PTX, 4-AP and Isc A was determined by trypan blue exclusion. Apoptotic cells and cell cycle were determined by flow cytometer, intracellular calcium (Ca^{+2}) was determined with Fura-2-AM, intracellular potassium was determined with PBFI-AM and membrane potential was determined with DiBAC₄(3) by fluorescent spectrophotometer. Statistical analysis was performed using one way ANOVA and p value <0.05 was accepted as significant.

Results: PTX cytotoxicity increased by combination 4-AP and PTX. A combination of these agents with viscotoxin decreased the survival to 5%. While 4-AP and PTX alone caused an increase in cytosolic Ca^{2+} , a combination caused an increase in MCF-7 and L929 but had no effect on MDA-MB 231. 4-AP alone and in combination with PTX increased K^{+} levels. Paclitaxel alone caused an increase in K^{+} only in MDA-MB 231. Membrane potential depolarization for all cell lines with single or combination treatment was observed. Accumulation in S phase was determined in cell cycle measurements.

Conclusion: This study showed that 4-AP and Isc A increased the cytotoxicity of PTX. These results are promising for a combination treatment.

Keywords: Breast cancer, Paclitaxel, 4-Aminopyridine, Iscador A, membrane potential.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür (Waks ve Winer, 2019). Dünya çapında kadınlar arasında bütün kanser türlerine göre görülme sıklığı %10,4 kadardır, akciğer kanserinden sonra en yaygın kanser türüdür ve kanser nedenli ölümler arasında beşinci sırada yer alır. Az sayıda yüksek gelirli ülke hariç olmak üzere tüm ülkelerde insidans hızları artmaya devam etmektedir. Yüksek gelirli bir çok ülkede mortalite hızları düşerken; düşük ve orta gelirli ülkelerde artmaktadır (Siegel ve ark., 2018).

Meme kanseri genellikle Mamografi ile saptanan nodüllerin biyopsisi ile teşhis edilir (Smith ve ark. 2008). Meme kanseri tedavisi ameliyat, radyoterapi ve kemoterapi seçeneklerini ayrı ayrı ya da kombine olarak içermektedir. Kemoterapi ameliyattan önce tümörü küçültmek için verilebilir ve bazen meme dokusunun korunduğu operasyonun yapılması için olanak sağlar. Meme kanserinde yaygın olarak kullanılan kemoterapiler; gen terapisi, nanoteknolojik ajanlar, onkogen inaktivasyonunu sağlayan ajanlar, tümör baskılayıcı genleri arttırıcı tedaviler (Osborne ve ark., 2004) ve anti mitotik Paklitaksel'dir.

Paklitaksel mikrotübül depolimerizasyonunu engelleyerek mikrotübül dinamiğinde değişimlere yol açar ve bu şekilde mitoz ve hücre proliferasyonu için gerekli mikrotübül ağının işlevini yerine getirememesine neden olur. Dolayısıyla paklitaksel uygulanan hücrelerde hücre döngüsü G2/M fazında bloke olur (Jordan ve Wilson, 2004). Nanomoların altındaki konsantrasyonlarda, paklitaksel mikrotübüller vasıtasıyla kromozomların ayrılmasını baskılayarak, yüksek konsantrasyonlarda mikrotübül sayısını ve kütlesini arttırır (Jordan, 1996).

Doz ve biyoyararlılık sorunundan kaynaklansa da G2/M fazında mitotik duraklamayı sağlamak hücre ölümü açısından kendi başına yeterli değildir (Gascoigne ve Taylor, 2009). Bu nedenle paklitakselin anti mitotik etkisinin arttırılması, G2/M fazında duraklama sonrası ölüme gitmemiş ve G1 fazına geçiş yapmış (mitotik

kayma) (Reider ve Maiato, 2004) hücrelerin G1/S fazında duraklatılması gerekmektedir. Bunun sağlanması için potasyum kanal blokeri 4-Aminopiridin kullanılabileceği düşünülmüştür.

4-Aminopiridin (4-AP), kimyasal formülü $C_5H_4=N-NH_2$ olan piridin türevli monoamino grubuna ait izomerik piridin aminlerden biridir. 4-AP, depolarize olmayan kasların rahatlaması, myasthenia gravis, Eaton Lambert sendromu ve botulizm gibi bir çok durumda ve analeptik olarak klinikte kullanılmaktadır. Anti konvülzan aktivitesinin mekanizmasının aydınlatılması için bir dizi elektrofizyolojik çalışma yapılmış ve periferik sinirlerin uyarılabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir. 4-AP'nin bu etkisi membranlarda seçici olarak potasyum (K) kanallarını bloklamasından kaynaklanır (Glover, 1982; Pelhate ve Pichon, 1974). 4-AP'nin anti kanser aktivitesi voltaj kapılı K kanallarını inhibe etmesi ve hücre içine kalsiyum (Ca^{+2}) girişi ile ilişkilendirilmektedir. 4-aminopiridinin çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda kritik pro-apoptotik özellikleri tanımlanmış ve 4-AP'nin hücreleri G1 fazında apoptoza götürdüğü belirlenmiştir (Wang ve ark.,2011).

Hücre döngüsünün bloklanması tümör gelişimini ve metastazın yavaşlatılması ve tedavinin daha efektif olmasını sağlamak için önemli bir yaklaşımdır.

Yan etkilerin giderilmesi ve dolayısıyla hayat kalitesinin artırılması için ilaç dozunun azaltılması gerekir. Hedeflenen düşük dozda yüksek etkinin gerçekleştirilmesi ise kemoterapik ajanın neoplastik hücreye yeterli konsantrasyonlarda girmesinin sağlanması ile olanaklıdır.

Son yıllarda, tedavi edici özelliği olan bitkiler, klasik tedavi ile kombine edilerek, hayat kalitesini iyileştirici destek tedavi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Tamamlayıcı ve alternatif tıp (complementary and alternative medicine: CAM), tıbbın kavramsal çerçevesini çeşitlendirerek, temel tıbbi tamamlayan teşhis, tedavi veya önlem olarak tanımlanmıştır (Sjöval ve ark., 2010; Kado ve ark., 2012; Mansky ve Wallerstedt, 2006; Ernst ve ark., 1995). Bu yaklaşım meme kanseri hastalarında da ağrıyı azaltmak ve kemoterapik ilaçların yan etkilerini hafifletmek amacıyla,

kanser tedavisinin önemli bölümlerinden biri olarak geliştirilmektedir (Gerber ve ark., 2006; Cui ve ark., 2004).

Hem meme kanserinde hem de mesane, prostat gibi diğer kanser türlerinde CAM olarak kullanılan ve Avrupada ticari olarak üretilip piyasaya sürülen bir bitki de ökse otudur. Ökse otu, triterpen asit, vezikül, polipeptid (viskotoksin), glikoprotein (lektin MLT), flavon, enzim ,polisakkarit, oligosakkarit, aminoasit, yağ ve karbonhidrat gibi, biyolojik olarak aktif bileşenlerin farklı türlerini içerir (Klett ve Anderer, 1989; Büssing, 2000).

Ökseotunun içerdiği viskotoksinler hücre membranı ile etkileşime girmeleri nedeni ile oldukça önemlidir.

Tionin tip 3 ailesine ait viskotoksinler, ökse otunun kökünden ve yapraklarından elde edilen ve 46 amino asit dizisinden oluşan katyonik proteinlerdir. Viskotoksinlerin aminoasit dizileri, disülfid köprülerinin düzeni ve dağılımında gösterdiği farklılıklardan kaynaklanan A1, A2, A3, B, 1-PS, U-PS olmak üzere altı izoformu tanımlanmıştır. Sitotoksik etkileri en fazla ve en az olan tipleri sırasıyla Viskotoksin A3 (VtA3) ve Viskotoksin B (VtB) dir.

Hem model membranlarda hem de hücre plazma membranlarında yapılan tionin toksisite çalışmalarında, pozitif yüklü proteinler ile negatif yüklü fosfolipidlerin etkileşimlerinin elektrostatik olduğu gözlemlenmiştir (Caaveiro ve ark., 1998; Huang ve ark., 1997; Hughes ve ark., 2000; Wang ve ark., 1993; Wilson ve ark.,1997). Kanser hücrelerinin membranlarının dış yüzeyinde, negatif yüklü fosfatidilserin ekspresyonu artar. Bu nedenle, normal ökaryotik hücrelere kıyasla kanser hücrelerinin dış yüzeyi daha yüksek net negatif yük taşır (Mader ve Hoskin, 2006; Chavakis ve ark., 2004). Bu durum, kanser hücresine seçici bağlanma açısından net +6 pozitif yüke sahip viskotoksin A3 için ayrıcalık sağlar (Büssing ve ark., 1998; Schaller ve ark., 1996).

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında, MCF-7 (ATCC, HTB-22), MDA- MB- 231 (ATCC, HTB-26), MDA- MB- 435 (ATCC, HTB-129) meme kanseri hücre soylarında, hücre döngüsünü bloklayarak ve hücre membranını daha geçirgen hale

getirerek, kemoterapik ajan Paklitaksel' in düşük dozlarda etkinliğinin arttırılması amaçlanmaktadır. Paklitaksel her ne kadar G2/M fazında hücre döngüsünü bloklayarak apoptoza yol açsa da mitotik kayma nedeniyle kanser hücrelerinin bu süreci atlatarak G1 fazına dönmeleri ilaç etkinliğini azaltan nedenlerden biridir. Bu aşamada hücrelerin 4-AP tarafında apoptotik yolağa girmeleri amaçlanmaktadır. Paklitaksel etkin ancak ciddi yan etkileri olan bir ajandır. Daha düşük dozlarda aynı oranda etkinliğin sağlanması için paklitaksel uygulaması öncesinde viskotoksin uygulaması ile hücre membran geçirgenliğinin arttırılması hedeflenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser

Kanser, dünya genelinde giderek artan bir sağlık problemidir ve toplumlarda önemli bir sosyoekonomik yüke, bireylerde de maddi ve manevi kayıp ve zorluklara yol açmaktadır. Yeni yayımlanan dünya kanser istatistiklerine göre; ölüm nedenleri arasında kanser ilk sırada yer almaktadır. Dünya’da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Kanserde benzer seyir devam ettiği takdirde 2030 yılına gelindiğinde yıllık 22 milyon yeni vaka ortaya çıkması, yani 2008 verilerine göre yeni vakalarda %75 artış olması beklenmektedir. Önümüzdeki yıllarda gelişecek olan kanser olgularının önemli bir kısmının az gelişmiş ülkelerde ortaya çıkması beklenmektedir (Ferlay ve ark., 2012). Ülkemizde sebebi bilinen ölümler sıralamasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık görülen ikinci ölüm sebebi olması açısından önemli bir toplum sağlığı problemidir.

Kanser, uygarlaşmayı başaran antik Mısır gibi insan topluluklarının aktivitelerinin ilk kaydedilmeye başlandığı zamandan beri bilinen bir hastalıktır (<https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/495-2014-y%C4%B1%C4%B1-t%C3%BCrkiye-kanser-istatistikleri.html> Erişim tarihi: 15 Nisan 2019).

Geçmişte enfeksiyon hastalıkları en büyük ölüm nedeni olmasına rağmen, halk sağlığında ve tıpta gerçekleşen gelişmeler ile kontrol altına alınmıştır fakat kanser riski taşıyan popülasyonun oranı ciddi şekilde artış göstermiştir. En az üç kişiden birinde kanser geliştiği ve dört erkekte birinin ve beş kadından birinin kanser nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, kanser araştırmaları gün geçtikçe önem kazanmakta ve çalışma sayısı artmaktadır.

Kanser sadece insanları etkileyen bir hastalık değildir, bitkiler ve hayvanlar gibi çok hücrelilerin tamamını etkiler. Kanser, hücre çoğalmasındaki ölüm/yaşam dağılımını, hücre farklılaşması ve gelişimini içerdiği için hastalığın altında yatan

mekanizmanın anlaşılması hayatın çok temel mekanizmalarının anlaşılmasına imkan sağlayacaktır.

Kanser, hücrelerin bir hastalığıdır ve genelde hücrelerden oluşan bir kütle yani tümör şeklinde görülmesine rağmen, tümör gelişimi yıllar süren değişim serilerinin bir sonucudur.

Kanser en kısa tanımı ile hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaları demektir. Bu çoğalma sırasında kanser hücresinde, normal hücrelere göre yapısal ve işlevsel farklılıklar oluşur. Anormal şekilde çoğalan bu hücreler bulundukları yerdeki dokuyu ve organları işgal eder ve hatta daha uzaktaki organları işgal ederek, bu bölgelerin işlevlerini kaybetmelerine neden olur. Moleküler seviyede, bütün kanser tipleri ortak birkaç özelliğe sahiptir. Gen okumasının değişim patterni karakteristik değildir, fakat biyokimyasal lezyonların neden olduğu malignant dönüşümü ve kanser ilerlemesi ortaktır (Ruddon, 2007).

Bir tümör hücresini kesin bir terimle tarif etmek mümkün değildir. Tümörler genellikle anormal çoğalma gösteren hücreler olarak tanımlanır. Bu tanım normal hücrelerden farklı olarak kontrol mekanizmalarına olan yanıtın eksikliği nedeniyle kabul edilebilir bir tanımdır.

Tümörler 3 ana gruba ayrılır:

1.İyi huylu (Benign) tümörler, her dokuda oluşabilir, lokal olarak büyüme gösterir ve lokal basınç veya tıkanma nedeniyle hasara neden olur.

2.In situ tümörler, genellikle epitelyumda gelişirler. Bu hücreler morfolojik olarak kanser hücresi olarak görülsede epitelyal tabakada kalırlar, bazal zarı ve destek mezenkim tabakasını istila etmezler.

3.Kanser, tamamıyla kötü huylu (malignant), mezenkim tabakasını istila eden ve zarar veren spesifik bir kapasiteye sahip tümörlerle gelişir. Tümör hücreleri kan dolaşımındaki besinlere ihtiyaç duyar ve tümör içinde damar oluşumunu uyaran proteinleri üretir ve böylece sürekli büyüme gösterir. Yeni oluşan damarlar iyi formda değildir ve kolaylıkla zarar görebilirler bu nedenle istilacı tümör hücreleri damarlara ve lenf damarlarına nüfuz edebilir. Tümör parçaları bu kanallar vasıtasıyla

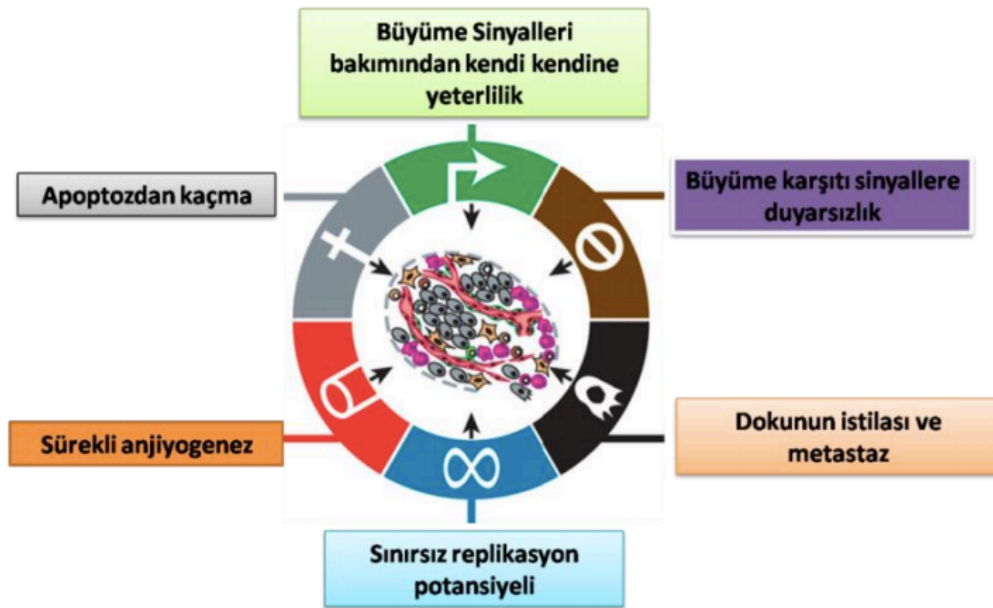
uzak organlara ve lenf nodlarına taşınabilirler ve taşındıkları dokularda ikincil bir tümör oluşturabilirler (metastaz). Kanser her dokuda oluşabilir. Kanser bazen benign den maligne dönüşebilsede, çoğu benign tümör, malign tümöre dönüşmeden kalabilir.

Tümörlerin tanımlanmasında karşılaşılan problemlerin iyi anlaşılması tümörün indüklenmesi ve gelişmesi (karsinogenez) süreçlerinin tamamının dikkate alınması ile kolaylaştırılabilir.

Karsinogenez çok sayıda basamak içeren bir süreçtir. Hayvanlarda, kansere neden olan bir ajanın (karsinojen) uygulanması hemen kanser oluşumuna neden olmaz. Tek bir uygulamadan ziyade uzun periyodlarla, çoklu kanser ajanının uygulanması kanser oluşumunu sağlar. 1940’larda Berenblum ve Shubik (Yuspa, 1994) tarafından fare derisi üzerinde yapılan araştırmalarda kanser oluşumu için üç büyük aşama tanımlanmıştır. İlk aşama, başlama olarak tanımlanmış ve deri kök hücrelerinde karsinojenin mutajenik etkisini içerdiği bulunmuştur. İkinci aşama, direk olarak karsinojen olmayan farklı ajanların kanseri indüklediği bulunmuş ve bu aşama gelişme olarak isimlendirilmiştir. Son olarak üçüncü aşama, bazı benign tümörlerin ilerletici ajanlara spontan veya devamlı olarak muamele edilmesi sonucu kanser sürecinin agresif tümörlere ilerletme süreci olarak tanımlanmış ve progresyon olarak adlandırılmıştır.

Fare deri kanseri modeli karsinogenezin çok sayıda basamak içerdiğini göstermekle beraber insan kanserleri için de bu basamakların geçerli olduğunu açıkça ortaya koymuştur. Örneğin, yetişkinlerde görülen çoğu katı tümör gelişimi için spesifik karsinojenlere uzun süreler boyunca sürekli maruziyet sonucunda oluşan çeşitli kalıtsal değişimlerin gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu kalıtsal değişimler, proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler ve epigenetik değişimleri içerir. Histopatolojik gözlemler morfolojik olarak benign tümör gibi lezyonların veya in situ anormal hücre gelişiminin görülmesi sonrası ve bu lezyonların uzun yıllar boyunca değişmeden kalması ve sonunda malignant tümöre dönüşmesi ile uzun preneoplastik periyodun varlığını destekler.

Başlama ve tümörün görülür hale gelmesi arasındaki uyku periyodu oldukça uzundur. Uzun yıllar endüstriyel karsinojenlere maruz kalan bir insanda, tümör gelişiminden önce uyku periyodu 20 yıl olabilir (Knowles ve Selby, 2005). Hayvanlarda büyük dozlarda verilen karsinojenlerle tümörün gelişimi, toplam hayat süresinin çeyreğini veya daha fazlasını alabilir. Nihayetinde tümör ortaya çıktığında, genetik ve epigenetik değişimler hücre popülasyonunun tamamında görülür (Resim 1) (Garcia ve ark., 2000).



Resim 1. Kanser gelişimi için gerekli mekanizmalar. (Hanahan ve Weinberg, 2000)

Neoplazma terimi yeni büyüyen anlamına gelmektedir, sıklıkla tümör terimi yerine kullanılabilir, kanserli büyüme anlamına gelir. Malignant neoplazma veya kanser, ayırıcı özelliklere sahiptir. Patologlar ve deneysel kanser biyologları bu özellikleri anormal olarak tanımlarlar. Neoplastik hücreler vücutta bölünme yeteneği olan her dokuda gelişebilir. Hızlı veya yavaş büyüyebilirler de, çoğalma hızları genellikle etrafını sardığı normal dokudan daha fazladır.

En yaygın insan neoplazma tipleri vücudun dış veya iç yüzeylerini kaplayan epitelyumdan köken alır. Bu hücreler bağ doku ve damarların destek dokularında bulunur. Epitel hücreleri insan vücudunu kapladığı, soluk borusu ve sindirim kanalları boyunca bulunduğu için, kanser vakalarının %90 ının epitel hücrelerinde meydana gelmesi sürpriz değildir.

Akciğer, kolon, meme ve prostat kanserleri en yüksek ölüm oranına sahip kanser türleridir.

Kanser her yaş grubunda görülmesine rağmen, genel olarak bir yaşlılık hastalığıdır. Kanser tanısı konmasının ortalama yaşı 67 dir ve bütün kanser teşhislerinin %76' sı 55 yaş üstü hastalara konmaktadır. Çocuklarda görece nadir olmasına rağmen, 1-14 yaş ölüm nedenlerinden kanser ikinci sıradadır. Bu yaş grubunda lösemi en büyük ölüm nedenidir, fakat osteosarkoma, lenfoma ve nöroblastoma da görülür (Wingo ve ark., 2003).

Kanser çevresel faktörlerin neden olduğu kompleks genetik bir hastalıktır. Kansere neden olan ajanlar (karsinojenler) yiyecekte, suda, havada, kimyasallarda bulunabilir ve güneş ışığı gibi insanların maruz kaldığı ajanlar olabilir.16. Yüzyıldan beri kimyasalların kansere neden olabildiği bilinmektedir. Karsinojenler kısaca şu şekilde sıralanabilir; kimyasal karsinojenler, radyasyon maruziyeti, genetik hassasiyet, yaşlılık, çoklu mutasyonlar, viral hastalıklar, reaktif oksijen türleri.

4.1.1. Kanser tanısı ve tedavisi

Kanserin erken teşhisi sıklıkla tedavi için en önemli şansı sağlamaktadır. Bazı kanser türleri için tarama testleri erken tanıyı sağlamasıyla hayat kurtarabilir. Kanser tanısında sıklıkla kullanılan yöntemler sırasıyla, fiziksel muayene, laboratuvar testleri, görüntüleme yöntemleri ve biyopsi şeklindedir.

Kanser teşhis edildiğinde, kanserin hangi evrede olduğu hızlıca belirlenmelidir. Kanser evresi tedavi olabilme şansı ve hangi tedavinin uygulanacağı konusunda zaruridir. Kanser evresinin belirlenmesinde görüntüleme yöntemleri sıklıkla kullanılır.

Tümörün yayılma hızı kanser evresinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Kanser evreleri genellikle I den IV e kadar romen rakamları ile ifade edilir (<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cancer/diagnosis-treatment/drc-20370594>, Erişim tarihi: 15 nisan 2019).

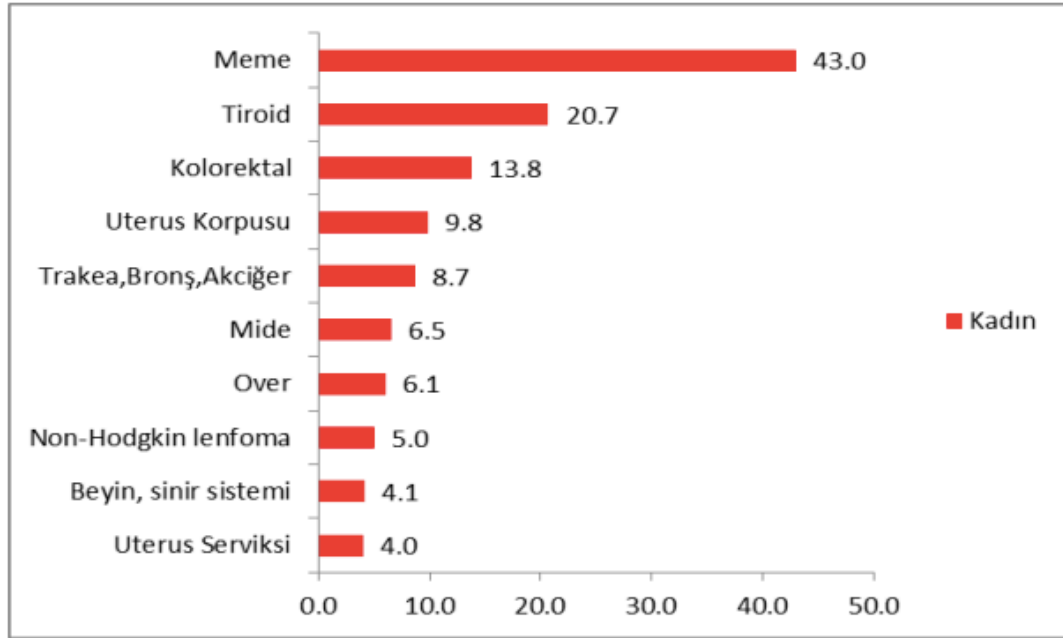
Kanser tedavisi genellikle bir kaç farklı yaklaşımın kombinasyonudur. Eğer tümör ameliyata uyumlu ise, ameliyat en etkili kanser tedavisidir. Hedefli radyoterapinin antikanser ilaçları ile kombine edilerek kullanılması diğer bir seçenektir. Çoğu geleneksel antikanser ilacı DNA yı hedef alacak şekilde sentezlenmiştir. Anti kanser ilaçlarının DNA'yı hedeflemesi problemlili bir durumdur çünkü vücutta bölünen hücreler sadece tümör hücreleri değildir, alimenter kanallar, kemik iliği, epidermal hücreler yüksek çoğalma kabiliyetine sahiptirler. Bu nedenle, kemoterapi alan hastalar çoğunlukla istenmeyen ve bazen hayatı tehdit edici yan etkilere maruz kalırlar ve bu nedenle ilaçlar tedavinin sınırlı kalmasına neden olur.

Yeni nesil kanser ilaçlarının hedefi direkt DNA sentezinden farklı olarak; hücre döngüsünü, büyüme faktörleri ve reseptörlerini, sinyal iletim yollarını, DNA tamir mekanizmalarını ve apoptozu düzenleyen ve kolaylaştıran sinyalleri etkilemektir. Bu yolların her biri mutasyonlar ile aktive ediliyor ve kansere yatkın hale getiriliyor olabilir. Bu nedenle inhibisyon için hedeflenme potansiyel taşıyor olabilir. Diğer tedavi stratejileri tümör spesifik antikorların hücre toksinleri ile birleşimi ile tümör hücrelerini spesifik olarak hedef alma, hücre adhezyonunu, proteolitik enzim aktivitelerini ve anjiyogenezi etkileyerek kanser gelişimini yavaşlatma üzerine yoğunlaşmaktadır.

4.1.2. Meme kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür (Resim 2). Dünya çapında kadınlar arasında bütün kanser türlerine göre görülme sıklığı %10, 4 kadardır, akciğer kanserinden sonra en yaygın kanser türüdür ve kanser nedenli ölümler arasında beşinci sırada yer alır. 2004 yılında sadece meme kanserinden kaynaklanan 519,000 ölüm saptanmıştır. Kadınlarda erkeklerden 100 kat daha fazla

görülmesine rağmen, erkeklerde tanı konmasının gecikmesi nedeniyle hastalıkla daha zor mücadele edilmektedir. (Sharma ve ark., 2010)



Resim 2. Kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türlerinin istatistiksel verileri. (<https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/495-2014-y%C4%B1l%C4%B1-t%C3%BCrkiye-kanser-istatistikleri.html> Erişim tarihi: 15 Nisan 2019).

Genellikle, kanser vücutta hangi dokudan köken alıyorsa ona göre isimlendirilir; bu nedenle, meme dokusundan köken alan hücrelerin değişken büyüme ve çoğalma göstermesi meme kanserini işaret eder (Khuwaja ve AbuRezaq 2004). Modern moleküler profillemeye teknikleri ile, histopatologlar morfolojik gözlemler aracılığıyla meme kanserinin heterojen yapıya sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu heterojenite histolojik tip, tümör evresi, lenf nodlarına yayılım durumu, östrojen reseptörü (ER) ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) gibi belirteçlerin kullanılmasıyla sınıflandırılmıştır. Moleküler profillemenin gelişmesi ile DNA mikro analizleri bu heterojeniteyi gen ekspresyon profili vasıtasıyla, östrojen reseptörü, progesteron

reseptör (PR), triple negatif ve insan epidermal büyüme faktörü 2 şeklinde sınıflandırılmış ve beş alt birim tanımlanmıştır: luminal A, luminal B, HER2, bazal ve normal (Perou ve ark., 2000).

Meme kanseri en yaygın olarak süt bezlerinin iç kanallarından veya süt bezlerinin desteği olan loblardan köken alır. Meme iki ana dokudan oluşur; bez ve stromal doku. Bez dokusu süt üreten loblar ve sütün taşınmasını sağlayan kanallardan oluşurken, stroma dokusu memenin lifli bağ dokusunu ve yağ dokusunu oluşturur.

Memenin farklı bölgelerinde gelişen farklı tip tümörler olabilir. Memede çoğu tümörler iyi huylu tümörlerin değişime uğraması sonucu oluşur.

Meme kanserlerinin çoğu süt kanallarında başlarken (ductal cancer), Bazıları loblarda (lobular cancer) başlar, çok küçük bir kısmı ise diğer dokularda başlar (http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_1X_What_is_breast_cancer_5.asp, Erişim tarihi: 15 Nisan 2019)

4.1.2.1. Meme kanseri çeşitleri

Non-İnvazif- saldırgan olmayan meme kanseri hücreleri süt kanallarında sınırlanan ve meme dokusunda etrafını çevreleyen bağ ve yağ dokusuna istila etmeyen kanser türüdür. İnvazif olmayan kanserlerin %90 ı duktal karsinomadır. Lobular karsinoma daha az yaygındır (Sharma ve ark., 2010).

İnvazif saldırgan meme kanseri hücreleri, süt kanalları ve lobular duvarını yarıp geçerek etrafını saran yağ ve bağ dokuyu istila eder. Kanser lenf nodlarına ve diğer organlara metastatik yayılım göstermeksizin invazif olabilir (<http://www.merck.com/mmhe/sec22/ch251/ch251f.html>, Erişim tarihi: 15 Nisan 2019).

Sıklıkla karşılaşılan meme kanserleri, lobular karsinoma, duktal karsinoma ve infiltrat lobular karsinomadır. Daha az yaygın olanları ise medullar veya kolloid karsinoma ve tubular karsinomadır.

4.1.2.2. Meme kanserinin nedenleri

Meme kanseri heterojen bir hastalıktır ve temelde nokta mutasyonlar, kromozomal büyümeler, delesyon, yeniden düzenlenme ve çiftlenme gibi genetik hataların birikmesinin sonucudur (Bell 2010, Wood ve ark 2007). Meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden biri aile öyküsüdür. Bütün meme kanseri vakaları dikkate alındığında yaklaşık %20'si ailesel olsa da, aileden gelen kanserlerde sorumlu genler tam olarak saptanabilmiş değildir. Eğer aile üyelerinden biri özellikle bir kanser türüne sahipse, diğer aile üyelerinde meme kanseri gelişmesi riski artar.

Daha önce meme kanseri tanısı konmuş bir kadında, kanserin diğer memeye sıçrama riski oldukça yüksektir. Meme kanserinin nedenleri kısaca genetik yatkınlık, hormonal değişimler, hayat tarzı ve beslenme, çevresel nedenler olarak sıralanabilir (Hartmann ve ark. 2005; Eberl ve ark. 2005; Fletcher, 2008; Tiernan, 2003).

4.1.2.3. Meme kanseri belirtileri, tanı ve tedavi yöntemleri

Meme kanserinin klasik belirtileri memede veya kolaltında yumru bulunmasıdır. Genelde meme kanserinin dikkat gerektiren belirtileri ,memede yumru veya şişlik, kolaltında şişlik (lenf nodlarında), meme ucundan gelen kanlı veya saydam akıntı, meme uçlarında acı, içe çökük meme ucu, meme ucunda pullu ve çukurlaşmış deri, memede hassasiyet ve alışılmamış meme ağrısı olarak sıralanabilir (Sharma ve ark., 2010).

Meme kanseri genellikle Mamografi ile saptanan nodüllerin biyopsisi ile teşhis edilir (Smith ve ark., 2008). Kanser tanısı konduktan sonra evre belirlenir. Meme kanseri evresinin saptanması, uygun tedavinin belirlenmesi ve hastalığın ilerleyişinin tahmin edilmesi açısından önemlidir. Meme kanseri evreleri genellikle invazif veya invazif olmayan şeklinde, I- IV arası rakamlar ile tanımlanır.

Meme kanseri tedavisine ilk yaklaşım ameliyattır. Meme kanseri ameliyatlarında iki temel seçenek vardır. İlk seçenek, sadece tümörün ve tümörün etrafındaki sağlıklı dokunun bir kısmını alınması ile gerçekleşen memenin korunduğu operasyonlar, ikincisi bütün meme dokusunun alınması ile gerçekleşen mastektomidir.

Tedavi seçeneklerinden bir diğeri, tümörlü bölgenin alınmasından sonra veya direkt tümör hedeflenerek uygulanan, yüksek enerjili X ışınları veya gamma ışınlarının kullanılmasını kapsayan radyoterapidir. Radyasyon operasyondan sonra kalabilecek veya tümör alınan bölgede tekrarlama ihtimaline karşı, kanserli hücrelerin öldürülmesinde oldukça etkili bir tedavi yöntemidir. Radyasyon tedavisi genellikle operasyondan sonra uygulanır. Radyasyonun dozunun kanser hücrelerini yok edecek yeterli güce sahip olması gerekmektedir. Tedavi 5-7 haftalık seanslar halinde verilir ve 5 gün boyunca devam eder. Her seans yaklaşık olarak 15 dakika sürer.

Kanserli hücrelerin tedavisinde kullanılan diğeri bir yöntem kemoterapidir. Kemoterapi terimi en genel anlatımıyla, farmasotik bileşenlerin ve kimyasalların kullanılmasıyla müdahaleyi kapsayan terapi yöntemidir. Meme kanserinin spesifik tedavisi, genel sağlık durumu, tıbbi geçmiş, yaş (menapoz olup olmadığı), kanserin türü ve evresi, spesifik ilaçlara tolerans gibi temeller üzerine kurulmalıdır. Kemoterapi tedavisi genellikle döngüler halinde verilir; bir periyot içinde uygulanan tedaviyi iyileşme süreci takip eder ve iyileşme sürecinin ardından tekrar tedavi periyodu başlar. Kemoterapi ameliyattan önce tümörü küçültmek için verilebilir ve bazen meme dokusunun korunduğu operasyonun yapılması için olanak sağlar. Çoğu zaman ameliyattan sonra verilir ve her iki veya üç haftada bir doz-yoğunluk tarzında uygulanabilir. Meme kanserinde yaygın olarak kullanılan kemoterapiler; gen terapisi, nanoteknolojik ajanlar, onkogen inaktivasyonunu sağlayan ajanlar, tümör baskılayıcı genleri arttırıcı tedaviler vb. (Osborne ve ark., 2004)

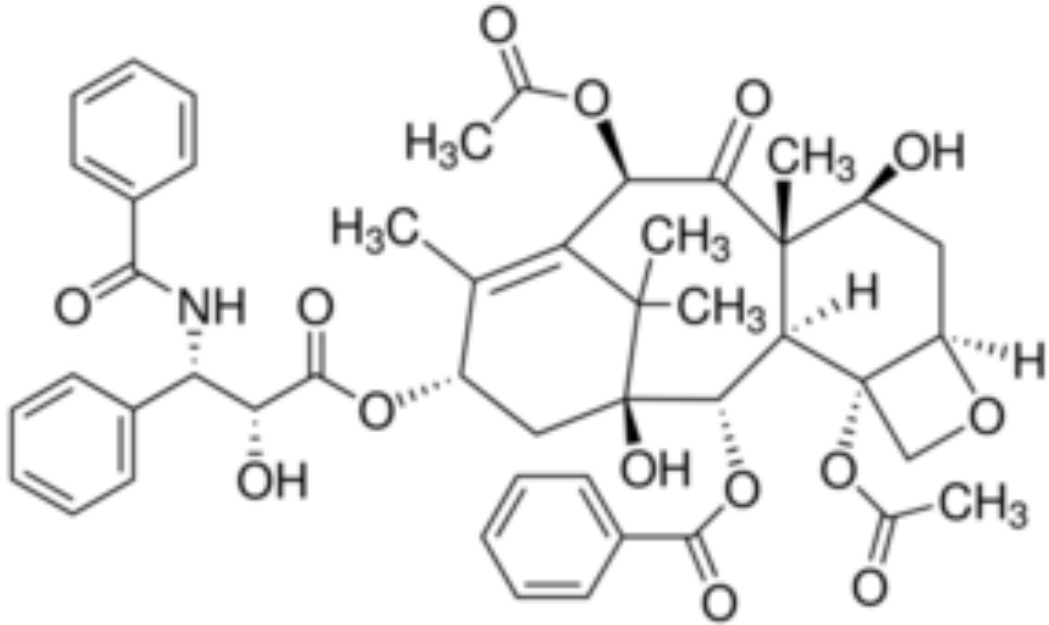
Meme kanserinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaç grubundan biri anti mitotik Paklitakseldir.

4.2. Paklitaksel

Paklitaksel (Paclitaxel; PTX), klinik deneylerde kullanılan ilk taksan sınıfı ilaçtır, aktif olarak geniş ölçekte kanserin tedavisinde özellikle kemoterapiye direnç gösteren kanser türlerinin tedavisinde kullanılır (Muggia ve ark., 2000).

PTX, National Cancer Institute (NCI) programının bir parçası olarak, anti-kanser etkisini tanımlamak için binlerce bitkinin özütünün çıkarılması ve taranması sonucunda keşfedilmiştir. 1963 yılında, Wani ve Wall tarafından Pasifik porsuk ağacı (Pacific yew *Taxus brevifolia*) kabuğundan ham özüt olarak elde edilmiştir. Elde edilen özütün prelinik çalışmalarda bir çok kanser türünde sitotoksik aktivitesi olduğu gösterilmiş ve 1971 de özütün öğelerinden PTX tanımlanmıştır. 1979 da PTX'in etki mekanizması anti tümör ilacı olarak tanımlanmış ve 1993 yılında Food and Drug Administration (FDA) tarafından over kanserinde ve 1994 yılında metastatik meme kanserininin tedavisinde kullanılmak üzere kabul edilmiştir (Wani ve ark., 1971; Wall ve Wani, 1995).

Paklitaksel, moleküler formülü C₄₇H₅₁NO₁₄ ve moleküler ağırlığı 853.906 g/mol olan çekirdeğinde 6-8-6 trisiklik bir halka olan lipofilik bir diterpenoid'dir. 13'üncü karbona bağlı yan zinciri antitümör aktivitesi açısından zorunludur (Surapanina ve ark., 2012) (Resim 3).



Resim 3. Paklitaksel'in kimyasal yapısı

PTX, pasifik porsuk ağacının kabuğundan izole edildiği için sınırlı sayıda kaynağı vardır. Bu nedenle günümüzde inaktif taksan ön maddesinden yarı sentetik olarak, avrupa porsuk ağacının iğnelerinde bulunan 10- deasetilbaccatin III' den türetilir.

4.2.1. Etki mekanizması ve direnç

Mikrotübüller alfa ve beta alt birimlerinden oluşan tübülün heterodimerleri ile dinamik bir dengede tübülün polimerlerinden oluşur. Başlıca hücre bölünmesi esnasında mitotik iğcik oluşturması ve interfazda şekil, hareket, sinyal iletimi ve hücre içi taşıma gibi bir çok hayati fonksiyona sahiptir (Rowinsky ve ark.,1990).

Vinka alkaloidler gibi mikrotübüllerin polimerizasyonunu indükleyen diğer antimikrotübül ilaçlardan farklı olarak, taksanlar tübülünlerin polimerizasyonunun gecikme süresini ve tübülün dimerleri ile mikrotübüller arasındaki ötelemeyi azaltarak polimerizasyona ve dolayısıyla mikrotübüllerin stabilizasyonuna neden olur. (Rao ve ark., 1994). Paklitaksel mikrotübül depolimerizasyonunu engelleyerek mikrotübül dinamiğinde değişimlere yol açar ve bu şekilde mitoz ve hücre proliferasyonu için gerekli mikrotübül ağının bozulmasına neden olur. Dolayısıyla paklitaksel uygulanan hücreler G1 ve G2/M fazında duraklatılırlar (Jordan ve Wilson, 2004). Nanomoların altındaki konsantrasyonlarda, paklitaksel mikrotübüllerin ayrılmasını baskılamak, yüksek konsantrasyonlarda mikrotübül sayısını ve kütlesini artırır (Jordon, 1996). Paklitaksel varlığında, mikrotübüller stabil ve fonksiyonsuz bir formda bulunurlar, dolayısıyla interfaz sürecinde ve hücre bölünmesi için gerekli mikrotübül dinamikleri bozulduğu için paklitaksel hücre ölümüne neden olur. Paklitaksel ayrıca tümör nekroz faktör alfa (TNF α)geninin ekspresyonunu indükler ama yapılan yapı aktivite çalışmalarında paklitakselin mikrotübül birleştirmede etkisi ile bu aktivitenin bir ilişkisi bulunamamıştır, ancak bu durum paklitakselin antitümör aktivitesinde sitokinlerin rolü olabileceğini düşündürmektedir (Burkhart ve ark., 1994). Paklitakselin bağlanma bölgesi GTP bağlama bölgesi açısından vinblastin, kolşisin ve podofilokstan farklıdır. Paklitaksel tübülün dimerlerinden ziyade, mikrotübülün beta tübülün alt biriminin N terminal

ucunda 31. amino asite bağlanır (Rao ve ark., 1994). Bütünlüğü bozulmamış hücrelerde paklitaksel mikrotübüllerin gruplanmasını indükler ve mitotik iğciklerin sayısının artmasını sağlar. Paklitaksel ayrıca in vitro da iyonize radyasyonun sitotoksik etkisini artırır, hücre döngüsünün mitotik ve premitotik G2 fazında tutulumu indükler. G2 ve M fazı hücre döngüsünün en radyasyona duyarlı fazlarıdır.

Ancak yapılan çalışmalar paklitakselin konsantrasyona bağlı olarak farklı etkileri olduğunu göstermiştir. Düşük konsantrasyonlarda (5-30 nM) mikrotübül dinamiğini etkileyerek G2/M fazında duraklamaya neden olurken (Jordan ve ark. 1993) yüksek konsantrasyonlarda (0.2mikroM-30mikroM) mikrotübül hasarına (Wang ve ark., 2000), mitojen-uyarılmış protein kinazların (MAPK), Raf-1, protein tirozin kinazların c-JUN kinazların, siklin bağımlı kinazların ve kaspazların gen anlatımlarında değişimlere yol açar (Stone ve Chambers, 2000). Paklitakselin neden olduğu apoptoz p53'den bağımsızdır ve aksine p53 geninde mutasyonun paklitaksel'e hassasiyeti arttırdığı gösterilmiştir (Safran ve ark, 1996; Wahl ve ark., 1996) . Diğer apoptoz uyarılarında olduğu gibi paklitaksel uyarılmış apoptoz Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenir (Sumantran ve ark., 1995). Buna karşın paklitakselin kendisinin de Bcl-2 ailesi proteinlerinin anlatımlarını düzenlediği gösterilmiştir (Liu ve Stein, 1997).

Paklitakselin uyardığı apoptoz G2/M fazındaki duraklamadan sonra (Woods ve ark., 1995) veya çok çekirdekli bir yapıda mitozdan G1 fazına çıkıştan sonra (Jordan ve ark., 1996) gerçekleşebilir.

Paklitaksel uyarılmış hücrelerde mitotik iğcik düzeneğinin kontrol noktasının apoptozu belirlediği önerilmiştir (Sorger ve ark., 1997). Paklitaksel gibi mikrotübül yapısını hedef alan ilaçların mitotik iğcik düzeneğinin kontrol noktasının (spindle assembly checkpoint, SAC) etkisinin uzamasına yol açıp mitotik duraklamayı gerçekleştirdiği ve bu nedenle hücre ölümüne neden olduğu iddia edilse de bu görüşe karşı çalışmalar mevcuttur (Weaver ve Cleveland, 2005; Reider ve Maiato, 2004).

Doz ve biyoyararlılık sorunundan kaynaklansa da mitotik duraklamayı sağlamak hücre ölümü açısından kendi başına yeterli değildir. Paklitakselin bazı hücrelerde

etkili olduğu ancak bazı kanser tiplerinde etkisiz olması tek başına mitotik duraklamanın yol açtığı henüz açığa çıkarılamamış başka mekanizmaların varlığına işaret etmektedir (Gascoigne ve Taylor, 2009).

Taksanlara iki şekilde direnç geliştirilebilir. Bunlardan ilki, bazı tümörlerin içerdiği alfa ve beta tübülünlerin mikrotübüller ile polimerizasyonu kalıtsal olarak bozulduğu için mikrotübül birleşme hızı yavaştır ve taksanlar polimerizasyon hızını normale çevirebilirler (Cabral ve ark., 1983). İkinci mekanizma, membran fosfoglikoproteinlerinin artmasıdır ve bu proteinler ilacı dışarı atan pompalar gibi çalışır. Tümör hücrelerinin çoklu ilaç direnci (multidrug resistance) tümör hücrelerinin fenotipi ile karşılıklı olarak, vinka alkaloidler, kolşisin, etoposid ve taksanlar gibi yapısı itibarıyla büyük hacimli doğal ürünlere karşı farklı derecelerde çapraz direnç olarak gözlemlenir. Bu mekanizmaların klinik ilaç direncine katkıları bilinmemektedir, fakat çoklu ilaç direnci fenotipi, direncin önemli bir mekanizması olsa da, meme kanseri hastalarıyla yapılan klinik çalışmalarda taksanlar ve antraksiklinler arasındaki çapraz direncin eksikliği beklenenin dışındadır (Rowinsky, 1995).

Paklitaksel'in etki mekanizmasının iyi anlaşılması için hücre döngüsünün iyi anlaşılması gereklidir.

4.3. Hücre Döngüsü ve Membran Potansiyeli

Hücre döngüsü, hücresel komponentlerin iki katına çıkması ve yavru hücrelere eşit olarak dağıtılmasını sağlayan hücresel olaylar dizisidir. Hücre döngüsü hücrelerin çoğalmasında, organizma gelişiminde, DNA hasarının tamirinin düzenlenmesinde, yaralanmalara yanıt olarak oluşan doku büyümelerinde ve kanser gibi hastalıklarda rol alan kompleks bir süreçtir. Ökaryotlarda, hücre döngüsü DNA replikasyonu sentez (S) fazı ve kromozom dağılımının gerçekleştiği mitoz (M) fazları arasında sınırlandırılmıştır. S ve M fazları, G1 ve G2 olarak bilinen iki faz ile ayrılır. G1 ve G2 de hücreler inaktif değildir daha ziyade bu periyotlarda hücre kütlelerinde büyüme, çoğalma sinyallerinin toplanması, genomun replikasyonunun

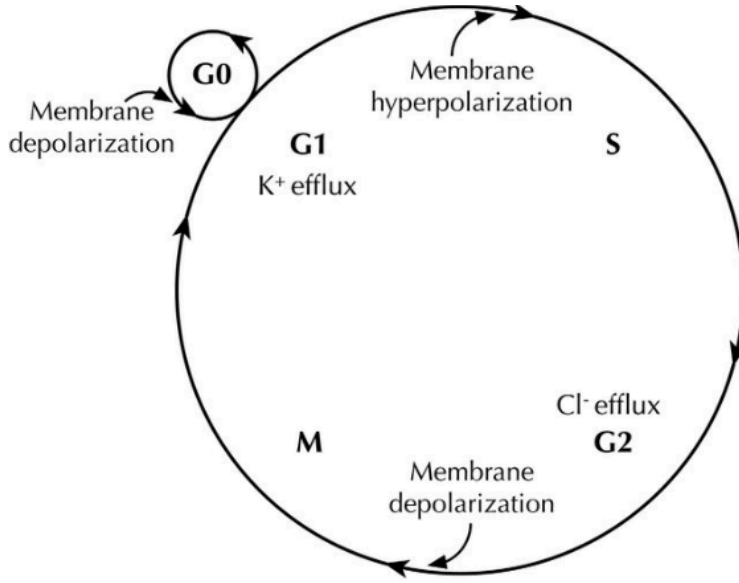
düzenlenmesi ve kromozom ayrımı için hazırlanma süreçleri tamamlanır (Barnum ve O'Connell, 2014).

Hücre döngüsü morfolojik olarak interfaz ve mitotik (M) faz olarak ikiye ayrılabilir. M fazı profaz, anafaz, metafaz ve telofazı, interfaz G1, S ve G2 fazlarını kapsar. G0 fazında hücreler aktif olarak döngüde değildir. G0 fazı, Olgun nöronlarda ve epidermisin dış tabakasındaki bulunan hücreler gibi tamamıyla farklılaşmış hücreleri tanımlamak için de kullanılır (Schafer, 1998).

Hücre döngüsü, hücrenin doğru bir şekilde bölünmesini sağlamak için bir çok mekanizma ile kontrol edilir. Hücre döngüsünde çok sayıda düzenleyici protein görev alır. Bu sürecin merkezinde siklin bağımlı kinazlar (cdk) ve siklin proteinleri yer alır. Siklin proteinleri G1, S, G2 ve M hücre döngüsü fazları boyunca hücresel süreçleri düzenlerler. Hücre döngüsünün kontrol noktalarında oluşan bozulma hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olabilir ve bu durum kanser biyolojisi ile yakından ilişkilidir. Biyokimyasal kontrol noktası moleküler süreçler içerirken, hücre döngüsünün düzenlenmesinin önemli bir alanı hücre döngüsünün transmembran voltaj potansiyeli ile düzenlenmesidir (Sandelacruz ve ark., 2009).

Yaşayan bütün hücreler, iç ve dış bölgeleri arasında elektriksel potansiyel farkına sahiptirler. Bu potansiyel farka membran potansiyeli (V_{mem}) denir. Membran potansiyeli genel olarak iyon kanalları aktivitesinin bir sonucudur (Blackiston ve ark., 2009). Membran potansiyeli ve hücre çoğalması arasındaki ilk ilişki yüksek dinlenme potansiyeline sahip nöron ve kas hücrelerinin düşük mitotik aktivitesinin gözlemlenmesi ile kurulmuştur (Binggeli ve Weinstein, 1986). 1950lerin başında V_{mem} ve çoğalma arasındaki ilişki henüz bilinmiyorken, 1950'lilerin sonu ve 1960'larda yapılan çalışmalarda hücrelerin membran potansiyelindeki azalmayı malign dönüşümün takip ettiği bir çok çalışma grubu tarafından rapor edilmiştir (Balitsky ve Shuba, 1964; Tokuoka ve Morioka, 1957). Hücrelerde membran potansiyeli, çoğalma, hücre göçü ve hücre şekli gibi özelliklerin düzenlenmesinde önemlidir (Blackiston ve ark. 2009; Sundelacruz ve ark., 2009). Bir çok farklı memeli hücre tipinde yapılan membran potansiyeli analizleri sonucunda, çoğalmayan

farklılaşmış hücrelerin membran potansiyelinin hiperpolarize ; embriyonik hücreler, olgun kök hücreler ve kanser hücreleri gibi çoğalma kapasitesi oldukça yüksek olan hücrelerin membran potansiyelinin depolarize olduğu gösterilmiştir. Membran potansiyeli ve proliferasyon arasındaki bu ilişki rastlantı değildir; membran potansiyeli, farklılaşma ve proliferasyon kontrolünde nedensel bir faktördür ve hücre döngüsü boyunca dalgalandığı belirlenmiştir (Cone 1971; Binggeli ve Weinstein , 1986; Levin, 2007; Sundelacruz ve ark., 2008). Bu dalgalanmalar (Resim 4), G1/ S geçişinde hiperpolarizasyon ve G2/M geçişinde depolarizasyon şeklindedir. Membran potansiyelinde oluşan dalgalanmaların kaynağı, hücre döngüsü boyunca iyon kanalları aktivitesinin değişmesidir (Cone, 1971; Rubin, 1985; Huang ve ark. , 2009; Burr ve ark., 1938).



Resim 4. Hücre döngüsü boyunca membran potansiyelindeki değişimler.
(Yang ve Brackenbury, 2013).

V_{mem}'in sürdürülmesinde K kanalları merkezi rol oynar. K kanalları , hücre içinde baskın olarak bulunan K ın dışarı atılmasını sağladığı gibi hücre hacminin osmotik düzenlenmesinde ve hücre içi pH'nın da düzenlenmesinde görevlidir.

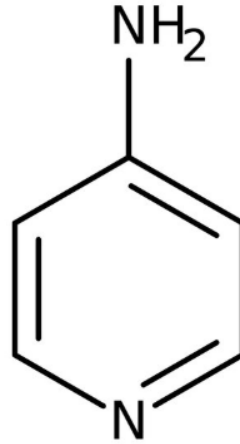
Vmem, pH ve hücre hacmi hücre döngüsü boyunca değişir, bu durum patolojik ve fizyolojik çoğalmanın belirlenmesinde K kanallarının önemini göstermektedir. K kanal aktivitesi hücre döngüsü boyunca değişir ve K kanallarının baskılanması anti-proliferatif etki gösterir (Prevarskaya ve ark., 2010). K kanal aktivitesi hücre döngüsünün G1 fazının başlaması için gereklidir (Wonderlin ve Strobl, 1996). Genellikle, normal hücrelere göre kanser hücreleri daha pozitif Vmem'e sahiptirler, hücre döngüsü boyunca geçici hiperpolarizasyonun sağlanması bazı K kanal tiplerinin daha fazla ekprese olmasını gereklidir (Marino ve ark., 1994). Modern moleküler genetik metodları kullanılarak yapılan çalışmalarda, kanserli ve normal hücrelerin çoğalmasında önemli iyon kanalları belirlenmiştir ve hücre çoğalmasında, kalsiyum, klor ve potasyum kanallarının aktivasyonu gösterilmiştir. (Pardo, 2004; Wonderlin ve Strobl, 1996; Kunzelmann, 2005; Arcangeli ve ark., 2012). Hücre döngüsü boyunca, mitozun tetiklenmesinde, hücrenin mitozu girişinde ve mitozun sürdürülmesinde bu kanalların aktif rol oynadığı gösterilmiştir (Wonderlin ve Strobl, 1996; Ouadid ve Ahidouch, 2008).

Hücre döngüsünün membran potansiyeli, farklı potasyum (K^+) kanalı izoformlarının oranı ve aktivasyonu tarafından düzenlenir. Kanser durumunda hücrenin membran yapısı, membran fonksiyonları, iyon konsantrasyonu, membran potansiyeli değişir. Özellikle potasyum iyon kanalları kanser hücrelerinde, farklı hücre döngüsü kontrol noktalarının düzenlenmesinde etkilidir. (Pardo ve ark., 2005) Bu nedenle, iyon akışı ve bunun sonucu olan voltaj gradyenti, kanserin anlaşılabilmesi ile bir hayli ilişkilidir (Levin, 2009; McCaig ve ark., 2009).

İyon kanallarının bazılarının ekspresyon düzeyinin tümör hücrelerinde değiştiği belirlenmiştir (Fiske, 2006; Schönherr, 2005). Potasyum kanallarının genetik veya farmasötik olarak bloklanması, kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılamıştır. Dahası potasyum kanallarının açılması çoğalma oranını arttırmıştır. Bu nedenle, kanser başlamasında ve tümör gelişiminde iyon akımının anlaşılması biyoloji ve tıp için oldukça önemlidir. Biyoelektrik kontrol noktalarından faydalanılarak, çoğalma ve

gelişimin iyonik kontrolünün iyi anlaşılması, kanserin engellenmesi, saptanması ve normalizasyonu için stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir ilerleme olacaktır.

Kanserli hücre membranında bulunan potasyum kanalları 4- aminopiridin (4-AP) vasıtasıyla baskılanabilir.



Resim 5. 4-Aminopiridin'in kimyasal yapısı.

4.4.4. Aminopiridin yapısı ve etki mekanizması

4-Aminopiridin (4-AP), kimyasal formülü $C_5H_4 =N-NH_2$ olan piridin türevli monoamino grubuna ait izomerik piridin aminlerden biridir (Resim 5). 4-AP, klinik denemelerde kullanılan ilk aminopiridindir. K kanallarını bloklar ve böylece sinir uçlarından asetil kolin salınımını artırır. Merkezi sinir sisteminde uyarıcı etkisi ve vazopresör aktivitesi gibi farmakolojik özellikleri 1924'te Dohrn tarafından tanımlanmıştır (Dohrn, 1924). 4-AP, depolarize olmayan kasların rahatlaması, myasthenia gravis, Eaton Lambert sendromu ve botulizm gibi bir çok durumda ve analeptik olarak klinikte kullanılmaktadır. Anti konvülzan aktivitesinin mekanizmasının aydınlatılması için bir dizi elektrofizyolojik çalışma yapılmış ve periferik sinirlerin uyarılabilirliğini arttırdığı ve uyarılabilir membranlarda seçici olarak K kanallarını blokladığı gözlemlenmiştir (Glover, 1982; Pelhate ve Pichon, 1974). K kanalları üzerinde aktivitesinin direkt sonuçlarından biri repolarizasyonu

geciktirmektir ve uzatılmış aksiyon potansiyeli süresince presinaptik sinir uçlarından kalsiyum girişini kolaylaştırarak transmitter salınımını arttırmaktır. Bunlara ek olarak 4-AP'nin, hücre içi Ca^{+2} depolarından veya membrandan Ca^{+2} salınımını kolaylaştırmada da direk etkileri mevcuttur (Glover, 1982).

Tüm canlı organizmalarda, iyonların hücre membranları boyunca taşınmasını düzenlemek için iyon kanallarını kullanılmaktadır. Bazı iyon kanalları voltaj bağımlı olarak sınıflandırılır, V_{mem} 'deki değişikliklere yanıt olarak açılacak şekilde voltaj algılayıcı bir yapıya sahiptirler (Ruta ve ark., 2003). Voltaj bağımlı K^+ kanalları, V_{mem} 'deki değişikliklere tepki olarak iyon iletimini sağlayan ve buna izin veren voltaj bağımlı katyon (K^+ , Na^+ ve Ca^{+2}) kanallarının üyeleridir.

Membran yüzeyi boyunca elektrik yükünün değişmesi, patolojik durumlarda olduğu kadar fizyolojik olarak hücrel homeostaziyi korumak için gereklidir. İyon kanallarının açılması, K^+ , Ca^{+2} , Cl^- , Na^+ gibi iyonların difüzyonuna izin verdiği için membran yüzeyi boyunca yük dağılımını değiştirir (Jiang ve ark., 2003). Geleneksel olarak, voltaj kapılı iyon kanallarının (Voltage gated ion channel; VGIC), aksiyon potansiyeli ve / veya kas kasılması dahil olmak üzere hızlı biyoelektrik sinyallemenin kontrol edilmesinde temel işlevleri olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, birkaç araştırma, bu protein sınıflarının mitozun biyokimyasal sinyal iletimine, hücre döngüsü ilerlemesine ve hücre hacmi düzenlemesine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Tüm bu fonksiyonlar kanser hücresi çoğalması için kritik öneme sahiptir. Farklı kanser dokularında anormal şekilde eksprese edilen birkaç voltaj kapılı katyon kanalının (Voltage gated cation channel; VGCC) sağlıklı eşdeğer dokularda bulunmadığı gösterilmiştir.

Voltaj kapılı potasyum kanalları (VGPC; K_v) seçici olarak potasyum ileten, geçit ve sensör veya toksin bağlayıcı bölge de dahil olmak üzere çeşitli bölgelerden oluşan heteromultimerik proteinlerdir. VGPC'ler çeşitli fizyolojik fonksiyonlara katkıda bulunurlar ve çeşitli tümör tiplerinde farklı oranlarda eksprese edilirler. Kalsiyum ile aktive edilen K kanalları (KCa) ve ATP'ye duyarlı K kanalları ($KATP$) dahil olmak üzere çeşitli tiplerde potasyum kanallarının, çeşitli hücre tiplerinde, özellikle tümör

hücrelerinde ekspresyon seviyelerinde değişim olduğu gösterilmiştir (Huang ve Jan, 2014.). VGPC'lerin aşırı ekspresyonu, tümörigenez ile ilişkilidir. Kanıtlanmış onkojenik potansiyeli olan ilk iyon kanalı Kv10.1 veya eater-go-go 1 (Eag 1) olup, çeşitli türde insan tümör biyopsilerinin yaklaşık %70'inde saptanmıştır. Ayrıca VGPC'ler çeşitli kanserlerde apoptoz, proliferasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastazı düzenlediği gösterilmiştir (Morokuma ve ark., 2008; Stringer ve ark., 2001).

Belirli voltaj kapılı K kanallarının ekspresyonu ve aktivitesinin hem sağlıklı hem de kanser hücrelerinde hücre döngüleri boyunca farklı olarak düzenlendiği gösterilmiştir. Örneğin, Kv1.3, Kv10.1 (EAG1), Kv10.2 veya Kv11.1 (HERG) K kanallarını içeren Kv kanal yoğunluğundaki artışın, M ve G1 geçişine, geçici bir repolarizasyon ile katkıda bulunduğu ve S ve G2 fazları süresince kanal aktivitesinde bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. (Rao ve ark., 2015).

4-AP'nin anti kanser aktivitesi voltaj kapılı K kanallarını inhibe ettiği ve hücre içine Ca^{+2} girişi ile bağlantılı olduğu için daha dikkat çekici hale gelmiştir. 4-aminopiridinin çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda kritik pro-apoptotik özellikleri tanımlanmıştır (Wang ve ark., 2011). Nöroblastoma, Schwann, insan melanoma ve malin astrositoma hücrelerinde çoğalmayı inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Rouzaire Duoıs ve ark., 1993; Fieber ve ark., 2003; Nilius ve Wohlrab, 1992; Rybalchenko ve ark., 2001; Chin ve ark., 1997).

Yapılan çalışmalarda 4-AP'nin Ca^{+2} ve apoptoz ile ilişkisi gösterilmiştir, 4-AP'nin geçici olarak hücre içi Ca^{+2} artışına neden olarak hücre ölümünde aracı görev aldığı, membran potansiyeli değişimi ile seçici olmayan katyon kanalları (NSCC) vasıtasıyla Ca^{+2} ' un hücre içine girişini arttırarak insan hepatoblastoma HepG2 hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Guse ve ark., 1994; Kim ve ark., 2000; Cabado ve ark., 2000).

Meme kanseri tedavisi olarak VGPC inhibitörlerinin test edilmesi, meme kanseri kemoterapötik ilaçlarının kanser tedavisi sırasında VPGC'lerin aktivitesini inhibe ettiği gözlemiyle motive olmuştur. VGPC inhibitörleri potasyum kanallarının

aktivitesini bloke eder ve böylece fizyolojik fonksiyonları da inhibe ederler. (Wonderlin ve ark., 1995; Öner ve ark., 2018).

2000'li yılların sonlarından bu yana, biriken bu kanıtlar, Kv kanallarının, çeşitli kanser türlerinin başlamasında, çoğalmasında ve kötü huylu şekilde ilerlemesinde önemli rol oynadığını ve Kv kanal blokerlerinin, hücre çoğalmasını önlediği ve kanser hücrelerinde apoptozu uyardığını göstermiştir (Ru ve ark.,2018).

4.5. Tamamlayıcı ve Alternatif Tıpta Ökse Otu

Tamamlayıcı ve alternatif tıp (complementary and alternative medicine: CAM), tıp'ın kavramsal çerçevesini çeşitlendirerek, temel tıptı tamamlayan teşhis, tedavi veya önlem olarak tanımlanmıştır (Büssing ve ark.,1999; Caaveiro ve ark.,1998; Mansky ve Wallerstedt, 2006; Ernst ve ark., 1995). Tamamlayıcı ve alternatif tıp geleneksel olmayan terapötik yaklaşımların toplamından oluşur, geleneksel tedavilere ek olarak veya geleneksel tedavi yerine kullanılabilir. Fitoterapi bitki ekstraktları kullanılarak yapılan, zerdeçal, resveratrol, kalendula gibi çok sayıda bitki türünün kullanıldığı bir yöntemdir. Tedavi edici özelliği olan bitkiler, klasik tedavi ile kombine edilerek, hayat kalitesini iyileştirici destek tedavi olarak kullanılmaktadırlar. Fitoterapi, tümör patolojisinde, inflamasyon tedavisinde ve özellikle çoklu biyolojik yolak hedeflenmesinde umut vaat eden yaklaşımlardan biridir. Fitoterapinin en önemli avantajlarından biri de sağlıklı dokuya etki etmemesidir (Pushpa, 2013). Fitoterapötikler evde ve klinikte başarılı bir şekilde kullanılmasına rağmen, etki mekanizması araştırmaları hala aktif olarak devam etmektedir. Meme kanseri hastalarında ağrıyı azaltmak ve kemoterapik ilaçların yan etkilerini hafifletmek amacıyla, kanser tedavisinin önemli bölümlerinden biri olarak kullanılmakta ve geliştirilmektedir (Gerber ve ark., 2006; Cui ve ark., 2004).

Hem meme kanserinde hem de mesane, prostat gibi diğer kanser türlerinde kullanılan ve Avrupada ticari olarak üretilip piyasaya sürülen bir bitki de ökse otudur (VA, Viscum Album).



Resim 6. Ökse otu.

Yan etkilerinin çok az olması ve bu yan etkilerin hayatı tehdit etmemesi açısından, özellikle meme kanseri tedavisi için ökse otu özütünün kullanılması üzerine yapılan çalışmalar devam etmektedir (Büssing, 2000; Hutt ve ark., 2000).

Ökse otu odunsu bitkilerin yan parazit bir bitkisi olup 50 cm. kadar boylanabilen tohumla çoğalan semi-parazitik bir bitkidir (Resim 6) (Özer ve ark.,1999). Ökse otu, Avrupanın geleneksel bitkisel kaynaklı ilacıdır, yaygın olarak Avrupa ökseotu olarak bilinir (European mistletoe), ayrıca Batı ve Güney Asyada da bulunur. Simbiyotik olarak çam, elma, meşe, karaağaç vb. gibi çeşitli konak bitkilerde yaşar. Bu bitkinin tamamı bitki ekstraktı olarak standardize edilir ve mistletoe lektin, viskotoksin, ve ayrıca çeşitli enzim, peptit, aminoasit, tiol, amin, polisakkarit, siklitol, lipid, fitosterol, triterpen, flavonoid, fenilpropan ve mineral içerir. Ticari olarak Iscador adıyla piyasada bulunmaktadır.

Viscum Album antik çağlardan beri yüzyıllardır Avrupada hipertansiyon, epilepsi, yorgunluk, anksiyeti, artrit ve eklemlerdeki dejeneratif inflamasyon gibi çeşitli hastalıkların tedavisine kullanılmaktadır. Günümüzde Alman ve İsviçreli araştırmacılar VA preparatlarını klinikte kullanmaktadır. VA preparatları, ameliyat,

kemoterapi ve radyoterapi ile beraber kullanıldığında kanser hastalarının hayat kalitesini arttırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Bar-Sela, 2011).

4.5.1. Ökse otu preparatlarının içeriği

Ökse otu preparatları çok sayıda biyolojik olarak aktif bileşen içermektedir. Fakat bu bileşenler, ekstratın işlenmiş veya işlenmemiş olmasına göre, ökse otunun konak bitkisine ve toplanma zamanına göre farklılık göstermektedir. Hücre kültüründe ve hayvan modeli araştırmalarında iki anahtar bileşen belirlenmiştir; viscumin (mistletoe lektin, ML) ve viskotoksin.

4.5.1.1. Viskotoksin

Viskotoksinler alfa ve beta Thionin ailesine ait, oldukça basit sisteinden zengin, ökse otunun kökünden ve yapraklarından elde edilen ve 45- 47 amino asit dizisinden oluşan katyonik peptidlerdir. Polipeptit zincirleri üç veya dört disülfid bağıyla bağlıdır ve bu bağlar hayli korunmuş yapılardır. Bu sayede kompakt ve kararlıdır. Yüksek kararlılığı sayesinde ısı ve proteaz bulunan durumlara karşı koyabilmektedir. Viskotoksin içeriği konak ağaca göre %0.05- 0.1 arasında değişiklik gösterir. Viskotoksinlerin 3 boyutlu yapılarının araştırılması ile spesifik fosfat bağlanma bölgesi saptanmıştır. Fosfat bağlanma bölgesi ve amfipatik yapısı sayesinde hücre membranının içine girerek ve membran bütünlüğünü bozarak ökaryotik hücrelerde sitotoksisite geliştirir.

Viskotoksinlerin aminoasit dizileri, disülfid köprülerinin düzeni ve dağılımında gösterdiği farklılıklardan kaynaklanan A1, A2, A3, B, 1-PS, U-PS olmak üzere altı izoformu tanımlanmıştır. Sitotoksik etkileri en fazla ve en az olan tipleri sırasıyla Viskotoksin A3 (VtA3) ve Viskotoksin B (VtB) dir. VtA3 ve VtB arasındaki toksik etki farkının amino asit dizilerindeki ve üç boyutlu yapılarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir (Büssing ve ark., 1999). Ayrıca viskotoksinlerin gösterdiği sitotoksik etki kanser hücre soyu çeşidine göre de farklılık göstermektedir. Viskotoksinlerin fonksiyonlarının anlaşılabilmesi için, thioninlerin model membranlar ve plazma membranı ile etkileşiminin spesifik mekanizmasının

belirlenmesi büyük önem taşır. Hem model membranlarda hem de hücre plazma membranlarında yapılan thionin toksisite çalışmalarında, pozitif yüklü proteinler ile negatif yüklü fosfolipidlerin etkileşimlerinin elektrostatik olduğu gözlemlenmiştir (Caaveiro ve ark., 1998; Huang ve ark., 1997; Wang ve ark., 1993; Wilson ve ark., 1997). Kanser hücrelerinin membranlarının dış yüzeyinde, negatif yüklü fosfatidilserin ekspresyonu artar. Bu nedenle, normal ökaryotik hücrelere kıyasla kanser hücrelerinin dış yüzeyi daha yüksek net negatif yük taşır (Mader ve Hoskin, 2006; Chavakis ve ark., 2004). Bu durum, kanser hücresine seçici bağlanma açısından, net +6 pozitif yüke sahip viskotoksin A3 için ayrıcalık sağlar (Büssing ve ark., 1998; Schaller ve ark., 1996).

Membran ile viskotoksin etkileşimleri iki adımda gerçekleşir. Bu adımlardan ilki, viskotoksinin pozitif yüklü hidrofilik bölgesinin dış tabakasında negatif yük miktarı artmış olan kanser hücresi membranı ile elektrostatik etkileşimidir. Bu elektrostatik etkileşimden sonra, ikinci adım, viskotoksinin hidrofobik bölgesinin, membran fosfolipidlerinin arasına girmesi ile membran bütünlüğünün ve membran yapısının değişimidir (Büssing ve ark., 1999; Caaveiro ve ark., 1998). Düşük konsantrasyonlarda viskotoksinler, membrana bağlanır ve iyon kanalı formu veya gözenek oluştururlar. Yüksek konsantrasyonlarda ise direk olarak membran yıkımı gerçekleştirirler. Dahası, viskotoksinlerin hücre ile etkileşimi, H_2O_2 üretimi ve Ca^{+2} konsantrasyonunda artış gibi etkilere sebep olur. Viskotoksinlerin, lenfoma hücrelerinde nekrozu indüklediği, granulositlerde güçlü immunomodülatör etki yaptığı, tümör hücrelerinin doğal öldürücü hücre (natural killer cell; NK) aracılı ölümünü arttırdığı gösterilmiştir (Thevissen ve ark., 1996; Tabiasco ve ark., 2002).

Belirtilen bu nedenlerle, Viskotoksinin hücre membranının geçirgenliğini arttırarak paklitakselin etkisinin arttırılacağı düşünülmüş ve PTX ile beraber Iscador A kullanılmıştır. Iscador A viskotoksin içeriği en yüksek olan ökseotu preparatıdır. (Urech ve ark., 2006).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Kullanılan malzemeler ve cihazlar

Hücreler DMEM, FBS, antibiyotik (penisilin, streptomisin) ve 2 mM L-glutamin içeren ortamda büyütüldü (Capricorn). Hücrelerin çoğaltılması ve ilaçlarla inkübasyonu CO₂ etüvde (Binder) sağlandı. Kullanılan PTX, 4-AP ve DMSO Sigma Aldrich sağlayıcısından alındı. Viskotoksin A3 deneyleri için kullanılan ökse otu özütü “Iscador A” Sayın Prof. Dr. Konrad Urech tarafından sağlanmıştır. Sitotoksosite için kullanılması planlanan MTT ve AB Thermo Fisher sağlayıcısından alındı. Fura-2 , Dibac4(3), PBFI-AM potasyum belirteci, Apopnixin FITC apoptosis detection kit, RNase A, PI AAT Bioquest sağlayıcısından alındı. Absorbans ve spektrofotometre ölçümleri Synergy H1 Elisa (Biotek) cihazı kullanılarak alındı. Akış sitometresi ölçümleri Genetik ve Metabolik Hastalıkları Araştırma Merkezi’nde (GEMHAM) BD FACS Calibur cihazı kullanılarak alındı.

5.1.2. Hücre hatları

Çalışmada L929 (ATCC CCL-1) sağlıklı hücre hattı kontrol olarak, MCF7 (ATCC HTB- 22) ve MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) hücre hatları deney grubu olarak kullanıldı. Çalışmalarda kontrol hücresi olarak MCF- 10A hücre hatının kullanılması hedeflenmiştir fakat hem maddi imkansızlıklar hem de hücre hattının sağlıklı olarak büyütülmesi sağlanamadığı için MCF- 10A yerine, L929 hücre hattı kontrol olarak kullanılmıştır. L929 hücre hattı farelerden elde edilen sağlıklı fibroblast hücresidir. MCF7 hücreleri, meme kanserinin metastaz yaptığı plevral efüzyondan elde edilen, östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hücreleridir. MDA-MB-231 hücreleri, meme kanserinin metastaz yaptığı plevral efüzyondan elde edilen üçlü negatif meme kanseri hücreleridir. Çalışmalarda deney grubuna MDA-MB-435 (ATCC HTB-129) hücrelerinin dahil edilmesi planlanmış fakat MDA-MB-435 hücreleri ilk başta

metastatik bölgeden türeyen meme kanseri olarak adlandırılmış olmasına rağmen daha sonra yapılan genetik araştırmalarda melanoma hücresi olduğu belirlenmiştir (Ellison ve ark., 2002). Bu nedenle bu hücreler çalışmalara dahil edilmemiştir.

5.2. Yöntemler

5.2.1. Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan bütün hücre hatları %10 FBS, %1 antibiyotik (penisilin, streptomisin) ve 2 mM L-glutamin içeren DMEM besiyerinde, 37⁰ C’de %5 CO₂ içeren etüv içerisinde çoğaltıldı. -80⁰ C stoktan açılan hücreler ilk olarak 25 cm²’lik hücre kültürü kaplarında büyütüldü. Yeterli çoğalma sağlandığında hücreler 75 cm²’lik hücre kültürü kaplarına alındı ve deneyler için büyütüldü. Pasajlama için hücreler 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra tripsin ve EDTA eklendi, 37⁰ C de 5 dakika inkübe edildi. Inkübasyondan sonra yüzeyden kalkan hücrelere tripsin aktivitesini inhibe etmek için FBS içeren besiyeri eklendi ve 15 ml’lik santrifüj tüplerine alınarak 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek çökmeleri sağlandı. Santrifüjden sonra, tüplerden üst sıvı atıldı, hücre peletine 1 ml besiyeri eklendi. Homojen dağılım sağlanana kadar pelet pipetaj ile karıştırıldı. Daha sonra 10 ul hücre ile 10 ul tripan mavisi karıştırıldı ve hücreler hemositometre kullanılarak mikroskop altında sayıldı.

5.2.2. İlaç çözeltilerinin hazırlanması

Toz halinde satın alınan PTX ve 4-AP DMSO’da çözüldü. Hücre kültüründe kullanılacak olan ilaçların DMSO konsantrasyonunu düşürmek için hazırlanan stok çözeltiler besiyeri ile seyreltildi. Konsantrasyon değerleri molarite (M) olarak hesaplandı. VtA3 denemeleri için öncelikle mayadan sentezlenen VtA3 alındı. Çalışmalar sırasında VtA3 uygulamasından sonra hücre kültüründe maya üremesi sebebiyle VtA3 çalışmaları durduruldu. Tekrar mayadan sentezlenen VtA3 alınması mali açıdan çok fazla yük getirmesi sebebiyle tercih edilmedi. İsviçreden Prof. Dr. Konrad Urech ile irtibata geçildi ve VtA3 içeriği en yüksek olan Iscador çeşidi ile ilgili bilgi alındı ve çalışma için en uygun olan Iscador Abietis (Isc A) Sayın Urech tarafından ücretsiz olarak sağlandı.

5.2.3. Sitotoksosite

Sitotoksosite çalışmalarında başlangıçta 2 farklı yöntem kullanıldı; MTT (MTT açılımı), Alamar mavisi (AB). Çalışmada kullanılan 2 ayrı yöntemin farklı sebepler ile hatalı sonuçlar vermesi nedeniyle canlılık mikroskop altında tripan mavisi yöntemi ile hemositometre kullanılarak hücre sayımı ile tespit edildi. Hemositometrede canlılığın belirlenmesi için hücreler 6 kuyucuklu tabakalara her kuyuda 3 ml besiyerinde 1.8×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Farklı konsantrasyonlarda ayrı ayrı PTX, 4-AP ve Iscador A ile inkübe edildi (%5 CO₂, 37⁰ C). Inkübasyonun ardından hücrelerin üzerinden ilaç içeren besiyeri atıldı ve hücreler kaldırılarak mikroskop altında sayıldı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. İlaçlar çözülürken DMSO kullanılması nedeniyle deney grubu haricinde 2 adet kontrol grubu kullanıldı. Kontrol grubundan birinde %0.1 DMSO içeren besiyer ile inkübasyon sağlandı ve %0.1 DMSO içeren ve içermeyen iki kontrol grubu arasında canlılıkta anlamlı bir fark saptanmadı. IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinin ardından ilaç kombinasyonları için canlılık belirlemeleri aynı yöntem ile mikroskop altında sayılarak yapıldı.

5.2.4. Apoptoz ölçümleri

Belirlenen PTX, 4-AP ve Iscador A değerlerinin kombinasyonları için akış sitometresinde apoptoz değerleri belirlendi. Apoptoz belirlemeleri Apopnecin FITC apoptosis detection kit ile yapıldı. Hücreler 6 kuyucuklu tabakalara 3 ml besiyerinde 1.8×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Her deney ve kontrol grubu için 3 kuyu ekildi. İlaçlarla inkübasyondan sonra hücreler tabakalardan kaldırıldı ve 5 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. Besiyerden arındırmak için 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından besiyeri atıldıktan sonra soğuk PBS ile hücreler 2 kez yıkandı. Yıkamanın ardından tüplere tekrar PBS eklendi ve PBS içerisindeki hücelere 2 ul Annexin V ve 3 ul PI eklendi, 15 dakika ile inkübasyonun ardından apoptoz ölçümleri alındı. Apoptoz ölçümleri BD FACS Calibur cihazı ile alındı. Sonuçlar Cell quest programı ile değerlendirildi. Apoptoz sonuçlarının istatistik değerlendirmesi

Graphpad Prism 7.0 programı ile one-way ANOVA yöntemi ile hesaplandı. Akış sitometresinde yapılan her analiz için GEMHAM'dan hizmet alımı yapıldı.

5.2.5. Hücre içi Potasyum Miktarının Belirlenmesi

Hücre içi potasyum miktarı potasyuma duyarlı PBFI-AM molekülü ile belirlendi. Toz olarak 1 mg'lık ambalaj halinde alınan PBFI-AM 1 ml DMSO'da çözüldü. Hazırlanan ana stoktan deneylerde kullanılmak üzere daha düşük konsantrasyonlarda stok çözelti hazırlandı. DMSO miktarını azaltmak için düşük konsantrasyonlu stok çözelti HBSS' de hazırlandı. Potasyum belirlemeleri için hücreler 96 kuyucuklu siyah tabakaya, her kuyuda 100 μ L'de 50×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler yapışmaları için besiyerinde gece boyunca CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin yapışmalarının ardından kuyulara ilaçlar eklendi ve 24 saat CO₂ etüvde inkübe edildi. Inkübasyonun ardından kuyulardan ilaçlı besiyeri atıldı, besiyerinden arındırmak için 2 kez HBSS ile yıkandı. Yıkamanın ardından HBSS içinde 5 μ M olacak şekilde PBFI-AM eklendi ve 1 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası boyanın fazlasından kurtulmak için kuyular 2 kez HBSS ile yıkandı ve kuyulara 100 μ L temiz HBSS eklendi ve ölçüm HBSS ortamında alındı. Floresan ölçümleri ex/em: 340/505 nm dalga boylarında alındı.

5.2.6. Hücre içi kalsiyum değişiminin belirlenmesi

Hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunda meydana gelen değişimler Screen Quest FURA-2 no wash calcium assay kit ile belirlendi. Kit içeriğinde gelen Fura-2 200 μ L DMSO da çözüldü. 20 μ L Fura-2 solüsyonu 1 adet 96 kuyucuklu tabaka için yeterli olması nedeniyle Fura-2 stok solüsyonu küçük miktarlara bölünüp -20⁰ C ye kaldırıldı. Analiz solüsyonu hazırlamak için 9 ml HHBS ve 1 ml Pluronik asit F127 karıştırıldı. Hazırlanan 10 ml'lik analiz solüsyonu ile 20 μ L Fura- 2 karıştırıldı. Karışımın stabil hale gelmesi için oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. 2 saatin sonunda besiyeri içinde bulunan serumun floresan sinyalinin etkilemesini engellemek için kuyulardan besiyeri alındı ve her kuyuya 100 μ L HHBS ve her kuyuya 100 μ L analiz solüsyonu karışımından eklendi. Boya eklendikten sonra 1 saat etüvde ve ardından

20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen hücrelerin hücre içi Ca^{+2} değişimleri floresan spektrofotometrede ex/em: 340/510 nm de ölçüldü. Floresan şiddetindeki değişimleri zamana bağlı olarak analiz etmek için ölçüm 15 dakika aralıklarla 24 saat boyunca alındı.

5.2.7. Membran potansiyeli

Membran potansiyeli ölçümleri Bis-(1,3- dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC4(3)) floresan boya kullanılarak spektrofotometre ile alındı. DiBAC4(3) stok çözeltisi spektroskopik DMSO da, konsantrasyon değeri 20 mM olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan stok çözelti tekrarlanan dondurma ve çözme işleminden kaçınmak için daha küçük miktarlara bölünüp - 20° C de saklandı. Hücreler 96 kuyucuklu siyah tabakaya her kuyuda 100 ul besiyerinde 50×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Yapışmaları için bir gece boyunca etüvde bekletildi. Besiyerinin yapacağı ışımadan kaçınmak için besiyer atıldı ve her kuyuya 100 ul HBSS eklendi. Besiyerinin değiştirilmesinin ardından ilaçlar ve kombinasyonları eklendi ve 2 saat inkübe edildi. Inkübasyonun ardından 20 mM ana stoktan 1 ml HBSS te 2 uM lık çalışma solüsyonu hazırlandı. 2 uM lık solüsyondan her kuyuya 100 ul eklendi 30 dakika etüvde inkübe edildi. Inkübasyonun ardından boya fazlalığından hücrelerin arındırılması için tabaka 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve kuyularda solüsyonun tamamı atıldı. Her kuyuya boya içermeyen HBSS eklendi ve eksitasyon dalga boyu 540 nm, emisyon dalga boyu 590 nm (ex/em: 540/590 nm) de floresan şiddeti ölçümleri zamana bağlı olarak 30 dakikalık aralıklarda 24 saat boyunca alındı.

5.2.8. Hücre döngüsü analizleri

Kombine ilaç uygulamasının ardından hücre döngüsünde meydana gelen bloklanmaların saptanması için akış sitometresinde RNase A ve PI kullanılarak hücre döngüsü analizleri yapıldı. Hücreler kombine ilaç uygulamasından bir gün önce 6 kuyucuklu tabakalara her kuyuda 3 ml besiyeri içinde 1.8×10^5 hücre olacak şekilde ekildi, yapışmaları için bir gece boyunca CO2 etüve bırakıldı. 4-AP + PTX

ve Isc A+ 4-AP+ PTX kombinasyonları kuyulara eklendi ve 24 saat CO₂ etüvde inkübe edildi. Inkübasyonun ardından hücreler %70'lik etanol kullanılarak sabitlendi ve 12 saat -20° C de bekletildi. Sabitlemenin ardından 2 kez PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından 100 ug/ml RNase içeren PBS ile 30 dakika 37° C' de inkübe edildi. Hücre içi DNA'yı işaretleme için 50 ug/ml PI ile boyandı. Ölçümler BD FACS Calibur akış sitometresinde alındı, analizler Cell Quest yazılımı kullanılarak yapıldı.

5.2.9. İstatistiksel analiz

Yapılan deneylerin istatistiki değerlendirmeleri GraphPad Prism 7.0 programı kullanılarak yapıldı. Kullanılan değişken sayısına bağlı olarak ANOVA istatistik yöntemleri kullanıldı. Her deney en az 4 kez tekrarlandı. P değeri < 0.005 olan değerler anlamlı kabul edildi.

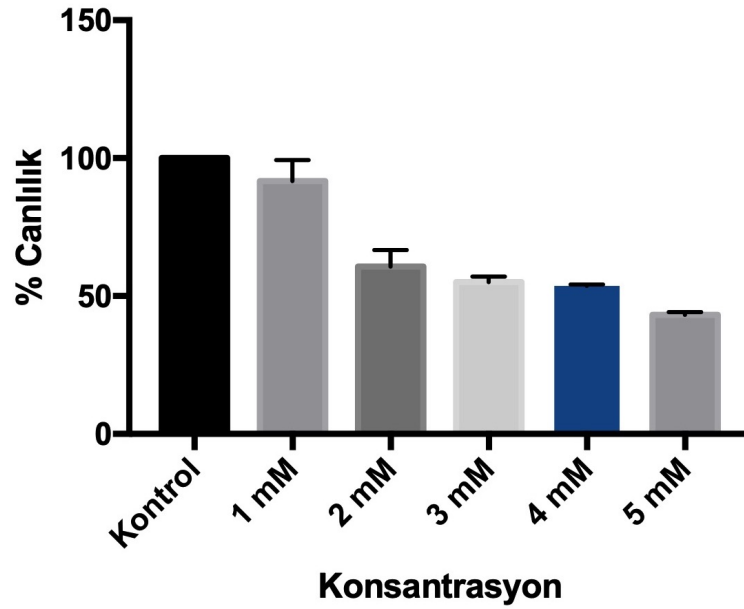
6. BULGULAR

6.1. IC₅₀ Belirlemeleri ve Sitotoksosite Sonuçları

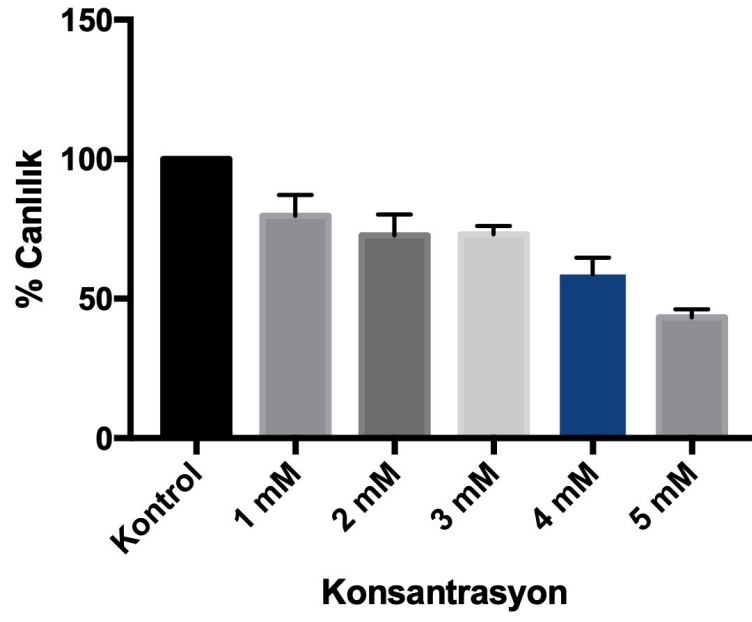
İlaç uygulaması ardından canlılık belirlemelerine ilk olarak PTX ve 4-AP nin hücre canlılığı üzerine etkileri incelenerek başlandı. Hücre canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi için sırasıyla MTT ve AB yöntemleri kullanıldı. MTT testi tetrazolyum bileşikler içeren test sınıfında yer alır. Tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenir ve formazan yapısına dönüşmeleri ile renk değişimine uğrarlar. Tetrazolyum halkası sadece aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve renk değişimi sadece canlı hücreler tarafından gerçekleştirilir (Tokur ve Aksoy, 2017). Bu mekanizmaya dayanarak üretilen MTT testinin kullanımı başlangıçta uygun bir yöntem olarak gözüktü de yapılan deneylerde hatalı pozitif sonuç verdiği saptandı. Yapılan literatür taramalarında 4-AP ve PTX' in hücrede reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa neden olması sebebiyle apoptoz sürecinde yada canlı hücrelerde artan ROS nedeniyle tetrazolyum halkasının daha hızlı kırılmasına yol açtığı belirlendi. Hatalı sonuçların bir diğer nedeninin PTX'in MTT sinyalini bozmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Ulukaya ve ark., 2008).

MTT testinden hatalı sonuç elde edilmesinin ardından deneylere AB yöntemi ile devam edildi. AB testi, resazurin adlı bileşiğin canlı hücreler tarafından resorufin bileşiğine dönüştürülmesi esasına dayanır, ölü hücreler metabolik olarak aktif olmadıkları için resazurin de form değişimine neden olmazlar (Tokur ve Aksoy, 2017). Yapılan AB testlerinde de hatalı sonuçlar ile karşılaşıldı. Hatalı sonuçların nedeninin MTT testinde olduğu gibi, kullanılan her iki ajanında ROS aktivitesinde artışa neden olmasından kaynaklandığı literatür taraması sayesinde saptandı. Bu nedenle, canlılık belirlemelerinin tripan mavisi metoduyla hemositometrede hücre sayımı ile yapılmasına karar verildi.

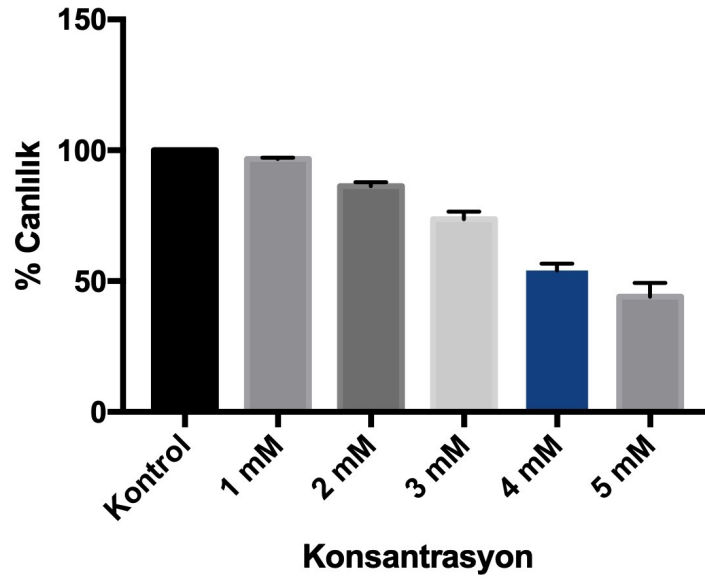
4-AP'nin IC₅₀ değerlerini belirlenmesinde ilk olarak literatür taraması yapıldı ve konsantrasyon aralıkları 1-5 mM olarak seçildi. Deneyler her hücre hattı için n= 5 olacak şekilde tekrar edildi. Belirlenen konsantrasyon değerleri ile 24 saat inkübasyonun ardından yapılan canlılık belirlemelerinin sonuçları Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3 de gösterilmektedir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için 4-AP 'nin IC₅₀ değeri 4 mM, L929 için 5 mM olarak saptandı. Kontrol hücresinin IC₅₀ değerinin daha yüksek olması nedeniyle kombinasyon denemeleri için 4-AP'nin konsantrasyon değeri 4 mM olarak seçildi.



Şekil 1. L929 4-AP Uygulaması

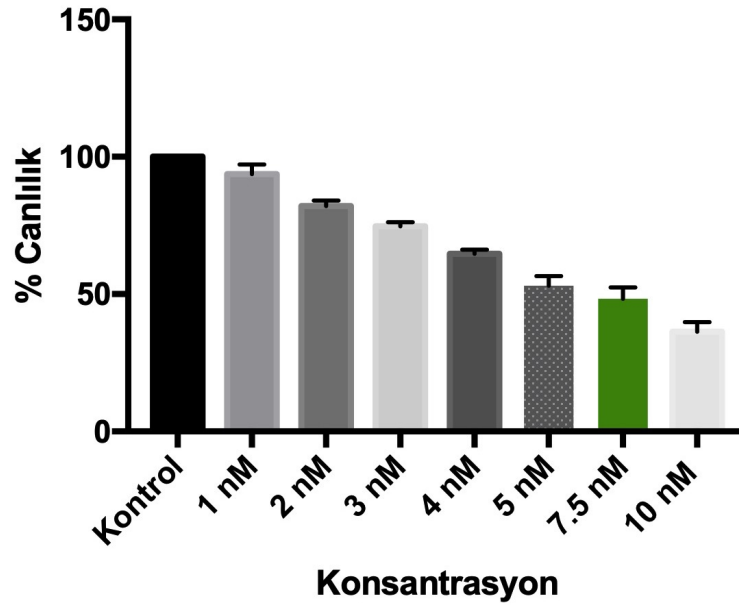


Şekil 2. MCF7 4-AP Uygulaması

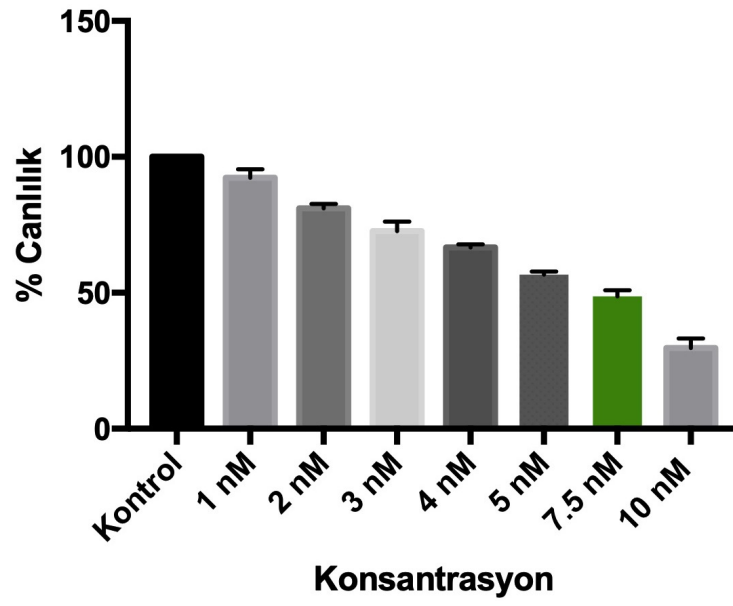


Şekil 3. MDA-MB 231 4-AP Uygulaması

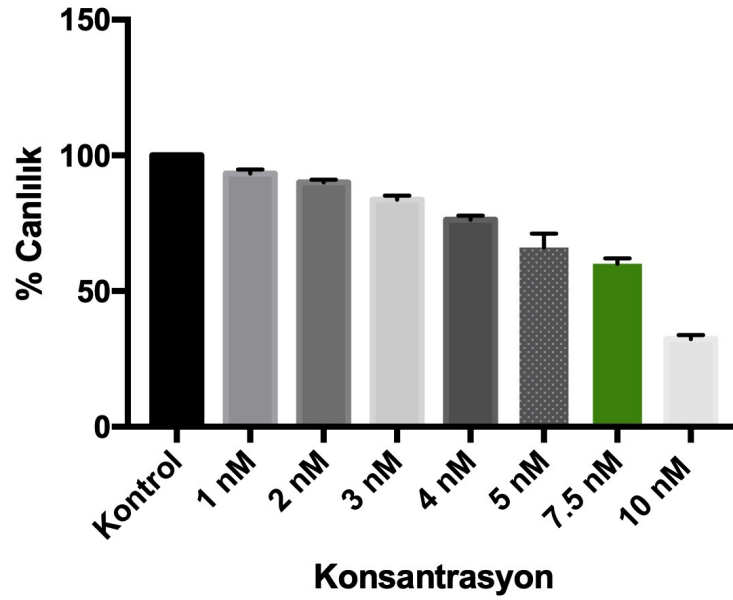
PTX in düşük doz kullanımı hedeflendiği için, PTX denemeleri için 1-10 nM konsantrasyon aralığı seçildi ve hücreler 24 saat süre ile belirlenen konsantrasyon değerlerinde PTX ile inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında hücreler sayılarak canlılık belirlemeleri yapıldı. MCF-7 ve L929 hücre hatları için PTX'in IC50 değeri 7.5 nM, MDA-MB-231 hücre hattı için 8 nM belirlendi. Kombinasyon deneyleri için 7.5 nM doz değeri seçildi (Şekil 4, 5, 6).



Şekil 4. L929 PTX Uygulaması

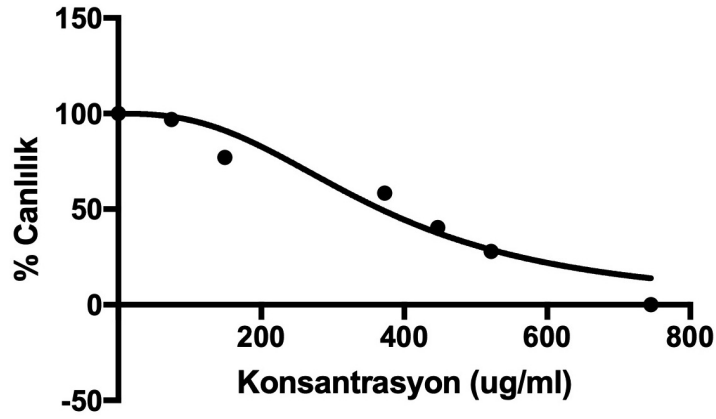


Şekil 5. MCF7 PTX Uygulaması

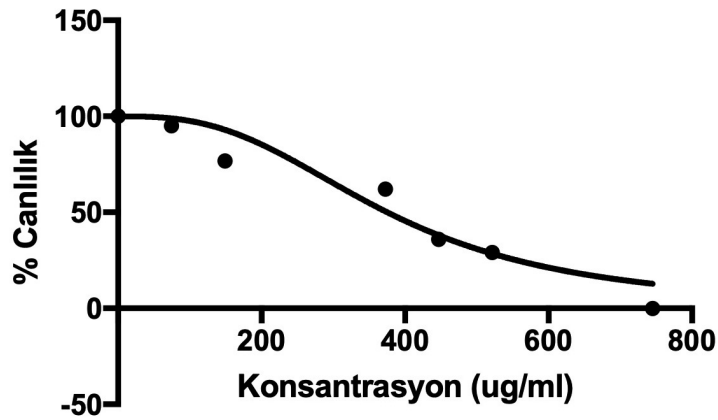


Şekil 6 MDA-MB 231 PTX Uygulaması

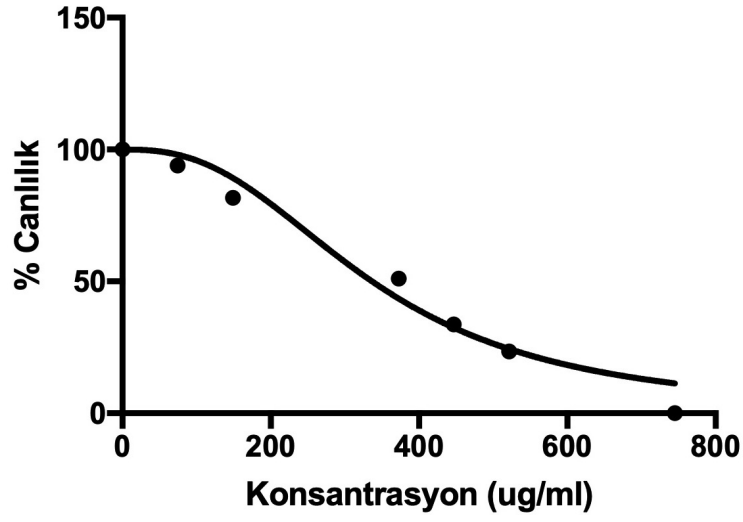
Viskotoksin A3 deneyleri için Iscador A (Isc A) kullanılmıştır. Isc A'nın viskotoksin A3 içeriği 74.5 mg/g olarak belirtilmektedir (Urech ve ark., 2006). Deneylerde kullanılacak konsantrasyon aralığı 74.5 ug/ml- 745 ug/ml olarak seçildi. L929 hücre hattı için IC50 değeri 386.9 ug/ml, MCF 7 hücre hattı için 381.8 ug/ml ve MDA MB 231 hücre hattı için IC50 değeri 244.7 ug/ml olarak belirlendi. Hesabın daha kolay yapılması ve yeteri miktarda Isc A özütünün sağlanması için kombinasyon denemelerinde 372.5 ug/ml değeri kullanılmak üzere seçildi (Şekil 7, 8, 9).



Şekil 7. L929 Isc A Uygulaması

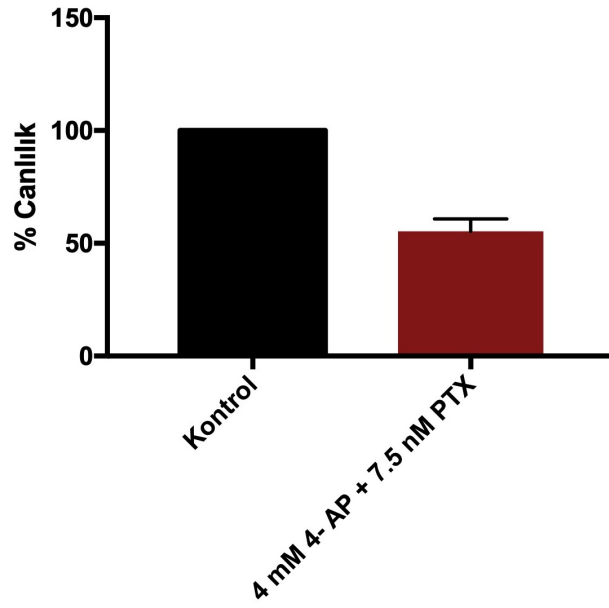


Şekil 8. MCF7 Isc A Uygulaması

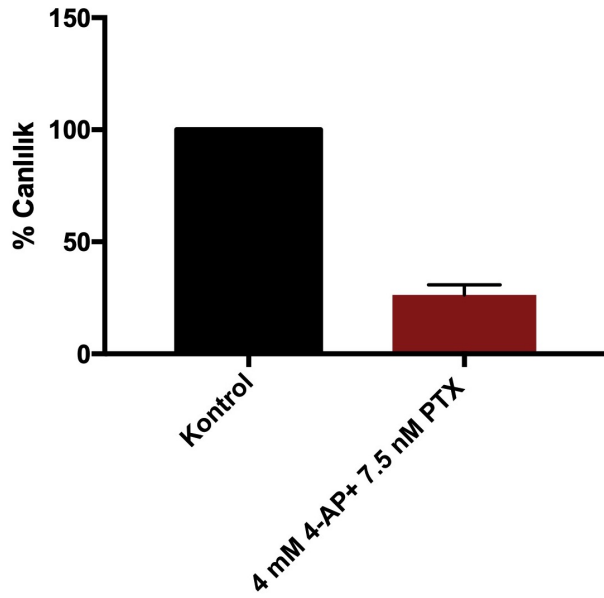


Şekil 9 MDA-MB 231 İsc A Uygulaması

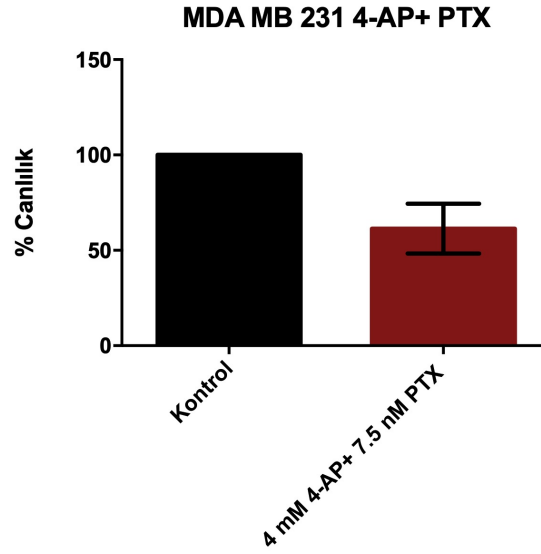
Belirlenen 4-AP konsantrasyonunun PTX aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için hücreler 24 saat boyunca 4 mM 4-AP ve 7.5 nM PTX'e maruz bırakılarak canlılık belirlenmeleri yapıldı. L929 hücre hattında 4-AP ve PTX in beraber kullanımı canlılıkta %45, MCF7 hücrelerinde %74, MDA-MB 231 hücrelerinde %60 azalmaya neden olduğu saptandı (Şekil 10, 11, 12).



Şekil 10. L929 24 saat 4-AP + PTX Uygulaması

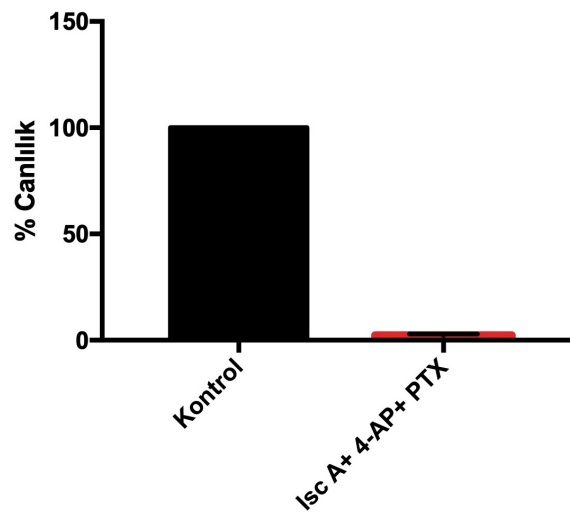


Şekil 11. MCF7 24 saat 4-AP + PTX Uygulaması

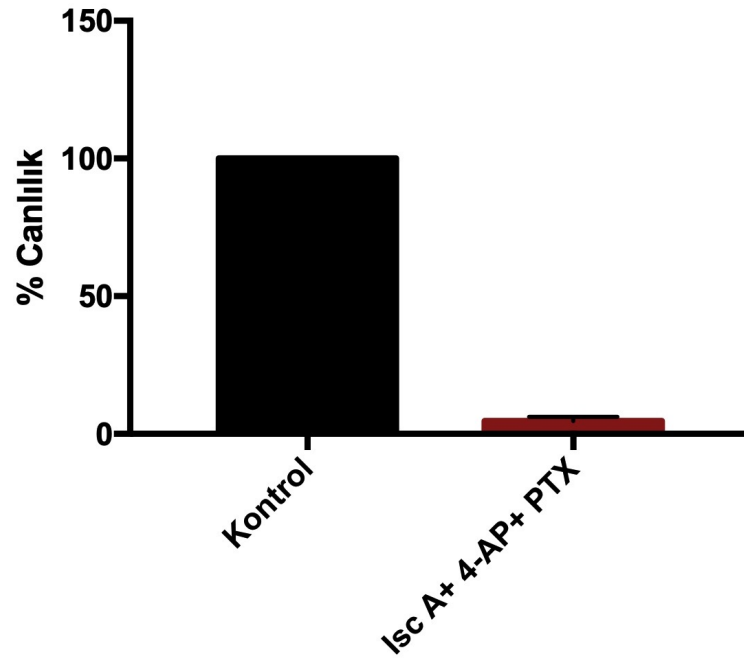


Şekil 12. MDA-MB 231 24 saat 4-AP + PTX Uygulaması.

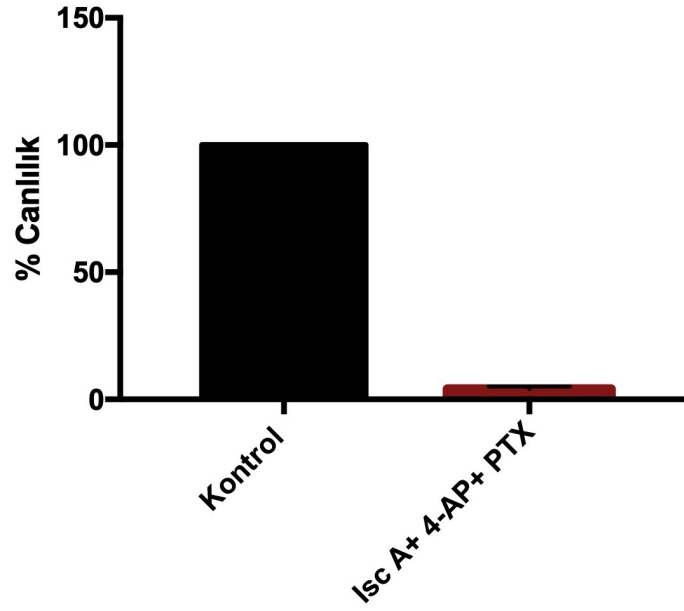
4-AP ve PTX'in beraber kullanımının hipoteze uygun sonuçlar vermesi nedeniyle bu iki ajanla beraber Isc A'nın kullanımının etkisinin belirlenmesi için hücreler belirtilen 3 ajanla birlikte 24 saat inkübe edildi. Inkübasyonun ardından her hücre hattı için canlılıkta yaklaşık olarak %95 azalma saptandı (Şekil 13, 14, 15).



Şekil 13. L929 Isc A + 4-AP + PTX Uygulaması



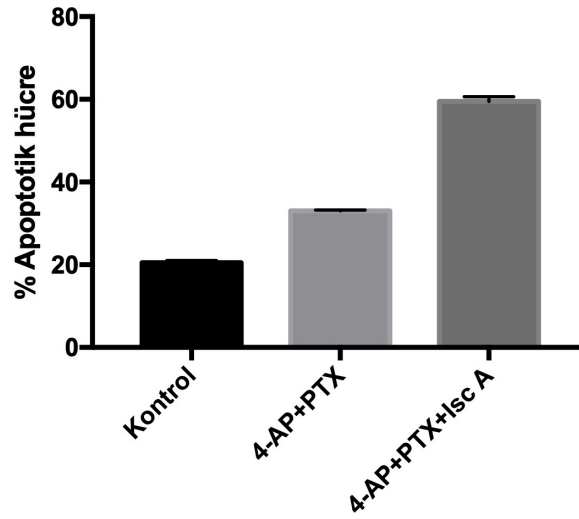
Şekil 14. MCF7 ISc A + 4-AP + PTX Uygulaması



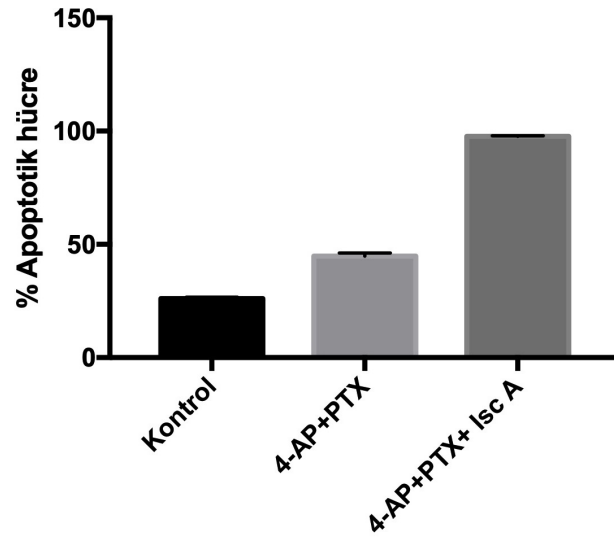
Şekil 15. MDA-MB 231 IScA + 4-AP + PTX Uygulaması

6.2. Apoptoz Belirlemeleri

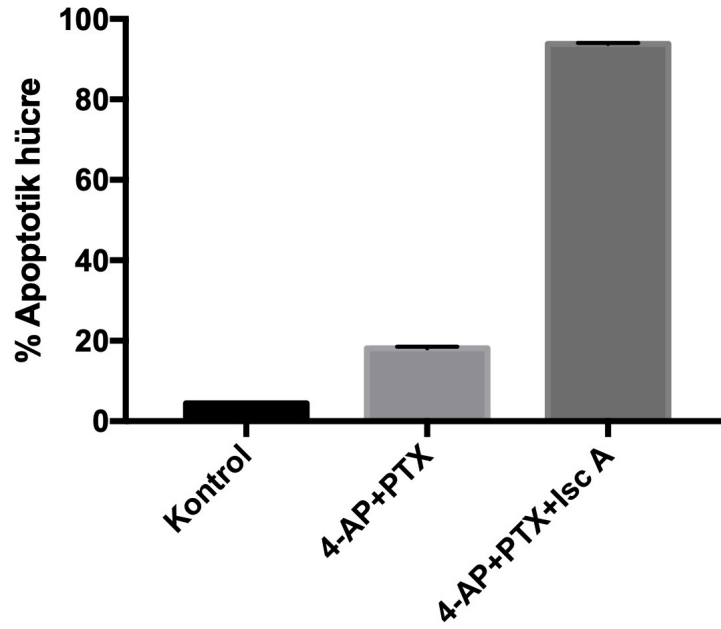
Kombine ilaç kullanımının neden olduğu hücre ölümünde apoptoz oranlarının belirlenmesi için Annexin V ve PI yöntemi ile akış sitometresinde apoptoz ölçümleri alındı. Elde edilen sonuçlar cell quest programı kullanılarak analiz edildi ve istatistiki değlendirmesi yapıldı. Sonuçlar % apoptotik hücre olarak Şekil 16, Şekil 17 ve Şekil 18 de gösterildi.



Şekil 16. L929 Apoptoz Değerleri



Şekil 17. MCF7 Apoptoz Değerleri



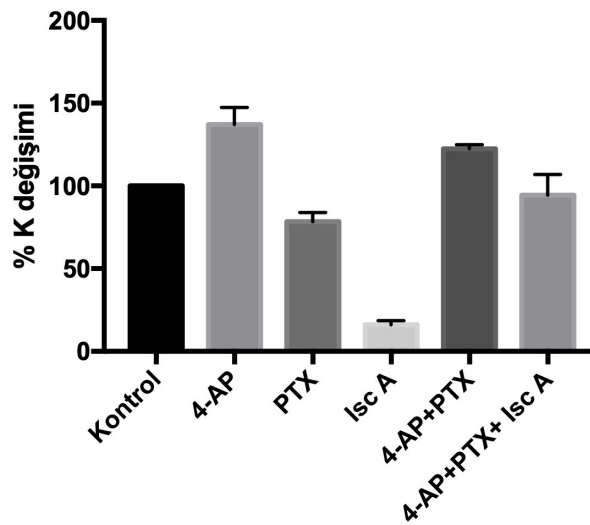
Şekil 18. MDA MB 231 Apoptoz Değerleri

4-AP ve PTX'in kombine kullanımının ardından L929, MCF7 ve MDA MB 231 hücrelerinde kontrole göre apoptotik hücre sayısında meydana gelen artış sırasıyla %33.5, %44.8 ve %18.5 olarak belirlendi.

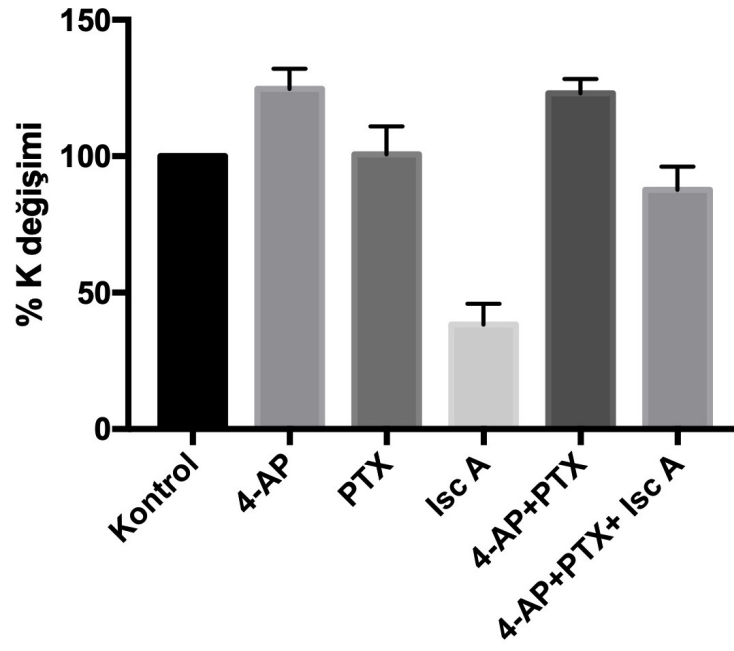
Isc A, 4-AP ve PTX'in kombine kullanımının ardından L929, MCF7 ve MDA MB 231 hücrelerinde kontrole göre apoptotik hücre sayısında meydana gelen artış sırasıyla %59.4, %97.7 ve %93.8 olarak belirlendi.

6.3. Hücre İçi K Değişiminin Belirlenmesi

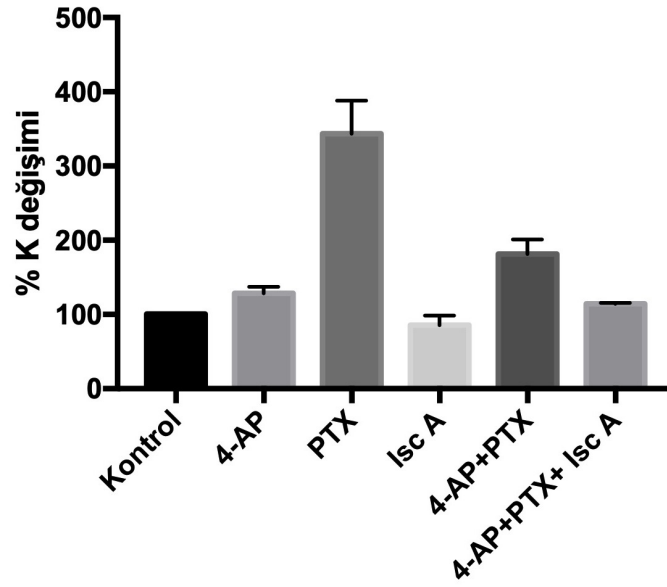
Ajanların ayrı ve kombine halde hücreler ile 24 saat inkübasyonu ardından floresan spektrofotometrede potasyum konsantrasyonu değişimleri PBFI-AM floresan boya kullanılarak belirlendi. L-929 hücre hattında tek başına 4-AP %37 artışa neden olurken PTX, Isc A ve Isc A+4-AP+PTX sırasıyla %22, %80 ve %6 azalmaya neden oldu. MCF-7 hücre hattında 4-AP ve 4-AP+PTX sırasıyla %24 ve %23 artışa neden olurken, PTX de değişim saptanmadı. Isc A ve IscA+4-AP+PTX uygulamalarında hücre içi K miktarında azalma sırasıyla %62 ve %13 olarak saptandı. MDA-MB-231 hücre hattında sadece Isc A'nın tek başına uygulaması %15 azalmaya neden olurken, 4-AP, PTX, 4-AP+PTX ve Isc A+4-AP+PTX uygulamaları sırasıyla %28, %240, %81 ve %14 artışa neden olduğu saptandı. Sonuçlar Şekil 19, Şekil 20 ve Şekil 21 de gösterildi.



Şekil 19. L929 K⁺ Değişimi



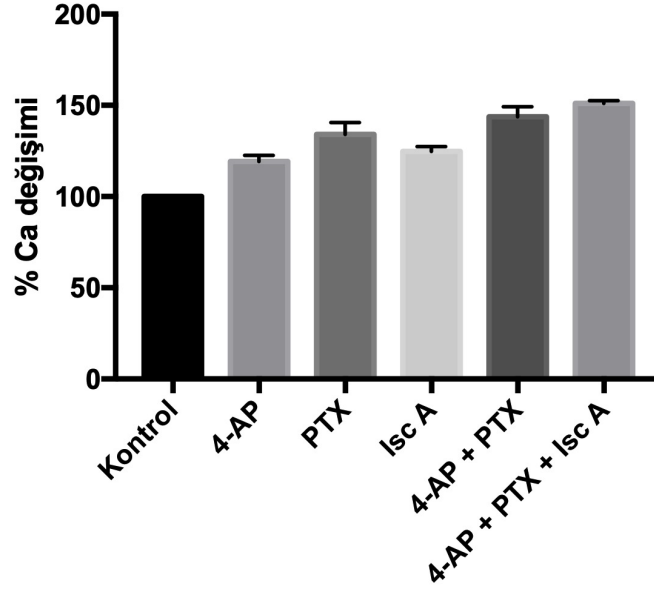
Şekil 20. MCF7 K⁺ Değişimi



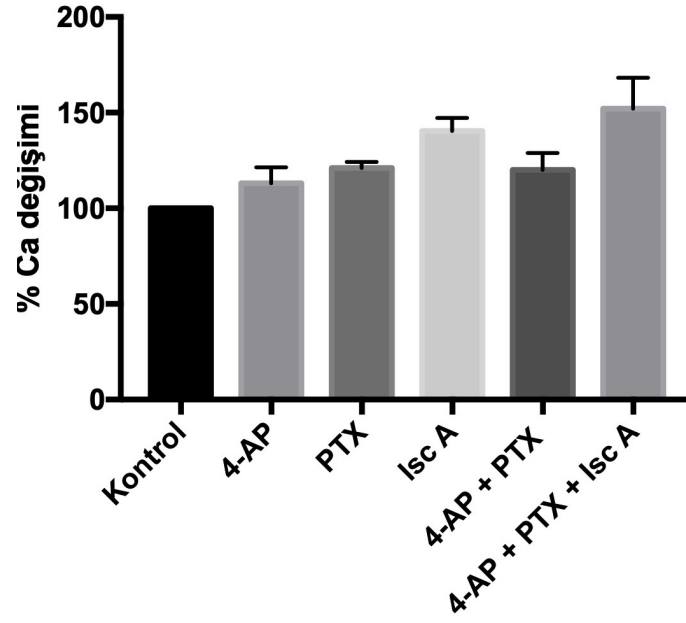
Şekil 21. MDA MB 231 K⁺ Değişimi

6.4. Hücre İçi Ca^{+2} Belirlemeleri

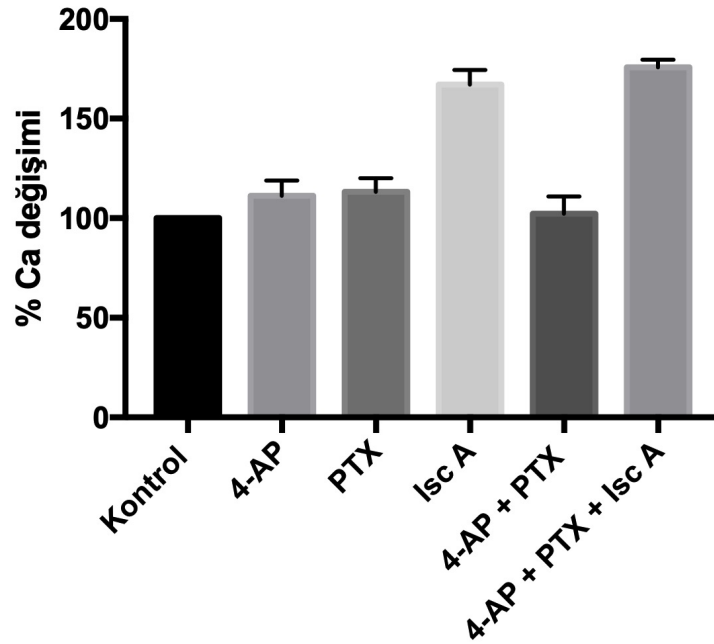
4-AP, PTX ve Isc A'nın ayrı ayrı ve kombine halde kullanımının hücre içi Ca^{+2} seviyelerinde meydana getirdiği değişimlerin belirlenmesi için Fura-2 floresan belirteç kullanıldı. Deneylerde kullanılan "Screen Quest Fura-2 AM No Wash Ca assay kit", Ca^{+2} kanallarının veya G protein kenetli reseptörlerin aktivasyonunun neden olduğu hücre içi Ca^{+2} değişimini homojen olarak ölçümüne olanak sağlar. Fura-2 AM hücre membranını geçerek hücre içine girer. Hücre içine girdiğinde, Fura-2 AM' in lipofilik bloklama grupları esterazlar vasıtasıyla ayrılır. Bunun sonucunda negatif yüklü floresan boya hücre içinde kalır ve Ca^{+2} a bağlandığında floresan dalga boyu mavi bölgeye kayar. Hücreler agonist veya bir uyarıcı ile uyarıldığında reseptör sinyali hücre içinde Ca^{+2} salınımına neden olur ve kısa dalga boylarında Fura-2' nin floresan şiddetinde güçlü bir artış olur. Hücre içi Ca^{+2} değişimleri, zamana bağlı olarak ve ilaçlar eklendikten sonra 24 saat boyunca ölçüm alınarak belirlendi. Zamana bağlı değişim görülmediği için sonuçlar histogram şeklinde Şekil 22, Şekil 23 ve Şekil 24 de verildi. L929 hücre hattında her uygulamanın ardından Ca^{+2} konsantrasyonunda 4-AP için %19, PTX için %34, Isc A için %24, 4-AP+PTX için %43 ve Isc A+4-AP+PTX için %51 artış saptandı. MCF-7 hücre hattında her bir uygulamanın ardında Ca^{+2} konsantrasyonunda 4-AP için %13, PTX için %21, Isc A için %40, 4-AP+PTX için %20 ve Isc A+4-AP+PTX için %52 artış saptandı. MDA-MB-231 hücre hattında her bir uygulamanın ardından Ca^{+2} konsantrasyonunda 4-AP için %11, PTX için %13, Isc A için %67, 4-AP+PTX için %2 ve Isc A+4-AP+PTX için %75 artış saptandı.



Şekil 22. L929 Ca⁺² Değişimi



Şekil 23. MCF7 Ca⁺² Değişimi



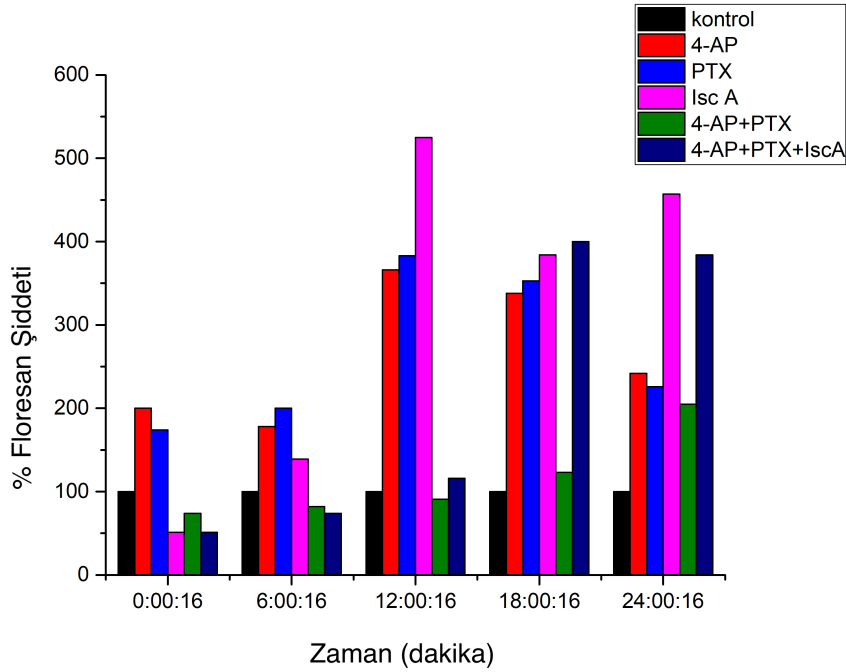
Şekil 24. MDA MB 231 Ca^{+2} Değişimi

6.5. Membran Potansiyeli Ölçümleri

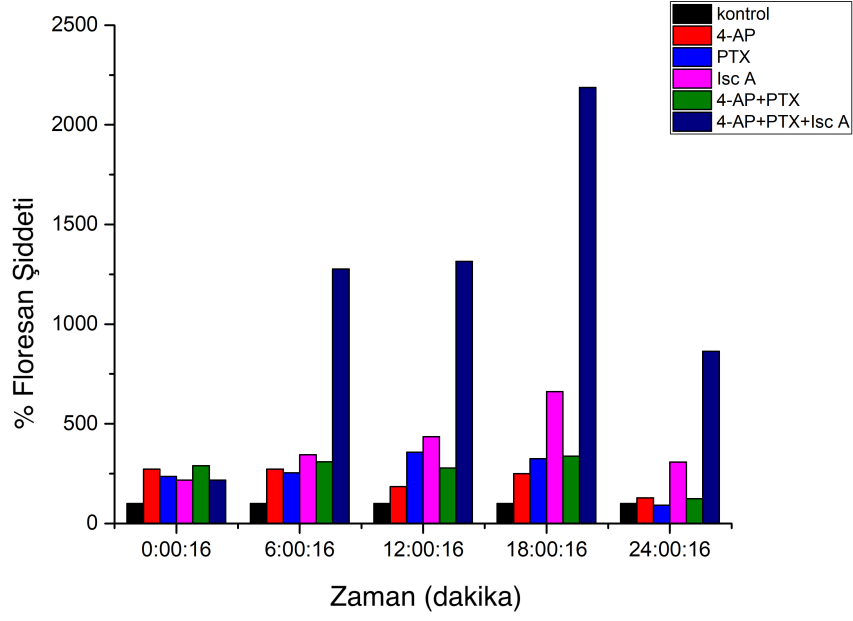
Kullanılan 4-AP, PTX ve Isc A'nın hücre membran potansiyelinde meydana getirdiği değişimler, membran potansiyeline duyarlı DiBAC₄(3) floresan prob ile belirlendi. DiBAC₄(3), hücre membranından geçebilen, hidrofobik yavaş yanıtı boyalar sınıfındadır. Hücreler boya ile inkübe edildiğinde, hidrofobik yapısından dolayı DiBAC₄(3) hücre dışı sulu ortamdan, lipid yapıya sahip membrana geçer. Uyarı olmadığında hücre membranının hücre içine bakan yüzeyi negatif yüklüdür ve bu negatif yükler nedeniyle iyonize boyanın hareketi engellenir. Uyarı varlığında membran depolarize olduğunda boya hücre içinde yer değiştirir lipidlere veya proteinlere bağlanır ve böylece floresan şiddetinde artış meydana gelir. Depolarizasyonun artması ile anyonik boya hücre içine daha çok girer ve floresan şiddeti artmaya devam eder. Hiperpolarizasyon durumunda floresan şiddeti azalır. Katyonik ve karbınasiyanin boyaların aksine DiBAC₄(3) mitokondri tarafından

dışarlanır ve başlıca seçiciliği membran potansiyelidir. DiBAC₄(3) vasıtasıyla potansiyele bağlı olarak gelişen floresan değişimi tipik olarak yaklaşık mV başına %1'dir.

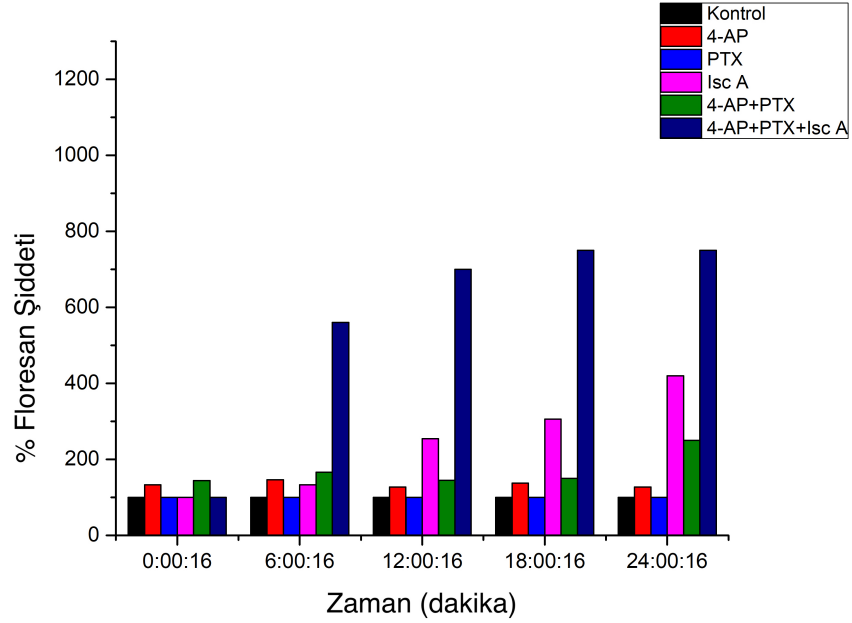
Her ajanın ayrı ve kombine kullanımından ardından membran potansiyelinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için ajanlar eklendikten sonra 15. dakikadan itibaren 6 saat aralıklarla membran potansiyeli ölçümleri alındı , sonuçlar histogram olarak Şekil 25, Şekil 26 ve Şekil 27 da verildi. L929 hücre hattı için membran potansiyelinde her bir uygulama için depolarizasyon saptandı. 12. Saatte alınan V_{mem} ölçümünde 4-AP, PTX ve Isc A maksimum depolarizasyona ulaşırken, kombine uygulamalarda depolarizasyon 24. Saatte maksimuma ulaştığı saptandı. MCF-7 hücre hattı için 18. Saate kadar depolarizasyonda artış ve 18. Saatte maksimum depolarizasyon gözlemlenirken, 24. Saatte depolarizasyonun sönümlendiği saptandı. MDA-MB-231 için PTX'in ayrı uygulamasında V_{mem} de değişim gözlenmezken, diğer uygulamalarda depolarizasyon saptandı.



Şekil 25. L929 Membran Potansiyeli



Şekil 26. MCF7 Membran Potansiyeli

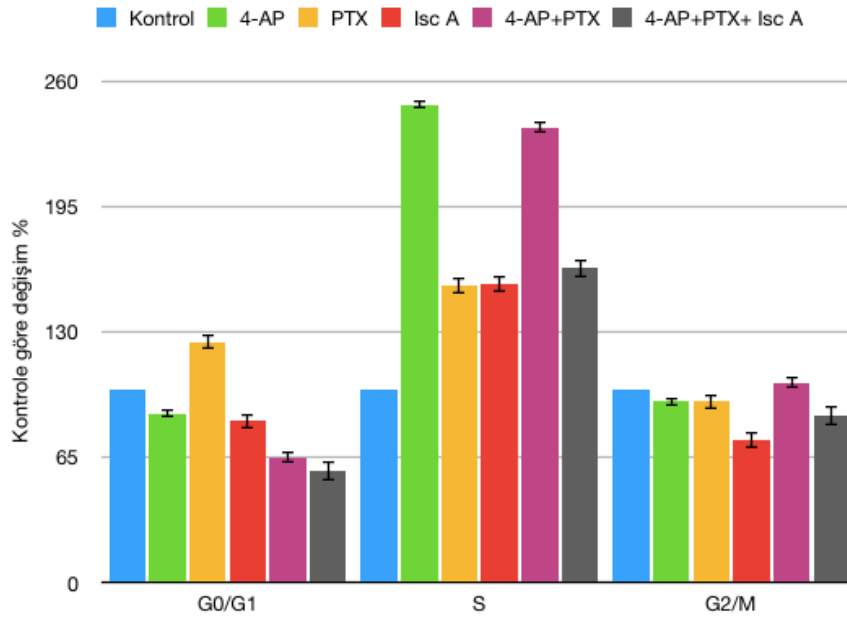


Şekil 27. MDA MB 231 Membran Potansiyeli

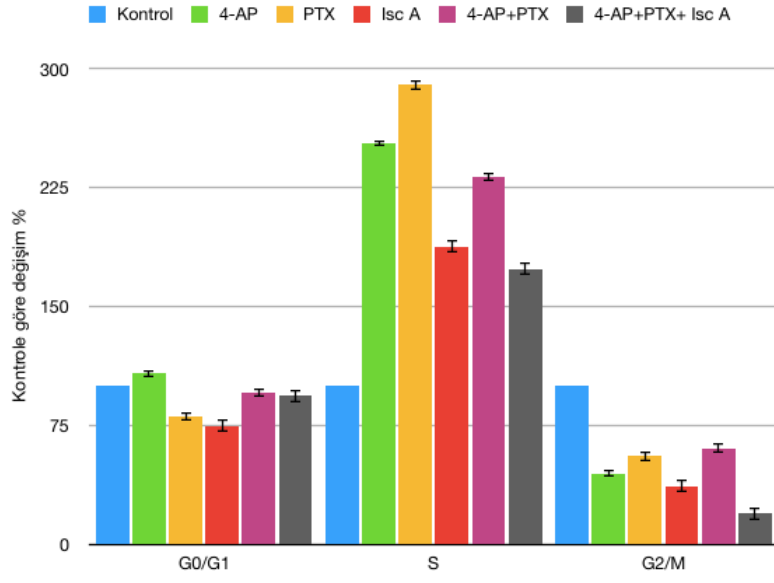
6.6. Hücre Döngüsü Analizleri

Her bir ajanın ayrı ve kombine halde 24 saat hücreler ile inkübasyonunun ardından hücre döngüsünde meydana gelen değişimler RNase A ve PI metodu kullanılarak akış sitometresinde alındı. Sonuçların analizi Cell Quest programı kullanılarak yapıldı.

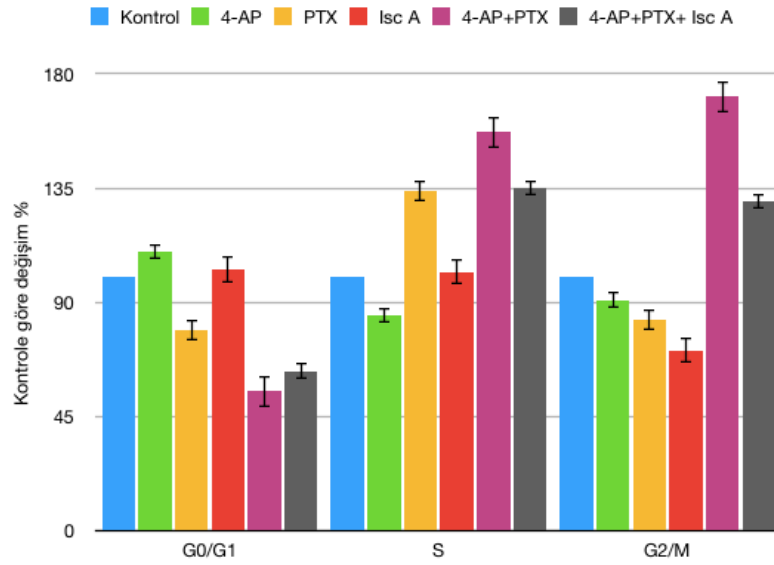
L 929 hücre hattında PTX tek başına G0/G1 ve S fazında birikme gösterirken, diğer bütün uygulamalarda hücre döngüsünün S fazında birikme saptandı. MCF-7 hücre hattında 4-AP tek başına G0/G1 ve S fazında birikme gösterirken, diğer bütün uygulamalarda hücre döngüsünün S fazında birikme saptandı ve G2/M fazına hücre geçişinin daha az olduğu gözlemlendi. MDA-MB-231 için 4-AP ve Isc A tek tek uygulandığında G0/G1’ de, PTX S fazında, 4-AP+PTX ve Isc A+4-AP+PTX uygulamalarında hem S fazında hem de G2/M fazında birikme saptandı (Şekil 28, 29, 30).



Şekil 28. L929 Hücre Döngüsü



Şekil 29. MCF7 Hücre Döngüsü



Şekil 30. MDA MB 231 Hücre Döngüsü

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve ölüme neden olan kanserler arasında ikinci sıradadır.

Meme kanserinin kemoterapi ile tedavisinde yaygın olarak kullanılan ajanlardan biri paklitakseldir. 1993 yılında over kanseri için kullanımının kabulünden sonra meme kanseri, AIDS bağlı Kaposi sarkoma, skuamoz hücreli baş boyun kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde de kullanıla gelmektedir. Ancak yararlılığının yanı sıra PTX periferik nötropeni, sinüs hasarı, eritrosit sayısında azalma, karaciğer sorunlar gibi yan etkilere neden olabilmektedir. Bu bağlamda bakıldığında paklitaksel etkinliğinin arttırılması önemlidir ve bu alanda birçok çalışma yürütüle gelmiştir (Crown ve ark., 2004).

Bu çalışmanın amacı, 4-aminopiridin ve viskotoksinin paklitaksel ile beraber kullanıldığında paklitakselin etkinliğini arttırıp arttırmayacağını ve viskotoksinin etkisinin saptanması ve olası mekanizmaya ışık tutabilecek hücre fizyolojisinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesidir. 4- AP voltaj kapılı potasyum kanal blokeridir. Potasyum kanallarının özellikle voltaj kapılı kanalların kanserli hücrelerde sağlıklı hücrelere görece ekspresyonları farklıdır ve dolayısıyla kanser gelişiminde, ilerlemesinde ve metastazda önemli oldukları ve bu kanallar hedeflenerek terapi uygulamaları yapılabileceği üzerine birçok çalışma mevcuttur (Nilius ve Wohlrab, 1992; Ruta ve ark., 2003). 4-AP'nin hücrelerde apoptoza yol açtığını gösteren çalışmalar vardır. Ancak paklitaksel ile beraber 4-AP'nin beraber kullanıldığı bir çalışma yoktur. Viskotoksin katyonik bir peptittir ve katyonik olması nedeniyle plazma membran yüzeyi sağlıklı hücrelere görece daha negatif olan kanser hücrelerine seçici olarak tutunup bu hücrelerde geçirgenliği arttıracığı için PTX + 4- AP ile beraber kullanımın hücre sağkalımını çok daha etkin biçimde olumsuz etkileyeceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda estrogen pozitif MCF-7, üçlü negatif MDA-MB-231 ve kontrol hücresi olarak fibroblast L-929 hücre hatları kullanılmıştır. Çalışmaya öncelikle bu ajanların tek tek ve beraberce uygulandıklarında hücre sağkalımını ne şekilde etkilediklerinin saptanması, IC₅₀ değerinin belirlenmesi ile başladı. Bulgular yukarda kısaca özetlenen öngörülerini doğrulamaktadır. Yapılan ilk çalışmalarda hücre sağkalımının belirlenmesi için MTT kullanıldıysa da MTT ile yapılan ölçümlerin hatalı pozitif değerler vermesi sonucu sağkalım ölçümlerine tripan mavisi kullanılarak hemositometre ile devam edilmiştir (Ulukaya ve ark.,2008). 4-AP ve PTX beraber kullanımında belirlenen IC₅₀ değerleri veya PTX için IC₅₀ değerinin biraz altı kullanılmıştır. Yapılan ölçümlerle hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde 4-AP ve paklitaksel beraber kullanımında hücre sağkalımının %30'a düştüğü, viskotoksin değeri yüksek Isc A eklenmesiyle sağ kalımın % 5 civarına düştüğü gözlenmektedir. L929 hücrelerinin ise bu iki ajanın beraber kullanımından fazla etkilenmedikleri ve Isc A'nın tek uygulamasında IC₅₀ değerinin diğer hücre hatlarından daha yüksek bulunması ile seçiciliğin doğrulandığı görülmektedir. Paklitakselin etkinliğini arttırmak bağlamında bu sonuçların önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Bu aşamadan sonra yapılan çalışmalar bu sonuçların hücre fizyolojisinde hangi değişimlerden kaynaklandığına, diğer bir deyişle mekanizmaya ışık tutacak değişimlerin saptanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hücre içi kalsiyum akısında değişim, hücre içi potasyum derişimi, plazma membran potansiyelinde değişim ve hücre döngüsü ölçümleri yapılmıştır.

Paklitaksel bir mitoz inhibitörü olarak sınıflandırılır. Mitoz inhibitörleri hücre bölünmesi sürecinde olan hücreleri hedefleyen kemoterapötik ilaçlardır. Antimitotik ilaçlar olarak da bilinirler. Bu ilaçların içinde en etkili olanları mikrotübül dinamiğini etkileyen, mikrotübül zehirleri veya mitotic içcik zehirleri olarak da adlandırılan antimikrotübül ilaçlardır (Matson, 2011). Bunlardan vinka alkaloitleri ve kolşisin, mikrotübül depolimerizasyonuna yol açarken, paklitaksel (taksol grubu) mikrotübüllerin depolarizasyonunu engellerler. Bu şekilde mitotik iç ipliklerinin

işlevlerini yerine getirememesi kromozomların orta bölgede konumlanmasını ve ayrılmasını engeller ve hücre döngüsü G2/M fazında baskılanır. Varsayılan bu durumda İğ kontrol noktası (spindle assembly checkpoint-SAC) adı verilen proteinlerin hücre döngüsünü durdurduğu ve hücrelerin birçoğunun apoptoz sürecine girdikleridir. Ancak bu durumun yol açtığı alt yollar tam olarak anlaşılamamıştır. Paklitakselin p53 yolağından bağımsız olarak hücreleri ölüme götürdüğü, Bcl-XL ekspresyonunu baskıladığı, Bak ekspresyonunu arttırdığı, p34, cdk2 ve diğer siklin bağımlı kinazlar vasıtasıyla apoptoz yolağını indüklediği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2000).

Her ne kadar yaygın kanı paklitakselin hücre döngüsünü G2/M fazında baskıladığı olsa da paklitakselin etkisinin konsantrasyona bağlı olduğu 1993 yılında Jordan ve ark. tarafından ve daha sonra da diğer araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Jordan ve ark., 1993). Zasadil ve ark. çalışmalarında IC₅₀ değeri nM olan paklitaksel seviyelerinde çok kutuplu (multipolar) iğ iplikleri oluşumu gözlemişler ve bu konsantrasyonlarda G2/M fazında mitotik duraklama olsa da birçok hücrede multipolar iğ iplikçiklerinin kromozom dağılımında eşitsizlik meydana getirerek hücrenin ölümüne yol açtığını söylemişlerdir (Zasadil ve ark., 2014). Pushkarev ve ark. paklitakselin farklı konsantrasyonlarda hücre döngüsünü farklı fazlarda kitlediğini, düşük paklitaksel konsantrasyonlarında hücre döngüsünün G1 fazında yüksek konsantrasyonlarda G2/M fazında baskılandığını göstermiştir (Pushkarev ve ark., 2009).

Bu çalışmada hücre döngüsü analizi akış sitometresinde tüm hücrelerde ve tüm ajanlar için hem tek tek hem de beraber uygulamalar için gerçekleştirilmiştir. 4-AP'nin hücreleri G1 fazında baskıladığı bilinmektedir. Bu çalışmada yapılan ölçümlerde 4-AP'nin MCF-7 hücrelerini G1 fazında ama daha çok S fazında duraklattıkları gözlenmiştir. Bu gözlem Ru ve ark. sonuçları ile uyumludur (Ru ve ark., 2016). L-929 hücreleri ise sadece S fazında görülmektedirler. MDA-MB-231 hücrelerinde 4-AP G1 fazında bir miktar yığılma meydana getirmiştir. Paklitaksel tüm hücre hatlarında bu konsantrasyonlarda beklendiği üzere G2/M fazında değil G1

ve özellikle S fazında bir duraklama meydana getirmiştir. Isc A ise MCF-7 ve L929 hücrelerinde S fazında duraklamaya neden olurken MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü üzerinde bir değişiklik meydana getirmemiştir. MCF-7 ve L929 hücrelerinde ikili (4-AP + PTX) ve üçlü (Isc A+ 4-AP+ PTX) kombinasyonlarda S fazında bir duraklama gözükürken MDA-MB-231 hücrelerinde hem S fazında hem de G2/M fazında duraklama görülmektedir. Bu sonuçlar, bu ajanların hücre döngüsünü ne şekilde etkilediklerine ışık tutsa da bu ölçümlerin uygulama sonrası 24 saatte alındığı göz önüne alınmalı ve bu ölçümlerin 24 saatten önce, hücre ölümleri meydana gelmeden çeşitli zaman aralıklarında tekrarlanmasının yararlı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda hem hücre proliferasyonunda hem de apoptozda işlevselliği bilinen kalsiyum iyon konsantrasyonu belirlendi. 4-AP'nin voltaj kapılı potasyum kanallarını ketlemesi sonucu hücre içi kalsiyumda artış meydana getirdiği belirlenmiştir (Kim ve ark., 2000). Paklitakselin nöronlarda kalsiyum osilasyonunu ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Kawakami ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2010) . Boehmerle ve ark. Nöron hücrelerinde Paklitaksel'in Ca^{+2} sinyal yolağını ve Ca^{+2} osilasyonlarını arttırdığını ve bunu InsP3R üzerinden gerçekleştirdiğini saptamışlardır (Boehmerle ve ark., 2006). Zhang ve ark. benzer sonuçları kardiyomiyositlerde gözlemlemişlerdir (Zhang ve ark. 2010). Başka bir çalışmada Sareen ve ark. Resveratrol'un MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde olasılıkla endoplazmik retikulumdan kaynaklanan kalsiyum artışına neden olduğunu ve kaspaz-3 içermeyen MCF-7 hücrelerinde resveratrol'un yol açtığı apoptozun kalsiyumla aktive olan kalpein proteazının aktive olması sonucu meydana geldiğini, mitokondri transition pore bloklayıcılarının kalpen aktivitesini ketlediğini belirlemişlerdir. Paklitakselin InsP3R üzerinden kalsiyum salınımı yaptığıının gözlemlendiği düşünülürse benzer bir mekanizmanın paklitaksel ile uyarılmış hücrelerde de geçerli olabileceği düşünülebilir. 4-AP ve paklitakselin beraber kullanımının kalsiyum konsantrasyonunu etkileyip hücrenin apoptoza gitmesini kolaylaştırabileceği öngörülmüştür. Bunu saptamak için kalsiyum ölçümleri ilaçların

hücrelere eklenmesinden sonra zamana bağlı olarak ölçülmüştür. Ancak tüm ölçümlerde kalsiyum artışı zamana bağlı olarak değişmediği için histogram olarak ifade edilmiştir. 4-AP ve paklitakselin tek başlarına tüm hücre hatlarında yaklaşık %20 oranında kalsiyum artışına yol açtıkları gözlenmektedir. MCF-7 ve L929 hücrelerinde 4-AP ve paklitaksel beraber kullanıldığında kalsiyumda az ama istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmektedir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise bu iki ajanın beraber kullanımı kalsiyum konsantrasyonunda kontrole göre bir farklılık göstermemiştir. Aşağıda belirtileceği gibi MDA-MB-231 hücreleri potasyum ölçümlerinde de diğer hücrelere göre görülen bu farklı davranışın nedeninin iyon kanalları ekspresyonlarının farklılığından kaynaklandığı açıktır (Azimi ve ark 2014). Her üç hücre hattında 4-AP ve paklitakselin beraber kullanımı apoptozu arttırmıştır. Bu artış MCF-7 ve L929 hücrelerinde kalsiyum artışına bağlanabilse de MDA-MB-231 hücrelerinde bu hücre hatlarından farklı yolların apoptoz sürecinde etkili oldukları düşünülmelidir. Tüm hücre hatlarında Isc A kalsiyum konsantrasyonunu arttırmıştır. En fazla MDA-MB-231 hücrelerinde ve en az L929 hücrelerinde görülen bu artış viskotoksinin katyonik bir peptid olduğu düşünülürse kanser hücre yüzeylerinin daha negatif yüklü olmaları ile kooreledir (Abercrombie ve Ambrose 1962).

Viskotoksin ökse otundan elde edilen tiyonin ailesine ait bir katyonik peptittir. Katyonik peptitler tüm canlılarda özgül olmayan savunma sistemleridir. Katyonik peptidler amfifilik moleküllerdir ve 12 ve 40 aminoasit arasında sekanslardan oluşurlar. Katyonik peptidlerin ayırt ettirici özelliği: Arginin ve lizin aminoasitlerini içerdikleri için en az +2 ya da genellikle olduğu gibi 4, 5, 6 kadar net pozitif yüke sahip olmalarıdır. Bu aminoasitler nötral pH'da pozitif yüklüdürler. Dolayısıyla hücre membran yüzeyi görece daha eksi yüklü bakteri gibi hücrelere seçici olarak bağlanırlar. Viskotoksinin seçici olarak kanser hücrelerine tutunması eksi yüklü fosfatidilserin fosfolipidlerinin kanser membran yüzeyinde sağlıklı hücrelere görece 7-8 kat daha fazla olmasından kaynaklanır (Utsugi ve ark., 1993; Coulon ve ark., 2002). Katyonik peptidlerin etki mekanizması üzerine yapılan çalışmalar bu

peptidlerin hücre yüzeyine tutunarak kanal açmaları ve membranda tutundukları bölgelerde membran akışkanlığını azaltıp hemen kenar bölgelerde membran akışkanlığını arttırarak membranın bütünlüğünü bozmalarıdır. Kalsiyum girişine ve giderek nekroza yol açan bu mekanizma ile hücre ölüme gider (Sten, 2006). Bu verilerin ışığında bu çalışmada viskotoksinin LDH ile yapılan ölçümlerde hücrede sızıntı meydana getirmeye başladığı ilk konsantrasyon IC50 değeriyle uyumlu olarak seçilmiş ve paklitakselin etkinliğini, daha kolay hücre içine girmesini sağlayarak veya henüz bilemediğimiz başka bir yolağın da aktivasyonu sonucu, arttıracığı öngörülmüştür. Kalsiyum ölçümleri ve hücre sağkalım sonuçları bu öngörünün doğruluğunu göstermektedir. Hücre sağkalım ölçümleri viskotoksinin paklitaksel + 4-aminopiridin ile beraber uygulandığında hücre sağkalımında önemli derecede azalma göstermiştir. Bu sonuç kalsiyum ölçümleri ile uyumludur.

Potasyum iyon kanallarının kanser ile yaşamsal ilişkisini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Potasyum kanallarının kanserogenez ile ilişkileri veya neoplastik dönüşümün bu kanalları nasıl değiştirdiği henüz tam açıklığa kavuşmasa da bu kanalların bloklanmasının proliferasyonu azalttığı saptanmıştır (Felipe ve ark., 2006).

Proliferasyon kapasitesi yüksek hücreler normal hücrelere göre daha depolarize durumdadırlar ancak yine de hücre siklusu sırasında G1/S faz geçişinin gerçekleşmesi için hiperpolarize olmak zorundadırlar. Hücre döngüsü sırasında elektrik potansiyelin bu dalgalanma zorunluluğu iyon kanalları ve özellikle K⁺ kanalları tarafından gerçekleştirilir. Voltaj kapılı K⁺ kanallarının hücre döngüsünün başında kontrol noktalarının kontrolünde ve dolayısıyla membran potansiyeli, hücre hacmi ve kalsiyum gibi diğer iyon kanallarının değişimlerin düzenlenmesinde etkin oldukları bildirilmiştir (Pardo, 2004). Dolayısıyla K⁺ kanalları kanser terapisi için potansiyel hedeflerdir (Villalonga ve ark., 2007). Hücre içi K⁺ konsantrasyonu PBFI-AM floresan boya ile belirlendi. PBFI-AM potasyuma bağlanma kapasitesi hücre içi sodyum konsantrasyonuna bağlıdır. Hücre içi Na⁺ konsantrasyonu arttığında PBFI-AM'in ayrışma sabiti (Kd) düşer ve böylece floresan boya K⁺ a daha çok bağlanır ve floresan şiddeti artar. Potasyum ölçümleri de kinetik olarak yapılmış ancak anlamlı

bir dalgalanma görülmediği için histogram olarak verilmiştir. 4-aminopiridin voltaj kapılı kanal blokeri olması nedeniyle beklendiği gibi tüm hücre hatlarında potasyum konsantrasyonunda artış meydana getirmiştir. Paklitakselin ise hücre hattına spesifik etki göstermesi ilginçtir. L929 hücrelerinde K^+ konsantrasyonunu düşürdüğü, MCF-7 hücrelerinde herhangi bir etki göstermediği ancak MDA-MB-231 hücrelerinde anlamlı bir artışa neden olduğu gözlenmektedir. Yüksek metastatik karakteri nedeniyle MDA-MB-231 hücre membranında Na^+ kanallarının diğer metastatik olmayan meme kanseri hücrelerine göre daha fazla sentezlendiği bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda PTX'in voltaj bağımlı Na^+ kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durum hücre içi Na^+ miktarında artışa neden olduğu için MDA-MB-231 hücrelerinde PTX'in sebep olduğu K artışı bu mekanizmayla açıklanabilir. Kitamura ve ark. kardiyak miyosit hücre benzeri H9c2 hücre hattında paklitakselin Kv2.1 (Ikur) kanallarını blokladığını göstermişlerdir (Kitamura ve ark., 2015). Bu çalışmada Potasyum konsantrasyon ölçümü yapılmamış olsa da bu kanalların bloklanması K^+ artışına neden olacağı açıktır. Meme kanseri hücrelerinde Paklitakselin potasyum konsantrasyonuna etkisini gösteren bir çalışmaya tarafımızdan rastlanmamıştır. 4-AP ve paklitaksel beraber kullanıldığında hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde potasyum artışı gözlenmektedir. Isc A ile beraber kullanıldığında bu artış azalmaktadır. Viskotoksin tek başına K^+ konsantrasyonunu düşürmektedir. Viskotoksinin hücre membranında kanal açma özelliği göz önüne alındığında bu sonuç şaşırtıcı değildir.

Plazma membran potansiyeli değişimi hücrelerin bölünmeye, G1 fazına geçişleri için ve hücre döngüsü açısından zorunludur. Kanser hücreleri ve embriyonik hücreler farklılaşmasını tamamlamış hücrelere görece daha depolarize durumdadırlar. Hücrenin bölünme aşamasına geçmesi için depolarize olması gerekmektedir. Aynı şekilde G1/S fazına geçiş için de hücrenin hiperpolarizasyonu gereklidir. Hücre ölümü membran potansiyelinin sıfırlanması ile son bulur dolayısıyla canlı durumdaki potansiyeline görece depolarize durumda olduğu söylenir. Bu çalışmada membran potansiyeli ölçümleri sağkalım ile ve potasyum, kalsiyum ölçümleri ile bir

korelasyon kurulup kurulamayacağını saptamak için yapılmıştır. Tüm hücre hatlarında 4-AP uygulaması sonucu görülen depolarizasyon bu hücrelerde ölçülen K^+ konsantrasyon artışı ile uyumludur. Paklitaksel uygulamasında hem L929 hem de MCF-7 hücrelerinde artan bir depolarizasyon görülmektedir. Her iki hücre hattında hücre içi potasyum konsantrasyonunda azalma (L929) veya herhangi bir değişiklik görülmediği (MCF-7) için bu depolarizasyon artan kalsiyum derişimi ile veya paklitakselin aktive edeceği voltaj kapılı sodyum kanalları sonucu açıklanabilir. Li ve ark. paklitakselin nöronlarda voltaj kapılı Nav1.7 kanalı ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Benzer bir etkinin diğer hücre hatlarında da görülmesi olasıdır (Li ve ark. 2018). Viskotoksin uygulaması sonucu tüm hücrelerde, MDA-MB-231 ve L929 hücrelerinde altıncı saatten sonra depolarizasyon görülmektedir. Bu depolarizasyonun kalsiyum girişine bağlamak yanlış olmayacaktır. Viskotoksinin iyon kanalları üzerine ekspresyon değişimi meydana getirmek gibi bir etkisi bildirilmemiştir. 4-AP ve paklitaksel beraber kullanımında L929 hücrelerinde önce hiperpolarizasyon daha sonra hücrelerin öldüğününe de işaret eden depolarizasyon görülmektedir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise tekli uygulamaların aksine depolarizasyon görülmektedir. Bu depolarizasyon K^+ artışı ile uyumludur. Üçlü uygulamada ise yüksek orandaki depolarizasyon artan kalsiyum ile ve hücre ölümü ile uyumludur.

Bu çalışma 4-AP ve viskotoksinin paklitaksel etkinliğini arttırdığını göstermiştir. Olası mekanizmayı aydınlatmak için iyon kanallarının akımında meydana gelen değişimlerin ölçülmesi için yama kenetleme tekniğinin kullanılmasının zorunlu olduğu düşüncesindeyiz. Hücre döngüsünün de 24 saat sonra değil membran potansiyeli ve iyon akımları ile korelasyonunun kurulması için ilaç uygulamasından sonra belli aralıklarla yapılmasında yarar görmekteyiz.

Paklitakselin etkinliğinin artırılması paklitakselin yan etkilerinin en aza indirilmesi açısından önemlidir. Bu verilerin klinikte kullanılması için bu çalışmanın hayvan deneyleri ile devam ettirilmesi önemlidir. Bu sonuçların klinik uygulamalar açısından ümit vaat ettiğine inanmaktayız.

8. KAYNAKÇA

Abercrombie M and Ambrose EJ . The Surface Properties of Cancer Cells: A Review. Cancer Res. 1962; 22: 525-548.

Arcangeli A, Pillozzi S, Becchetti A. Targeting ion channels in leukemias: a new challenge for treatment. Curr. Med. Chem. 2012;19: 683-696.

Azimi SJ, Thomson R, Monteith GR. Calcium influx pathways in breast cancer: opportunities for pharmacological intervention. Br. J. Pharmacol. 2014;171: 945–960.

Balitsky KP, Shuba EP. Resting potential of malignant tumour cells. Acta Unio Int Contra Cancrum. 1964; 20:1391–1393.

Barnum JK , O’Connell MJ. Cell cycle regulation bu checkpoints. MJ Methods Mol Biol. 2014; 1170: 29–40.

Bar-Sela G. White-Berry Mistletoe Viscum album L as complementary treatment in cancer: Does it help?, European Journal of Integrative Medicine 2011;3:55–62 .

Bell DW. Our changing view of genomic landscape of cancer. J pathol. 2010; 2:231-243.

Binggeli R, Weinstein RC. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. J Theor. Biol. 1986; 123: 377-401.

Blackiston DJ, McLaughlin KA, Levin M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle*. 2009; 8: 3527- 3536.

Boehmerle W, Splittgerber U, Lazarus MB, et al. Paclitaxel induces calcium oscillations via an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and neuronal calcium sensor 1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18356–18361

Burkhart CA, Berman JW, Swindell CS, Horwitz SB. Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor- α gene expression and cytotoxicity. *Cancer Res*. 1994; 54: 5779- 82.

Burr HS, Strong LC, Smith GM. Bio-electric correlates of methylcolanthrene-induced Tumors in mice. *Yale J Biol. Med*. 1938;10: 539-544.

Büssing A. Biological and pharmacological properties of *Viscum album* L, in Mistletoe. The Genus *Viscum*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 2000; 123-182.

Büssing A Mistletoe. The Genus *Viscum*. Hardwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 2000.

Büssing A, Schaller G, Pfuller U. Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L *Anticancer Res*. 1998;18:4291–4296.

Büssing A, Stein GM, Wagner M, Wagner B, Schaller G, Pfuller U, Schietzel M. Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album* L *Eur. J Biochem*. 1999; 26:279–287.

Caaveiro JM, Molina A, Rodriguez-Palenzuela P, Goni FM, Gonzalez-Manas JM. Interaction of wheat alpha-thionin with large unilamellar vesicles. *Protein Sci.* 1998; 7:2567–2577.

Cabado AG, Alfonso A, Vieytes MR, González M, Botana MA, Botana LM.: Crosstalk between cytosolic pH and intracellular calcium in human lymphocytes: effect of 4-aminopyridin, ammonium chloride and ionomycin. *Cell Signal.* 2000; 12:573-581.

Cabral F, Wible L, Brenner S, Brinkley BR. Taxol-requiring mutant of Chinese hamster ovary cells with impaired mitotic spindle assembly. *J Cell Biol.* 1983; 97:30-9.

Chavakis T, et al. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (α-defensins): a link between inflammation and angiogenesis. *Faseb Journal* 2004; 18:1306–1308.

Chin LS, Park CC, Zitnay KM, Sinha M, Dipatri AJJR, Perillan P, Simard JM.: 4-Aminopyridine causes apoptosis and blocks an outward rectifier K⁺ channel in malignant astrocytoma cell lines. *J Neurosci Res.* 1997; 48:122-127.

Cone CD Jr. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *J Theor. Biol.* 1971; 30: 151-181.

Coulon A, Berkane E, Sautereau AM, Urech K, Rougé, P, Lopez A. Modes of membrane interaction of a natural cystein-rich peptide: viscotoxin A3. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes.* 2002; 1559(2): 145-159.

Cui Y, Shu X, Gao Y et al. Use of complementary and alternative medicine by Chinese women with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004; 85(3):263 -270.

Crown J, O’Leary M, Ooi WS. Docetaxel and Paclitaxel in the Treatment of Breast Cancer: A Review of Clinical Experience. *Oncologist* 2004; 9: 24–32

Dohrn M. Pharmakologie einiger pyridinderivate. *arch. exp. Path. Pharmacol.* 1924; 105: 10- 11.

Eberl MM, Sunga AY, Farrell CD, Mahoney MC. Patients with a family history of cancer: Identification and Management. *JABFM*. 2005; 18:211–217.

Ellison G, et al. Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol. Pathol.* 2002; 55: 294-299.

Ernst E. Complementary cancer treatments: Hope or hazard? *Clin Oncol.* 1995; 7: 259–263.

Ernst E, Resch KL, Mills S, et al. Complementary medicine a definition. *Br J Gen Pract.* 1995; 45: 506.

Felipe A, Vicente R, Villalonga N, Roura-Ferrer M, Martinez-Marmol R, Sole L, Ferreres JC, Condom E. Potassium Channels: New Targets in Cancer Therapy. *Cancer Detect. Prev.* 2006; 30: 375–385.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mather C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 2015; 136: 359–386.

Fieber LA, Gonzalez DM, Wallace MR, Muir D: Delayed rectifier K⁺ currents in NF1 Schwann cells. Pharmacological block inhibits proliferation. *Neurobiol Dis.* 2003; 13:136-146.

Fiske JL, Fomin VP, Brown ML, Duncan RL, Sikes RA. Voltage sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2006; 25:493-500.

Fletcher SW. Patient information: Risk factor for breast cancer. 2008.

Garcia SB, Novelli M, Wright NA. The clonal origin and clonal evolution of epithelial tumours. *Int J Exp Pathol.* 2000; 81: 89-116.

Gascoigne KE, Taylor SS. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J Cell Sci.* 2009; 122(15):2579-2585.

Gerber B, Scholz C, Reimer T, Briese V, Janni W Complementary and alternative therapeutic approaches in patients with early breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2006; 95:199–209.

Glover WE. The aminopyridines, *Gen Pharmac.* 1982; 13: 259-285

Gueritt F. General and recent aspects of the chemistry and structure-activity relationships of taxoids, *Curr. Pharmacol. Des.* 2001; 7:1229–1249.

Guse AH, Roth E, Emmrich F: Ca²⁺ release and Ca²⁺ entry induced by rapid cytosolic alkalization in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem Journal.* 1994; 301:83-88.

Hanahan D , Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000; 100: 57–70.

Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, Ghosh K, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, Hillman DW, Suman VJ, Blake C, Tlsty T, Vachon CM. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353:229–237.

Hegde P. Therapeutic intervention in inflammatory pathologies and cancer: understanding the anti-inflammatory properties of *Viscum album*. Human health and pathology. Universite de Technologie de Compiègne, English, 2013.

Huang S, Ernberg I, Kauffman S. Cancer attractors: a systems view of tumors from a gene network dynamics and developmental perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2009;20: 869-876.

Huang W, Vernon LP, Hansen LD, Bell JD. Interactions of thionin from *pyrularia pubera* with ipalmitoylphosphatidylglycerol large unilamellar vesicles. *Biochemistry.* 1997; 36:2860–2866.

Huang X, Yeh L. Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol.* 2014; 206: 151–162

Hughes P, Dennis E, Whitecross M, Llewellyn D, Gage P. The cytotoxic plant protein, a-purothionin, forms ion channels in lipid membranes. *J Biol. Chem.* 2000; 275:823–827.

Hutt N, Kopferschmitt-Kubler MC, Cabalion J, Purohit A, Alt M, and Pauli G. Anaphylactic reactions after therapeutic injection of mistletoe *Viscum album* L, *Allergologia et Immunopathologia.* 2001;29: 201–203.

Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, Mackinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K¹ channel, *Nature*. 2003; 423: 33-41.

Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*. 2003; 423: 42-48.

Jordon MA, Wendell K, Gardiner S, et al. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res*. 1996; 56:816–825.

Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:9552–9556.

Jordan MA, Leslie Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(4): 253–265.

Kado K, Forsyth A, Patel PR, Schwartz JA. Dietary supplements and natural products in breast cancer trials. *Frontiers in Bioscience: Elite*. 2012; 4(1):546 -567.

Karolewicz B, Maciag D, O'Dwyer G, Stockmeier CA, Feyissa AM, Rajkowska G. Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010;13:411-420.

Kawakami K, Chiba T, Katagiri N, Saduka M, Abe K, Utsunomiya I, Hama T, Taguchi K. Paclitaxel increases high voltage-dependent calcium channel current in dorsal root ganglion neurons of the rat. *J Pharmacol Sci*. 2012;120(3):187-95.

Khuwaja GA, AbuRezaq AN. Bimodal breast cancer classification system. *Pattern Analysis and application*. 2004; 7:235–242.

Kim JA, Kang YS, Jung MW, Kang GH, Lee SH, Lee YS: Ca^{2+} influx mediates apoptosis induced by 4-aminopyridine, a K^{+} channel blocker, in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Pharmacol*. 2000; 60:74-81.

Kitamura N, Sakamoto K, Ono T, Kimura J. THE INHIBITORY EFFECT OF PACLITAXEL ON ($\text{Kv}2.1$) K^{+} CURRENT IN H9c2 CELLS. *Fukushima J Med Sci*. 2015;61(1):47–53

Klett CY, Anderer FA. Activation of natural killer cell cytotoxicity of human blood monocytes by a low molecular weight component from viscum album extract. *Arzneimittelforschung*. 1989; 39: 1580 -1585.

Knowles Margaret A, Selby PJ. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer, Oxford university press Inc., New york. 4th edition. Edited by Knowles Margaret A, Selby PJ. 2005.

Kunzelmann K. Ion channels and cancer. *J Membr. Biol*. 2005; 205: 159-173.

Levin M. Bioelectric mechanisms in regeneration: unique aspects and future perspectives. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2009; 20: 543-556.

Levin M. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration. *Trends Cell Biol*. 2007; 17: 261-270.

Li Y, North RY, Rhines LD, et al. DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 Is Upregulated in Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats and in Humans with Neuropathic Pain. *J Neurosci*. 2018; 38(5): 1124–1136.

Liu QY, Stein CA. Taxol and estramustine–induced modulation of human prostate cancer cell apoptosis via alteration in bcl-xL and bak expression. *Clin Cancer Res*. 1997; 3: 2039–46.

Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2006; 15: 933–946.

Mansky PJ, Wallerstedt DB. Complementary medicine in palliative care and cancer symptom management. *Cancer Journal*. 2006; 12 (5): 425 -431.

Marino AA, et al. Association between cell membrane potential and breast cancer. *Tumour Biol*. 1994; 15: 82–89.

Matson DR, Stukenberg PT. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Mol. Interv*. 2011;11:141–150.

McCaig CD, Song B, Rajnice AM. Electrical dimensions in cell science. *J Cell Sci*. 2009; 122: 4267-4276.

Miyano K, Tang H, Nakamura Y, Morioka N, Inoue A, Nakata Y. Paclitaxel and vinorelbine evoked the release of substance P from cultured rat dorsal root ganglion cells through different PKC isoform-sensitive ion channels. *Neuropharmacology*. 2009;57: 25–32.

Morokuma J, Blackiston D, Adams DS, Seebom G, Trimmer B, Levin M. Modulation of potassium channel function confers a hyperproliferative invasive phenotype on embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105:16608–16613.

Muggia FM, Braly PS, Brady MF, Sutton G, Niemann TH, Lentz SL, Alvarez RD, Kucera PR, Small JM. Phase III randomised study of cisplatin versus paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in patients with suboptimal stage III or IV ovarian cancer; a Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 18:106–115.

Nilius B, Wohlrab W. Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells. *J Physiol London*, 1992; 445:537-48.

Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer. Potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist* 2004; 4 : 361–377.

Ouadid-Ahidouch H, Ahidouch A. K⁺ channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. *J Membr.Biol.* 2008; 221: 1–6.

Öner Ç, Çolak E, Coşan D. Potassium channel inhibitors induce oxidative stress in breast cancer cells, *Asian Biomedicine*. 2018; 11(4): 323-330.

Özer Z, Önen H, Tursun N ve Uygur FN. Türkiye'nin Bazı Önemli Yabancı Otları Tanımları ve Kimyasal Savaşları. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları. 1999; No: 38, Kitap Serisi No: 16.

Pardo LA, et al. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr. Biol.* 2005; 205:115–124.

Pardo LA. Voltage- gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)* 2004;19: 285–292.

Pelhate M, Pichon Y. Selective inhibition of potassium current in the giant axon of the cockroach. *J Physiol.* 1974; 71:101-120.

Perou CM, Jeffrey SS, Van De Rijn M, Rees C.A, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D: Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999; 96:9212-9217.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*,. 2000; 406:747-752.

Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channelss and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular medicine.* 2010; 16:107-121.

Pushkarev VM, Starenki DV, Saenko VA, Yamashita S, Kovzun OI, Popadiuk ID, Pushkarev VV, Tronko MD. Effects of low and high concentrations of antitumour drug taxol in anaplastic thyroid cancer cells. *Exp Oncol.* 2009;31(1):16-21

Rao VR, Perez- Neut M, Kaja S, Gentile S. Voltage gated Ion Channels in Cancer Cell Proliferation. *Cancers (Basel).* 2015;7. 849-875.

Rao S, Krauss NE, Heerding JM, et al. 3'-(p-Azidobenzamido) taxol photo- labels the N-terminal 31 amino acids of tubulin. *J Biol. Chem.* 1994; 269:132–34.

Rieder CL, Maiato H. Stuck in division or passing through: Review what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint, *developmental cell.* 2004; 7: 637–651.

Rouzaire-Dubois B, Gerard V, Dubois JM. Involvement of K⁺ channels in the quercetin-induced inhibition of neuroblastoma cell growth. *Pflugers Arch.* 1993; 423:202-205.

Rowinsky E K. The Development and Clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu. Rev. Med.* 1997; 48: 353–374.

Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: a novel investigation- al antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82:1247-59.

Ru Q, Tian X, Liu JS, Li CY. 4- Aminopyridine Inhibits Cell Proliferation and Affects Anti-Tumor Activities of Cell Cycle Specific Drugs. In: Chou JJ, Zhou H, editors. *Proceedings of The 9TH International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*; 2015 Sept 18-20; Shanghai, China. Taylor & Francis Group, UK: London. 2016; 383-408.

Ru Q, Li W, Xiong Q, Chen L, Tian X, Li CY. Voltage gated potassium channel blocker 4-aminopyridine induces glioma cell apoptosis by reducing expression of microRNA. *Biol Cell.* 2018; 29: 1125-1136.

Rubin H. Cancer as a dynamic developmental disorder. *Cancer Res.* 1985; 45: 2935-2942.

Ruddon RW. Cancer Biology. 4th Edition, Oxford University Press, Oxford. 2007; 223.

Ruta V, Jiang Y, Lee A, Chen J, Mackinnon R. Functional analysis of an archaeobacterial voltage-dependent K¹ channel. *Nature*. 2003; 422: 180-185.

Rybalchenko V, Prevarskaya N, Van Coppenolle F, Legrand G, Lemonnier L, Le Bourhis X, Skryma R. Verapamil inhibits proliferation of LNCaP human prostate cancer cells influencing K⁺ channel gating. *Mol Pharmacol*. 2001; 59:1376-1387.

Safran H, King T, Choy H, Gollerkeri A, Kwakwa H, Lopez F, et al. p53 mutations do not predict response to paclitaxel/radiation for nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 1996; 78: 1203-1210.

Schafer KA. The cell cycle: A review. *Vet Pathol*. 1998; 35: 461-478.

Schaller G, Urech K, Giannattasio M. Cytotoxicity of different viscotoxins and extracts from the European subspecies of *Viscum album* L *Phytother. Res*. 1996; 10:473–477.

Schönherr R. Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *J Membr. Biol*. 2005; 205: 175-184.

Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res*. 2010; 1(2): 109–126.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*. 2018; 68:7–30.

Sjöval K, Strombeck G, Lofgren A, Bendahl PO, Gunnars B. Adjuvant radiotherapy of women with breast cancer information, support and side-effects. *European Journal of Oncology Nursing*. 2010; 147: 14-153.

Smith RA, Cokkinides V, Brawley O. W. Cancer screening in the United States,,CA *Cancer J Clin*. 2008; 58:161–179.

Sorger PK, Dobles M, Tournebize R,Hyman AA. Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 1997; 9: 807–14.

Sten B. Plant thionins- the structural perspective. *Mol. Life Sci*. 2006; 63(12): 1370-85.

Stone A, Chambers TC. Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3 carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2000; 254: 110-119.

Stringer BK, Cooper AG, Shepard SB. Overexpression of the G-protein inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1) in primary breast carcinomas correlates with axillary lymph node metastasis. *Cancer Res*. 2001; 61:582–588.

Sumantran VN, Ealovega MW, Nunez G, Clarke MF, Wicha MS. Overexpression of Bcl-XS sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 1995; 55: 2507–10.

Sundelacruz S, Levin M, Kaplan DL. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev Rep*. 2009; 5:231–246.

Sundelacruz S, Levin M , Kaplan DL. Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. PLoS ONE 2008; 3:3737.

Surapaneni MS, Das SK, Das NG. Designing paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: Current status and challenges. ISRN Pharmacol 2012. 2012; 6: 231-239.

Tabiasco, J, Pont F, Fournie JJ, and Vercellone A. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. Eur. J Biochem. 2002; 269:2591–2600.

Thevissen K, Ghazi A, De Samblanx GW, Brownlee C, Osborn RW, and Broekaert WF. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. J Biol. Chem. 1996; 271:15018–15025.

Tiernan AM. Behavioral risk factor in breast cancer: Can risk be modified? The Oncologist. 2003; 8:326–334.

Tokuoka S, Morioka H. The membrane potential of the human cancer and related cells I. Gan. 1957; 48:353–354.

Tokur O, Aksoy A. In vitro Sitotoksiste Testleri. Harran Uni Vet Fak Der. 2017; 6: 112-118.

Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Yilmaztepe Oral A, Demirci M. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. Toxicology in Vitro 2008;22: 232–239.

Urech K, Schaller G, and Jäggy C. Viscotoxins, Mistletoe lectins and their isoforms in Mistletoe *Viscum album* L extracts Iscador analytical results on pharmaceutical processing of mistletoe. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 2006; 56: 428-434.

Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD, Fidler IJ. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res.* 1991; 51: 3062.

Villalonga N, Ferreres JC, Argiles JM, Condom E, Felipe A. Potassium Channels Are a New Target Field in Anticancer Drug Design. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 2007; 2: 212–223.

Wahl AF, Donaldson KL, Fairchild C, Lee FY, Foster SA, Demers GW, et al. Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat Med.* 1996; 2:72–9.

Waks AG, Winer EP. Breast Cancer treatment a review. *JAMA.* 2019; 321(3): 288-300.

Wall ME, Wani MC. Camptothecin and Taxol: discovery to clinic—thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 1995; 55: 753–760.

Wang F, Naisbitt GH, Vernon LP, Glaser M. Pyrularia thionin binding to and the role of tryptophan-8 in the enhancement of phosphatidylserine domains in erythrocyte membranes. *Biochemistry.* 1993; 32:12283–12289.

Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel-induced cell death: Where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer.* 2000;88(11):2619–2628.

Wang W, Xiao J, Adachi M, Liu Z, Zhou J. 4-aminopyridine Induces Apoptosis of Human Acute Myeloid Leukemia Cells via Increasing $[Ca^{2+}]_i$ Through P2X7 Receptor Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2011; 28: 199-208.

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Plant antitumor agents. VI. J Am Chem Soc.* 1971; 93: 2325-2327.

Weaver BA, Cleveland DW. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell.* 2005; 8(1): 7-12.

Wilson HA, Huang W, Waldrip JB, Judd AM, Vernon LP, Bell JD. Mechanisms by which thionin induces susceptibility of S49 cell membranes to extracellular phospholipase A2. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997; 1349:142–156.

Wingo PA, Cardinez CJ, Landis SH, Greenlee RT, Ries AG, Anderson RN, Thun MJ. Long-term trends in cancer mortality in the United States, 1930–1998. 2003; *Cancer* 97:3133.

Wonderlin WF, Strobl JS. Potassium channels proliferation and G1 progression. *J Membr.Biol.* 1996; 154: 91–107.

Wonderlin WF, Woodfork KA, Strobl JS. Changes in membrane potential during the progression of MCF-7 human mammary tumor cells through the cell cycle. *J Cell. Physiol.* 1995; 165:177–185.

Wood LD, Parson DW, Jones S, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2007; 318:1108-1113.

Woods CM, Zhu J, McQueney PA, Bollag D, Lazarides E. Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol Med*. 1995; 1: 506–26.

Yang M, Brackenbury WJ. Membran potential and cancer progression. *Frontiers in Physiology*. 2013; 4:185

Yuspa SH. The pathogenesis of squamous cell carcinogenesis. Thirty- third GH.A Clowes memorial Award Lecture. *Cancer res*. 1994;54: 1178- 1189.

Zasadil LM, Andersen KA, Yeum D, Rocque GB, Wilke LG, Tevaarwerk AJ, Raines RT, Burkard ME, Weaver BA. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Sci Transl Med*. 2014;6(229): 229-243.

Zhang K, Heidrich FM, DeGray B, Boehmerle W and Ehrlich BE. Paclitaxel accelerates spontaneous calcium oscillations in cardiomyocytes by interacting with NCS-1 and the InsP3R. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49:829-835

9. EKLER

EK 1. Yayın

Clinical and Experimental Health Sciences

"Synergistic Effects of 4-Aminopyridine and Paclitaxel on MCF 7 cell line"

Article ID: 557797

EK 2. Kongre Bildirileri

1. International Congress on Biological and Medical Sciences 2018 31 October - 03 November 2018, Nigde / Turkey.

“Effect of 4- Aminopyridine on Paclitaxel Activity on MDA- MB 435 Breast cancer cell line.“

2. 6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi 27-30 Ekim 2016 Konya. Turk J Biochem, 2016; 41 (S4).

“Effect Of 4-Aminopyridine On Paclitaxel Activity In Mcf-7 Cell Line.“

3. VI. International Congress of Molecular Medicine 22 - 25th of May 2017, Istanbul, Turkey.

Turkish Journal of Molecular Biology & Biotechnology Supplement 1 (2017).

“Synergistic Effect of 4-aminopyridine and Paclitaxel on MDA- MB 231 Breast Cancer Cell Line.“

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Esra Münire	Soyadı	Aydoğmuş
Doğum Yeri	Zonguldak	Doğum Tarihi	14.03.1987
Uyruğu	T.C.	Tel	5555905434
E-mail	esrace@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/ Uzmanlık		
Yüksek Lisans	M.Ü. Tıp Fak. Biyofizik A.B.D.	2013
Lisans	M.Ü. Fen Edebiyat Fak. Fizik	2009
Lise	Zonguldak Atatürk Lisesi	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Öğr. Gör.	İstinye Üniversitesi	2018-2019

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu								
YDS	Yökdil	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
75	81.5							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	71	68	60
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

EK : Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)