

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

HELA HÜCRE HATTINDA EF-24'ÜN, TAKSOL'ÜN OLUŞTURDUĞU APOPTOTİK
VE
ANTİ-PROLİFERATİF CEVABI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Işinsu KARAOĞLU

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Sevdâ MENEVŞE

ANKARA

Temmuz, 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

HELA HÜCRE HATTINDA EF-24'ÜN, TAKSOL'ÜN OLUŞTURDUĞU APOPTOTİK
VE
ANTI-PROLİFERATİF CEVABI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Işinsu KARAOĞLU

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Sevdâ MENEVŞE

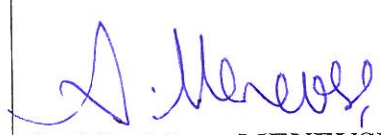
ANKARA
Temmuz, 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 03/08/2012


Prof. Dr. Sevdâ MENEVŞE
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Adnan MENEVŞE
Gazi Üniversitesi


Yrd. Doç. Dr. Ebru ALP
Giresun Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

No	Sayfa
Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller ve Grafikler	V
Tablolar	VII
Semboller, Kısaltmalar	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serviks Anatomisi	3
2.2. Serviks Kanseri	4
2.3. Serviks Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri	5
2.4. Human papillomavirus	9
2.5. Patogenez ve Gelişim Öyküsü	10
2.6. Taksol	11
2.6.1. Taksol'ün Kimyasal Yapısı	12
2.6.2. Taksol'ün Etki Mekanizması	13
2.7. EF-24	14
2.8. Apoptoz	15
2.9. Kaspaz-3	19
2.10. Kaspaz-9	19
2.11. Siklin D1	20
2.12. HeLa Serviks Adenokarsinomu	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	22

3.1.1. HeLa Hücre Hattı	22
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	22
3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	23
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.1.5. Kullanılan Kitler	23
3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	24
3.2.1. % 10'luk RPMI-1640 Besiyerinin Hazırlanışı	24
3.2.2. % 1'lik RPMI-1640 Besiyerinin Hazırlanışı	24
3.2.3. MTT Karışımının Hazırlanması	24
3.2.4. 1X PBS Çözeltisinin Hazırlanması	24
3.3. Yöntemler	25
3.3.1. Hücre Kültürü	25
3.3.2. MTT Hücre Canlılığı Deneyi	25
3.3.3. Hücre Kültüründen Total RNA'nın Elde Edilmesi	26
3.3.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi (RT-PCR)	27
3.3.4.1. Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı	27
3.3.5. Gen İfadesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi	28
3.3.5.1. Siklin D1 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	28
3.3.5.2. PI3KA Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	29
3.3.5.3. Kaspaz-3 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	29
3.3.5.4. Kaspaz-9 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	30
3.3.5.5. GAPDH Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	31
3.3.5.6. Siklin D1, PI3KA, Kaspaz-3, Kaspaz-9, GAPDH Genleri için Real Time PCR Tepkime Karışımları	31
3.3.5.7. Light Cycler (LC) Deney Programı	32
3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	33

4. BULGULAR	34
4.1. HeLa Hücrelerinin Taksol ve EF-24'e Duyarlılığının MTT Hücre Canlılığı Yöntemi ile İncelenmesi	34
4.2. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	38
4.3. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması	40
4.3.1. Taksol ve EF-24' ün' Siklin D1, PI3KA, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Genlerinin İfade Düzeylerine Etkisi	40
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ	56
7. ÖZET	59
8. SUMMARY	61
9. KAYNAKLAR	63
10. EKLER	83
11. ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER ve GRAFİKLER

	Sayfa No
Şekil 1: Uterus ve Kısımları	4
Şekil 2: Serviks Kanserinin Gelişimi	11
Şekil 3: Taksol'ün Moleküler Yapısı	12
Şekil 4: EF-24'ün Moleküler Yapısı	15
Şekil 5: Dışsal ve İçsel Apoptoz Yolakları	17
Şekil 6: Siklin D1 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	28
Şekil 7: PI3KA mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	29
Şekil 8: Kaspaz-3 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	30
Şekil9:Kaspaz-9 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	30
Şekil10:GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	31
Şekil 11: HeLa hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Taksol ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları	34
Şekil 12: HeLa hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) EF-24 ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları	35

Şekil 13: HeLa hücrelerine (10.000 hücre/kuyu) 24 saat süre ile 25nM Taksol ve EF-24'ün tek başına ve birlikte uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık oranları. 36

Şekil 14: HeLa hücrelerine 24 saat süre ile 50 nM Taksol ve EF-24'ün tek başına ve birlikte uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık oranları. 37

Şekil 15: D1, PI3KA, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ifadelerini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. 39

Şekil 16: HeLa hücrelerine 24 saat Taksol ve EF-24 uygulanması sonrasında SiklinD1 geninin mRNA ifade düzeyindeki değişiklik. 41

Şekil 17: HeLa hücrelerine 24 saat Taksol ve EF-24 uygulanması sonrasında PI3K geninin mRNA ifade düzeyindeki değişiklik. 41

Şekil 18: HeLa hücrelerine 24 saat Taksol ve EF-24 uygulanması sonrasında kaspaz-9 geninin mRNA ifade düzeyindeki değişiklik. 43

Şekil 19: HeLa hücrelerine 24 saat Taksol ve EF-24 uygulanması sonrasında kaspaz-3 geninin mRNA ifade düzeyindeki değişiklik. 43

TABLÖLAR

	Sayfa No
Tablo 1: RT-PCR tepkime karışımı	27
Tablo 2: Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program	27
Tablo 3: Siklin D1, PI3KA, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH Real-Time PCR tepkime karışımı	31
Tablo 4: Siklin D1, PI3KA, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı	32

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

A549	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Adenokarsinomu Hücreleri
AIDS	: Kazanılmış İmmun Yetmezlik Sendromu
Apaf-1	: Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör 1
APO1/Fas	: Apoptotik protein
BT-474	: Meme Kanseri Hücre Hattı
Bcl-2	: B hücresi lenfoma geni 2
°C	: Santigrad Derece
CARD	: Kaspazların Kümelenme Bölgeleri (Caspase recruitment domain)
COX2	: Siklooksijenaz-2
CASP3	: Kaspaz 3 geni
CASP9	: Kaspaz 9 Geni
Cp	: Crossing point
cDNA	: Komplementer DNA
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Eg5	: Mitotik Kinesin
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
ERK	: Ekstrasellüler düzenleyici MAP kinaz
FCS	: Fetal sıgır serumu
Fas	: (CD95/APO-1) TNF reseptör ailesinden bir hücre yüzeyi "ölüm reseptörü"
FasL	: Fas Ligandı
GAPDH	: Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrojenaz

HeLa	: Serviks Epitel Adenokarsinom Hücreleri
Hep-G2	: Hepatoselüler Karsinoma hücre hattı
HL-60	: Lenfositik Hücre Soyu
HPV	: İnsan papilloma virüsü (Human papillomavirus)
HPV-18	: İnsan papilloma virüs-18
HPV-6	: İnsan papilloma virüs-6
HR	: Yüksek Riskli
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (Human Immunodeficiency Virus)
HR22C16	: Mitotik Kinesin İnhibitörü
HR22C16-A1	: Mitotik Kinesin İnhibitörü Analogu
H520	: Akciğer Skuamöz Kanser Hücre Hattı
HIF-1	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör -1
HIF-1 α	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör -1 α
HGSIL	: Yüksek Grade'li Servikal İntraepitelyal Lezyon
LR	: Düşük Riskli
LGSIL	: Düşük Grade'li Servikal İntraepitelyal Lezyon
LC	: Light Cyclor
mg	: Miligram
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
MCF-7	: Meme Kanseri Hücre Hattı
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MAPK	: Mitojen Aktive Eden Kinaz
MAP	: Mitojen Aktive Eden Protein
mRNA	: Mesajcı RNA
ml	: Mililitre
NaCl	: Sodyum Klorür
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
NF-KB	: Nükleer Faktör Kappa B

PA1	: İnsan Ovaryum Kanseri Hücre Hattı
PI3K	: Fosfatidilinozitol 3 Kinaz
P53	: Protein 53
PKB/Akt	: Protein Kinaz B
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
pmol	: Pikomol
PTEN	: Tümör Süpresör Geni
pRB	: Retinoblastoma Baskılayıcı Gen
pH	: Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması
Rpm	: Dakika Başına Dönme Sayısı
RT-PCR	: Ters transkriptaz-Polimeraz Zincir Tepkimesi
REST	: Relatif Ekspresyon Software Tool
RNA	: Ribonükleik asit
RNase	: Ribonükleaz
sn	: Saniye
SK-BR-3hr	: Meme Kanseri Hücre Hattı
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü- α
UPL	: Universal Probes Kütüphanesi
UV	: Ultraviyole
Wnt	: Wingless-int 1
WiDr	: İnsan Kolon Karsinoma Hücre Hattı
XIAP	: X'e Bağlı Apoptoz Baskılayıcı Protein
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
5637	: Mesane Kanseri Hücre Hattı

1. GİRİŞ

Serviks kanseri dünyada kadınlar arasında meme kanserinden sonra en sık tanı konan ve ölüme neden olan kanserlerden ikincisidir. Ortalama görülme yaşı 52'dir, ancak 35-39 ve 60-64 yaş aralığında görülme sıklığında belirgin bir artış bulunmaktadır. Dünyada her yıl 530 bin kadına serviks kanseri tanısı konmakta ve bu kadınların 275 bin'i kaybedilmektedir. Kansere bağlı mortalitede Serviks kanseri 7'nci sırada yer almakta iken Türk popülasyonunda görülme sıklığı bakımından 2010 Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre 10. sırada yer almaktadır.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar serviks kanseri için majör risk faktörünün *Human Papillomavirus* olduğunu göstermiştir. Cinsel yolla bulaşan bu virüs serviks kanserinin yanı sıra, servikal displazilere, başta genital bölge olmak üzere tüm vücuttaki siğillere, ayrıca vulva/vajina, anüs, penis kanserlerine ve daha az oranda ağız ve orofarenks kanserlerine neden olmaktadır.

Mikrotübüller esas olarak hücre bölünmesi sırasında mitotik apareyin oluşumunda rol oynamakla birlikte, hücre içi transport, sinyal iletimi, hareket yeteneği ve hücre şeklinin korunmasında görev alırlar. Mikrotübül stabilizatörleri olarak kullanılan moleküller, mikrotübül dinamiğinde meydana getirdikleri değişiklikten dolayı metafaz/anafaz geçişini engellerler. Mitoz bölünmenin bu şekilde baskılanması apoptozu uyarır. Bu grup ilaçlardan en yaygın olarak kullanılan Taksol, küçük hücre dışı akciğer kanseri, metastatik meme kanseri ve ovaryum kanseri gibi çeşitli kanserlerde kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır. Bu molekül mikrotübül depolimerizasyonunu inhibe ederek mikrotübül yapısını stabil hale getirmektedir. Böylece hücre proliferasyonunu metafaz/anafaz sınırında duraklatarak inhibe etmekte ve oluşan mitotik duraklamanın sonucu olarak da apoptoz gözlenmektedir.

Son zamanlarda anti-proliferatif ve anti-anjiyogenik özelliklerinden dolayı dikkat çeken önemli bir anti-kanser ajanıdır curcumin. Curcumin, *Curcuma longa* bitkisinin köklerinden izole edilen, zencefil ailesine ait bir bitkidir. Çeşitli kanser türlerinde kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Curcuminin yanı sıra curcuminden elde edilen sentetik analoglarının da kanser çalışmalarında yaygın olarak kullanımı mevcuttur. EF-24, yapısal olarak curcumine benzeyen ancak curcuminden daha etkili ve biyoyararlanımı daha fazla olan sentetik bir curcumin analogudur. EF-24'ün mikrotübül stabilizasyonunu indüklediği ve in vitro koşullarda çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek ve bunun sonucu olarakda apoptozu uyardığı bilinmektedir.

Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar, DNA sentezi ve hücre bölünmesinde önemli rol oynarlar. Bu moleküllerin işlevlerindeki değişimler hücre bölünme kontrolünün bozulması ve sonrasında kanser gelişimi ile sonuçlanabilir. Bu moleküllerden biri olan siklin D1, hücre bölünme döngüsünde memeli hücrelerinde G1/S fazı geçişini düzenlemektedir. Siklin D1'in fazla ifade edilmesi de çeşitli kanserler ile ilişkili bulunmuştur. Hücre proliferasyonunda rol alan diğer bir gen de PI3K'dır. PI3K'nın fazla ifade edilmesinde çeşitli kanser türleriyle ilişkisi gözlenmiştir.

Bu bilgiler doğrultusunda, mikrotübül yapısını stabilize ederek hücrelerinin çoğalmasını engelleyen Taksol ve EF-24'ün serviks kanseri hücre hattı olan HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik ve anti-proliferatif etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bundan dolayı, hücre döngüsünün ilerlemesinde etkin rol oynayan siklin D1 ve PI3K genleri ile apoptotik yolda görevli olan kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA ifade düzeyleri üzerindeki etkileri değerlendirildi. Aynı zamanda HeLa hücrelerinin bu ilaçlara verdiği apoptotik yanıtları ve ilaçların hücre canlılığı üzerine olan etkileri de araştırıldı.

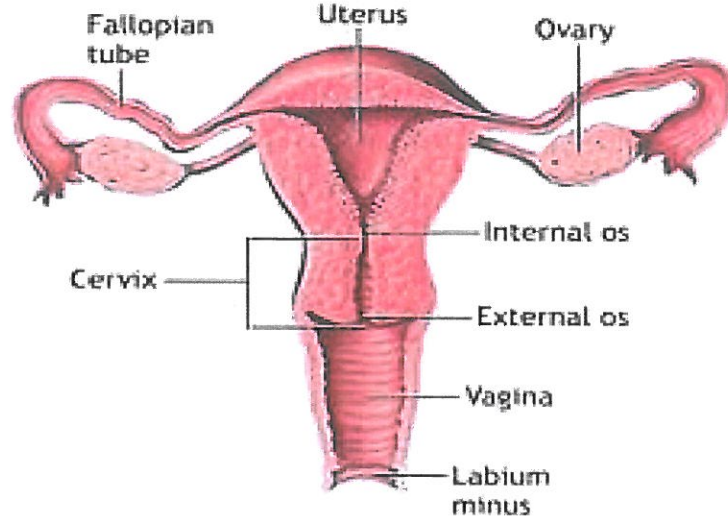
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Serviks Anatomisi

Kadın üreme organları pelvik kavitede yerleşmiş iç üreme organları ile perinede yerleşmiş dış üreme organlarından oluşur. İç üreme organları uterus, overler, tuba uterinalar ve vajenden oluşur. Overler, uterusun her iki yanında, tuba uterinaların fimbrial uçlarına yakın olarak yerleşmişlerdir. Tuba uterinalar ise bir çifttir ve uterusun üst yan köşelerinden açılırlar. Uterus, dört kısımda incelenir. Fundus, korpus, istmus ve servikstir.¹

Serviks uterusun dar bir segmenti olup silindirik veya konik bir şekildedir. 3-4 cm uzunluğunda ve 2.5 - 3.5 cm çapındadır. Şekli ve büyüklüğü kadının yaşına, paritesine ve hormonal durumuna bağlı olarak değişmektedir. Serviksin ortasında uterus kavitesi ve vajinayı birleştiren servikal kanal bulunur. Kanalin uterusu açılan kısmına internal os, vajinaya açılan kısmına eksternal os adı verilir. Doğum yapmamış kadınlarda eksternal os küçük ve yuvarlakken doğumdan sonra enine bir yarık olarak görünür.^{1,2} Serviksin external os'un dış tarafında kalan kısmı ekstoserviks, yukarısında kalan kısım ise endoserviks olarak adlandırılır. Endoserviks'den geçen endoservikal kanal uterus boşluğunu vajina ile birleştirmekte ve internal os'dan external os'a uzanmaktadır. Endoservikal kanalın uzunluğu ve eni yaş ve hormonal duruma göre değişiklik gösterir.^{1,3,4}

Servikal mukus yapımı hormonal etki altındadır. Mukozanın altında, submukoza da bağ dokusu ve az miktarda sirküler yerleşimli kas tabakası vardır.⁵ Serviksin stroması, içinden serviksin damar, sinir ve lenfatiklerinin geçtiği yoğun fibromüsküler dokudan oluşur.⁶ Servikal lenfatik drenaj, primer ve sekonder grup lenf bezleri ile olur. Lenfatik drenajın bu özelliği serviks kanserinin yayılmasında ve tedavisinde önemlidir.⁴



Şekil 1 : Uterus ve Kısımları

2.2. Serviks Kanseri

Serviks kanseri dünyada kadınlar arasında meme kanserinden sonra en sık tanı konan ve ölüme neden olan kanserlerden ikincisidir.⁷ Ortalama görülme yaşı 52'dir, ancak 35-39 ve 60-64 yaş aralığında görülme sıklığında belirgin bir artış bulunmaktadır.⁸ Her yıl dünyada 530 bin kadına serviks kanseri tanısı konmakta ve bu kadınların 275 bin'i kaybedilmektedir.⁹

Serviks kanseri, uzun preinvaziv dönemi, tarama programlarının varlığı ve preinvaziv lezyonların etkin tedavisinin mümkün olması nedeniyle önlenabilir bir kanser olarak kabul edilir.¹⁰ Bu nedenle gelişmiş ülkelerde görülme oranı düşüş göstermektedir. Yılda 2.7 milyon kadının ölümüne neden olan serviks kanserinin sadece 0.3 milyonunun gelişmiş olan ülkelere görülmesi de bunu desteklemektedir.¹¹

Dünya kanser istatistikleri (GLOBOCAN) 2008 verilerine göre Kansere bağlı mortalitede serviks kanseri, 7'nci sırada yer almakta iken¹² Türk populasyonunda görülme sıklığı bakımından 2010 Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre 10. sırada yer almaktadır.¹³

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar serviks kanseri için majör risk faktörünün Human Papillomavirus olduğunu göstermiştir. Cinsel yolla bulaşan bu virus serviks kanserinin yanı sıra, servikal displazilere, başta genital bölge olmak üzere tüm vücuttaki siğillere, ayrıca vulva/vajina, anüs, penis kanserlerine ve daha az oranda ağız ve orofarenks kanserlerine neden olmaktadır.¹⁴

2.3. Serviks Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Serviks kanseri-HPV ilişkisi ilk olarak 1980'lerin başında Alman virologist Harald zur Hausen tarafından belirlenmiştir.¹⁵ Günümüzde ise serviks kanseri etyolojisinde HPV enfeksiyonu büyük önem taşımaktadır. Seksüel yolla bulaşan bu onkogenik virüsün sıklıkla servikal transformasyon zonunda metaplastik epitelin kalıcı subdural enfeksiyonuna yol açtığı kanıtı ile desteklenmektedir. Skuamöz hücreli kanserlerin % 95'inde, adenokarsinomların da % 90'ında HPV DNA pozitif bulunmuştur.¹⁶ Bugün serviks kanseri gelişimi için HPV'nin mutlaka var olması gerektiği, diğer risk faktörlerinin ise ya virüsle karşılaşma oranlarını arttırdığı ya da viral persistansı-karsinojenik süreci hızlandırdığı için önemli olduğu düşünülmektedir. Serviks kanseri risk faktörleri şunlardır.¹⁷

1) Demografik faktörler:

- İleri yaş
- Irk
- Düşük sosyo-ekonomik durum
- Düşük eğitim düzeyi

2) Davranış ve seksüel faktörler:

- Fazla sayıda seksüel partner-İnfeksiyöz partner
- Erken ilk koitus yaşı
- Sigara
- Uzun süreli oral kontraseptif kullanımı
- Folat, karoten ve vitamin C'den fakir diyet

3) Medikal/Jinekolojik faktörler:

- Multiparite
- Erken yaşta gebelik
- Cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü
- Spesifik tip HPV enfeksiyonu
- HIV enfeksiyonu
- İntrauterin dönemde dietilbesterol ile karşılaşma
- Rutin sitolojik tarama olmaması
- İmmun yetmezlik¹⁸

Cinsel davranışlar: Erken yaşta serviks hücreleri tam olarak olgunlaşmadığından gençlerde HPV enfeksiyonu gelişme olasılığı daha fazladır.¹⁹ Çünkü skuamöz kolumnar hücre bileşkesi geçiş alanı çok daha dışa açıktır. Erişkin serviksinde kolumnar epitelyumdan oluşmuş servikal ektopi daha küçük bir alan kapladığından, HPV'ye ergen serviksinden daha dayanıklıdır.²⁰ Bu nedenle ilk cinsel ilişkiye başlama yaşının erken olması serviks kanseri gelişme olasılığını artırır.¹⁹ HPV enfeksiyonu en sık cinsel yönden aktif 15-25 yaş grubu kadınlarda görülürken (% 20), 30 yaştan sonra azalma vardır (% 5).^{21,22}

Sigara: Sigara içen kadınlar içmeyenlere göre iki kat daha fazla serviks kanserine yakalanma riskine sahiptir. Çünkü tütün ve türevlerinin içinde bulunan kimyasal maddeler sigara içen kadınların servikal mukusunda saptanmıştır. Bu kimyasal maddeler serviks hücrelerinde DNA hasarı meydana getirerek kanser gelişimine zemin oluşturmaktadır.^{19,23,24}

Beslenme: Şişmanlık ve meyve-sebzelerden fakir beslenme serviks kanseri gelişme riskini artırmaktadır.^{19,24} Karoten, C vitamini alımının kötü olması, A vitamini eksikliği ve folat yetmezliği de serviks kanseri için risk faktörleri arasındadır.^{25,26}

Parite: Yüksek paritenin serviks kanseri ile ilişkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Paritenin artışı; doğum travmaları, hormonal değişim, kadının beslenme durumunun etkilenmesi, immünosüpresyon ve özellikle eversiyon olmak üzere transformasyon zonunda değişimlere neden olarak serviks kanserinin görülmesine yol açabilir.^{26,27} Gebelik sayısının dörtten fazla olması ve ilk gebeliğin 20 yaşından önce olması önemli risk faktörleri olarak gösterilmektedir.^{2,28}

Düşük sosyo-ekonomik durum: Sosyo-ekonomik durumu düşük kişilerin sağlık hizmeti alma oranı daha düşük olduğu için hem rutin taramalara devam oranı, hem de preinvazif lezyonların etkin şekilde tedavi edilebilme oranları düşüktür. Bu kişilerde genellikle beslenme bozukluğu da söz konusudur. Ayrıca bu durum kişilerin hijyen davranışlarını da etkilemekte ve buda enfeksiyon ajanları ile karşılaşma olasılığını artırmaktadır.¹

Oral kontraseptif kullanmak : Beş yıldan fazla oral kontraseptif kullanımı serviks kanseri gelişme riskini iki kat artırmaktadır, kullanımı bırakıldıktan sonra risk azalmaya başlar ve 10 yıl sonra normale dönmektedir.¹⁹

Oral kontraseptif kullanımının servikal glanduler anormalliklere yol açtığı ileri sürülmektedir. Ancak bu hipotez yeterince destek görmemiştir. Çünkü puberte sonrası erken seksüel aktiviteye başlanması, çok seksüel eşin olması ve önceden cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsünün bulunması gibi faktörlerin de etkili olabileceği ifade edilmektedir.^{5,27}

Eş Durumu: Kadınların eşlerinde prostat ya da penis kanserinin olmasının, cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsünün bulunmasının, sünnetsiz oluşunun, birden fazla kişi ile ilişkide bulunmasının, daha önce servikal kanserli eş olmasının serviks kanserinin görülme sıklığını arttırdığı düşünülmektedir.^{1,2,29}

Cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü: HIV bağışıklık sisteminin işlevlerini bozarak kadınların daha kolay HPV enfeksiyonuna yakalanmasına neden olur. Bağışıklık sistemi aynı zamanda kanser hücrelerinin öldürülmesini sağladığından AIDS'li hastalarda prekanseröz lezyonlar normale göre daha hızlı bir şekilde serviks kanserine dönüşür. Tedavi edilmemiş diğer vajinal enfeksiyonlar, özellikle *Klamidy*, *Trikomanas vajinalis*, genital herpes enfeksiyonları yüksek riskli HPV tiplerinin kanser yapıcı etkisini güçlendirebilir.^{19,24,30}

Dietilstilbestrol: 1940-1971 yılları arasında düşüğü önlemek için kullanılmıştır. Anneleri dietilstilbestrol kullanan kadınların serviks kanserine yakalanma olasılığı daha yüksektir.^{19,31}

Serviks kanserinin ortaya çıkmasında rol oynayan bu faktörlerin yanısıra en önemli risk faktörleri; taramanın yapılmaması, eksik veya yanlış yapılması ve anormal sonuçların yanlış yönetimidir.¹⁵

2.4. Human papillomavirus

İnsan papillomavirusları, *Papillomaviridae* ailesinden DNA virüsleri olup sadece insanları enfekte ederler. Bu virüsler, proteinle çevrili çift sarmal DNA genomu içerirler. DNA dizisindeki farklılığa göre 100'den fazla HPV tipi belirlenmiştir. İnsanlarda mukozal ve genital enfeksiyonlara neden olan 70'den fazla HPV tipi mevcuttur.³² HPV kanserojen özelliklerine göre iki gruba ayrılır;

1. Grupta kanser açısından “düşük riskli (LR)” enfeksiyonlara neden olan virüsler yer alır. Özellikle HPV-6 ile 11'in başta geldiği bu virüsler düşük dereceli servikal lezyonlar ve genital siğillerin nedenidirler.³³ LR:6-11-40-42-43-44-54-61-70-72-74-81-83-84.^{34,35}

2. Grupta ise “yüksek riskli (HR)” olarak adlandırılan kanserojen HPV tipleri yer almaktadır.³³ Yüksek riskli HPV tipleri servikal kanserlerin ve onun öncüsü olarak kabul edilen prekanseröz, skuamöz intraepitelyal lezyonların %99.7'sin de saptanmaktadır.^{36,37} HR:16-18-31-33-35-39-45-52-56-58-59-67-68.^{34,35}

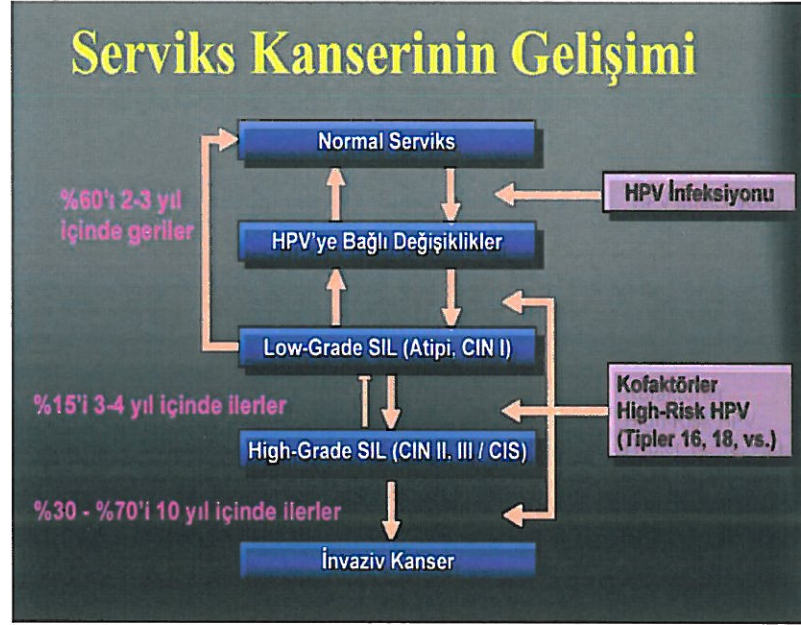
Servikal kanser gelişiminde en riskli olanı HPV-16 enfeksiyonudur.³⁸ Tüm dünyada serviks kanseri olgularının % 55'inden sorumludur.³⁶ Diğer yüksek riskli virüs HPV-18 ise sadece skuamöz lezyonlarda değil serviksin glandüler lezyonlarında da bulunmuştur ve serviks kanserlerinin %10-12' sinde görülür.³⁹

HPV enfeksiyonlarının sıklığı değişik bölgelerde % 2-44 arasında bildirilmektedir.^{37,38} Onkolojik açıdan yüksek riskli HPV tipleri ile enfeksiyon en sık 25 yaş altı kadınlarda görülür; daha sonra yaşla bir azalma kaydedilir. 55 yaş ve üzeridekilerde düşük riskli HPV tipleri daha baskın olarak saptanmaktadır.⁴⁰

Gelişmiş ülkelerde cinsel olarak aktif erkek ve kadınların % 50'sinden fazlasının yaşamlarının bir döneminde en az bir HPV tipi ile enfekte oldukları bilinmektedir.^{38,41} HPV, cinsel temas sırasında direkt deri veya mukoza teması ile insanlara veya vertikal olarak enfekte maternal genital traktus ile temas eden yenidoğana bulaşır. Düşük riskli HPV'lerin prenatal geçişi ile yenidoğan ve süt çocuklarında rekürren respiratuvar papillomatozis adı verilen solunum yollarında papillomların oluşumu ve solunum sıkıntısının ortaya çıktığı tablo gelişir.³² Bulaşma olması için cinsel ilişkide penetrasyon şart değildir. Genital bölgede cilt teması bile bulaşma için yeterlidir. Semptomu olmayan HPV ile enfekte kişiler virüsün yayılmasında önemli rol oynarlar. HPV'nin bulaşması için tek bir cinsel temas bile olması yeterlidir ve enfeksiyon ilk cinsel temastan bir ay gibi kısa bir sürede gelişebilir.⁴⁰

2.5. Patogenez ve Gelişim Öyküsü

HPV enfeksiyonlarının çoğu asemptomatik ve geçicidir.^{39,42} Pek çok kadın HPV ile enfekte olur ancak bunlardan bazıları serviks kanserine dönüşmektedir(%10). Güçlü bağışıklık sistemi bu virüsü etkisiz kılabilir.¹⁹ Normal bir serviks HPV enfeksiyonuna maruz kaldıktan sonra; öncelikle ona bağlı enfeksiyöz değişiklikler görülür. Bu değişiklikler spontan normale geri dönebileceği gibi düşük grade'li servikal intraepitelyal lezyon'a (LGSIL) dönüşebilir. LGSIL olgularının %70'i enfeksiyonu izleyen 2-3 yıl içerisinde spontan gerileyerek normale dönebilir. Ancak %15'i 3-4 yıl içerisinde ko-karsinojenlerin de etkisiyle ilerleyerek yüksek grade'li servikal intarepitelyal lezyona (HGSIL) dönüşebilir. HGSIL'lerin % 30-70 kadarı tedavi edilmedikleri takdirde 10 yıl içerisinde invaziv kansere dönüşebilir.²⁷



Şekil 2 : Serviks Kanserinin Gelişimi

Tümörün intraepitelyal sınırlardan çıkıp serviks stromasına yayıldığı durumlara invaziv servikal karsinoma denir. Serviks kanseri direkt yolla serviks stromasına yayıldıktan sonra kan ve lenf yolu ile ya da intraperitonel implantasyon yolu ile metastazlar yapabilir. En yaygın yayılım yolu direkt yayılımdır. Yayılım endoservikte başlar ve tüm servikse, parametriumu, vezikovajinal ve rektovajinal septalara, vajinanın üst kısmına, mesane ve rektuma yayılır. Lenf ve kan yolu ile akciğerler, mediastinal ve supraklavikular nodlara, karaciğere ve kemiklere yayılım görülür.^{1,43}

2.6. Taksol

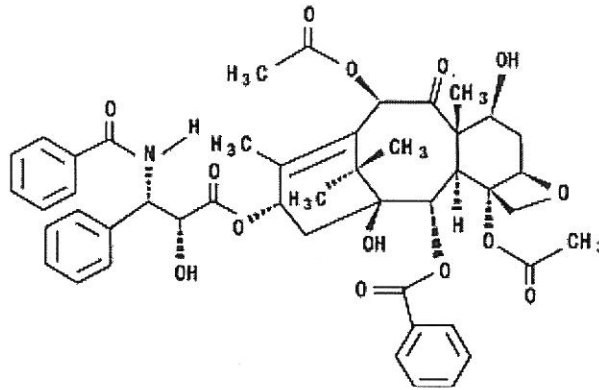
Kemoterapotiklerin antineoplastik ilaçlar grubundan olan Taksol, taksanlar sınıfına aittir.⁴⁴ Pasifik porsuk ağacının (*Taxus brevifolia*) kabuğundan üretilen, doğal diterpen alkaloidleri sınıfından sitotoksik bir anti-kanser ilacıdır. PAKLİTAKSEL olarak da adlandırılmaktadır.^{45,46,47,48}

Taksanlar çeşitli kanser türlerinin tedavisinde çok etkilidir. Bir taksoit türevi olan Taksol over, meme kanseri, lösemi, küçük hücreli olmayan akciğer ve prostat kanseri tedavisinde kombine ya da tekli tedavi şeklinde kullanılmaktadır.⁴⁹

Taksanlar, doğal kaynaklıdır ve metafaza özgüdürler. DNA sentezini ve DNA yapısını etkilemezler.⁵⁰ Mikrotübüller üzerine olan etkileriyle hücre bölünmesinin metafazda durmasına ve hücre ölümüne neden olduklarından bu sınıfa ait ilaçlar M dönemine özgü ilaçlardır. Bunlara mitoz zehirleri ya da metafaz zehirleri de denmektedir. Taksol hücreler üzerindeki etkisini vinka alkaloidler gibi mikrotübüller üzerine yapmaktadır. Ancak vinka alkaloidler, mikrotübüllerin depolimerizasyonuna neden olurken⁵¹, Taksol etkisini mikrotübül depolimerizasyonunu engelleme şeklinde göstermektedir. Mikrotübüllere yüksek bir afiniteyle bağlanarak mikrotübül toplanmasını uyarmakta ve mikrotübül polimerlerini stabilize ederek hücre replikasyonunu durdurmaktadır.^{47,52,53}

2.6.1. Taksol'ün Kimyasal Yapısı

Moleküler formülü $C_{47}H_{51}NO_{14}$ 'tür ve açık kimyasal adı "5 beta,20-epoksi-1, 2alfa, 4, 7beta, 10beta,13alfa-hekzahidroksitaks-11-en-9-on,4,10-diasetat 2-benzoat-13-ester(2R,3S)-N-benzoil-3-fenilizoserin'dir. Moleküler ağırlığı 853,9 daltondur.⁵⁴



Şekil 3: Taksol'ün Moleküler Yapısı

2.6.2. Taksol'ün Etki Mekanizması

Alfa ve β alt birimlerinden oluşan tubulin heterodimer polimerleri olan mikrotübüller, hücre içersindeki dinamik yapı birimleridir. Bu yapılar, esas olarak hücre bölünmesi sırasında mitotik apareyin oluşumunda rol oynamakla birlikte, hücre içi transport, sinyal iletimi, hareket yeteneği ve hücre şeklinin korunmasını içeren çok sayıda vital interfaz reaksiyonlarından da sorumludurlar.^{55,56}

Taksol, hücresel tubulin yapısına bağlanıp, mikrotübül depolimerizasyonunu inhibe ederek mikrotübül yapısını stabil hale getirmektedir.^{55,56,57} Bunun sonucu olarak, hücrelerin G2/M fazında birikmesi ile hücre siklusu bloke olmaktadır.^{56,57} Böylece hücre bölünmesini, proliferasyonunu ve migrasyonunu engelleyerek apoptozu başlatmaktadır.⁵⁸ Taksol tedavisini takiben oluşan apoptozun, G2/M fazında birikimin bir sonucu olarak ortaya çıktığı⁵⁹ ve bunun da uygulanan doza bağımlı olarak değiştiği gösterilmiştir.⁶⁰

Taksol varlığında polimerize olan mikrotübüller oldukça kararlı haldedirler ve soğuk, kalsiyum iyonları ve anti-mitotik ilaçlarla depolimerizasyona dayanmaktadırlar.⁵³

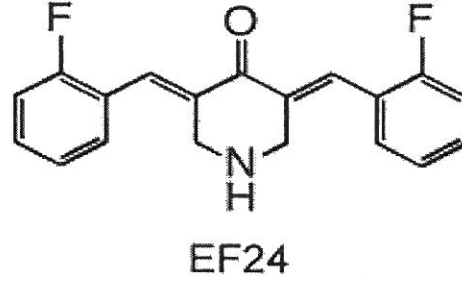
2.7. EF-24

Curcuma longa bitkisinin köklerinden izole edilen curcumin, zencefil ailesine ait çok yıllık otsu bir bitkidir ve yaygın olarak güney ve güneydoğu tropikal Asya'da (Hindistan-Çin) yetiştirilmektedir. Genellikle gıda ürünlerinde renklendirici ve tatlandırıcı baharat olarak kullanılmaktadır.^{61,62}

Cucumin'in çeşitli çalışmalarda anti-oksidan, anti-inflamatuar, immün sistem düzenleyici ve anti-tümoral etkinliği gösterilmiştir.⁶³ Ayrıca farklı tümörler üzerinde çok çeşitli mekanizmalarla anti-karsinojenik etki gösterdiği de bildirilmiştir. İnflamasyonu, hücre proliferasyonunu, bazı onkogenleri, tümör implantasyonunu ve karsinojenlerin biyotransformasyonunu, transkripsiyon faktörü NF-KB ve COX2 enzimini baskıladığı, buna karşılık; glutatyon-s-transferaz enzimini aktive ettiği çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur.^{64,65,66,67,68} Yapılan araştırmalar sonucu doğal curcuminin kimyasal koruyucu, anti-oksidan ve benzeri etkilerinin kanıtlanması ile araştırmacılar benzer yapıda ancak farklı içerikteki sentetik curcumin analoglarına yönelmişlerdir.⁶⁹

EF-24 sentetik bir curcimin analogudur. Yapısal olarak curcumine benzer ancak ondan daha etkili ve biyoyararlanımı daha fazladır.⁷⁰ İn vitro koşullarda çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunun G2/M fazında bloke olmasına neden olur ve bunu takiben de apoptozu uyarır. G2/M kontrol nokta proteinlerinin seviyelerinde artışa neden olur(pp53, p53 ve p21). Ayrıca tümör süpresör geni PTEN ekspresyonunu artırdığı ve PTEN'in aşırı ekspresyonunun da G2/M fazında hücre döngüsünün durdurulmasını ve apoptozu indüklediğine dair çalışmalar mevcuttur.⁷¹ EF-24'ün transkripsiyon faktörü NF-KB'nin inhibisyonu, p38, MAPK, Hsp70, HIF-1 ve mikrotübüller üzerine etki mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur.^{72,73}

Hücre ölümüne curcuminden 10 kat daha büyük potansiyelle neden olur. Ayrıca antikanser taramalarda daha etkilidir ve kombine kullanımı yaygın olan sisplatinden daha az toksiktir.⁷⁴ Yapısal formülü 3,5-Bis(2-fluorobenzylidene)-4-piperidone dur.⁷⁵



Şekil 4: EF-24'ün Moleküler Yapısı

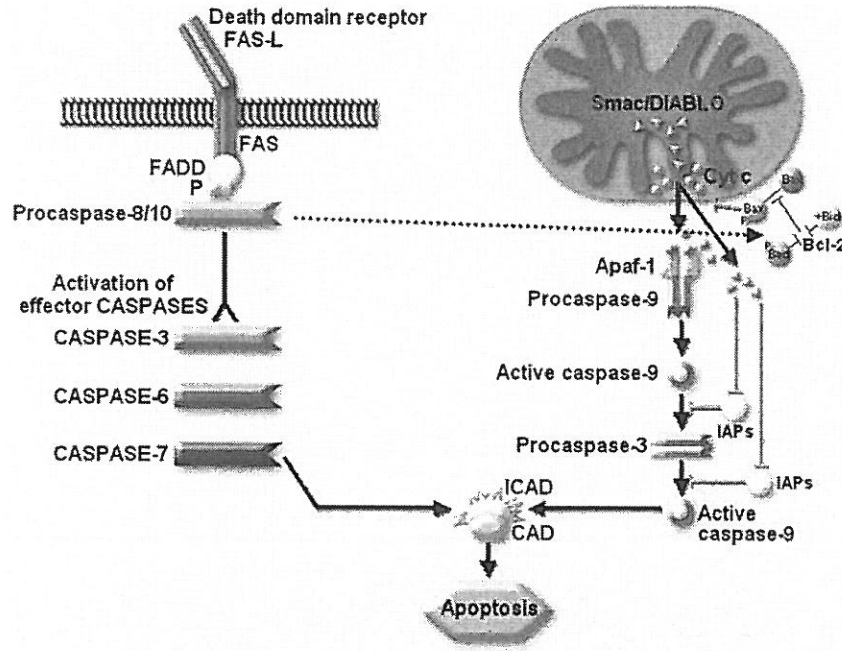
2.8. Apoptoz

Hücre ölümünde nekroz ve apoptoz olarak adlandırılan iki temel mekanizma vardır. Dış etkilerden zarar gören hücreler nekroza, dış veya iç uyarı ile programlı hücre ölümüne dürtülen hücreler ise apoptoza yönelirler.⁷⁶ Yunancada yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır.^{77,78} Apoptoz, hücre-içi ve hücre-dışı pek çok sinyal tarafından iki temel yolak üzerinden aktifleşen ve pek çok protein tarafından regüle edilen, kontrollü ve programlı bir hücre ölüm sürecidir.⁷⁹ Fizyolojik şartlardaki çok hücreli organizmalarda, hem gelişim esnasında hem de gelişimini tamamlamış organizmaların homeostazının sağlanmasında, istenmeyen hücrelerin yok edilmesi için evrimleşmiş bir mekanizmadır.^{80,81}

Bu mekanizma potansiyel zararlı hücrelerin yok edilmesi görevini üstlendiğinden pek çok hastalık ile de yakından ilişkilidir. Aşırı apoptoz iskemik ve nörodejeneratif hastalıklara neden olurken, yetersiz apoptoz otoimmün hastalıklara ve kansere neden olabilmektedir. Apoptotik mekanizma, fizyolojik süreçte büyüme faktörlerinin hücreye ulaşamaması veya hücrenin oksidatif stres, hipoksi, iyonize radyasyon, UV ya da ilaç uygulamaları gibi farklı etkenlerin etkisinde kalması sonucunda oluşan hasarlı hücrelerin yok edilebilmesi için de tetiklenebilmektedir.⁸²

Morfolojik olarak apoptoz süreci; plazma membranının tomurcuklanması, fosfolipidlerin kalıntılarının membranın dış yüzeyine yönelmesi, hücre büzülmesi, kromatin kondensasyonu ve hücre içeriğinin çoklu membran kaplı parçacıklar halinde dağılarak komşu hücreler ve fagositler tarafından yutulmasını kapsayan bir süreçtir.⁸¹ Morfolojik değişimler, hücrenin bütünlük ve canlılık için gerekli olan polipeptidlerin proteolitik yıkımı ile gerçekleşmektedir. Yıkım süreci spesifik sistein proteazlar olan kaspazların aktivitesi sayesinde meydana gelmektedir.⁸³ Apoptotik hücre ölüm mekanizmasında, hücre içi bileşenlerin membran ile çevrilmiş apoptotik parçacıklar halinde çevre dokuya dağılması nedeniyle nekrotik hücre ölüm mekanizmasında meydana gelen enflamasyon oluşmamaktadır.⁸¹

Apoptoz mekanizmasında kaspazlar kilit rol oynar. Kaspaz protein ailesi üyelerinin aktivasyonu ile apoptozun morfolojik süreci gerçekleştirilir.^{79,84} Kaspaz enzimlerinin aktivitesi apoptozun tetiklenmesinden DNA fragmentasyonuna, plazma membranının tomurcuklanmasından, fosfolipid asimetrisinin bozulmasına kadar tüm apoptoz sürecinde yer almaktadır.⁷⁹



Şekil 5: Dışsal ve İçsel Apoptoz Yolakları

Apoptoz yolaklarından birincisi ekstrinsik (dışsal) veya sitoplazmik yolaktır, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin bir üyesi olan Fas ölüm reseptörü yoluyla tetiklenir. İkinci yolak ise intrinsik (içsel) veya mitokondriyal yolaktır, uyarılınca mitokondriden sitokrom-C salınımı ve ölüm sinyalinin aktif hale getirilmesi ile tetiklenir. Her iki yolak da kaspazlar olarak adlandırılan sistein proteazların oluşturduğu yıkım kısmı ile sonlanır.⁷⁶ Kaspazlar inaktif zimojenler olarak sentezlenirler. Apoptotik olayların yıkım fazında aldıkları göreve göre de başlatıcı (kaspaz-2,-8,-9,-10) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3,-6,-7) olmak üzere 2 guba ayrılırlar.⁸⁵ Başlatıcı kaspaz moleküllerinin efektör kaspazları aktifleştirmesiyle hücre iskelet proteinleri gibi çeşitli hedef molekülleri parçalayarak hücre ölümü gerçekleşir.^{86,87}

Ekstrinsik yolağın aktivasyonunu çeşitli yolak ve proteinler düzenler. Transkripsiyonel olarak inaktif bir gen olan FasL genini ayarlayan aktive edici protein 1 ve NF-KB gibi transkripsiyon faktörleri ekstrinsik yolağın düzenleyicileridir.⁸⁸

Apoptozun temel düzenleyicileri olan Bcl-2 ailesi hem pro-apoptotik(Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, ve Hrk) hemde anti-apoptotik proteinleri (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1) içermektedir.⁸⁸ Bcl-2'nin ekspresyonunun azalması antikanser ilaçlara karşı apoptotik tepkiyi yükseltirken, ekspresyonunun artması radyasyon terapisine ve kemoterapötik ilaçlara karşı dirence neden olur. Ayrıca, yüksek Bcl-2 ekspresyonu hücre döngüsü Go fazında hücrelerin yığılmasına sebep olur ve kemorezistansa katkı sağlar. Pro-apoptotik Bcl-2 üyeleri apoptoz destekleyici olarak davranırken, anti-apoptotik üyeleri sitokrom-C'nin salımını engelleyerek apoptoz önleyicisi olarak davranırlar.⁸⁹ Bcl-2'nin intrinsik yolakta gereğinden fazla ifadesi ekstrinsik kontrollü apoptozu engeller; ters olarak da, TNF α , NF-KB'nin ekspresyonunu yükseltir ve Bcl-2 ailesi proteinlerin anti-apoptotik üyelerini uyarır.⁷⁶

Kaspaz aktivasyon yolağının diğer bir düzenleyicisi de X'e bağlı apoptoz baskılayıcı protein (XIAP) molekülüdür. Kaspaz-3 ve kaspaz-9'un inhibitörü olarak görev yapar. Aktif kaspaz-3'ü baskılayarak kaspaz kaskadının oluşmasını engeller ve böylece çok sayıda kaspazın aktivasyonu ile tetiklenen apoptotik uyarı baskılanır.⁹⁰ Apoptoz mekanizması bu şekilde birçok protein ve yolak kontrolü altındadır. Yolaklara örnek olarak da p53, NF-KB, PI3K/Akt yolağı, ve ubikütin/ proteozom yolağı gösterilebilir.^{76,91}

2.9. Kaspaz-3

Sitogenetik lokasyonu 4q35.1 dir. Sistein aspartik asit protezin bir üyesidir. Kaspaz-3'de diğer tüm kaspazlar gibi inaktif proenzimler olarak sentezlenir.⁹² Dışsal apoptotik sinyal iletimini başlatan kaspaz-9 ve içsel apoptotik sinyal iletimini başlatan kaspaz-8 ile aktiveleşen efektör kaspazdır. Aktiveleştiğinde, kromatin oluşumunda görev alan moleküller, transkripsiyon faktörleri ve sinyal iletim yollarında görev alan uyarıların proteolitik yıkımına neden olmaktadır. DNA fragmentasyonunda, DNAaz aktivasyonuna sebep olan kaspaz-3'ün direkt rolü olduğu düşünülmektedir.⁹³ Bu gen embriyonik dönemin 4. gününden itibaren gelişimden sorumludur. Kaspaz-3'deki eksiklik ciddi nörolojik gelişim problemlerine hatta 3 haftalık embriyoda ölüme neden olabilmektedir.^{94,95}

2.10. Kaspaz-9

Apoptozun mitokondriyon yolunda görev alan kaspazdır. Kaspaz-9 geni 1.kromozomun p36.3 bölgesinde yerleşiktir.⁹⁶ Kaspaz-9 geninde 9 ekzon bulunur ve DNA'sı yaklaşık olarak 35 Kb'dır. Genel yapısı diğer kaspazlara büyük benzerlik gösterir. Düzenleyici bölgesinde CARD dizisi bulunur ve bölgeler arası ilmek yapısı bu kaspazda daha uzundur. PKB-Akt ve ERK2 tarafından fosforilasyonla baskılanır. Fizyolojik konsantrasyonlarda inaktif monomer olarak bulunur ancak daha yüksek konsantrasyonlarda dimer şekline geçerek aktiflenir. Kırpılarak değil, adaptör proteinlerle (Apaf-1) kümelenecek aktiflenir.⁹⁷

2.11. Siklin D1

Siklin D1 hücre siklusunda, G1 fazından S fazına geçişte rol alan önemli bir regülatördür.⁹⁸ 11q13 kromozomunda lokalize bcl-1 geninin ürünüdür. Bcl-1 geninde ya da 11q13 lokusunda translokasyon ya da amplifikasyon olduğunda siklin D1'in aşırı ekspresyonu gerçekleşir. Bu genin aşırı ekspresyonu, G1 fazının süresini kısaltarak hücresel proliferasyon hızını artırır yani hücrelerin devamlı ve kontrolsüz olarak G1-S fazına girmesine neden olur. Normal hücrelere göre tümöral hücrelerde siklin D1 ekspresyonu artar.⁹⁹

Siklin D1'in bu sürekli kontrol edilemeyen ekspresyonu ile sonuçlanan mutasyonlar birçok kanserin gelişimine katkıda bulunmaktadır. Siklin D1'in aşırı ekspresyonu, meme karsinomu, mesane karsinomu ve baş-boyunun skuamöz hücreli karsinomu gibi birçok neoplazide gösterilmiştir.^{98,100} Tiroid tümörlerinde yapılan çalışmalara bakıldığında, tümör boyutu arttığında ve lenf nodu metastazı varlığında siklin D1 ekspresyonu yüksek bulunmuştur.^{101,102} Siklin D1 ekspresyonunun bilinen regülatörleri arasında MAP kinaz kaskadı, NF-κB ve Wnt sinyalleri gibi değişik faktörler yer alır.^{103,104}

2.12. HeLa Serviks Adenokarsinomu

Scherer tarafından 1952 yılında 31 yaşında zenci bir kadından izole edilen ilk insan kaynaklı serviks epitel adenokarsinom hücreleridir. Hücrelerin %98'inde küçük telosentrik kromozomlar vardır. Test edilen 1385 hücrenin tümü anöploididir.^{105,106}

p53 düzeyi düşük, retinoblastoma baskılayıcı gen (*pRB*) seviyesi normal olarak bulunmuştur.^{107,108} İnsan papilloma virüs 18 (HPV-18) proteini taşımaktadır. HPV-18 ile infekte olan HeLa hücrelerinden yüksek oranda çözünebilir APO-1/Fas antijeni salgılanmaktadır. Poliovirüsü 1 ve 2, İnsan Poliovirüsü 3, Adenovirüsü Tip 3, Encephalomyocarditis virüslerine duyarlıdır.^{106,109,110,111,112,113}

HeLa hücrelerinde doğal olarak düşük süperoksit dismutaz aktivitesi vardır. Hücre oksidatif stresin hücresel etkilerini incelemek açısından uygun bir modeldir.¹¹⁴ Sitosolik bir enzim olan açıl fosfataz, HeLa hücreleri için güçlü bir apoptoz indükleyicidir.¹¹⁵ İntrinsik glukokortikoid reseptörleri bulundurur.¹¹⁶ Üç tip inositol trifosfat reseptör izoformları tespit edilmiştir.¹¹⁷ HeLa hücrelerinde mitokondride kalsiyum birikimi diğer epitel hücrelerine göre daha hızlıdır. Mitokondri, nükleer tübül içine ve dışına hareket edebilmektedir.^{118,119}

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. HeLa Hücre Hattı

Çalışmamızda, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'na bağlı Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Hücre ve Virüs Bankası Bölümü'nden alınan insan serviks epiteloid karsinom hücre hattı olan HeLa hücreleri (HÜKÜK Kayıt No: 90061901) kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf, Danimarka)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, Japonya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Otomatik ısı döngü cihazı (Eppendorf, ABD)
- Invert mikroskop (Zeiss, Almanya)
- Işık mikroskobu (DCM 4000, Leica, Almanya)
- Karbondioksitli etüv (Sanyo, Japonya)
- LightCycler 480 Real-Time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Mikropipetler, 10µL, 100µL, 1000µL (Bt10, Bt100, Bt1000 Biohit, CLP, ABD)
- Mikroplaka okuyucu (Spectramax M3, Molecular Devices, ABD)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) (Thermo Scientific, ABD)
- Spin vorteks (Biosan, Rusya)

3.1.3 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Hücre dondurma ampülü (Greiner, Almanya)
- Hücre kültür flaskları, 25 cm² ve 75 cm² (Corning, ABD)
- Kültür tüpleri (Corning, ABD)
- Mikrosantrifüj tüpleri (CLP, Almanya)
- Petri kabı, 35mm, 60mm ve 100mm (Corning, ABD)
- Pipet uçları (CLP, Almanya)

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Taksol (Sigma, Amerika)
- EF-24 (Sigma, Amerika)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Amresco, ABD)
- Etanol (Sigma, ABD)
- İnaktif edilmiş fetal sığır serumu (FCS) (HyClone, Thermo, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (HyClone, Thermo, ABD)
- Primerler (Alfa DNA, Almanya)
- RPMI-1640 besiyeri (HyClone, Thermo, ABD)
- Tripsin-EDTA (HyClone, Thermo, ABD)
- Universal Probe Library (UPL) Problemleri (Roche, Almanya)

3.1.5. Kullanılan Kitler

- Hücre canlılığı Kiti (MTT) (Roche, Almanya)
- High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche, Almanya)
- LC 480 Master Mix (Roche, Almanya)
- Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche, Almanya)

3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1. % 10'luk RPMI-1640 Besiyerinin Hazırlanışı

450 ml RPMI-1640 besiyeri içerisine, 50 ml fetal sığır serumu (FCS), 200 mM L-glutaminden 10 ml ve son konsantrasyonu 100 IU/ml penisilin ile 100 µg/ml streptomisin olacak şekilde hazırlandı.

3.2.2. % 1'lik RPMI-1640 Besiyerinin Hazırlanışı

495 ml DMEM besiyeri içerisine, 5 ml FCS, 200 mM L-glutaminden 10 ml, 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin eklenerek hazırlandı.

3.2.3. MTT Karışımının Hazırlanması

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] stok solüsyonu hazırlamak için toz halinde olan MTT 1 ml'de 5 mg olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldü. Daha sonra filtreden geçirilerek steril hale getirildi.

3.2.4. 1X PBS Çözeltisinin Hazırlanması

1.09 g Na_2HPO_4 , 0.32 g NaH_2PO_4 ve 9 g NaCl tartılıp 800 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 7.4'e ayarlanıp son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hücre Kültürü

HeLa hücreleri, %10'luk RPMI-1640 besiyerinde %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda 37 °C'de kültüre edilerek çoğaltıldı.

3.3.2. MTT Hücre Canlılığı Deneyi

Hücre canlılığı 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) kullanılarak belirlendi. Hücreler 96 kuyulu doku kültür kabında her bir kuyuya 10⁴ hücre gelecek şekilde ekildi ve hücrelerin yüzeye tutunması için bir gece 37 °C' de bekletildi. HeLa hücrelerine 24 ve 48 saat süre ile 1-100 µM arasında değişen dozlarda EF-24, 1-100 nM arasında değişen dozlarda Taksol uygulandı. Bir grup hücreye ise 24 saat süre ile 25 nM ve 50 nM sabit dozda Taksol ile beraber 5 µM ve 10 µM dozlarında EF-24 ayrı ayrı ve birlikte uygulandı. İnkübasyon süresi bittikten sonra 10 µl MTT (5 mg/ml) her bir kuyucuğa eklendi ve 4 saat süre ile inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi ve formazan kristalleri çözüldükten sonra 570 nm' de Spectramax M3 mikropate okuyucu (Molecular Devices, ABD) ile ölçüldü. Her bir doz için deney 5 tekrarlı yapılarak ortalama absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen ortalama absorbans değerleri, madde uygulaması yapılmayan kontrole oranlanarak hücre canlılığı üzerine ilaçların etkisi belirlendi.

3.3.3. Hücre Kültüründen Total RNA'nın Elde Edilmesi

Taksol ve EF-24 ile inkübasyon sürelerinin dolmasıyla, hücrelerden RNA izolasyonu, "High Pure RNA Isolation Kiti" kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre biyogüvenlik kabininin içinde yapıldı.

1. Hücrelerin üzerine 200 μ L soğuk PBS ve 400 μ L Lizis tamponu eklenip 15 saniye vortekslendi.
2. Filtre, toplama tüpüne yerleştirilip tüm karışım filtre üstüne aktarıldı.
3. Tüp 9000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
4. Toplama tüpünde toplanan sıvı atılıp filtre aynı tüpe tekrar yerleştirildi.
5. Her bir örnek için 90 μ L DNaz inkübasyon tamponu steril tüpe alındı ve 10 μ L DNaz I eklendi. Pipetaj ile karıştırıldıktan sonra karışım filtrenin ortasına bırakıldı. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. 500 μ L'lik 1. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve 9000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
7. 500 μ L'lik 2. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve 15 saniye 9000 rpm'de santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
8. 200 μ L'lik 3. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve 3 dk 13500 rpm'de santrifüj edildi.
9. Toplama tüpü atıldı. Filtre, steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
10. Filtre üzerine 20 μ L örnek seyreltme çözeltisi eklendi ve 9000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
11. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı "NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılabilecek kadar - 80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.3.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi (RT-PCR)

Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Primer olarak random hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1 : RT-PCR tepkime karışımı.

	Son Konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4µL
dNTP	1mM	2µL
Random hekzamer primeri	60µM	2µL
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5µL
Transkriptor Ters Transkriptaz	10 ünite	0.5µL
Total RNA	1µg	1µg olacak şekilde

cDNA sentezi için PCR karışımı ince çeperli 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldıktan sonra elde edilen total RNA eklendi.

3.3.4.1 Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı

Otomatik ısı döngüsü cihazı, Tablo 2'de belirtilen programa ayarlanarak cDNA sentezi yapıldı.

Tablo 2: Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program.

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25°C	10dk	1
Ters Transkripsiyon	50°C	60dk	1
İnaktivasyon	85°C	5dk	1
Soğutma	4°C	-	1

Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR'da kullanılabilecek kadar -20 °C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.3.5. Gen İfadesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi

Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 genlerinin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile Light Cycler (LC) cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 20 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, mRNA'ya özgü primerler, UPL probu, LightCycler 480 Master karışımı ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 gen ifade miktarlarını normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı.

3.3.5.1. Siklin D1 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

Siklin D1 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 6'da gösterilmiştir.

Siklin D1 F 5'- TGTCCTACTACCGCCTCACA -3'

Siklin D1 R 5'- CAGGGCTTCGATCTGCTC -3'

16 numaralı prob dizisi: 5'- CTGCCTCC-3'

5' -TGTCCTACTACCGCCTCACA-3'

661 AACAACTTCCTGTCCTACTACCGCCTCACACGCTTCCTCTCCAGAGTGATCAAGTGTGAC

5' -CTGCCTCC-3'

721 CCGGACTGCCTCCGGGCCTGCCAGGAGCAGATCGAAGCCCTGCTGGAGTCAAGCCTGCGC

3' -CTCGTCTAGCTTCGGGAC-5'

Şekil 6: Siklin D1 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000227507 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.

3.3.5.2. PI3K Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

PI3K genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 7'de gösterilmiştir.

PI3K Forward primer: 5'- CACGAGATCCTCTCTCTGAAATC -3'
PI3K Reverse primer: 5'- GGTAGAATTTTCGGGGATAGTTACA -3'
15 numaralı prob dizisi: 5'-CAGGAGAA-3'

5'-CACGAGATCCTCTCTCTGAAATC-3'

1584 AGAACAGCTCAAAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGAA

5'-CAGGAGAA-3'

1644 AGATTTTCTATGGAGTCACAGACACTATTGTGTAAGTATCCCCGAAATTCTACCCAAATT

3'-TGTAAGTATCCCCGAAATTCTACC-5'

Şekil 7: PI3K mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000263967 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.

3.3.5.3. Kaspaz-3 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

Kaspaz-3 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 8'de gösterilmiştir.

Kaspaz-3 Forward primer: 5'-TGGAATTGATGCGTGATGTT-3'
Kaspaz-3 Reverse primer: 5'-TGGCTCAGAAGCACACAAAC-3'
68 numaralı prob dizisi: 5'-AGGAGCAG-3'

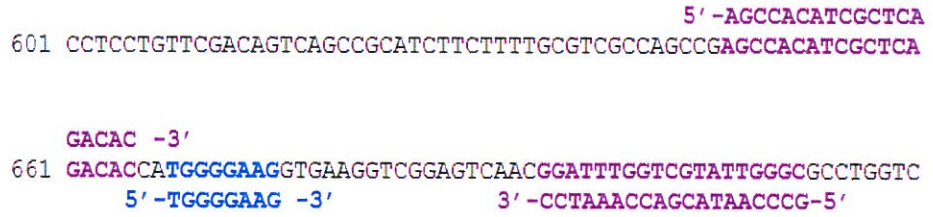
3.3.5.5. GAPDH Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

GAPDH genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri Şekil 10' da gösterilmiştir.

GAPDH Forward primer: 5'- AGCCACATCGCTCAGACAC -3'

GAPDH Reverse primer: 5'- GCCCAATACGACCAAATCC -3'

60 numaralı prob dizisi: 5'- TGGGGAAG -3'



Şekil 10: GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000229239 giriş no'lu dizi).

3.3.5.6. Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH

Genleri için Real Time PCR tepkime karışımları

Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH genlerine uygun verilen primer ve probolar kullanılarak Real-Time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenlerin miktarları Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3: Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	4.7µL
MgCl ₂ (25mM)	4mM	1.2µL
Primer F (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
Primer R (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.1µL
LC 480 Master karışımı		2.5µL
cDNA	-	1µL

3.3.5.7. Light Cyclor (LC) Deney Programı

Real-Time PCR karışımları hazırlandıktan sonra 96 kuyucuklu plate' in her bir kuyusuna bir örnek gelecek şekilde dağıtıldı ve üzerine cDNA'ler eklendi. Plate cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 4'de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH genleri için aynı program kullanıldı. Reaksiyon sonucu, Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 ifade düzeyleri GAPDH ifade düzeyine göre normalize edildi.

Tablo 4: Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
	95	
Hedef Sıcaklık (°C)	10:00dk	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	20.0	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	40	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2

Program 3. Soğutma	
Program Verisi	Değer
Döngüler	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

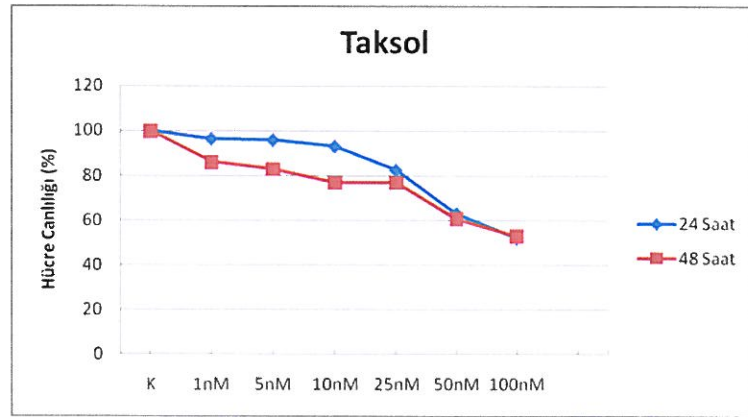
3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Doza ve zamana bağlı olarak değişen, Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “REST (2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırıldı.¹²⁰ Hücre canlılığı oranlardaki değişimler ise “tek yönlü Anova” testiyle karşılaştırıldı. Veriler “SPSS 15.0” istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. 0.05’den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

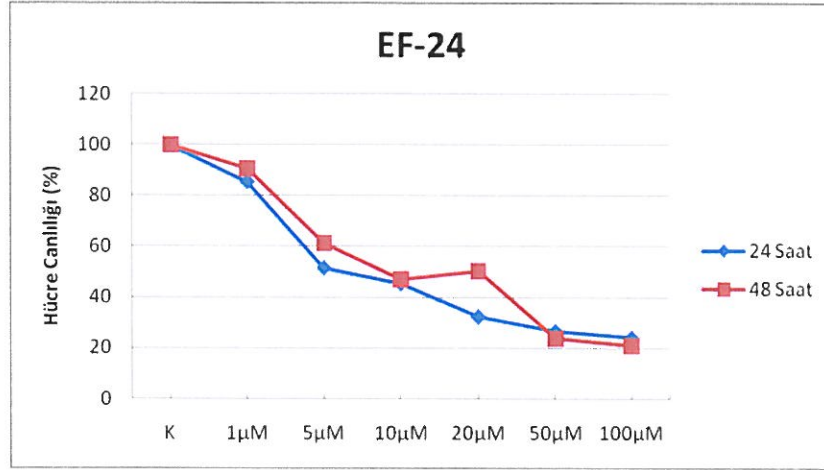
4.1. HeLa Hücrelerinin Taksol ve EF-24'e duyarlılığının MTT Hücre Canlılığı Yöntemi ile İncelenmesi

Taksol ve EF-24'ün HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini belirlemek için öncelikle MTT yöntemi uygulandı.



Şekil 11: HeLa hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Taksol ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.

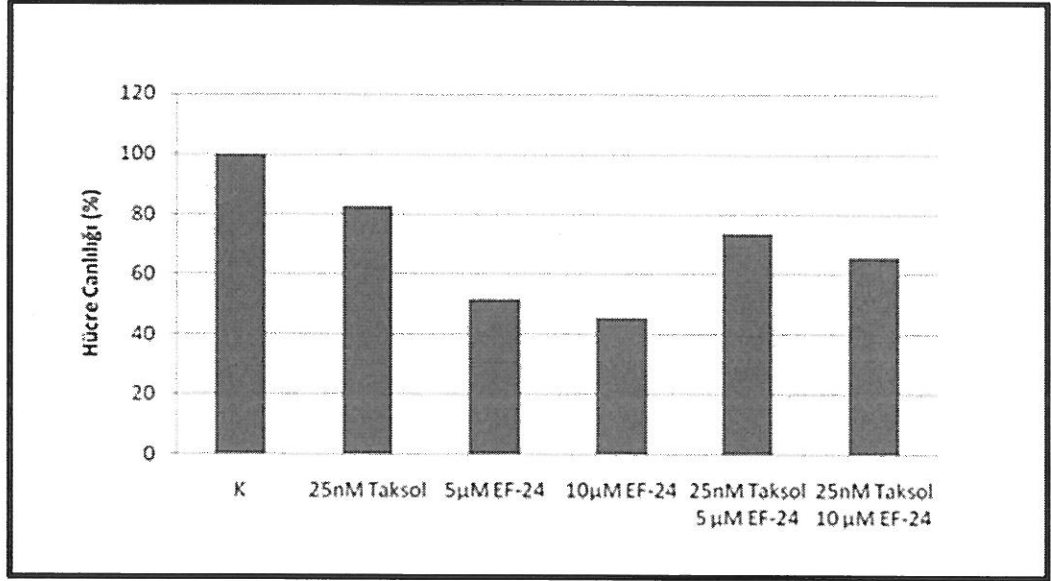
HeLa hücrelerine 24 ve 48 saat Taksol uygulandıktan sonra gözlenen hücre canlılık oranları Şekil 11'de görülmektedir. Buna göre, 25nM doza kadar Taksol'ün hücreleri doza ve zamana bağlı olarak etkilediği ve hücre canlılıklarında azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Ancak 25nM'in üzerindeki dozlarda Taksol'ün hücreler üzerinde süreden bağımsız bir şekilde yaklaşık aynı etkileri oluşturduğu belirlendi. Buna göre, her iki süre için Taksol'ün IC50 değeri 100 nM civarında olduğu gözlemlendi.



Şekil 12: HeLa hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) EF-24 ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.

HeLa hücrelerine EF-24 uygulamasının 24 ve 48 saat sonrasındaki hücre canlılığı oranları Şekil 12’de görülmektedir. Buna göre EF-24 uygulanan hücrelerin canlılık oranlarında doza bağlı bir azalma olduğu görüldü. Her iki süre için IC50 değeri yaklaşık 10 µM EF-24 konsantrasyonunda elde edildi. Daha yüksek EF-24 dozlarında ise hücre canlılığının %20'lere kadar düştüğü belirlendi.

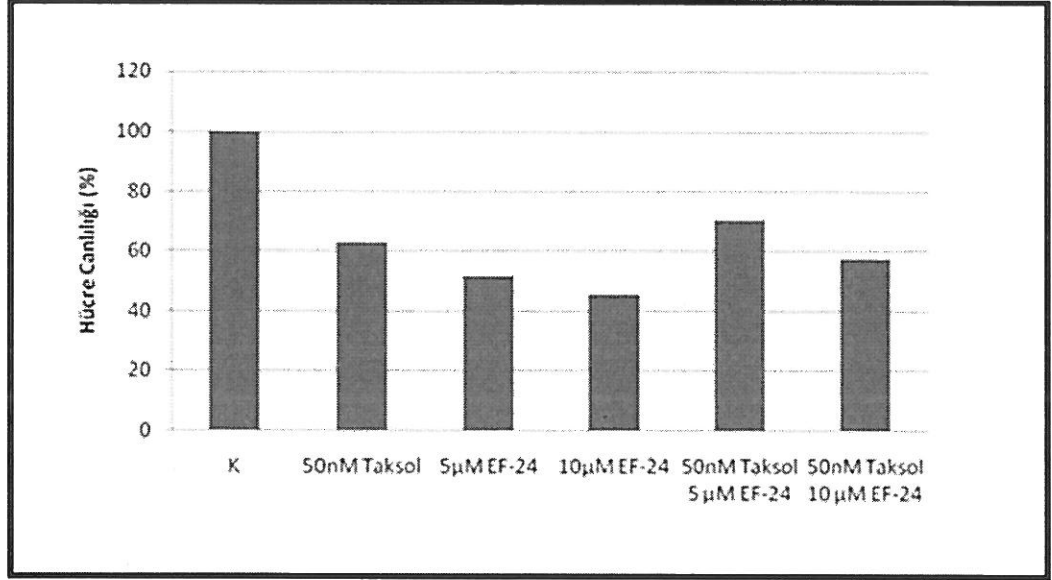
25 nM Taksol ve EF-24'ün birlikte uygulanmasının 24 saat sonunda HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri ise Şekil 13'de verilmiştir.



Şekil 13: HeLa hücrelerine (10.000 hücre/kuyu) 24 saat süre ile 25nM Taksol ve EF-24'ün tek başına ve birlikte uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık oranları.

Birlikte uygulama sonucunda EF-24'ün 25 nM Taksol'ün hücre ölümü üzerine olan etkisini daha da arttırdığı belirlendi. 25 nM Taksol tek başına uygulandığında hücre canlılığı %82.5 iken, aynı dozda Taksol ile birlikte ortama 5 µM EF-24'ün eklenmesi bu oranın %73 seviyesine inmesine neden oldu. Benzer şekilde 25nM Taksol ile birlikte 10 µM EF-24 uygulaması sonucunda hücre canlılığının %65 seviyesine indiği gözlemlendi.

50 nM Taksol ve EF-24'ün birlikte uygulanmasının 24 saat sonunda HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri ise Şekil 14'de verilmiştir.



Şekil 14: HeLa hücrelerine 24 saat süre ile 50 nM Taksol ve EF-24'ün tek başına ve birlikte uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık oranları.

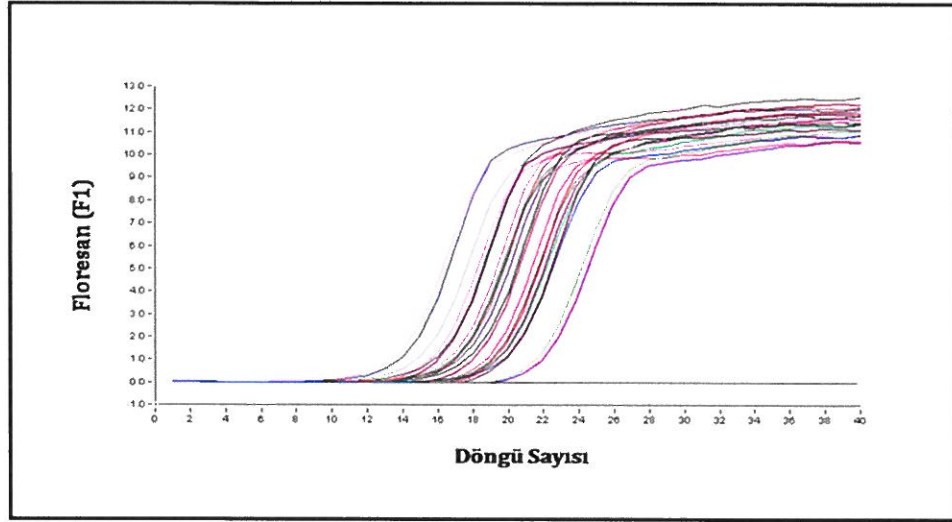
50 nM Taksol tek başına uygulandığında hücre canlılığı %63 iken, aynı dozda Taksol ile birlikte ortama 5 µM EF-24'ün eklenmesi bu oranın %70 seviyesine çıkmasına neden olduğu buna karşın 50nM Taksol + 10 µM EF-24 uygulamasının ise hücre canlılığını %57 seviyesine indirdiği gözlemlendi. Ancak EF-24'ün tek başına uygulanması, birlikte uygulamaya oranla daha etkili sonuçlar ortaya çıkardı. Sırasıyla 5 µM ve 10 µM EF-24'ün tek başına uygulaması sonucunda hücre canlılığının % 51 ve % 45 seviyelerine indiği gözlemlendi.

Bu durum EF-24'ün Taksol ile birlikte kullanımının antagonistik bir etki yarattığını göstermektedir. Ayrıca Taksol'ün düşük dozda (25 nM) uygulandığı zaman ortama eklenen EF-24 ile etkisinin arttığını ancak daha yüksek konsantrasyonda Taksol uygulandığı zaman, EF-24'ün varlığının Taksol'ün etkisini ortadan kaldırdığını göstermektedir.

4.2. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler cihazı kullanıldı. HeLa hücre hattından elde edilen cDNA'larda Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 ile bu genlerin normalizasyonu için seçilen GAPDH genlerine özgül primerler ve UPL LNA problemleri kullanılarak mRNA ifade düzeyleri çalışıldı.

Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ifadelerini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 15'de gösterildi.



Şekil 15: Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ifadelerini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Siklin D1, PI3KA, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve GAPDH genlerinin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Göreceli gen ifadesi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta Ct(\text{kontrol-örnek})}}{E(\text{referans})^{\Delta Ct(\text{kontrol-örnek})}}$$

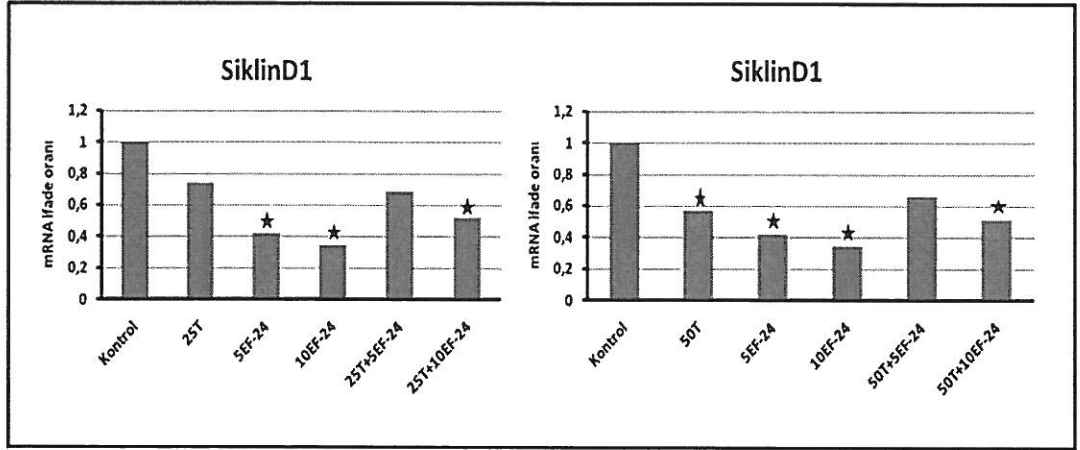
Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔCt değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir.

4.3. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması

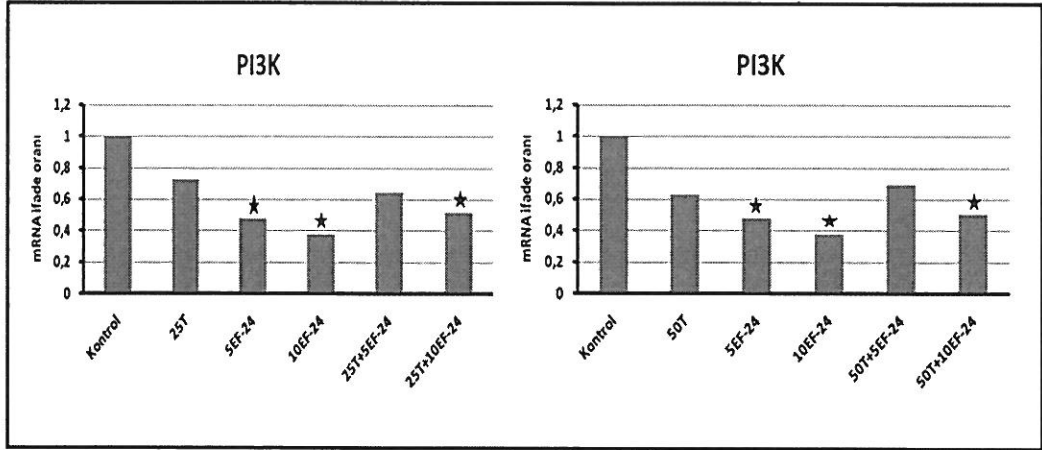
4.3.1. Taksol ve EF-24'ün' Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Genlerinin İfade Düzeylerine Etkisi

HeLa hücre hattında Taksol ve EF-24 uygulanmasından sonra Siklin D1, PI3K, Kaspaz-3, Kaspaz-9 genlerinin ifade düzeylerinin doza bağlı olarak karşılaştırmalı değerlendirmesi yapıldı. Bu genlerin mRNA ifade düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi kullanıldı.

HeLa hücreleri, Taksol ve EF-24 ile ayrı ayrı ve birlikte inkübe edildikten sonra kontrol ile karşılaştırıldığında genel olarak hücre çoğalmasından sorumlu olan Siklin D1 ve PI3K genlerinin mRNA'larında azalma olduğu gözlemlendi. Ancak EF-24'ün tek başına uygulaması sonucu hücrelerdeki SiklinD1 ve PI3K mRNA düzeylerinde görülen azalmanın birlikte uygulamaya oranla daha fazla olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). 10 μ M EF-24 inkübasyonu sonucunda Siklin D1 mRNA ifade düzeyinin yaklaşık 3 kat, PI3K mRNA düzeyinin ise 2.6 kat azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil16 ve 17). Tek başına 25 nM Taksol uygulamasından sonra ise siklin D1 ve PI3K mRNA düzeylerindeki düşüşün anlamlı düzeyde olmadığı ($p>0.05$) gözlenirken 50 nM Taksol uygulamasında ki siklin D1 ve PI3K'nın mRNA düzeylerindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$). 25 nM Taksol + 10 μ M EF-24 konsantrasyonunda Siklin D1 ve PI3K mRNA düzeylerinin yaklaşık 2 kat azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil16 ve 17). Aynı şekilde 50 nM Taksol ile birlikte 10 μ M EF-24 kullanılması sonucunda siklin D1 ve PI3K mRNA düzeylerindeki düşüşünde yaklaşık 2 kat olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Şekil16 ve 17).



Şekil 16: HeLa hücrelerine 24 saat Taksol ve EF-24 uygulanması sonrasında SiklinD1 geninin mRNA ifade düzeyindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyine göre normalize edildi. *; $p < 0.05$.



Şekil 17: HeLa hücrelerine 24 saat Taksol ve EF-24 uygulanması sonrasında PI3K geninin mRNA ifade düzeyindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyine göre normalize edildi. *; $p < 0.05$.

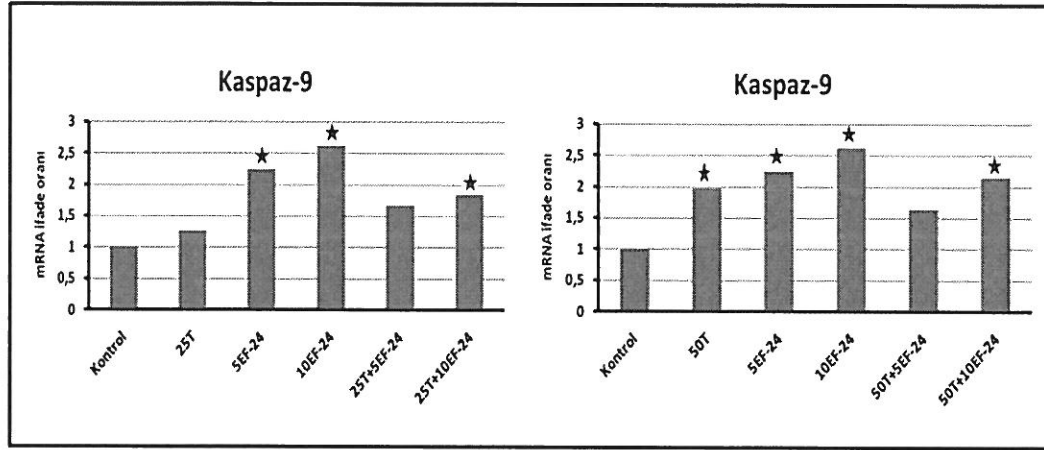
Proliferasyondan sorumlu genler dışında, Taksol ve EF-24'ün apoptozda aktif rol oynayan kaspaz-9 ve kaspaz-3 genlerinin mRNA ifadenme düzeyleri üzerine etkileri de incelendi (Şekil18 ve19).

Taksol ve EF-24'ün ayrı ayrı ve birlikte kullanılması sonucunda kontrol ile karşılaştırıldığında, kaspaz-9 ve kaspaz-3 mRNA ifadelenme düzeylerinde genel olarak artış gözlemlendi. Ancak EF-24'ün tek başına uygulaması sonucu hücrelerdeki kaspaz-9 ve kaspaz-3 mRNA düzeylerinde görülen artışın birlikte uygulamaya oranla daha fazla olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Bu sonuçlara göre en yüksek kaspaz-3 ve kaspaz-9 mRNA ifadelenmesi 10 μ M EF-24 uygulaması sonrasında elde edildi ($p < 0.05$). 10 μ M EF-24 uygulaması ile kaspaz-3 mRNA ifade düzeyinin yaklaşık 3 kat arttığı, kaspaz-9 mRNA düzeyinin ise yaklaşık 2.5 kat arttığı bulundu (Şekil18 ve 19). Ayrıca tek başına 25 nM Taksol uygulamasından sonra kaspaz-3 ve kaspaz-9 mRNA düzeylerindeki artışın anlamlı düzeyde olmadığı görülürken ($p > 0.05$) 50 nM Taksol uygulamasında ki kaspaz-3 ve kaspaz-9' un mRNA düzeyindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

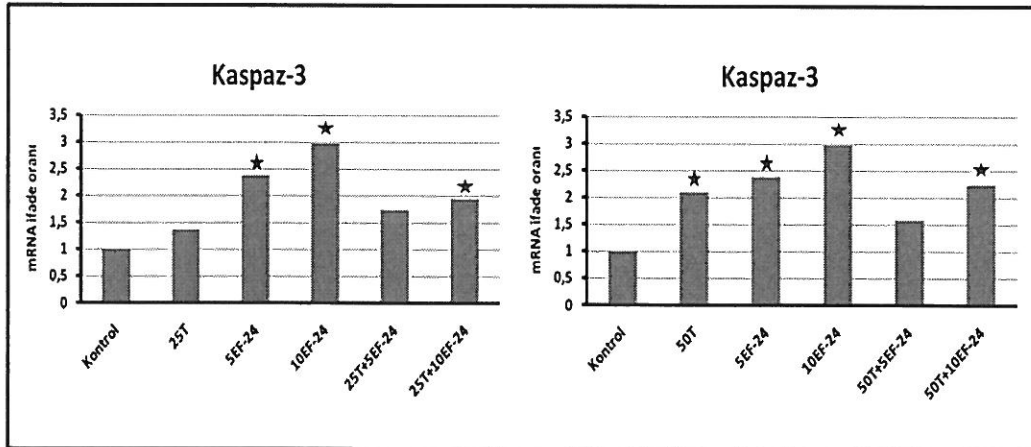
Proliferasyondan sorumlu genlerde görüldüğü gibi, ilaçların birlikte kullanılması ile kaspaz-9 ve kaspaz-3 mRNA düzeylerindeki artışın tek başına uygulanan EF-24'e göre daha az olduğu da belirlendi. 25 nM Taksol + 10 μ M EF-24 konsantrasyonunda kaspaz-3 mRNA düzeyinin yaklaşık 2 kat arttığı kaspaz-9 mRNA düzeyinin ise 1.8 kat arttığı belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil18 ve19). Ayrıca 50 nM Taksol ile birlikte ortama 10 μ M EF-24 eklenmesi sonucunda kaspaz-3 mRNA düzeyinin 2.2 kat arttığı kaspaz-9 mRNA düzeyinin ise 2.1 kat arttığı belirlendi ($p < 0.05$).

Taksol ve EF-24 kombinasyonunun tek başına 25 nM Taksol ile karşılaştırıldığında, kaspaz-3 ve kaspaz-9 mRNA ifadelenmesinde artışa neden olduğu görüldü. Bu kombinasyonun tek başına 50 nM Taksol ile karşılaştırıldığında ise kaspaz-3 ve kaspaz-9 mRNA ifadelenmelerinde anlamlı düzeyde artışa neden olmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$).

Bu durum düşük Taksol konsantrasyonunda EF-24 ile birlikte elde edilen hücre canlılığı oranlarının daha da düşük çıkmasını açıklarken, yüksek Taksol ve EF-24 uygulandığında elde edilen etkinin Taksol'ün tek başına etkisine oranla neden daha az olduğunu gösterebilir (Şekil18 ve19).



Şekil 18: HeLa hücrelerine 24 saat Taksol ve EF-24 uygulanması sonrasında kaspaz-9 geninin mRNA ifade düzeyindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyine göre normalize edildi. *; $p < 0.05$.



Şekil 19: HeLa hücrelerine 24 saat Taksol ve EF-24 uygulanması sonrasında kaspaz-3 geninin mRNA ifade düzeyindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyine göre normalize edildi. *; $p < 0.05$.

MTT deneyinden elde edilen sonuçlara bakıldığında bu iki ilacın birlikte kullanımının antagonistik bir etki yarattığı gözlemlendi. Bu sonuçlar ile paralel olarak yapılan mRNA analizinde de Taksol ve EF-24'ün birlikte uygulanmasının, tek başına EF-24 uygulamasına göre kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin ifadenmesinde daha az etkili olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde birlikte uygulamanın, tek başına EF-24 uygulamasına göre proliferasyondan sorumlu genlerin baskılanmasında da daha az etkili olduğu görüldü. Bu sonuçlar bize bu ilaçların antagonistik etki göstermesinin nedenini açıklayabilir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada günümüzde over kanseri, meme kanseri, lösemi, küçük hücreli olmayan akciğer ve prostat kanseri gibi birçok kanser tedavisinde kullanılan, *Taxus brevifolia* adlı ağacın kabuklarından elde edilen doğal bir alkaloid olan Taksol ile *Curcuma longa* bitkisinin köklerinden izole edilen curcumin analoglarından biri olan EF-24 kullanılmıştır.^{45,46,47,48,49,61,62,70,121,122,123}

Curcuminin çeşitli çalışmalarda anti-oksidan, anti-inflamatuar, immün sistem düzenleyici ve anti-tümoral etkinliği gösterilmiştir.⁶³ Ayrıca farklı tümörler üzerinde çok çeşitli mekanizmalarla antikarsinojenik etki gösterdiği de bildirilmiştir. İnflamasyonu, hücre proliferasyonunu, bazı onkogenleri, tümör implantasyonunu ve karsinojenlerin biyotransformasyonunu, transkripsiyon faktörü NF-kB ve COX2 enzimini baskıladığı, buna karşılık; glutatyon-s-transferaz enzimini aktive ettiği çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur.^{64,65,66,67,68}

Yapılan bir çalışmada Curcuminin HeLa hücrelerinin proliferasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği, aynı zamanda kaspaz-3 ekspresyonunu artırıp bcl-2 ve bcl-xl ekspresyonlarının da azaltarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir.¹²⁴

Yine HeLa hücrelerinde *in vitro* ve *in vivo* curcumin sitotoksitesinin ve apoptotik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *curcuminin* doz ve zamana bağlı olarak çoğalmayı inhibe ettiği ve bu etkinin apoptoz ile olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda curcuminin sadece *in vitro* değil *in vivo* olarak da etkili bir antikanser ajan olduğu bildirilmiştir.¹²⁵

Yapılan araştırmalar sonucu doğal curcuminin kimyasal koruyucu, antioksidan ve benzeri etkilerinin kanıtlanması ile araştırmacılar benzer yapıda ancak farklı içerikteki sentetik curcumin analoglarına yönelmişlerdir.⁶⁹ EF-24 sentetik bir curcimin analogudur. Yapısal olarak curcumine benzer ancak ondan daha etkili ve biyoyararlanımı daha fazladır.⁷⁰ İn vitro koşullarda çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunun G2/M fazında bloke olmasına neden olur ve bunu takiben de apoptozu uyarır. G2/M kontrol noktası proteinlerinin seviyelerinde de artışa neden olur(pp53, p53 ve p21).⁷¹

EF-24'n ovaryum kanser hücre canlılığı üzerine etkilerini belirlemek için yapılan bir çalışmada, sisplatin dirençli ve sisplatin duyarlı hücreler 24 ve 48 saat EF-24'n farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilip hücre canlılıkları MTT ile incelendiğinde, her iki hücre grubunda da hücre proliferasyonunun EF-24 tarafından doza bağlı olarak inhibe edildiği gözlenmiştir. Ayrıca EF-24'n, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucunda gözlenen hücre canlılık oranlarında önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, normal hücrelerle kıyaslandığında kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmede EF-24'n çok daha etkili olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda EF24'n zamana bağlı olarak G2/M fazında hücre döngüsünün duraklamasını uyardığı ve bunun yanısıra G2/M hücre döngüsünü düzenleyen faktörlerden siklinB1, siklinA, siklinD1, Cdc2 ve Cdc25C'nin ifadelenmelerinin de zamana bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. EF24'n sisplatin dirençli kanser hücrelerinde kaspaz kaskadı aracılığıyla apoptozu indüklediği de gözlenmiştir. Ayrıca EF24'n, insan ovaryum kanser hücrelerinde PI3K/Akt yolağının negatif yönde regüle edilmesine neden olan PTEN ekspresyonunu da artırdığı gösterilmiştir.⁷¹

Mitoz ya da metafaz zehirleri olarak da bilinen Taksol ise, mitoz bölünme sırasında hücresel tubulin yapısına bağlanıp, hücre bölünmesi ve diğer hücresel fonksiyonlarda önemli bir kademe olan mikrotübül depolimerizasyonunu inhibe ederek mikrotübül yapısını stabil hale getirmektedir.^{55,56,57} Bunun sonucu olarak, hücrelerin G2/M fazında birikmesi ile hücre siklusu bloke olmaktadır.^{56,57} Yani mikrotübüllerin tubulinlere dönüşmesini ve mitoz bölünme sırasında oluşan iç ipliklerinin yıkımını engellerler ve hücre bölünmesini durdururlar.³ Böylece hücre bölünmesini, proliferasyonunu ve migrasyonunu engelleyerek apoptozu başlatırlar.^{56,58,126}

Taksol'ün teşvik ettiği hücre ölümünün apoptozla olduğu ve bunun da uygulanan doza bağımlı olarak değiştiği gösterilmiştir.⁶⁰

HL-60 hücrelerinde yapılan bir çalışmada Lovastatin ve Taksol'ün kombine kullanımının hücre büyümesi üzerine sinerjistik etki gösterdiği gözlenmiştir. Lovastatin'in, hücre döngüsünün G2/M fazında duraklamasıyla Taksol tarafından indüklenen apoptozu, artırdığı rapor edilmiştir.¹²⁷ Buna karşın Hepatoselüler karsinoma(Hep-G2) hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise Lovastatin'in, curcumin ile kombine kullanımının, ayrı ayrı uygulanmasına oranla tüm dozlarında antagonistik bir etki gösterdiği rapor edilmiştir.¹²⁸

5637 mesane kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada, özellikle kırmızı üzümde bol bulunan doğal bir bileşik olan Resveratrol ile Taksol'ün 48 saat ayrı ayrı ve kombine kullanımlarının etkileri incelenmiş ve bunların birlikte kullanımlarında Resveratrol'ün Taksol'e karşı antagonistik bir etki gösterdiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda Taksol ile indüklenmiş DNA fragmentasyonunun Resveratrol ile azaldığı da bu çalışmanın bulguları arasında yer almaktadır.¹²⁹

Taksol'e duyarlı ve Taksol'e dirençli ovaryum kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada, mitotik kinesin (Eg5) inhibitörü olan HR22C16 ve analoğu HR22C16-A1'in her ikisinde, hücre canlılığını inhibe ettiğini gösterilmiştir. Aynı zamanda HR22C16-A1 ve Taksol gibi iki anti-mitotik ajanın tek tek ve kombine uygulamanının hücre ölümü üzerine göstereceği etkiler de araştırılmış ve bu iki ilacın birlikte kullanımının antagonistik bir etkiye neden olduğu gösterilmiştir.¹³⁰

A549, MCF-7, PA1 ve WiDr insan kanser hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, Taksol ve 5-Fluorourasil arasındaki sitotoksik etkileşimin kullanım şekline bağımlı olduğu gösterilmiştir. Hücreler, 24 saat Taksol uygulamasını takiben 24 saat 5-Fluorourasil inkübasyonuna peş peşe maruz kaldıklarında bu iki ilacın birbirlerinin etkisini arttırdığı gözlenmiştir. Ancak bu 2 ilacın kombine uygulanmasında veya ardışık olarak 24 saatlik 5-Fluorourasil uygulamasını takiben 24 saatlik Taksol uygulamasına maruz kalan hücrelerde ise antagonistik bir etkinin görüldüğü bildirilmiştir.¹³¹

Mikrotübül dinamiği, hücre proliferasyonunda önemli bir rol üstlenirken, mikrotübül dinamiğinin inhibisyonu ise birçok anti-mitotik bileşiğin anti-tümör etkilerinin mekanistik temeli olarak görünmektedir.¹³²

Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, mikrotübül ağı hem hücre siklusu hem de apoptozdaki mekanistik bileşenleri tamamlamaktadır. Bu nedenle Taksol'ün hem hücre siklusu hem de apoptozun üzerine çoklu etkilerinin olması şaşırtıcı değildir.⁵⁹ Bu nedenle elde edilen veriler ışığında etkili bir antikanser ajan olan Taksol'ün tek hedefi tubulin yapısı değildir. Aynı zamanda, anti-apoptotik *bcl-2* proteinine de bağlanmaktadır.¹³³

Bu nedenle Taksol, bölünen hücrelerin ortadan kaldırılması üzerine çift yönlü bir rol üstlenmektedir. Birincisi, toplanmış mikrotübülleri stabilize etmesi ve böylece mitozu duraksatmasıdır. İkincisi de, *bcl-2* yi inhibe etmesi ve apoptozun ilerlemesine izin vermesidir.¹³³

Bu çalışmamızda HeLa hücrelerinin Taksol ile muamelesinden sonra hücre proliferasyonundan ve apoptozdan sorumlu genlerinin mRNA düzeyleri incelendi. HeLa hücrelerinin, 25nM ve 50nM Taksol ile 24 saat inkübasyonu sonrasında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında genel olarak Taksol'ün artan dozlarda, hücre çoğalmasından sorumlu siklinD1 ve PI3K genlerinin mRNA düzeylerinde düşüşe neden olurken, apoptotik özellikteki kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeylerinde ise bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Hücre proliferasyonundan sorumlu genlerde gözlenen düşüşle Taksol'ün mikrotübüller üzerindeki etkisini göstererek hücre döngüsünü duraklattığını, apoptotik genlerde görülen artışlarda Taksol'ün apoptozu indüklediğini söyleyebiliriz.

Ayrıca bu apoptotik genlerin ifadenmesindeki artış, apoptoz işlemini bloke edecek ya da ilerlemesine engel olacak herhangi bir etkileşimin de gerçekleşmediğini düşündürebilir. Bu bulgular Taksol'ün kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması üzerine çift yönlü bir rol üstlendiği görüşünü desteklemektedir.

Curcuminin, insan skuamöz hücreli akciğer karsinomu H520 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve kullanılan kemoterapötik ajan vinorelbin ile sinerjik etki yaptığı gösterilmiştir. İki ajanın da mitokondriden sitokrom-C salınımını sağlayıp kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir.¹³⁴

Ayrıca bu ajanların Bax ve Bcl-XI ekspresyonunu artırıp Bcl-2 ve Bcl-X(L) ekspresyonunu azaltarak apoptoza neden olduğu bildirilmiştir. Tek başına verildiklerinde, vinorelbin H520 hücrelerinde %38 apoptoza neden olurken, curcuminin %23,7 apoptoza yol açtığı görülmüştür. Ancak kombine uygulandıklarında curcumin ile ön tedavi, vinorelbinin neden olduğu apoptozu %61,3 düzeyine çıkarmıştır. Bu bulgular, curcuminin in vitro olarak H520 hücrelerde vinorelbinin kemoterapötik etkinliğini artıran muhtemel etkili adjuvan bir kemoterapötik olduğunu göstermektedir.¹³⁴

Bu çalışma ile uyumlu olacak şekilde çalışmamızda, serviks kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde vinorelbin ile aynı grupta yer alan ancak mikrotübüller üzerindeki etkileri farklı olan diğer bir ilacın Taksol'ün, curcumin analogu olan EF-24 ile ayrı ayrı ve kombine kullanımının yarattığı etkiler incelendi. Taksol, vinorelbin'in aksine mikrotübül depolimerizasyonunu inhibe eden bir kematerapötik ajandır. 24 saat süre ile 25nM ve 50nM Taksol ile 5 µM ve 10 µM EF-24 ayrı ayrı ve birlikte inkübe edildiğinde tek başına uygulanan Taksol'ün artan dozlarda, apoptotik özellikteki kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeylerinde artışa neden olduğu gözlemlendi.

Ancak bunların kombine uygulanmaları farklı sonuçların gözlenmesine neden oldu. Örneğin 25nM Taksol'ün, 5 µM ve 10 µM EF-24 ile kombine uygulaması kontrol grubuna ve tek başına aynı dozda Taksol uygulanmasına karşı daha fazla etki gösterirken, EF-24'ün tek başına uygulanmasına göre çok daha düşük bir etki göstermektedir. 25 nM Taksol + 10 µM EF-24 konsantrasyonunda kaspaz-3 mRNA düzeyinin 2 kat ($p<0.05$) arttığı kaspaz-9 mRNA düzeyinin ise 1.8 kat ($p>0.05$) arttığı belirlendi.

50nM Taksol'ün 5 µM ve 10 µM EF-24 ile kombine uygulaması kontrol grubuna göre daha fazla etki göstermekte ancak tek başına Taksol uygulanmasına oranla, 50 nM Taksol + 5 µM EF-24 uygulanması daha düşük bir etki göstermektedir. 50nM Taksol + 10 µM EF-24 ile kombine uygulandığında kaspaz-9 mRNA düzeyinin 2.1 kat arttığı ($p>0.05$), kaspaz-3 mRNA düzeyinin ise 2.2 kat arttığı ($p<0.05$) belirlendi.

Sonuç olarak Taksol ve EF-24 kombinasyonunun tek başına düşük doz Taksol (25nM) ile karşılaştırıldığında, kaspaz-3 ve kaspaz-9 mRNA ifadenmesinde artışa neden olduğu gözlenirken, tek başına yüksek doz (50nM) Taksol ile karşılaştırıldığında ise kaspaz-3 ve kaspaz-9 mRNA ifadenmelerinde anlamlı düzeyde bir artışa neden olmadığının gözlenmesi, bu iki ilacın birlikte kullanımının yüksek dozda Taksol varlığında HeLa hücrelerinde apoptotik genlerin aktivasyonunda antagonistik bir etkiye neden olduğunu göstermektedir. Bunun yanısıra tek başına EF-24 uygulamasının, kombine uygulamaya oranla kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyelerinde daha fazla artışa neden olduğunun gözlenmesi de bu iki ilacın birlikte kullanımının apoptotik genlerin aktivasyonunda antagonistik bir etkiye neden olduğunu göstermektedir.

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada hücre proliferasyonunu inhibe eden kemoterapötik bir ajan olan vinblastin ile curcumin ve Taksol'ün ayrı ayrı ve kombine uygulamalarının etkileri incelenmiştir. 8µM curcumin ile 2nM ve 3 nM vinblastinin her biri tek başına uygulandığında ayrı ayrı %26, %22 ve %24 oranında MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu baskımlarken bunların kombine uygulamaları hücre proliferasyonunu %44 ve %51 oranında baskılamaktadır.¹³⁵

Aynı şekilde 8 μ M curcumin ile 2 nM Taksol'ün her biri tek başına uygulandığında MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu ayrı ayrı %26 ve %13 oranında inhibe ederken bunların kombine uygulamaları ise hücre proliferasyonunu %9 oranında baskılamaktadır. Curcumin, vinblastinle kombine kullanımında MCF-7 hücre proliferasyonunun inhibisyonunda sinerjistik bir etki gösterirken, Taksol ile kombine kullanımında antagonistik bir etki gösterdiği bildirilmiştir.¹³⁵

Bu çalışmayla benzer şekilde, HeLa hücrelerinde Taksol ve EF-24'ün ayrı ayrı ve kombine uygulamaları sonucunda hücre proliferasyonundan sorumlu genlerin mRNA ifade düzeyleri incelendiğinde genel olarak kontrol grubuna göre bir azalma olduğu gözlemlendi. Ancak EF-24'ün tek başına uygulaması sonucu hücrelerdeki siklinD1 ve PI3K mRNA düzeylerinde görülen azalmanın birlikte uygulamaya oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. 10 μ M EF-24 inkübasyonu sonucunda siklinD1 mRNA ifade düzeyinin yaklaşık 3 kat, PI3K mRNA düzeyinin ise 2.6 kat azaldığı gözlemlendi. Tek başına 25 nM Taksol uygulamasından sonra ise siklinD1 ve PI3K mRNA düzeylerindeki düşüşün anlamlı düzeyde olmadığı ($p>0.05$) ama 50 nM Taksol uygulamasında ki siklinD1 ve PI3K'nın mRNA düzeylerindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$).

İlaçların birlikte kullanılması ile siklinD1 ve PI3K mRNA düzeylerindeki düşüşün tek başına EF-24'e göre daha az olduğu belirlendi. 25 nM Taksol + 10 μ M EF-24 konsantrasyonunda siklinD1 ve PI3K mRNA düzeylerinin yaklaşık 2 kat azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). Aynı şekilde 50 nM Taksol ile birlikte 10 μ M EF-24 kullanılması sonucunda siklinD1 ve PI3K mRNA düzeylerinde görülen düşüşünde yaklaşık 2 kat olduğu belirlendi.

Sonuç olarak Taksol ve EF-24 kombinasyonunun tek başına düşük doz Taksol (25nM) ile karşılaştırıldığında, hücre proliferasyonundan sorumlu genlerin mRNA ifadenmesinde daha etkili bir düşüşe neden olduğu gözlenirken, tek başına yüksek doz (50nM) Taksol ile karşılaştırıldığında ise bu genlerin mRNA ifadenmelerinde anlamlı düzeyde bir düşüşe neden olmadığının gözlenmesi, bu iki ilacın birlikte kullanımlarının yüksek dozda Taksol varlığında, HeLa hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonunda antagonistik bir etkiye neden olduğunu göstermektedir. Bunun yanısıra EF-24' ün tek başına uygulandığında, hücre proliferasyonu üzerinde Taksol'le kombine uygulanımına göre daha etkili olduğunun gözlenmesi de bu iki ilacın birlikte kullanımlarının antagonistik bir etkiye neden olduğunu göstermektedir.

BT-474 ve SK-BR-3-hr meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada, Herceptin ve curcuminin kombine kullanımının hücre canlılığında etkin bir şekilde azalma gösterdiği bildirilmiştir. Ancak SK-BR-3-hr hücrelerinde bu kombine uygulama, sinejitik ya da antagonistik bir etki göstermezken BT-474 hücrelerinde herceptin ve curcuminin kombine uygulananının, doza bağlı olarak farklı etkiler gösterdiği bildirilmiştir.¹³⁶

0,1-10 $\mu\text{g/mL}$ 'a kadarki farklı konsantrasyonlardaki herceptin ile farklı dozlarda (5,10 ve 15 $\mu\text{g/mL}$) ki curcuminin kombine uygulamaları sinerjitik ya da katkı sağlayıcı bir etki gösterirken, aynı dozlardaki curcumin ile 10 $\mu\text{g/mL}$ herceptin'in kombine uygulaması antagonistik bir etki göstermiştir. Yani düşük doz herceptin ile curcuminin uygulamasında sinerjitik bir etki gözlenirken, yüksek dozda ki herceptin'le curcuminin kombine uygulamasında antagonistik bir etki gözlenmiştir.¹³⁶

Benzer şekilde HeLa hücrelerinde Taksol ve EF-24'ün tek tek ve kombine kullanımlarının 24 saat sonrasındaki hücre canlılığı üzerine etkileri incelendi. Sırasıyla 5 μ M ve 10 μ M EF-24'ün tek başına uygulaması sonucunda hücre canlılığının %51 ve %45 seviyelerine indiği, ayrıca daha yüksek EF-24 dozlarında hücre canlılığının %20'lere kadar düştüğü de belirlendi.

25 nM Taksol tek başına uygulandığında hücre canlılığı %82.5 iken, 50 nM Taksol tek başına uygulandığında ise hücre canlılığının %63 olduğu belirlendi. Birlikte uygulama sonucunda EF-24'ün, 25 nM Taksol'ün hücre ölümü üzerine olan etkisini daha da arttırdığı belirlendi. 25 nM Taksol tek başına uygulandığında hücre canlılığı %82.5 iken, aynı dozda Taksol ile birlikte ortama 5 μ M EF-24'ün eklenmesi bu oranın %73 seviyesine inmesine neden olurken, 10 μ M EF-24'ün eklenmesi hücre canlılığının %65 seviyesine inmesine neden olduğu gözlemlendi. EF-24'ün tek başına uygulanması, birlikte uygulamaya oranla daha etkili sonuçlar ortaya çıkardı.

50 nM Taksol tek başına uygulandığında hücre canlılığı %63 iken, aynı dozda Taksol ile birlikte ortama 5 μ M EF-24'ün eklenmesi bu oranın %70 seviyesine çıkmasına neden olduğu buna karşın 50nM Taksol + 10 μ M EF-24 uygulamasının ise hücre canlılığını %57 seviyesine indirdiği gözlemlendi. Bu durum Taksol'ün düşük dozda (25 nM) uygulandığı zaman ortama eklenen EF-24 ile etkisinin arttığını, daha yüksek konsantrasyonda Taksol uygulandığı zaman ise EF-24'ün varlığının Taksol'ün etkisini ortadan kaldıracılabileceğini göstermektedir. Bu da yüksek dozda Taksol'ün, EF-24 varlığında antagonistik bir etkiye neden olduğunu göstermektedir.

Genel olarak bulgularımız antikanser etkisi bilinen Taksol'ün yanısıra EF-24'ün de tek başına in vitro olarak anti-kanserojen etkili olduğunu gösterdi. Ancak bu iki ilacın birlikte kullanımlarının, EF-24'ün tek başına uygulamasına göre daha az etkili olduğu da görüldü. Bu nedenle bu iki ilacın HeLa hücreleri üzerinde antagonistik bir etki yarattığı da bulgularımız arasında yer almaktadır.

Sonuç olarak EF-24'ün güçlü bir antikanser ajan olarak kullanılabileceği ve düşük dozda Taksol ile birlikte Taksol'ün etkisini artırabileceği görülmektedir. Ayrıca bulgularımız bu şekilde bir kombinasyonun klasik kanser tedavisi sırasında kullanılan Taksol'e karşı daha etkili bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmüştür. Ancak yüksek dozda Taksol ile birlikte EF-24 kullanımının Taksol'ün etkisini ortadan kaldıracılabileceği de gözden kaçırılmamalıdır.

6. Sonuç

Bu tez çalışmasında Taksol ve EF-24'ün farklı dozlarda tek tek ve kombine olarak HeLa hücre hattı üzerine olan etkileri araştırıldı. İlaç uygulaması sonrasında 24. ve 48. saatte hücre kültürleri sonlandırılarak hücrelerin canlılık oranları MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. Ayrıca, Taksol ve EF-24'ün hücre proliferasyonu ve apoptozla ilgili genlerin ifade düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi kullanıldı.

Çalışmamızda Taksol ve EF-24'ün artan konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalmaya neden olduğu görüldü. 25 nM Taksol tek başına uygulandığında hücre canlılığı %82.5 iken, 25 nM Taksol + 10 µM EF-24 kullanılması ile bu oranın %65 seviyesine indiği gözlemlendi. 50 nM Taksol tek başına uygulandığında hücre canlılığı %63 iken, 50 nM Taksol + 10 µM EF-24 kullanılması ile bu oranın %57 olduğu görüldü. Bunun dışında EF-24'ün tek başına uygulanması, birlikte uygulamaya oranla daha etkili sonuçlar ortaya çıkardı. Sırasıyla 5 µM ve 10 µM EF-24'ün tek başına uygulaması sonucunda hücre canlılığının %51 ve %45 seviyelerine indiği gözlemlendi.

Çalışmamızda farklı dozlarda Taksol ve EF-24'ün tek tek ve kombine uygulanmasıyla, genel olarak hücre proliferasyonunda görevli olan Siklin D1 ve PI3K genlerinin mRNA düzeylerinde azalma olduğu, apoptotik özellikteki kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeylerinde ise artma olduğu gözlemlendi. Ancak, tek başına EF-24 uygulanmasının kombine uygulamaya oranla daha etkili olduğu görüldü.

10 μ M EF-24 inkübasyonu sonucunda Siklin D1 mRNA ifade düzeyinin yaklaşık 3 kat, PI3K mRNA düzeyinin ise 2.6 kat azaldığı belirlendi. 25 nM Taksol + 10 μ M EF-24 konsantrasyonunda ise siklin D1 ve PI3K mRNA düzeylerinin yaklaşık 2 kat azaldığı gözlemlendi. Aynı şekilde 10 μ M EF-24 inkübasyonu sonucu kaspaz-3 mRNA ifade düzeyinin yaklaşık 3 kat, kaspaz-9 mRNA düzeyinin ise yaklaşık 2.5 kat arttığı bulundu. 25 nM Taksol + 10 μ M EF-24 konsantrasyonunda kaspaz-3 mRNA düzeyinin yaklaşık 2 kat, kaspaz-9 mRNA düzeyinin ise 1.8 kat arttığı belirlendi.

Sonuç olarak MTT deneyinden elde edilen sonuçlara bakıldığında bu iki ilacın birlikte kullanımının yüksek dozda Taksol varlığında antagonistik bir etki yarattığı gözlemlendi. Bu sonuçlar ile paralel olarak mRNA analizinde de tek başına EF-24 uygulamasının birlikte uygulamaya göre apoptotik genlerin aktivasyonunda ve proliferasyondan sorumlu genlerin baskılanmasında daha çok etkili olduğu gözlemlendi. Ayrıca düşük doz Taksol ile EF-24 kombinasyonu, kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA ifadenin düzeylerinde artışa neden olurken, yüksek doz Taksol ile kullanılan EF-24 kombinasyonu bu etkiyi göstermedi. Bu durum düşük Taksol konsantrasyonunda EF-24 ile birlikte elde edilen hücre canlılığı oranlarının daha da düşük çıkmasını açıklarken, yüksek dozda Taksol ile EF-24 uygulandığında elde edilen etkinin Taksol'ün tek başına etkisine oranla neden daha az olduğunu gösterebilir.

Sonuç olarak Taksol gibi klasik kemoterapotik ajanların yanında, üzerinde birçok çalışma yapılarak etkinliği gösterilmiş olan curcumin gibi moleküllerin ve bu moleküllerin yeni geliştirilen EF-24 gibi daha etkili analoglarının kanser üzerine etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Ayrıca bu moleküllerin uyardığı ya da baskıladığı sinyal yolaklarının tanımlanması ve kanser hücrelerinin apoptoza yönlendirilmesinde daha etkili olabilecek kemoterapotik ajanların tasarlanması ve geliştirilmesine imkan tanıyacaktır.

7. ÖZET

EF-24'ün, Taksol'ün oluşturduğu apoptotik ve anti-proliferatif cevabı üzerine etkilerinin HeLa hücre hattında araştırılması.

Mikrotübül stabilizatörleri olarak kullanılan moleküller, mikrotübül dinamiğinde meydana getirdikleri değişiklikten dolayı metafaz/anafaz geçişini engeller ve hücreleri apoptoza yönlendirirler. Bu moleküllerden biri olan Taksol çeşitli kanserlerde kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır. Çeşitli kanser çalışmalarında kullanılan diğer bir kemoterapötik ajan da curcuminin sentetik analoglarından biri olan EF-24 dür. EF-24'ün in vitro koşullarda çeşitli kanser hücrelerinin hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu uyardığı bilinmektedir. Bu çalışma ile Taksol'ün ve EF-24'ün serviks kanseri hücre hattı olan HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik ve anti-proliferatif etkisi ile hücre döngüsünün ilerlemesinde etkin rol oynayan siklin D1 ve PI3K genleri ile apoptotik yolakda görevli olan kaspaz-3 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA ifade düzeyleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmamızda Taksol ve EF-24'ün farklı dozlarda tek tek ve kombine olarak HeLa hücre hattı üzerine uygulanması sonrasında 24. ve 48. saatte hücre kültürleri sonlandırılarak hücrelerin canlılık oranları MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. Ayrıca, Taksol ve EF-24'ün hücre proliferasyonu ve apoptozla ilgili genlerin mRNA ifade düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi kullanıldı.

Çalışmamızda tek başına EF-24 ve Taksol uygulamasının, hücre canlılığını artan konsantrasyonlarda düşürdüğü gözlemlendi. Bu ilaçların birlikte kullanımlarının ise özellikle tek başına EF-24 uygulamasına oranla hücre canlılığını daha az düşürdüğü ve birlikte uygulamanın antagonistik bir etkiye neden olduğu gözlemlendi. Özellikle yüksek doz Taksol ile birlikte kullanılan EF-24'ün Taksol'ün etkisini azalttığı, düşük doz Taksol ile birlikte kullanılan EF-24'ün ise Taksol'ün etkisini arttırdığı çalışma sonunda gösterildi. Aynı şekilde mRNA analizlerinden elde edilen verilere göre birlikte uygulama sonucu kaspaz-3, kaspaz-9, siklin D1 ve PI3K mRNA düzeylerine bakıldığında da bu sonuçları destekleyici bulgular elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Gen İfadesi, Apoptoz, Serviks Kanseri, Taksol, EF-24

8. SUMMARY

Investigation of the EF-24's effect on Taxol 's apoptotic and anti-proliferative response in HeLa cell line

The molecules used as stabilizers of microtubules inhibit metaphase and anaphase transition and direct the cells to apoptosis due to the change in microtubule dynamics. Taxol is one of these molecules which is used as chemotherapeutic agent in various cancer types. Another chemotherapeutic agent used in a variety of cancer studies is EF-24, one of the curcumin's synthetic analogues. EF-24, under in vitro conditions, is known to stimulate apoptosis of various cancer cells by inhibiting cell proliferation.

In this study, we aimed to research the apoptotic or anti-proliferative effect of Taxol and EF-24 on HeLa cells , Cyclin D1 and PI3K genes which play a crucial role in cell cycle progression and the effects of caspase-3 and caspase-9 genes in charge in apoptotic pathway on the mRNA expression levels.

In our study, after Taxol and EF-24 were implemented on Hela cell line both individually and combined, their cell cultures were ended in 24 and 48 hours' time. The cell viability rates were determined by MTT method. In addition, quantitative real-time PCR method was used to determine the levels of mRNA expressions genes related to cell proliferation and apoptosis of Taxol's and EF-24 's .

In our study, we observed that when EF-24 and Taxol were applied separately, the viability of cells decreased in increasing concentrations. However, when these drugs were used together, it has been observed that the viability of cells decreased less-especially compared with the application of EF-24 alone- and that when they were used together they were creating an antagonistic effect. At the end of the study, it has been shown that especially EF-24 used with a high dose of Taxol decreased the effect of Taxol, EF-24 used with a low dose of Taxol increased the effect of Taxol. Similarly, according to the data obtained from mRNA analysis, as a result of the use of those drugs together, as we look to the levels of caspase-3, caspase-9, cycline D1 and PI3K mRNA, supporting symptoms have been obtained.

Key Words: Gene expression, Apoptosis, Cervix Cancer, Taxol, EF-24

9. KAYNAKLAR

1. Taşkın L. (2005) Doğum ve Kadın Sağlığı Hemşireliği, Sistem Matbaacılık,VII. Baskı, s: 40, 607-615.
2. Robbins S.L., Kumar V.,Cotran R., (2003), Serviks İntraepitelyal Neoplazi ve Skuamöz Hücreli Karsinom, Serviks Tümörleri, Kadın Genital Sistem ve Meme. Çeviri Editörü:Prof.Dr.Ugur Çevikbas.7nd.Ed;686-689.
3. International Agency For Research On Cancer IARC Screening Group Websites
4. Philip, D.J., William, C.T., 2003, Klinik Jinekolojik Onkoloji, altıncı baskı 3-61,633s.
5. Berek J. S. (2004) Novak Jinekoloji, Çeviri Ed.; Erk A., 13. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, s: 471-493, 1119-1232.
6. Sankaranarayanan R, Ramani S, Wesley R.Servikal Neoplazilerde Gözle Tarama Pratik El Kitabı. 1. baskı. Ankara 2005.
7. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS. HPV screening for cervical cancer in rural India. New England Journal of Medicine. 2009;360(14):1385–94
8. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002.CA Cancer J Clin 2005; 55: 74-108.
9. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>

10. Berek J.S., Fu Y.S., Hacker N.F., Ovarian Cancer, in Berek JS, Adashi EY, Hillard P: Novak's Gynecology. Baltimore, Maryland. Williams & Wilkins 1996 p: 155. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1997; 9 (2): 169-172
11. Dunleavey R: Cervical cancer: a guide for nurses. John Wiley & Sons., 2009
12. Jemal A, Melissa M. Center, Carol D, Elizabeth M Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. Ward. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev August 2010 19:1893-1907
13. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanseri İstatistikleri 2005, URL: <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-7179/eski2yeni.html>
14. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM: Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: Comparison by geographic region and with cervical cancer, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14(5):1157-64.
15. zur Hausen H. The role of viruses in human tumors. Adv Cancer Res. 1980;33:77-107
16. Wright T.C. Jr, Schiffman M., adding a test for human papillomavirus DNA to cervical cancer screening. N Engl J Med. 2003 Feb 6;348(6):489-90.
17. Walboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M., Bosch F.X., Kummer J.A., Shah K.V., Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999; 189:12-19.

18. Quinn MA. Screening and prevention of gynaecological cancer. *Rev Gynaecol Prac* 2003;3:148–155
19. American Cancer Society: Cervical Cancer What Are the Risk Factors for Cervical Cancer?
http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_2X_What_are_the_risk_factors_for_cervical_cancer_8.asp?rnav=cri
20. Pichichero M.E. (2007) Who Should Get the HPV Vaccine? *The Journal of Family Practice*, Vol: 56(3), March, s: 197-202.
21. Arvas M., Gezer A., Güralp O. (2008), Genital HPV Enfeksiyonu ve Koruyucu HPV Aşıları, *Türk Pediatri Arşivi*, 43(1):1-8.
22. Pınar G.,(2008) Human Papillomavirus Enfeksiyonlarına Genel Yaklaşım, *Sağlık Dergisi*, Sayı: 3, Nisan, s: 40-45.
23. Harvard School of Public Health. Cancer: cervical cancer, Risk factors.
http://www.diseaseriskindex.harvard.edu/update/hccpquiz.pl?lang=english&func=show&quiz=cervical&page=risk_list
24. National Cancer Institute. Cervical Cancer Prevention
http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/prevention/cervical/HealthProfessional/77.cdr#Section_77
25. Gökaslan H., Uyar E. (2004) Pap Smear ile Servikal Kansere Taraması, *Türk Aile Hekim Dergisi*, 8(3):105-110.
26. Yüce K., Salman N., (2007) Serviks Kanseri ve Önlenmesi, *Matbaa Çözümleri*, 1. Baskı, İstanbul, s:1-39, 84-110.

27. Çiçek N., Mungan T. (2007) Klinikte Obstetrik ve Jinekoloji, Güneş Tıp Kitabevleri, s: 679-740.
28. Tıbbi Onkoloji Derneği, <http://www.kanser.org>
29. Scott J., Disaia P., Hammond C., Spellacy W., (1997) Obstetrik ve Jinekoloji (Danforth) Çeviri Ed.; Erez S., 7. Baskı, 1997, Yüce Yayım Dağıtım, s: 901-916.
30. Benedet J.L., Progress in gynecologic cancer detection and treatment. Int J Gynaecol Obstet 2000;70: 135-47.
31. Brant J,. Cervical Cancer. içinde: Oncology Nursing Assessment and Clinical Care, Ed:Miaskowski C, Buchsel P, Mosby, 1999;29: 657-85.
32. Vanchiere J.A.,Demmler G.J., Human Polyomaviruses and Papillomaviruses, "Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL (eds): Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 5.baskı" kitabında s.1809-31, Saunders, Philadelphia (2004).
33. Munoz N., Bosch F.X., de Sanjosé et al: Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer, N Eng J Med 2003;348(6):518-27.
34. Yarkın F. Human Papillomavirus: Patogenez ve İmmünite.XXXII.Türk Mikrobiyoloji Kongresi (Kongre kitabı) S:234-236
35. Gerald L., Mandell, John E.Bennat, Raphael Dolin. Principles and Practice of İnfection Disease . Fifth Edition, Volume 2, S:1160-71

36. Bosch F.X., Manos M.M., Muñoz N., et al: Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer (IBSCC): A worldwide perspective, J Natl Cancer Inst 1995;87(11):796-802.
37. Trottier H., Franco E.L., The epidemiology of genital human papillomavirus infection, Vaccine 2006;24(Suppl 1):S1-15.
38. Bosch F.X., de Sanjosé S., Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer- burden and assessment of causality, J Natl Cancer Inst Monogr 2003;31:3-13.
39. Woodman C.B., Collins S., Rollason T.P., Human papillomavirus type 18 and rapidly progressing cervical intraepithelial neoplasia. Lancet. 2003;361:40-43.
40. Dunne E.F., Unger E.R., Sternberg M., et al: Prevalence of HPV infection among females in the United States, JAMA 2007;297(8):813-9.
41. World Health Organization: Report of the consultation on human papillomavirus vaccines, WHO, Geneva (2005).
42. Ho G.Y., Bierman R., Beardsley L., Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. N Engl J Med. 1998;338:423-428
43. Oats J., Abraham S., (2005) Fundamentals of Obstetrics and Gynaecology, Eighth Edition, Elsevier Science, s: 297-305.

44. Anatomical Therapeutic Chemical, "Antineoplastik ve immünomodölatör ajanlar"
<http://www.ilacabak.com/etkengoster.php?Id=L01CDO1>
45. FITZPATRICK F.A., and WHEELER R.,2003,The immunopharmacology of paclitaxel(Taxol®),Docetaxel (Taxotere®), and related agents, *International Pharmacology* 3, 1699-1714.
46. Wani M.C., Taylor H.L. and Wall M.E., et al., 1971, Antitumor agents VI, the isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from taxus brevifolia, *J.Am. Chem. Soc.* 93:2325-2327 pp.
47. MASTROPAOLO D., CAMERMAN A., LUO Y., BRAYER G.D., CAMERMAN N.,1995, Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol), *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 92, 6920-6924
48. ÖZCAN ARICAN, G., 2005,Evaluation of chemoprotective effects of amifostine and cysteamine in cell cultures treated with paclitaxel using growth rate parameter,*Biologia*, 60(3), 325-330
49. Costanzo F., Gasperoni S., Rotella V., et al. Targeted delivery of albumin bound paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer.*Onco Targets Ther* 2009, 2;179-188
50. Aydın S., "Antineoplastik ilaçların farmakolojisi ders notu Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,Eskişehir

51. SORGER, P.K., DOBLES, M., TOURNEBIZE, R., HYMANN, A.A., 1997, Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics, *Curr Opin Cell Biol*, 9: 807-814.

52. BALOĞLU, E., 2001, *Synthesis and biological evaluation of paclitaxel analogs*, Doktor of philosophy in chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University.

53. JORDAN, M.A., 2002, Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin, *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 2, 1-17

54. Malika S., Cusidó R.M., Mirjalili M.H., Mayona E., Palazón J. and Bonfill M., 2011, Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures:A review, *Process Biochemistry*, 46:23–34pp.

55. SCHIFF, P.B., FANT, J., HORWITZ, S. B. 1979, Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol, *Nature*, 277: 665-667.

56. SCHIFF, P.B. and HORWITZ, S.B., 1980, Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 1561-5.

57. CHEN, C-T., AU, J.L-S., GAN Y., WIENTJES, M.G., 1997, Differential time dependency of antiproliferative and apoptotic effects of taxol in human prostate tumors, *Urol Oncol*, 3:11-17.

58. Türkyılmaz M.Ç. (2008) Paclitaksel ve Sisplatin Kemoterapisinin Ratlarda Neden Olduğu Ovaryan Hasarın GnRH Analogu Kullanılarak Önlenebilirliği, Erciyes Üniversitesi Yayınlanmış Tıpta Uzmanlık Tezi
59. WANG, T.-H., WANG, H.-S., SOONG, Y.-K., 2000, Paclitaxel-induced cell death, *Cancer*, June 1, Volume 88, Number 11, 2619-2628.
60. TORRES, K., HORWITZ, S. B., 1998, Mechanisms of taxol- induced cell death are concentration dependent, *Cancer Research*, 58, 3620-3626
61. Perkins S., Verschoyle R.D., Hill K., Parveen I., Threadgill M.D., Sharma R.A., Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11 (6): 535-540.
62. Natarajan C., Bright J.J., Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through janus kinase-stat pathway in T-lymphocytes. *The Journal of Immunology* 2002; 169: 6506–6513.
63. Balasubramanyam M., Koteswari A.A., Kumar R.S., Monickaraj S.F., Maheswari J.U., Mohan V., Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. *J Biosci* 2003; 28: 715- 21.

64. Huang M.T., Smart R.C., Wong C.Q., Conney A.H.. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 1988;48: 5941-6.
65. Rao T.S., Basu N., Seth S.D., Siddiqui H.H., Some aspects of pharmacological profile of sodium curcumin. *Indian J Physiol Pharmacol* 1984;28: 211-5.
66. Deshpande S.S., Ingle A.D., Maru G.B., Chemopreventive efficacy of curcumin-free aqueous turmeric extract in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumorigenesis. *Cancer Lett* 1998;123: 35-40.
67. Sharma R.A., McLelland H.R., Hill K.A., Ireson C.R., Euden S.A., Manson M.M., et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7: 1894-1900.
68. Thangapazham R.L., Sharma A., Maheshwari R.K., Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin, *AAPS J* 2006;8:443-9.
69. Ahsan H, Parveen N, Khan NU, Hadi SM. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chem Biol Interact* 1999; 121: 161- 75

70. Thomas S.L., Zhong D., Zhou W., Malik S., Liotta D., Snyder J.P., Hamel E. & Giannakakou P., (2008) EF24, a novel curcumin analog, disrupts the microtubule cytoskeleton and inhibits HIF-1. *Cell Cycle* 7,2409–2417.

71. Selvendiran K., Tong L., Vishwanath S., Bratasz A., Trigg N.J., Kutala V.K., Hideg K., Kuppusamy P., 2007. EF-24 induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression . *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282, no. 39: 28609-28618.

72. Thomas S.L., (2009) Analysis of the EF24-modulated signaling pathways for the development of novel cancer combination therapies, B.S., A dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of Emory University

73. Kasinski A.L., Du Y., Thomas S.L., Zhao J., Sun Shi-Yong, Khuri F.R., Wang Cun-Yu, Shoji M., Sun A., Snyder J.P., Liotta D., Fu H., Inhibition of IKK-NF- B signaling pathway by EF24, a novel monoketone analogue of curcumin. *Mol Pharmacol* 2008; as doi:10.1124/mol.108.046201

74. Tan X., Sidell N., Mancini A., Huang R.P., Wang S., Horowitz I.R., Liotta D.C., Taylor R.N., and Wieser F., 2010, Multiple Anticancer Activities of EF24,a Novel Curcumin Analog, on Human Ovarian Carcinoma Cells, *Reproductive Sciences* 17:931, DOI: 10.1177/1933719110374239

75. Olivera A., Moore T.W., Hu F., Brown A.P, Sun A., Liotta D.C., Snyder J.P., Yoon Y., Shim H., Marcus A.I., Miller A.H., Pace T.W.W., (2012), Inhibition of the NF- κ B signaling pathway by the curcumin analog, 3,5-Bis(2-pyridinylmethylidene)-4-piperidone (EF31): Anti-inflammatory and anti-cancer properties, "International Immunopharmacology 12 (2012) 368–377 "
76. GHOBRIAL, I. M., WITZIG, T. E., ADJEI, A. A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin.* **55**: 178-194. [<http://caonline.amcancersoc.org/cgi/content/full/55/3/178>].
77. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
78. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
79. Raff MC: Cell suicide for beginners. *Nature* 1998, 396:119-122.
80. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997, 88:347-354.
81. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68:251–306.
82. Cryns VL, Yuan J. The cutting edge: caspases in apoptosis and disease. In *When Cells Die*. Edited by Lockshin RA, Zakeri Z, Tilly JL. New York: Wiley-Liss Inc; 1998:177-210.

83. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:383–424.
84. GÖZÜAÇIK, D., KİMCHİ, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 23(16):2891-2906.
85. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(11): 897-907.
86. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(4): 277-88.
87. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 2000; 157(5): 1415-30.
88. ANTONSSON, B., MARTIGNOU, J.C. (2000). The Bcl-2 Protein Family. *Experimental Cell Research*. 256: 50–57.
89. KAUR, M., AGARWAL, R., AGARWAL, C., (2006) Grape seed extract induces anoikis and caspase-mediated apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells: possible role of ataxia telangiectasia mutated–p53 activation. *Mol Cancer Ther*. 5(5).
90. Schimmer AD. Apoptosis in leukemia: from molecular pathways to targeted therapies. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; 21(1):5-11.

91. CAO, W., CHI, W.H., WANG, J., TANG, J.J., LU, Y.J. (2005). TNF- α promotes Doxorubicin-induced cell apoptosis and anti-cancer effect through downregulation of p21 in p53-deficient tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **330**: 1034–1040.
92. <http://omim.org/entry/600636>
93. Wingrave J.M., Schaecher K.E., Sribnick E.A., Wilford G.G., Ray S.K., Hazen-Martin D.J., Hogan E.L., Banik N.L., *Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats*, J. of Neuroscience Res., 73:1(2003) 95–104.
94. Cohen G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*, Rew. Article Biochem J., 326 (1997) 1-16.
95. B.R. Pike, J. Flint, J.R Dave, X.-C M. Lu, K.K.K Wang, F.C Tortella and R.L. Hayes, *Accumulation of Calpain and Caspase-3 Proteolytic Fragments of Brain-Derived II-Spectrin in Cerebral Spinal Fluid After Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats*, J. of Cereb. Blood Flow & Metab., 24:1(2004) 98–106.
96. Hirano A et al. Two novel single-nucleotide polymorphism of the Caspase-9 (CASP9) gene in the Japanese population. *Genes Immun* 2001; 2 : 117-118.
97. Johnson AL et al. Caspase mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction* 2002; 124: 19-27.

98. Zhu XL, Hartwick W, Rohan T, Kandel R. Cyclin D1 gen amplification and protein expression in benign breast disease and breast carcinoma. *Mod Pathol* 1998; 11:1082–1088.
99. Vinay Kumar, Abul K Abbas, Nelson Fausto. *Pathologic Basis of Disease*. 7 th edition, 2005
100. Tut VM, Braithwaite KL, Angus B, Neal DE, Lunec J, Mellon JK. Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: correlation with p53, waf1, pRb and Ki67. *Br J Cancer* 2001; 84: 270–275.
101. Ito Y, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Miyauchi A. Papillary microcarcinomas of the thyroid with preoperatively detectable lymph node metastasis show significantly higher aggressive characteristics on immunohistochemical examination. *Oncology* 2005; 68(2-3):87-96. Epub 2005 May 9.
102. Lantsov D, Meirmanov S, Nakashima M, Kondo H, Saenko V, Naruke Y, Namba H, Ito M, Abrosimov A, Lushnikov E, Sekine I, Ymashita S. Cyclin D1 overexpression in thyroid papillary microcarcinoma: its association With tumour size and aberrant betacatenin expression. *Histopathology*. 2005 Sep; 47(3):248-56.
103. Tuncer E. Midenin Neoplastik ve Nonneoplastik Lezyonlarında p53, p21WAF1/CIP1 ve cyclin D1 Ekspresyonunun araştırılması ve H.pylori ile ilişkilerinin incelenmesi(Tez). Sivas: Cumhuriyet Üniversitesi; 2003

104. R. Donnellan, R. Chetty. Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol:Mol Pathol* 1998; 51: 1–7.
105. Florea, A., Dopp, E., Büsselberg, D., Elevated Ca^{2+} transients induced by trimethyltin chloride in HeLa cells: types and levels of response, *Cell Calcium*, 37, 251–258, (2005).
106. Macville, M., Schrock, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B. M., Zimonjic, D., Popescu, N., Ried, T., Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping, *Cancer Res.*, 59 (1), 141-150, (1999).
107. Baldi, A., Boccia, V., Claudio, P. P., De Luca, A., Giordano, A., Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2/p130 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (10), 4629-4632, (1996).
108. Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J. C., Howley, P. M., The state of the *p53* and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(13), 5523-5527, (1991).
109. Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., zur Hausen, H., A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer, *EMBO J.*, 3 (5), 1151-1157, (1984).
110. Bruder J.T., Kovesdi I., Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signalling pathway and induces interleukin-8 expression, *J. Virol.*, 71 (1), 398-404, (1997).

111. Gasowska-Giszcza, U., Darmochwal-Kolarz, D., Wasniewska, A., Dziubinska-Parol, I., Rolinski, J., Oleszczuk, J.: Apoptosis of HeLa cell lines incubated with retinol, *Eur. J. Obstet. & Gynecol. Reprod. Biol.*, 119 (1), 119–122, (2005).
112. Scherer, W. F., Syverton J. T., Gey G. O., Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix, *J. Exp. Med.*, 97 (5), 695–710, (1953).
113. Schneider-Gadicke, A., Schwarz, E., Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes, *EMBO J.*, 5 (9), 2285-2292, (1986).
114. Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z., Ferencik, M., Detection of drug-induced, superoxide-mediated celldamage and its prevention by antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.*, 30 (6), 650–664, (2001).
115. Giannoni, E., Cirri, P., Paoli, P., Flaschi, T., Camici, G., Manao, G., Raugei, G., Ramponi, G., Acylphosphatase is a strong apoptosis inducer in HeLa cell line, *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, 3, 264–270, (2000).
116. Dvorak, Z., Modriansky, M., Ulrichova, J., Maurel, P., Vilarem, M., Pascussi, J., Disruption of microtubules leads to glucocorticoid receptor degradation in HeLa cell line, *Cell Signal.*, 17, 187–196, (2005).

117. Missiaen, L., Van Acker, K., Van Baelen, K., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Parys, J. B., De Smedt, H., Vanoevelen, J., Dode, L., Rizzuto, R., Callewaert, G., Calcium release from the golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments, *Cell Calcium*, 36, 479–487, (2004).
118. Lui, P. P. Y., Chan, F. L., Suen, Y. K., Kwok, T. T., Konga, S. K. The nucleus of HeLa cells contains tubular structures for Ca^{2+} signaling with the involvement of mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308, 826–833, (2003).
119. Varadi, A., Cirulli, V., Rutter, G. A., Mitochondrial localization as a determinant of capacitative Ca^{2+} entry in HeLa cells, *Cell Calcium* 36, 499–508, (2004).
120. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(9): e36.
121. Thayer A.M., 2000, Busting down a blockbuster drug. *Chem. Eng. News* 78:20–21 pp.
122. Vaishampayan U., Parchment R.E., Jasti B.R. and Hussain M., 1999, Taxanes: an overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Urology*, 54: 22 pp.

123. El Alaoui A., Saha N., Schmidt F., Monneret C. and Florent J.C., 2006, New taxol (paclitaxel) prodrugs designed for ADEPT and PMT strategies in cancer chemotherapy. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 5012-5019pp.
124. Jing Z., Yong Z., Effects of Curcumin on Proliferation and Apoptosis of Human Cervical Carcinoma HeLa Cells In Vitro, *Chinese Journal of Cancer research* 16(3):225-228,2004
125. Jing Z., Yong Z., Yan Z., Wei C., Anti-Tumor Effect of Curcumin on Human Cervical Carcinoma HeLa Cells In Vitro and In vivo, *Chinese Journal of Cancer research* 19(1): 32-36,2007
126. Milas, L., Hunter, N. R., Kurdoglu, B., Mason, K. A., Meyn, R., Stephens, L. C., and Peters, L. J. Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with taxol. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 35: 297-303,1995.
127. Holstein SA, Hohl RJ: Synergistic interaction of lovastatin and paclitaxel in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* 1:141-149,2001
128. Popovich D.G., Tiaras F., Yeo C.R., Zhang W., Lovastatin Interacts with Natural Products to Influence Cultured Hepatocarcinoma Cell (Hep-G2) Growth, *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 29, No. 3, 204-210 (2010)
129. Mao Q.Q., Bai Y., Lin Y.W., Zheng X.Y., Qin J., Yang K. and Xie L.P., Resveratrol confers resistance against taxol via induction of cell cycle arrest in human cancer cell lines, *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54, 1574-1584

130. Marcus A.I., Peters U., Thomas S.L., Garrett S., Zelnak A., Kapoor T.M., and Giannakakou P., Mitotic Kinesin Inhibitors Induce Mitotic Arrest and Cell Death in Taxol-resistant and -sensitive Cancer Cells, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 280, No. 12, Issue of March 25, pp. 11569–11577, 2005
131. Kano Y., Akutsu M., Tsunoda S., Ando J., Matsui J., Suzuki K., Ikeda T., Inoue Y., and Adachi K., Schedule-dependent interaction between paclitaxel and 5-fluorouracil in human carcinoma cell lines in vitro, *British Journal of Cancer* (1996) 74,704-710
132. JORDAN, M. A., and WILSON, L., 1998, Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy, *Curr Opin in Cell Bio*,10: 123-130.
133. Amos L.A., Löwe J., How Taxol stabilises microtubule structure, *Chemistry & Biology* 1999, Vol.6, No.3, 6:R65–R69
134. Sen S., Sharma H., Singh N., Curcumin enhances Vinorelbine mediated apoptosis in NSCLC cells by the mitochondrial pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331: 1245-52.
135. Banerjee M., Singh P., and Panda D., Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells. *FEBS Journal* 277 (2010) 3437–3448

136. Lai H.W., Chien S.Y., Kuo S.j., Tseng L.M., Lin H.Y., Chi C.W., and Chen D.R., The Potential Utility of Curcumin in the Treatment of HER-2-overexpressed Breast Cancer: An In Vitro and In Vivo Comparison Study with Herceptin. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Vol. 2012, Article ID 486568

10. EKLER

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgisini ve desteğini daima hissettiğim, emeğini ve zamanını harcayarak, mesleki bilgi ve tecrübeleriyle eğitimimde ve çalışmalarımda beni yönlendiren, her türlü durumda manevi desteğini üzerimde hissettiğim değerli hocam, tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Sevda MENEVŞE'ye şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, desteklerini her zaman hissettiğim değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Adnan MENEVŞE'ye ve Sn. Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimin yanı sıra, tezimin tüm aşamalarında yardımlarını benden esirgemeyen, dostlukları ve manevi destekleri ile beni hep cesaretlendiren başta Sn. Yrd. Doç. Dr. Ebru ALP olmak üzere Sn. Öğr. Gör. Dr. H. İlke ÖNEN'e ve Dr. Akın Yılmaz'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini sürekli yanımda hissettiğim, eğitim sürecim boyunca gösterdikleri anlayış, özveri ve hayatıma kattıkları anlam için annem Gülseren KARAOĞLU, babam A. Kadir KARAOĞLU ve doğduğu gün hayatıma sunulan en güzel armağan olan canım kardeşim Harika KARAOĞLU'na sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.