

**T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NİTRİK OKSİD İLE İNDÜKLENMİŞ PROSTAT KANSER KÖK
HÜCRELERİNDE ZOLEDRONİK ASİDİN APOPTOTİK ETKİSİNİN
İNCELEMESİ**

TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Tezi

Hadi ROUHRAZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM**

**İZMİR
2017**

**T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NİTRİK OKSİD İLE İNDÜKLENMİŞ PROSTAT KANSER KÖK
HÜCRELERİNDE ZOLEDRONİK ASİDİN APOPTOTİK ETKİSİNİN
İNCELEMESİ**

TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Tezi

Hadi ROUHRAZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM**

**İZMİR
2017**

Tez deęerlendirme kurulu sayfası



ÖNSÖZ

Kendisini tanıdığım günden bu yana, değerli fikirleri, eşsiz bilgi birikimi ve yardımlarını esirgemeyen, sorularımı sabırla cevaplayan, her türlü laboratuvar çalışma ortamını sunan, tecrübesini benden esirgemeyen saygıdeğer danışmanım, Sayın Prof. Dr. Gülperi ÖKTEMe,

Kendisini tanıdığım günden bu yana, gerek akademik gerekse sosyal, birlikte olduğumuz her ortamda üstün bilgisini, deneyimini, öngörüsünü, değerli fikirleri, benden esirgemeyen, sayın hocam Prof. Dr. Nevbahar TURGAN'a,

Her üyesi birbirinden kıymetli, deneylerimde yardımcı olan "ÖktemLab" arkadaşlarıma,

Kanser Biyolojisi eğitimime başladığım günden itibaren çalışmalarımı yaptığım Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi doktora eğitimi ve tez çalışmalarım boyunca da maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, canım annem Tahereh NIKKHOU ve sevgili babam Atouf ROUHRAZİle, ağabeyim ve kardeşime,

Son olarak, her koşulda yanımda olan, sabrını, sevgisini, ilgisini benden hiç esirgemeyen, sevgili eşim, hayat arkadaşım Katira SOLEYMANZADEH'ye, ve hayatıma anlam veren yavrum Janmehr ROUHRAZİ'ye,

Sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

İzmir, Ağustos 2017

Hadi ROUHRAZİ

ÖZET

AMAÇ: Kanser kök hücreleri, tümör hücrelerinin bir alt popülasyonu olup, tümörün başlatılmasından sorumludur ve yüksek düzeyde kendi kendini yenileme potansiyeline sahiptir. Tümörün nüksetmesindeki rollerine ek olarak, kemoterapi ve radyasyona karşı direnç düzeyleri yüksektir. Elde edilen bulgular, DETA NONOate gibi nitric oksit(NO) vericilerinin kemo-duyarlılık yaratıcı etkileri olduğunu göstermiştir. Üçüncü nesil bifosfonat zoledronik asit (ZA)'ın insan prostat DU-145 kanser kök hücreleri üzerinde gözlemlediğimiz pro-apoptotik proteinlerin fazla ekspresyonu ve bazı anti-apoptotik proteinlerin normalden az ekspresyonu ile karakterize apoptotik etkileri, bizi insan prostat kanseri hücrelerinde, DETA NONOate'in, hücre sağkalımı ve ZA ile indüklenmiş apoptoz üzerindeki etkilerini incelemeye yöneltmiştir.

YÖNTEM: İnsan prostat kanseri DU-145 hücre hattından izole edilen kanser kök hücreleri ve non-KKH, 500 µM DETA NONOate ile 24 saat inkübe edildi ve daha sonra 72 saat boyunca ZA'nın belirlenen IC₅₀ dozu ile muamele edildi. Hücre viabilite testleri ve Annexin V testi Muse™ cell analyzer ile gerçekleştirildi. Apoptoz ilişkili 84 genin ekspresyonu qRT-PCR array ile ölçüldü.

BULGULAR: DETA NONOate ve ZA'nın birlikte kullanımına bağlı olarak azalan hücre viabilitesi ve yalnızca ZA ile muamele edilen DU-145 kanser kök hücreleri ile elde ettiğimiz önceki sonuçlarımıza kıyasla total apoptozun artan düzeyleri ile sitotoksitede anlamlı derecede artış olduğu gözlenmiştir. Apoptoz önleyici protein ailesi, BIRC2 ve BIRC3 genlerinin ekspresyonu DETA-NONOate ile önceden muamele edilen kanser kök hücrelerinde, sadece ZA ile muamele edilen hücelere göre anlamlı derecede azalmıştır. DETA NONOate ile gözlenen bu etkiler, non-KKH'de gözlenmemiştir.

SONUÇ: Sonuçlarımız, DETA NONOate ve ZA'nın kombine kullanımı ile, kanser kök hücreleri üzerinde, non-KKH'lara oranla, daha yüksek düzeyde toksik ve apoptotik etki elde edilmiştir. Nitrik oksit, kanser kök hücrelerini, BIRC2 ve BIRC3'ün ekspresyonunu azaltarak, ZA ile indüklenen apoptoza karşı duyarlı hale getirir. Bu nedenle, nitrik oksit vericisi olan DETA NONOate ve prostat kanser kök

hücrelerinde kritik öneme sahip, hücre sağkalımı ile ilişkili yolları hedefleyen ilaçların beraber kullanımı, agresif prostat kanserinin tedavisi için geliştirilen klinik faz çalışmalarında önemli derecede etkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: Kanser Kök Hücre; Apoptoz; İlaç direnci; Bifosfonat; Zoledronik asid; DETA NONOate



ABSTRACT

Cancer stem cells (CSCs) are a subset of tumor cells responsible for tumor initiation and exert a high self-renewal potential. In addition to their role in tumor recurrence, they also exhibit increased resistance to chemotherapy and radiation. Evidence shows that nitric oxide (NO)-donors such as DETA NONOate possess chemo-sensitizing effects. Our previous observations of apoptotic effects of third generation bisphosphonate zoledronic acid (ZA) in human prostate DU-145 CSCs through over-expression of some pro-apoptotic and under-expression of some anti-apoptotic proteins prompted us to investigate the impact of DETA NONOate on cell survival and ZA-induced apoptosis in prostate cancer. CSCs and non-CSCs isolated from human prostate cancer DU-145 cell line were first treated with 500 microM of DETA NONOate for 24 hours and then with IC_{50} doses of ZA for an additional 72 hours. Cell viability tests and Annexin V assays were performed by MuseTM cell analyzer. Expressions of 84 apoptosis-related genes were analyzed by qRT-PCR array. Sequential treatment with DETA NONOate demonstrated significantly greater cytotoxicity through decreased cell viability and enhanced levels of total apoptosis in prostate DU-145 CSCs compared to our previous results of treatment with ZA only. Expressions of inhibitor of apoptosis protein (IAP) family *BIRC2* and *BIRC3* genes decreased significantly in CSCs pretreated with DETA NONOate compared with those treated with ZA alone. These effects of DETA NONOate were not observed in non-CSCs. Our findings indicate that combined treatment with ZA and DETA NONOate has more cytotoxic and apoptotic effect on CSCs than non-CSCs and that nitric oxide sensitizes CSCs to ZA-induced apoptosis through down-regulation of IAP proteins *BIRC2* and *BIRC3*. Therefore, sequential treatment with nitric oxide donor DETA NONOate and drugs

specifically targeting key survival pathways in prostate CSCs warrant testing in prospective clinical trials for treatment of aggressive prostate cancer.

Keywords: Cancer stem cell; Apoptosis; Drug resistance; Biphosphonate; Zoledronic acid; DETA NONOate



İçindekiler

BÖLÜM I	1
1. GİRİŞ	1
BÖLÜM II	5
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser Kök Hücreleri	5
2.1.1. Kanser Kök Hücrelerin Tanımı	5
2.1.2. Kanser Kök Hücrelerin Tanımlanması	6
2.1.3. Terapötik Bir Hedef Olarak KKH'ler	7
2.1.3.1. Yüzey Marker Bazlı Terapi	8
2.1.3.2. Sinyal Yolağı Hedefleme Terapi	9
2.1.3.2.1. Wnt/B-Katenin Sinyal Yolağı	10
2.1.3.2.2. Notch sinyal yolağı	10
2.1.3.2.3. Hedgehog (Hh) sinyal yolağı	10
2.1.3.3. Protein Detoksifikasyon Bazlı Terapiler	10
2.1.3.3.1. Aldehid dehidrojenaz (ALDH)	10
2.1.3.3.2. İlaç-dışarı atım pompası ABCG2 Hedefleme	11
2.2. Bifosfonatlar	11
2.2.1. Tanım ve tarihçe	11
2.2.2. Biokimyasal düzeyde bifosfonatların etki mekanizması	12
2.2.3. ZA'in potansiyel antikanser etkileri	15
2.2.3.1. Tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi	15
2.3. Nitrik oksit ve DETA NONOate	16
2.3.1. Nitrik oksit	16
2.3.2. NO'in kemoterapi duyarlılaştırılması	17
2.4. KKH'lerinde Apoptoz Sinyal Yolağı	18
2.4.1. Apoptozisin Ekstresek Yolağı	19
2.4.2. Apoptozisin İçsel Yolağı	20
2.4.3. KKH'lerinde Apoptozis Sinyal Yolakları	21

BÖLÜM III	24
GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Materyaller	24



3.1.1. Kullanılan kitler, cihazlar, sarf malzemeleri ve kimyasallar	24
3.1.2. Çözeltilerin hazırlanması	25
3.1.2.1. Zoledronik asid çözeltisinin hazırlanması	25
3.1.2.2. DETA NONOate çözeltisinin hazırlanması	25
3.1.2.3. %70'lik Etanol Çözeltisinin Hazırlanması	25
3.1.2.4. Hücre hattı kültürü için medyumun hazırlanması	25
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Hücre Hatlarının Temini ve Çoğaltılması	27
3.2.2. Akım Sitometri Cihazında Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Toplanması	28
3.2.2.1. DU-145 Hücrelerin ayırımı	28
3.2.2.2. MCF-7 Hücrelerin ayırımı	28
3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	29
3.2.4. Hücre Canlılığı ve IC ₅₀ değerlerin Belirlenmesi	29
3.2.5. Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümü	31
3.2.6. Hücre Döngüsünün Belirlenmesi	33
3.2.7. İmmunfloresan Yöntemi	33
3.2.8. RNA İzolasyonu ve Saflaştırılması	33
3.2.9.cDNA sentezi	35
3.2.10. Gen Ekspresyon Analizi	35
3.2.10.1. Gen Ekspresyon Analizi Aşamaları	40
3.2.10.2. $\Delta\Delta C_T$ Metodu ile Veri Analizi	41
3.2.10.3. Veri Analizinin Yorumlanması	42
3.3. İstatiksel Analiz	42

BÖLÜM IV	43
4. BULGULAR	43
4.1. KKH'lerin ayırımı, oran ve saflığının belirlenmesi	43
4.2. Canlılık/Viabilite Bulguları	44
4.2.1. DU-145 insan prostat kanseri hücre kültüründe DETA NONOate'ın sitotoksik etkilerinin incelenmesi	44
4.2.2. DU-145 insan prostat kanseri hücre kültüründe ZA'ın sitotoksik etkilerinin incelenmesi	48
4.3. IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi	52
4.4. DU-145 insan prostat kanseri hücre kültüründe DETA NONOate ve ZA'ın birlikte uygulanmasının sitotoksik etkilerinin incelenmesi	53
4.5. Apoptozis deneyleri bulguları	54
4.5.1. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültüründe DETA NONOate'ın Apoptotik Etkileri	53
4.5.2. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültüründe Zoledronik asidin Apoptotik Etkileri	56
4.5.3. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültüründe DETA NONOate ve Zoledronik asidin birlikte uygulanmasının Apoptotik Etkileri	59
4.6. Gen ekspresyon deneyleri	61
4.6.1. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültürlerinde Zoledronik asidin Apoptozis ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri	61
4.6.2. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültürlerinde Zoledronik asidin anlamlı etkilediği apoptotik genlerin ekspresyonu üzerinde DETA NONOate ile birlikte muamele sonrası değişimler.....	67

4.7. DETA NONOate ve Zoledronik asidin gen ifadesini anlamlı etkilediği apoptotik proteinlerin İmmunofloresans boyama yöntemi ile doğrulaması	70
BÖLÜM V	82
5. TARTIŞMA	82
BÖLÜM VI	88
6. Sonuç ve Öneriler	88
BÖLÜM VII	91
7. KAYNAKLAR	91
Özgeçmiş	111

Tablolar Dizini

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kitler ve üretici firma bilgileri.....	24
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	24
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri	25
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar	25
Tablo 3.5. Hücre kültürü için hazırlanan medyumun bileşenleri	27
Tablo 3.6. İncelenen apoptozis ile ilişkili genlerin isim ve fonksiyonları	38
Tablo 3.7. PCR karışımının bileşenleri	40
Tablo 3.8. SYBR green mastermixin içeriği	40
Tablo 3.9. PCR için döngü koşulları	40
Tablo 3.10. Kontrol için kullanılan genler	41
Tablo 4.1. IC ₅₀ dozu ve 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri	61
Tablo 4.2. IC ₅₀ doz ve süresi boyunca DU-145 non-KKH'lerine Zoledronik asid uygulanarak RT-PCR analizi sonucunda apoptozis ile ilişkili genlerinin elde edilen ekspresyon değişiklikleri kat cinsinden ilaç uygulanmamış kontrol hücrelere göre gösterilmiştir	65
Tablo 4.3. DETA NONOate, ZA ve DETANONOate ile ZA'in birlikte muamele edildikten sonra DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.....	68

Şekiller Dizini

Şekil 2.1. KKH'lerini hedef alan yeni tedavi yaklaşımları	7
Şekil 2.2. Klinik uygulamalarda kullanılmış olan bifosfonatlar	12
Şekil 2.3. Bisfosfonatların hücresel ve biyokimyasal etki mekanizmaları	13
Şekil 2.4. Mevalonat yolağı ve azot içeren bifosfonatların etkileri	14
Şekil 2.5. Apoptozis sinyal yolağı şeması	19
Şekil 2.6. Apoptozisin intrinsek ve ekstrinsek sinyal yolları	21
Şekil 3.1. Çalışmadaki 2 deney grubu	29
Şekil 3.2. Muse™ Cell Analyzer cihazında hücrelerin canlılık yüzdesi değerlerinin belirlenmesi	31
Şekil 3.3. Muse™ Cell Analyzer cihazında hücrelerin apoptotik değerlerinin belirlenmesi	32
Şekil 3.4. Muse™ Cell Analyzer cihazında hücrelerin hücre döngüsünü değerlerinin belirlenmesi	36
Şekil 3.5. Human Apoptosis genes RT ² Profiler PCR Array Prosedürü	37
Şekil 3.6. RT ² Profiler PCR Array plate düzeni	37
Şekil 4.1. CD133 ⁺ /CD44 ⁺ prostat kanseri kök hücrelerinin FACS-Aria Cell Sorter ile ayrılması	43
Şekil 4.2. Giderek artan dozlarda DETA NONOate'ın 24. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	45
Şekil 4.3. Giderek artan dozlarda DETA NONOate'ın 48. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	45
Şekil 4.4. Giderek artan dozlarda DETA NONOate'ın 72. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	45
Şekil 4.5. Giderek artan dozlarda DETA NONOate'ın 24. saatte DU-145 non- KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	46
Şekil 4.6. Giderek artan dozlarda DETA NONOate'ın 48. saatte DU-145 non- KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	47

Şekil 4.7. Giderek artan dozlarda DETA NONOate'ın 72. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	47
Şekil 4.8. DETA NONOate'ın farklı doz ve sürelerde elde edilen hücre canlılığı değerleri.....	45
Şekil 4.9. Giderek artan dozlarda ZA'in 24. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	49
Şekil 4.10. Giderek artan dozlarda ZA'in 48. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	49
Şekil 4.11. Giderek artan dozlarda ZA'in 72. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri	50
Şekil 4.12. Giderek artan dozlarda ZA'in 24. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri	51
Şekil 4.13. Giderek artan dozlarda ZA'in 48. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri	51
Şekil 4.14. Giderek artan dozlarda ZA'in 72. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri	52
Şekil 4.15. Tüm grupta ZA'in giderek artan doz ve sürelerde elde edilen hücre canlılığı değerleri ve IC ₅₀ değerlerini gösteren grafikler	53
Şekil 4.16. DETA NONOate ve Zoledronik asidin insan prostat DU-145 KKH ve non-KKH'lerin üzerinde viabilite etkisi.....	54
Şekil 4.17. DETA NONOate'ın 500, 1000 µM konsantrasyonları ile 72 saat muamele edilen DU-145 KKH'lerinde bulunan “total apoptosis” değerleri.....	55
Şekil 4.18. DETA NONOate'ın 500, 1000 µM konsantrasyonları ile 72 saat muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde bulunan “total apoptosis” değerleri.....	55
Şekil 4.19. Zoledronik asidin IC ₅₀ dozu ile 72 saat muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde bulunan “total apoptosis” değerleri.....	57
Şekil 4.20. Zoledronik asidin IC ₅₀ dozu ile 72 saat muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde bulunan apoptotik değerler.....	57

Şekil 4.21. Zoledronik asidin IC ₅₀ dozu ile 72 saat muamele edilen muamele edilen DU-145 KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptozis ve erken apoptozis yüzde değerlerini gösteren bir örnek.....	58
Şekil 4.22. Zoledronik asidin IC ₅₀ değerindeki dozuyla 72 saat muamele edilen DU-145 non-KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptozis ve erken apoptozis yüzde değerlerini gösteren bir örnek.....	58
Şekil 4.22. Zoledronik asidin IC ₅₀ değerindeki dozuyla 72 saat muamele edilen DU-145 non-KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptozis ve erken apoptozis yüzde değerlerini gösteren bir örnek.....	56
Şekil 4.23. DETA NONOate ve Zoledronik asid ile birlikte muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde bulunan apoptotik değerler.....	60
Şekil 4.24. DETA NONOate ve Zoledronik asid ile birlikte muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde canlı, ölü, geç apoptozis ve erken apoptozis yüzde değerlerini gösteren bir örnek.....	60
Şekil 4.25. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.....	64
Şekil 4.26. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.....	67
Şekil 4.27. DETAT NONOate'ın 500 µM konsantrasyonu ile muamele edilen, IC ₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate + ZA ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.....	69

Şekil 4.28. DETAT NONOate'ın 500 µM konsantrasyonu ile muamele edilen, IC ₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate + ZA ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.....	70
Şekil 4.29. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bcl-2 proteininde ortaya çıkan değişimler	71
Şekil 4.30. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Bcl-2 proteininde ortaya çıkan değişimler.....	71
Şekil 4.31. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bax protein'inde ortaya çıkan değişimler	71
Şekil 4.32. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Kaspaz-7 protein'inde ortaya çıkan değişimler.....	73
Şekil 4.33. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bad protein'inde ortaya çıkan değişimler	73
Şekil 4.34. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Bad protein'inde ortaya çıkan değişimler.....	74
Şekil 4.35. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Kaspaz-4 protein'inde ortaya çıkan değişimler.....	74
Şekil 4.36. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Kaspaz-9 protein'inde ortaya çıkan değişimler.....	75
Şekil 4.37. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC-2 protein'inde ortaya çıkan değişimler.....	75
Şekil 4.38. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC-2 protein'inde ortaya çıkan değişimler....	76
Şekil 4.39. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC-3 protein'inde ortaya çıkan değişimler.....	76
Şekil 4.40. IC ₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC-3 protein'inde ortaya çıkan değişimler....	77

- Şekil 4.41.** DETA NONOat'ın 500 µM konsantrasyonu ile muamele edilen, IC₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate + ZA ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC2 proteininde ortaya çıkan değişimler.....78
- Şekil 4.42.** DETA NONOat'ın 500 µM konsantrasyonu ile muamele edilen, IC₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate + ZA ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC3 proteininde ortaya çıkan değişimler.....79
- Şekil 4.43.** DETA NONOat'ın 500 µM konsantrasyonu ile muamele edilen, IC₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate + ZA ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC2 proteininde ortaya çıkan değişimler.....80
- Şekil 4.44.** DETA NONOat'ın 500 µM konsantrasyonu ile muamele edilen, IC₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate + ZA ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC3 proteininde ortaya çıkan değişimler.....81

KISALTMALAR LİSTESİ

AKT1	Gene: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALDH	Aldehid dehidrogenaz
ANOVA	Varyans analizi
APAF1	Gene: apoptotic peptidase activating factor 1
AREL	Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı
ATP	Adenozin trifosfat
AVEN	Gene: apoptosis, caspase activation inhibitor
BAD	Gene: BCL2-antagonist of cell death
BAG1	Gene: BCL2-associated athanogene
BAK1	Gene: BCL2-antagonist/killer 1
BAX	Gene: BCL2-associated X protein
BBC3	Gene: BCL2 binding component 3
BCL2	Gene: B-cell CLL/lymphoma 2
BCL2L1	Gene: BCL2-like 1
BCL2L10	Gene: BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
BCL2L11	Gene: BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BCL2L13	Gene: BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)
BCL2L2	Gene: BCL2-like 2
BID	Gene: BH3 interacting domain death agonist
BIK	Gene: BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
BIRC2	Gene: baculoviral IAP repeat-containing 2
BIRC3	Gene: baculoviral IAP repeat-containing 3
BIRC5	Gene: baculoviral IAP repeat-containing 5
BOK	Gene: BCL2-related ovarian killer
BP	Bifosfonat
c-FLIP	HücreSEL FLICE inhibitör protein
CAD	Gene: carbamoyl-phosphate synt. 2, aspartate transcarb., and dihydroorotase
CASP1	Gene: caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP10	Gene: caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP12	Gene: caspase 12 (gene/pseudogene)
CASP14	Gene: caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP2	Gene: caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP3	Gene: caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP4	Gene: caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP5	Gene: caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP6	Gene: caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP7	Gene: caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP8	Gene: caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP8AP2	Gene: CASP8 associated protein 2
CASP9	Gene: caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
CFLAR	Gene: CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
CRADD	Gene: CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
CSC	Canser stem cell (Kanser kök hücresi)
C_T	threshold döngü
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DFFA	Gene: DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
DIABLO	Gene: diablo homolog (Drosophila)
DU-145	Prostat kanseri hücre hattı
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ENDOG	Gene: endonuclease G

FACS	Floresan ile aktifleşmiş hücre ayırışı
FADD	Gene: Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
FAM96A	Gene: family with sequence similarity 96, member A
FAM96B	Gene: family with sequence similarity 96, member B
FAS	Gene: Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
FASLG	Gene: Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
FBS	Fötal Bovin Serum
FC	Kat değişimi
FITCH	Floresin izotiyosianat
FPP	Farnesil pirofosfat
FPPS	Farnesil pirofosfat sentaz
GE	Genomik Eliminasyon
GGPP	Geranilgeranil pirofosfat
GOA	apoptozis yolağında görevli genler
HGDC	İnsan Genomik DNA kontrolü
Hh	Hedgehog
HKG	housekeeping genler
HMGB1	Gene: high-mobility group box 1
HRK	Gene: harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
HSP90B1	Gene: heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
HTRA2	Gene: HtrA serine peptidase 2
IAP	Apoptoz inhibitor proteinler
IC₅₀	hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KKH	Kanser kök hücresi
KML	Kronik miyeloid lösemi
LRDD	Gene: leucine-rich repeats and death domain containing
MCF 10a	Meme epitel hücre hattı
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
MCL1	Gene: myeloid cell leukemia sequence 1
MDA-Bone	Meme kanseri hücre hattı
MDA-231	Meme kanseri hücre hattı
MDA-Met	Meme kanseri hücre hattı
miRNA	Mikro RNA
MOMP	Mitokondrinin dış zarının geçirgenliğinin artışı
mRNA	Mesajcı RNA
N-BP	Azot içeren bifosfonat
ncRNA	Kodlamayan RNA
NF-κB	Nükleer faktör-kapa B
NFKB1	Gene: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFKB2	Gene: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
NGFR	Sinir büyüme faktörü reseptörü
NGFR	Gene: nerve growth factor receptor
non-KKH	non-Kanser kök hücre
PBS	Fosfat bafer salin
PC3	Prostat kanseri hücre hattı
PI	propidium iodide
PMAIP1	Gene: phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1)
PPC	PCR pozitif kontrol
PS	Fosfatidilserine
PTEN	Gene: phosphatase and tensin homolog
REL	Gene: v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
RELA	Gene: v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
RELB	Gene: v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
RLT	hücre lizis tamponu
RPMI	Hücre kültürü besiyeri

RT-PCR	Gerçek zamanlı PCR
RTC	Ters transkripsiyon kontrolü
SD	Standart sapma
Shh	Sonik hedgehog
SOCS2	Gene: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2)
SOCS3	Gene: suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)
STAT1	Gene: signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa (STAT1)
STAT5A	Gene: signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A)
STAT5B	Gene: signal transducer and activator of transcription 5B (STAT5B)
TNF	Gene: tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) (TNF)
TNFRSF10A	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
TNFRSF10B	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
TNFRSF10C	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c
TNFRSF11B	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
TNFRSF1A	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TNFRSF1B	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
TNFRSF21	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 (TNFRSF21)
TNFRSF25	Gene: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25 (TNFRSF25)
TNFSF10	Gene: tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (TNFSF10)
TNFSF11	Gene: tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 (TNFSF11)
TNFSF8	Gene: tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8 (TNFSF8)
TP53	Gene: tumor protein p53 (TP53)
TP53I3	Gene: tumor protein p53 inducible protein 3 (TP53I3)
TRAF1	Gene: TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1)
TRAF2	Gene: TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)
TRAF3	Gene: TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3)
TRAF4	Gene: TNF receptor-associated factor 4 (TRAF4)
TRAF5	Gene: TNF receptor-associated factor 5 (TRAF5)
TRAF6	Gene: TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)
TRAF7	Gene: TNF receptor-associated factor 7 (TRAF7)
TRAIL	TNFe bağımlı apoptoz indükleyen ligand
ZA	Zoledronik asid

BÖLÜM I

1. GİRİŞ

Kanser, dünyada olduğu gibi Türkiye’de de kalp hastalıklarından sonra en önemli mortalite nedenidir ve görülme sıklığı giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü’nün son verilerine göre, tüm dünyada her yıl 12.4 milyon yeni kanser vakası, 25 milyon kanserli hasta ve 7.6 milyon da kansere bağlı ölüm gözlenirken, Türkiye’de de her yıl 100 bin kişinin 229’una yeni kanser teşhisi konulmaktadır. Artışın bu hızla devam etmesi halinde, 2030’lu yıllarda kanserin 2 misli artacağı ve 100 binde 450’lere yaklaşacağı öngörülmektedir. Bu nedenle hem dünyada hem de ülkemizde kanser araştırmaları önemli yer tutmaktadır. Kanser moleküler temellerinin anlaşılmasında, kanser teşhisi ve tedavisinde büyük gelişmeler kaydedilmiş olmasına rağmen bazı kanser türlerinin halen kesin tedavisi bulunmamaktadır. Ameliyat, hormon tedavisi, anti-anjiyogenetik tedavi, immünoterapi, kemoterapi ve radyoterapi halen tüm dünyada uygulanmakta olan başlıca tedavi yaklaşımlarıdır. Ancak bunların sistemik veya lokal toksisite ve ilaç direnci gibi birçok olumsuz etkileri olmaktadır. Halen en yaygın olarak kullanılan antikanser ajanlar arasında paklitaksel, doksorubisin, sisplatin ilk akla gelenlerdir. Bu ajanlar yüksek bir sitotoksisiteye sahip olduğundan tümör kitlesini ortadan kaldırmada etkili olduklarından klinik uygulamada yer bulmaktadırlar, ancak bunlar doğrudan tümör hücrelerini spesifik hedef olarak almadıklarından (non-target ajanlar) ilaç direnci nedeni ile tümörün nüksüne neden olur. Kanserlerin çoğunda, radyoterapi iyi bir noninvaziv tedavi seçeneği ve yüksek sağkalım oranları sunarken, kanser kök hücreleri (KKH) üzerine etkili olmadıkları için tedavinin etkinliği de düşük olabilmektedir. Her ne kadar KKH’leri tümör kitlesinin çok küçük bir oranını oluştursa da tedaviye direncin ortaya çıkmasında başrolü oynarlar. KKH’lerinin tedaviye dirençli olmasının altında yatan neden ya da mekanizmaların başlıcaları bunların dormant/hücre döngüsü kinetiklerinin yavaş olması, yüksek DNA onarım kapasitesine sahip olmaları, çoklu ilaç direnç taşıyıcılara sahip olmaları (örneğin ABC transporterler gibi), anti-apoptotik proteinleri yüksek miktarda eksprese etmeleri ve mikroçevresel özellikleridir. Geleneksel kanser tedavi yaklaşımları bazı hallerde yukarıda sayılan nedenlerle

etkisiz kalabildiğinden tümörün nüks riskini ve tedavinin yan etkilerini minimize edebilmek için KKH'lerini de hedefleyen terapötik yaklaşımlarla kombine edilerek desteklenmelidir. Bu terapötik yaklaşımların tıpta devrimsel gelişmelere yol açacağına inanılmaktadır. KKH'lerini yok etmek kanserin köklerini ve nüks riskini de minimize edeceğinden kanseri tedavi etmeye ve sağkalım oranlarını arttırmaya yönelik umut verici yaklaşımlar olduğu düşünülmektedir. Kanser kök hücrelerini öldürme çalışmalarında, moleküler hedefleme terapisi, sinyal yollarını hedefleme, doğal bileşenler ve bunların güçlü KKH'lerini hedeflemesi, mezenşimal kök hücre kullanımı ve farklılaştırma terapisini (differentiation therapy) içeren birçok yöntem geliştirilmiştir. Son yıllarda büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, kanser kök hücrelerinin tedaviye direnç geliştirme mekanizması halen tam olarak açıklanamamış ve bu nedenle bunlara etkili bir tedavi seçeneği de geliştirilememiştir.

Osteoporoz tedavisinde yaygın olarak kullanılan bifosfonatlar kemik metastazlı hastalarda kemik kaybını azaltarak yaşam kalitesini arttırmırlar. Bifosfonatlar yapı ve etki mekanizmalarına göre iki ayrı kuşak oluştururlar. Birinci kuşak bifosfonatlar, klodronat ve etidronat gibi pirofosfata benzeyen bifosfonatlar olup metabolik olarak hidroliz edilemeyen sitotoksik adenozintrifosfat (ATP) analogları oluştururlar. Daha yeni ve güçlü olan ikinci kuşak ise alendronat, pamidronat, risedronat, ibandronat ve zoledronik asid (ZA) gibi nitrojen içeren bifosfonatlardır (N-BPs). ZA mevalonat yolağında anahtar bir enzimi, farnesil pirofosfat sentazı (FPP), inhibe eder. Sonuçta, ZA kemik rezorpsiyonu ve osteoklastların yaşamını etkileyen temel hücresel fonksiyonları bozar. Bu bağlamda ZA, farnesil pirofosfat sentaz enzimini inhibe etmekte diğer bisfosfonatlardan daha etkilidir. Bu yolakda, guanozin Ras, Rho ve Rac gibi trifosfata bağlanan proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonu için farnesil pirofosfat ve geranilgeranil pirofosfattan oluşan bir kaç ara ürün gereklidir. Bu sinyal moleküller hücre proliferasyonu, hücre sağkalımı ve hücre iskeletinin organizasyonunda düzenleyici rol oynarlar.

Osteoklastogenez üzerindeki etkilerine ek olarak, ZA'in solid ve hematolojik malignitelerde dikkat çekici antikanser aktiviteye sahip olduğunu

gösteren çok sayıda preklinik kanıt bildirilmiştir. ZA'in proliferasyon hızının düşürülmesi ve apoptozisi indüklemek gibi doğrudan anti-kanser etkilerinin yanı sıra, antikanser immün yanıtı aktive etmek gibi dolaylı etkileri de vardır. Bisfosfonatların doğrudan antitümör aktivitesi için sorumlu birincil mekanizmalardan biri, tümör hücresi apoptozunun indüksiyonudur.

Çok sayıda çalışmanın bulguları ZA'in kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini göstermektedir. Ancak yaptığımız literatür incelemelerinde, bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda kanser kök hücreleri (KKH'leri) ve diğer kanser hücrelerinin (non-KKH'leri) ayrı gruplar halinde ele alınarak aynı hücre hattı içinde incelemelerin KKH'leri ve non-KKH'leri için ayrı ayrı yapılmadığını ve ZA'in KKH'leri üzerine olası apoptotik etkilerinin incelenmediğini fark ettik.

Son yıllarda yeni çıkan ajanlar içinde, NO indükleyen veya DETA NONOate gibi NO verici ajanlar bulunmaktadır. NO çok sayıda biyolojik etkisi olan ve bol miktarda bulunan bir moleküldür. NO'in tümör hücrelerinde çeşitli kemoterapik ilaçlara karşı kemo-duyarlılık indüklenmesinde çok önemli bir faktör olarak bilinmektedir. Bu şekilde, NO gibi kemo-duyarlılık kazandırıcı ajanlar, kemoterapötik ilaçların anti- tümörijenik etkisini yükseltebilir. Buna rağmen, bu tümör karşıtı etkilerin mekanizmasını tamamen açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu projenin amacı, KKH modeli olarak prostat KKH kullanılarak, zoledronik asid ve DETANONOate'ın birlikte uygulanması *invitro* ortamda KKH'leri üzerine olası apoptotik etkilerinin ve apoptoz ile ilişkili genlerdeki ekspresyon değişimlerinin incelenmesidir. Proje kapsamında zoledronik asid ve DETA NONOate'ın; prostat karsinoma hücre hatlarında, prostat karsinoma kök hücreleri ve kök hücre dışı tümör hücrelerinde apoptoza ve sağkalıma etkileri değerlendirilmiştir. Kanser hücrelerini apoptoza sevk eden mekanizmaların anlaşılması, gelecekte bugünden daha etkili kanser tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde hayati önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın temel amacı, ZA ve DETA NONOate'ın kanser kök hücreleri üzerine olan apoptotik etkileri ve apoptoz ile ilişkili genlerdeki ekspresyon

değişikliklerinin *invitro* ortamda incelenmesidir. Bu tez çalışması sürecinde aşağıdaki soruların cevaplarının araştırılması hedeflenmiştir;

1. Prostat KKH'lerinde ZA'in kanser hücrelerinin %50'sini öldüren konsantrasyonunun (IC_{50} değeri) belirlenmesi,
2. Prostat KKH'lerinde ZA'in indüklediği apoptozun kantitatif olarak belirlenmesi,
3. Prostat KKH'lerinde DETA NONOate'n indüklediği apoptozun kantitatif olarak belirlenmesi,
4. Prostat KKH'lerinde DETA NONOate ve ZA'in birlikte uygulandığı indüklediği apoptozun kantitatif olarak belirlenmesi,
5. KKH'lerinde ZA'in ekspresyonunu etkilediği apoptozla ilişkili genlerin belirlenmesi,
6. KKH'lerinde DETA NONOate ve ZA'in birlikte uygulanınca ekspresyonunu etkilediği apoptozla ilişkili genlerin belirlenmesi,
7. KKH'leri ve diğer tümör hücrelerinde oluşan apoptotik gen ekspresyon değişikliklerinin karşılaştırılması ve olası direnç mekanizmalarının tartışılması
8. KKH'lerinde ZA'in ekspresyonunu etkilediği apoptozla ilişkili genlerin protein seviyesinin incelenmesi amaçlanmıştır.
9. KKH'lerinde DETA NONOate'ın ekspresyonunu etkilediği apoptozla ilişkili genlerin protein seviyesinin incelenmesi amaçlanmıştır.
10. KKH'lerinde DETA NONOate ve ZA'in birlikte uygulanınca ekspresyonunu etkilediği apoptozla ilişkili genlerin protein seviyesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

BOLÜM II

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Kök Hücreleri

2.1.1. Kanser Kök Hücrelerin Tanımı

Tümör dokuları, normal dokularda olduğu gibi, anahtar sinyal yolları ve işlevlerini düzenleyen yüzey markerlarında farklı derecelerde genetik mutasyona sahip heterojen hücre popülasyonlarından oluşurlar. Kanser hücreleri arasındaki bu işlevsel heterojenlik, iki farklı kanser oluşumu modeli ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bunlar hiyerarşi modeli ve stokastik modeldir (1,2).

Hiyerarşi modelinde kendini yenileme, nüks, uzak metastaz ve ilaç/ışın direnci gibi kanser modaliteleri, öncelikle kanser kök hücreleri (KKH) ile ilişkilidir. Bu hücreler tümörün içinde çok az sayıda bulunan bir popülasyonu oluştururlar. Belirli bir kanser içinde heterojenlik, KKH'lerinin asimetric hücre bölünmesi ile oluşur. Bu şekilde tümör içinde bir KKH havuzu ve tümör oluşturma potansiyeli düşük olan non-KKH'leri sınıfı oluşur. KKH'lerinin kanserin kendini yenileme ve metastaz yapabilme özelliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Tümör kitlesini oluşturan diğer tüm hücreler ise, farklılaşmış kardeş hücrelerden türetilmiştir (3).

Tümör içinde bulunan heterojenlik için diğer bir alternatif açıklama stokastik modelden gelmektedir (4). Bu modele göre tümör hücrelerinin hepsi kendini yenileme özelliğine sahiptir ve tümörün devamlılığına değişen ölçülerde katkıda bulunurlar. Buna göre, tümör içerisinde bulunan heterojenlik öncelikle tümörleşme esnasında genetik ve epigenetik heterojenlikten meydana gelen alt klonlardaki değişikliklerden kaynaklanır. Özet olarak, hiyerarşi modeli, altklonlar arasında genetik değişiklikleri göz önüne almadan hücre büyümesi ve tümör oluşumu açısından fenotipik ve fonksiyonel heterojenliğe odaklıdır. Ancak stokastik model, tümör kitlesinin içinde alt klonlar arasındaki fonksiyonel varyasyonları göz ardı ederek tümörün içinde bulunan genetik heterojenliği vurgulamaktadır (5).

En etkili kanser tedavisi, kendini yenileme, metastaz ve ilaç/radyasyon direnci yeteneği olan kanser hücresi alt popülasyonunu hedefleyen tedavidir.

2.1.2. Kanser Kök Hücrelerin Tanımlanması

Tümör kitlesinde bulunan kanser hücrelerinin çoğunluğu sınırlı bölünme ve tümör oluşturma yeteneğine sahip iken, kanser hücrelerinin sadece belli bir alt popülasyonu kendini yenileme ve yeni bir tümör oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu benzersiz hücre popülasyonuna kanser kök hücreleri (KKH) veya kanser oluşturan hücreler (KOH) ismi verilmiştir. Tümör oluşturan ve geliştiren KKH modeli, tümör alt popülasyonları ile ilişkili fenotipik ve işlevsel değişiklikler için bir açıklama getirmektedir (1).

1963 yılında, Bruce ve arkadaşları, transplante kemirgen lenfoma hücrelerinin sadece %1 – 4'ünün vitro ortamda koloni oluşturabildiğini ya da fare dalağında kanseri başlatabileceğini gösterdiler (6). KKH'lerinin tanımlandığı ilk solid tümör meme kanseridir. Burada KKH'leri CD44⁺/CD24⁻ ve epitel hücre yüzeyi antijenlerine karşı pozitif olmak üzere sınıflandırılmışlardır.(7,8). Bu hücreler farelere nakledildiklerinde yalnızca 100 kadar hücrenin çoğalabildiği ve yeni tümör oluşturabildikleri gözlenmiştir. Son on yılda beyin (9), akciğer (10,11), karaciğer (12), kolon (13), baş boyun (14), ve diğer (15) solid tümörlerde de KKH'leri tanımlanabilmektedir.

KKH'leri in vitro ortamda aşağıdaki özelliklere göre tanımlanırlar:

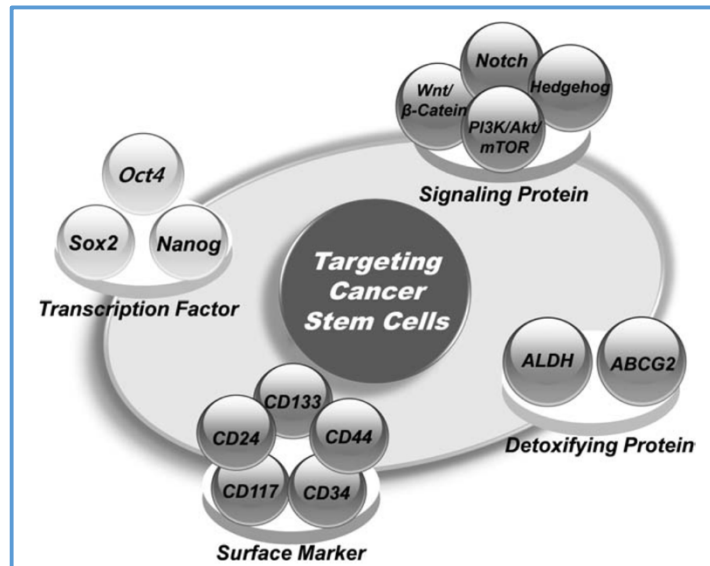
- a) yüzey markerleri düzey ve paternlerine göre (16–19);
- b) süspansiyon kültürlerinde sferik koloni oluşturma yeteneğine göre (20);
- c) konvansiyonel kemoterapötikler veya iyonizan radyasyonlar ile muamele edildiğinde yüksek oranda sağkalım gösterebilme özelliğine göre (21–23).

Malign tümörler içinde az miktarda bulunan bu hücre alt gruplarının tedavi sonrasında tümör başlatma ve büyütme hızı daha yüksektir (18,24–27). Bu durum, kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser tedavi seçeneklerinin tümör hücrelerinin önemli bir kısmına etkili olmakla birlikte, yeni tümör oluşturabilen ve dirençli KKH'lerine karşı etkili olamamaları nedeni ile kanser hastalarını tamamen iyileştirmede başarısız olduğunu düşündürmektedir.

2.1.3. Terapötik Bir Hedef Olarak KKH'ler

Hem eski hem de güncel kanser tedavi yaklaşımlarındaki kısıtlılıklar nedeni ile sıklıkla tedavide başarısızlık ve yüksek risk oranları ile karşılaşilmektedir. Tedavideki başarısızlığın yaygın bir nedeni radyoterapi veya standart kemoterapiye dirençtir. KKH'den zengin popülasyonlar standart tedavilere daha dirençlidir (28). KKH aracılı kemoterapiye direnç lösemi (29), meme (23), melanoma (30), pankreas (31), beyin (32), ve kolorektal (33) kanserlerde belgelenmiştir. Ayrıca, KKH aracılı radyoterapiye direnç beyin (9) ve meme kanserinde (34) gösterilmiştir. Bu nedenle, KKH'lerini yok etmek için özellikle hastaların sağlıklı hücrelerine zarar vermeden yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine acil olarak ihtiyaç duyulmaktadır (35–37).

Yüzey marker farklılıklarını ve çoklu sinyal yollarındaki değişimleri hedefleyerek etkin bir tedavi elde edilebilir. Araştırmacılar son zamanlarda, transkripsiyon faktörleri, hücre yüzeyi markerleri ve köklük özelliğine ilişkin sinyal yolları da dahil olmak üzere çok sayıda potansiyel KKH terapötik hedefleri, belirlemişlerdir. Bunların amacı, KKH'lerini ve tümörün nüksünü tamamen ortadan kaldırmak için yeni terapötik hedefleri belirlemektir. Maligniteleri tamamen ortadan kaldırmaya yönelik KKH'lerini hedef alan yeni tedavi yaklaşımları şekil 2.1'de özetlenmiştir (2).



şekil 2.1. KKH'lerini hedef alan yeni tedavi yaklaşımları (2)

2.1.3.1. Yüzey Marker Bazlı Terapi

Tümör kütlelerinden ve normal sağlıklı hücrelerden KKH'lerini spesifik olarak ayırabilmek için spesifik hücre yüzey belirteçlerini hedeflemek gerekir ki bu KKH'lerini hedef alan tedavinin de temelini oluşturmaktadır (38). Halen, floresans-activated cell sorting (FACS), flow sitometri, PCR, ve immünfloresan analiz, KKH'lerinin izolasyonu, saflaştırılması ve tanımlanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. KKH belirlenmesi ve yüzey belirteçlerin tanımlanmasında önemli ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen, pek çok sorun hala devam etmektedir. Bu nedenle, bu belirteçlerin özgün olmaması ve muhtemelen bazı non-KKH'lerde ve normal hücrelerde de ifade olabilmesi mümkündür. Bu nedenle, KKH markerlerinin, sinyal yolları ve/veya transkripsiyon faktörleri gibi diğer hedefler ile kombine kullanılması gerekebilir (38).

CD133; Prominin-1 olarak da bilinen CD133 membranı kateden beş bölge ve iki büyük N-glikozile hücre dışı ilmeğe sahip 120 KDa'luk bir glikozile proteindir. Yetişkinlerde, CD133 öncelikle immatür hematopoetik kök hücreler ve endotelial progenitör hücrelerin yüzeyinde mevcut olup işlevi ve fizyolojik düzenlenmesi hakkında bilgi azdır (39). CD133'ün kolon ve hepatosellüler karsinoma gibi pek çok insan kanserinde eksprese olur (40,41). Son araştırmalar, CD133 pozitif hücrelerin yüksek sağkalım ve paklitaksel, doksorobisin, sisplatin ve etopozid gibi çeşitli ilaçlara karşı direnç özelliği bulunduğunu göstermektedir (42).

CD44; hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerinde rolü olan, çok farklı yapı ve işlevlere sahip bir molekül olup hyaluronik asit için temel reseptördür (43). CD44 ekspresyonu malign hastalıkları olan hastalarda tümör yükü ve metastaza işaret eden faydalı bir göstergedir. CD44; meme (8), over (44), serviks (45), mesane (46), mide (47), kolon (48), pankreas (49), prostat (50), ve akciğer (51) gibi solid kanserlerin KKH'lerinde tespit edilmiştir. CD44'ün birçok kanserde ve KKH'sinde artmış ekspresyonu, CD44'ün hemen hemen tüm kanser tiplerinin gelişmesinde önemli düzenleyici bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Genel olarak, CD44 bir KKH yüzey belirteci olarak çeşitli kanser tiplerinin karakterizasyonunda, tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır.

CD24; CD24 ilk olarak hematolojik malignitelerde tespit edilmiş olan ve çeşitli solid tümörlerde eksprese olan küçük bir hücre yüzey glikoproteinidir. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin düzenlenmesinde rol oynayan ağır derecede glikozile bir proteindir (52,53). Adezyon ile ilişkili olup kanser hücrelerinin metastaz potansiyeline katkıda bulunur (52). Bu durumda CD24 çeşitli kanser türlerinde önemli bir prognostik belirteç olarak kabul edilebilir. Hücre adezyonu ve metastazı düzenleyici rolleri ile birlikte, CD24 bir prognostik faktör olarak ve yeni KKH belirteci olarak önemli biyolojik rollere sahip gibi görünmektedir (52).

Ayrıca, tümör dokularında KKH'lerini tanımlamak ya da ayırmak için kullanılmış olan hücre yüzeyi belirteçleri sadece KKH'lerinde ifade edilmez, normal kök hücreler ve hatta bazı somatik hücreler de aynı belirteçleri ifade edebilmektedir. Bu nedenle, sadece hücre yüzey belirteç ifadesine bakarak KKH tanımlanması ve izole edilmesi yeterli değildir. Spesifik hücre yüzey belirteçlerinin tespitine ek olarak KKH'lerine özgü gen ifadesi analizleri, ALDH enzim aktivitesinin belirlenmesi, serumsuz ortamda veya yumuşak agarda sferoid oluşumu deneyleri gibi diğer fonksiyon bazlı hedefleme yaklaşımları da kullanılmalıdır.

2.1.3.2. Sinyal Yolağı Hedefleme Terapi

KKH'lerinin belirlenmesi ve ortamdan alınması için diğer bir yol ise KKH'lerinin işlevi için esas olan ve onlara özgü sinyal yollarının hedeflenmesidir. KKH'lerinin kendini yenilemesi ve farklılaşması tümör hücrelerinin mikroçevresi ve sitokinler gibi çeşitli düzenleyici sinyal yolları tarafından düzenlenmektedir. Wnt/ β -catenin, Notch ve Hedgehog gibi çeşitli sinyal yolları kanserin gelişmesi ve ilerlemesini kontrol etmektedir (54). Bu sinyal yolları hücre proliferasyonu, polaritesi ve büyümesi gibi çok önemli süreçlerin düzenlenmesinde ve kontrolünde büyük önem taşımaktadır.

2.1.3.2.1. Wnt/B-Katenin Sinyal Yolağı

Wnt proteinleri, hedef hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanan, normal gelişim ve hastalıklardaki çeşitli olayları düzenleyen salgısal sinyal molekülleridir. Wnt/B-Katenin sinyal yolağının, KKH'lerinin fonksiyonlarında düzenleyici rolü olduğu düşünülmekte, akut miyeloid lösemi, kolon ve karaciğer kanseri, melanoma, meme ve akciğer kanserlerinde KKH'lerinin fonksiyonunda rol oynamaktadır (55,56).

2.1.3.2.2. Notch sinyal yolağı

Ntoch yolağı, hücrenin kaderinin belirlenmesi, morfogenez gibi geniş bir yelpazede gelişimi yöneten evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yolağıdır (57). Bu yolağın pro-onkojen işlevi iyi bilinirken KKH'lerindeki rolü henüz yeni yeni belirlenmektedir.

2.1.3.2.3. Hedgehog (Hh) sinyal yolağı

Hedgehog (Hh) sinyal yolağı, ilk olarak Drosophila'nın erken gelişimindeki aşamalarda büyüme ile ilişkili olaylarda kritik bir düzenleyici olarak tanımlanmıştır. Bu yolak, embriyonik hücrelerde proliferasyon, migrasyon (yapışma/kopma) ve farklılaşmayı düzenler (58–61). Memelilerde bulunan Sonik (Shh), Desert (Dhh) ve Indian Hedgehog (Ihh) olarak bilinen üç salgısal ligandan birinin reseptöre bağlanmasıyla sinyal başlar. Kronik myeloid lösemi (KML), pankreatik adenokarsinoma, meme kanseri, gliyoblastoma ve multipl miyeloma gibi pek çok insan kanser tipleri üzerindeki araştırmalardan ortaya çıkan verilere göre, Hh sinyal yolağı KKH'lerinin kendi kendini yenileme ve tümörjenisitesini düzenlemektedir.

2.1.3.3. Protein Detoksifikasyon Bazlı Terapiler

2.1.3.3.1. Aldehid dehidrojenaz (ALDH)

NAD(P)⁺-bağımlı, evrensel olarak korunmuş bir enzim ailesinden olan ALDH, 'aldehid çöpçüsü' olarak hücrenin sitoplazma, çekirdek ve mitokondrisinde yer alan aldehidleri karboksilik asite okside etmektedir (62,63). ALDH aktivitesi ilk

defa lösemi KKH'lerinin izolasyonunda kullanılmıştır (64). Ayrıca, meme kanserlerinin tümörijenik ve kendini yenileme potansiyeli taşıyan alt popülasyonlarında, ALDH-pozitifliğinin kötü klinik sonuç belirleyicisi olduğu gösterilmiştir (65). Son yıllarda, ALDH aktivitesi melanoma dışında (66), beyin (67), karaciğer (68), baş ve boyun (69), kolon (70), akciğer (10), ve prostat (71) gibi pek çok kanser tipinde evrensel bir KKH markeri olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

2.1.3.3.2. İlaç-dışarı atım pompası ABCG2 Hedeflemesi

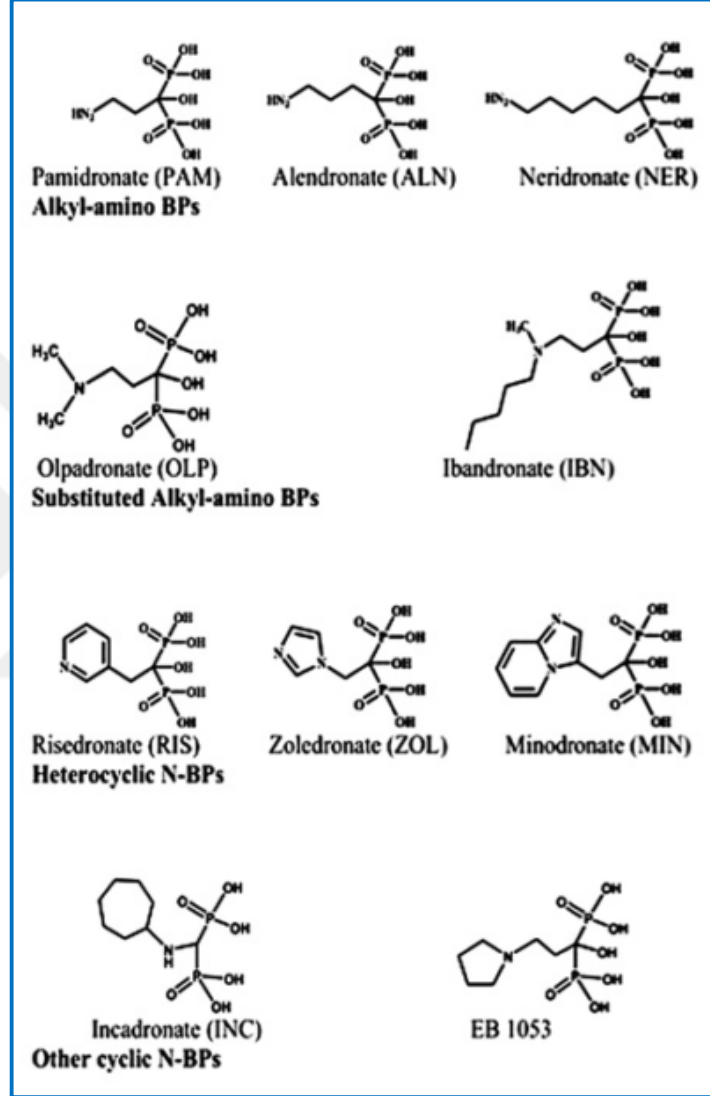
ABCG2; kanser hücrelerine çoklu ilaç direnci kazandıran ATP bağlayıcı çoklu ilaç transporter kaset (ABC) ailesinin bir üyesidir (72). ABCG2'nin geniş substrat afinitesi ve taşıma kapasitesi olduğundan, kanser nüksü ve tümörün çoklu ilaç direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (73). Son yıllarda, prostat (74), beyin (75), limbik epitel (76), pankreas (77), ve akciğer (78) dokularına özgü kök hücre çeşitlerinde ABCG2'nin ekspresyonu gösterilmiştir. ABCG2 ekspresyonunun small interfering RNA (siRNA) ile inhibisyonu ise meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını anlamlı derecede azaltmıştır (79).

2.2. Bifosfonatlar

2.2.1. Tanım ve tarihçe

Halen klinik tıpta ilaç olarak kullanılmakta olan tüm bifosfonatlarda (BP'lar) iki adet P/C bağı bulunur. Bunlar, doğada geniş bir şekilde bulunan pirofosfat bileşiklerinin kimyasal olarak stabil analoglarıdır. Doğada bulunan en basit pirofosfat inorganik pirofosfatdır. Bu bileşiğin endojen bir 'su yumuşatıcısı' olarak vücut içerisinde dolaşmakta olduğunun keşfi ile bisfosfonatlar üzerinde çalışmalar başlatılmıştır. Bifosfonatlar kimyasal olarak 1800'lerde sentezlenmesine rağmen (80), kalsiyum metabolizması bozukluklarının tedavisinde kullanılmaya başlanması son 40 yıl içerisinde olmuştur. İnsanlarda kullanılmış ilk bisfosfonat olan etidronat, ilk olarak 100 yıl önce sentezlenmiştir (81). İlk yayınlar 1968 yılında abstrakt şeklinde ortaya çıkmış ve ardından 1969 yılında Science dergisinde iki makale yayınlanmıştır. Bu yayınlarda iki bifosfonat olan etidronat ve klodronatin

damarların kalsifikasyonu ve kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkileri üzerinde durulmuştur (80,82,83).

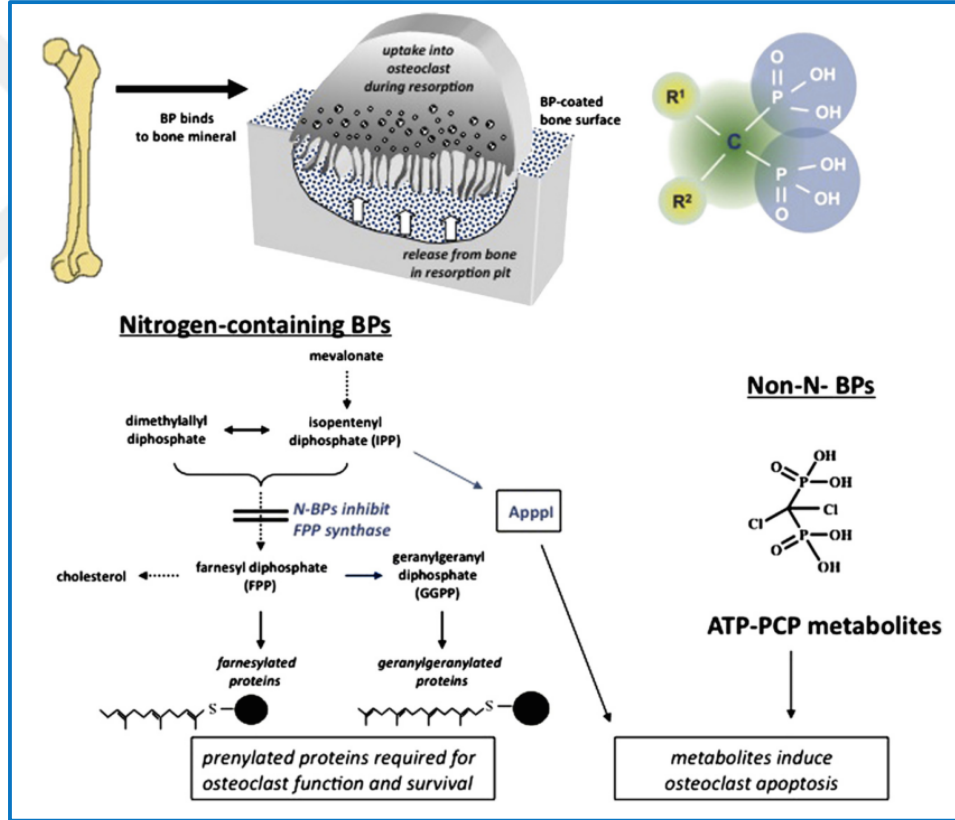


Şekil 2.2. Klinik uygulamalarda kullanılmış olan bifosfonatlar (80)

2.2.2. Biyokimyasal düzeyde bisfosfonatların etki mekanizması

Güncel görüş, bifosfonatların osteoklastlar üzerine etkilerini iki farklı moleküler mekanizma ile oluşturdukları ve bu farklı etki mekanizmaları temel alınarak bifosfonatların en az iki ana gruba ayrılabilceği şeklindedir (84). İlk grup, pirofosfata benzeyen, klodronat ve etidronat gibi nitrojensiz bisfosfonatlardan oluşmaktadır. Klodronat ve etidronat hidroliz olamayan ATP analoglarına

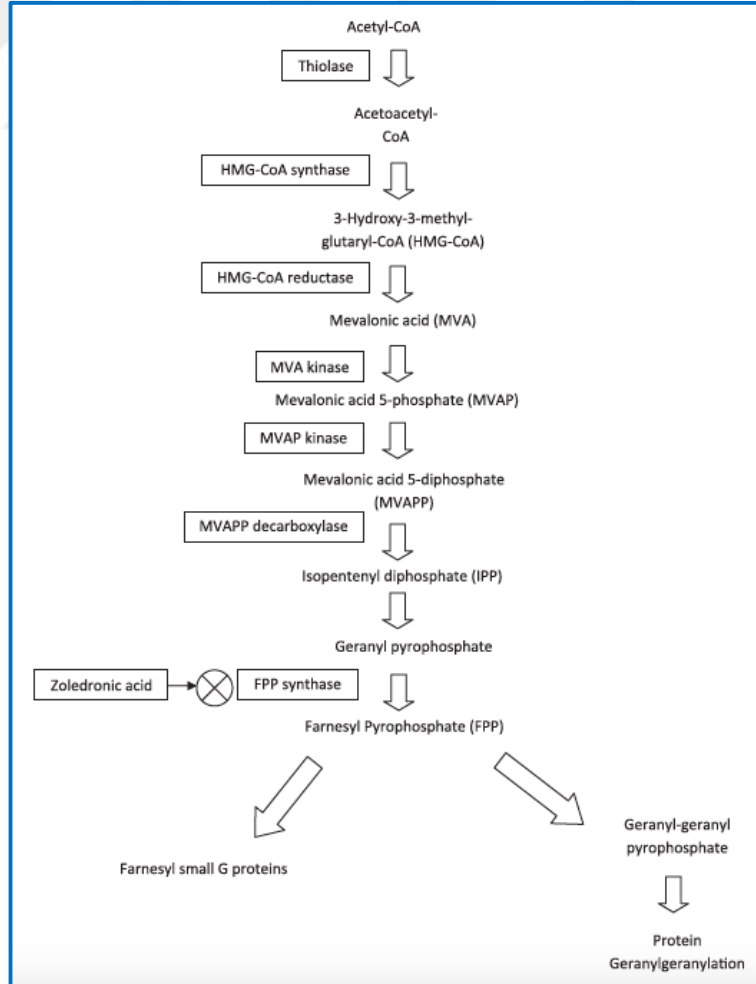
bağlanarak aminoasit-tRNA sentetazların etkilerini değiştirir ve PPI analogları gibi davranırlar. Ortaya çıkan metabolitlerde, ATP'nin β,γ -fosfat gruplarının yerini P\C\P yapıları alır, bu durumda hidroliz edilemeyen nükleotidler ortaya çıkmaktadır (85–87). Bu metabolitlerin osteoklastların içinde birikmesi ile osteoklast işlevleri inhibe olurken, muhtemelen mitokondri ATP translokazlarla interferans osteoklastik hücre ölümüne yol açmaktadır (80,88,89). Bu nedenle, bu azotsuz bifosfonatlar bir ön ilaç gibi davranmakta, *in vivo* etkilerini osteoklastlar ile hücre içine alındıktan sonra aktif ilaç metabolitlerine dönüşerek göstermektedirler.



Şekil 2.3. Bisfosfonatların hücresel ve biyokimyasal etki mekanizmaları (80).

Bunun tersine, bifosfonatların ikinci grubu yukarıda bahsedildiği gibi AppCp-tip metabolitlere metabolize olmayıp ve azot içeren bileşenlerden (N-BPs) oluşmaktadır. Bu N-BP grubun üyeleri spesifik metabolik tepkimelere özellikle kolesterol ve diğer sterollerin sentezlendiği mevalonat biyosentez yolağında

müdahale etmektedir. Bu yolaktaki enzimler pirofosfat içeren izoprenoid lipidleri, metabolize etmektedir. Bisfosfonatlar bu yolaktaki enzimleri çeşitli derecelerde inhibe edebilirler fakat anti-resorptif N-BP'lar için en büyük hedef farnesil pirofosfat sentazdır (FPPS) (90). Mevalonat yolağında üretilen izoprenoid lipidler arasında izopentenildifosfat (İPP), farnesildifosfat (FPP) ve geranilgeranildifosfat (GGPP) yer alır. FPP ve GGPP, Ras, Rab, Rho ve Rac gibi küçük GTPaz'ların C-terminalinde bulunan sistein kalıntısının prenilasyonu için gereklidir (91,92). Küçük GTPaz'lar osteoklastların hücre morfolojisi, hücre iskeletinin düzenlenmesi, membran dallanması, vezikül trafiği ve apoptoz gibi önemli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli rolü olan sinyal proteinlerdir (93–95). Bu proteinlerin işlevlerini gerçekleştirebilmeleri için prenilasyon gereklidir, çünkü prenil grubu, proteini hücre membranına tutturmak ve protein-protein etkileşimi için gereklidir (şekil 2.4).



Şekil 2.4. Mevalonat yolağı ve azot içeren bifosfonatların etkileri (96)

2.2.3. ZA'in potansiyel antikanser etkileri

Preklinik bulgular, bisfosfonatların tümör hücrelerini inhibe etme yeteneğini açıklayabilecek olası mekanizmalar sunmaktadır (96).

Preklinik verilere göre, ZA'in (ve diğer bisfosfonatların) olası anti-kanser etki mekanizmaları (şekil. 2.4) (96):

1. Tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi
2. Sitotoksik ajanların inhibitör etkilerinin artırılması
3. Anjiogenezin inhibisyonu
4. Tümör hücrelerinin kemiğe adezyonunun azatılması
5. Tümör hücrelerinin invazyon ve migrasyonunun azatılması ve hücre iskeletinin organizasyonunun bozulması
6. $\gamma\delta$ T hücrelerinin aktivasyonu
7. tümör makrofaj infiltrasyonu üzerine etkiler

2.2.3.1. Tümör hücresi proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi

ZA'in doğrudan antitümör etkisini destekleyen önemli preklinik kanıtlar vardır. ZA'in in vitro ortamda insan fibrosarkoma hücrelerinin proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği, hücre döngüsünü S ve G2/M fazları arasında durdurup ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir (97). Aynı araştırmacılar, bir fare modelinde ZA'in osteosarkoma hücrelerinin büyümesinin engellediğini bildirmişlerdir (98). Başka bir çalışmada, Zwolak ve arkadaşları, ZA'in kemik sementinden salınabildiğini göstermişlerdir. Proliferasyon deneylerinde, ZA'in stromal dev hücreli tümör kültürlerinde, multipl myeloma ve renal hücreli karsinomada doza bağımlı sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir (99). Diğer bir çalışmada, ZA'in dört farklı oral karsinoma hücre hattı üzerinde 10 – 100 mM konsantrasyonlar arasında direkt anti-tümör etkisi gösterilmiştir. ZA apoptotik yolakta kaspaz-3, -8 ve -9'u aktifleştirip apoptozda olan hücre sayısını artırmıştır.

Western blotlama analizlerinde ZA'in anti-hman poliADP-riboz polimeraz ifadesini arttırdığı, Bcl2 ve Bid ifadesini azalttığı gösterilmiştir (100). Renal kanser hücre hatlarında (ACHN, A-498 ve CAKI-2), 6.25 – 100 mM konsantrasyonlarında ZA uygulanmasından sonra her üç hücre hattında canlı hücrelerde ZA uygulanmamış kontrollere göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Aynı zamanda apoptoz kaspazına bağımlı M30 antijeninde de artış gösterilmiştir. Bu etki Z-VAD pan-kaspaz inhibitörü ile bloke edilebilmektedir (101). ZA'in benzer apoptotic etkisi (5-40 konsantrasyonunda) deksametazon dirençli multiple miyeloma (MM) hücrelerinde de görülmüştür (102). ZA'in anti-tümör etkisinin prelinik kanıtları, akciğer, meme ve prostat gibi diğer solid tümör modelleri için de belgelenmiştir (103,104). En azından prelinik araştırmalarda, ZA'in anti-proliferatif etkisinin en önemli mekanizması apoptozun indüklenmesidir. Bu mekanizmanın klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekir.

Her ne kadar, 15 dakikalık 4 mg ZA intravenöz infüzyonu ile 0.97 mM maksimum konsantrasyon elde edilebilse de (ürün bilgisi: RECLAST(R) IV injeksiyon, Novartis Pharma Stein AG, Stein, Switzerland, 2008), bazı kemik metastazlı meme kanseri fare modellerinde alternatif bir ZA dozaj rejiminin (bölünmüş dozlarda günlük ve haftalık uygulama) tümörü küçültebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle, ZA'in bölünmüş dozlar halinde günlük ya da haftalık uygulamaları klinik çalışmalarda daha uygun olabilir.

2.3. Nitrik oksit (NO) ve DETA NONOate

2.3.1. Nitrik oksit (NO)

Son yıllarda yeni çıkan ajanlar içinde, NO indükleyen veya DETA NONOate gibi NO verici ajanlar bulunmaktadır. NO çok sayıda biyolojik etkisi olan ve bol miktarda bulunan bir moleküldür. Klinikte kalp damar hastalıklarında kullanılmaktadır. Ayrıca, kanser önleyici bir ajan olarak ve daha yakın zamanda ise tümör hücrelerin ilaca dayanıklılığının kırılmasında yeni bir terapötik olarak tanınmıştır. NO, protein translasyon sonrası modifikasyon yolu ile vazodilasyon, nörotransmisyon, inflamasyon ve hücre ölümü gibi temel fizyolojik süreçlerin düzenlenmesi ile ilgilidir. NO bu süreçlerin çoğunu sitozolda bulunan çözünür

guanilil siklaz (sGC) reseptörlerine bağlanarak etkilemektedir. Bu eylem, sGC aktivitesini tetikleyen konformasyonel değişimlere yol açar ve farklı yolların akış aşağısında yer alan, protein kinazlar, fosfodiesterazlar ve iyon kanalları gibi düz kas gevşemesi, platelet çözülmesi ve sinaptik plastisite gibi hücresel işlevleri modüle eden farklı hedef molekülleri aktive edici özellikte olan siklik GMP'nin GTP'den oluşumunu sağlar.

2.3.2. NO'in kemoterapi duyarlılaştırması

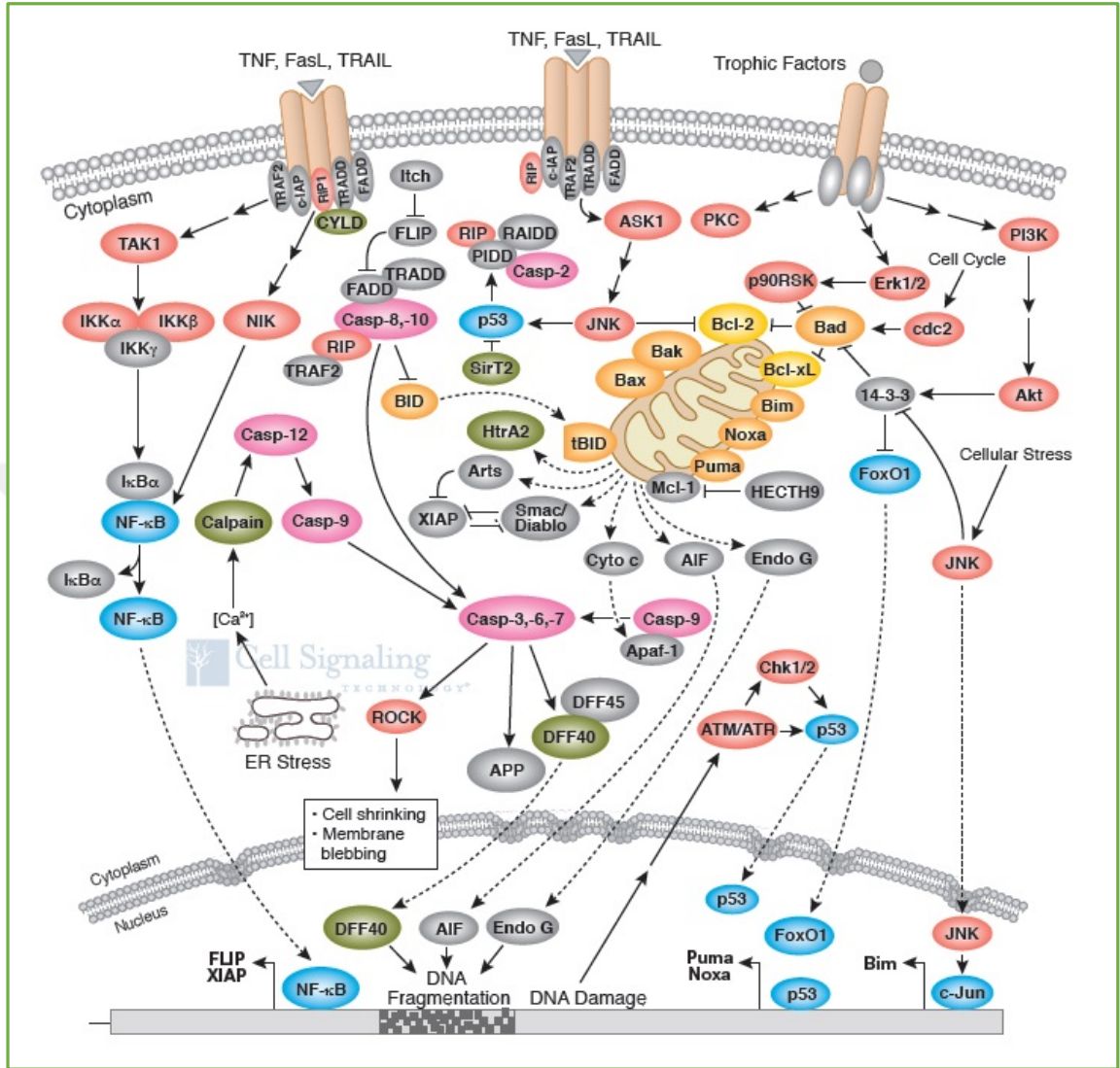
NO'in tümör hücrelerinde çeşitli kemoterapik ilaçlara karşı kemo-duyarlılık indüklenmesinde çok önemli bir faktör olarak bilinmektedir. Hipoksinin, kanser hücrelerinde ilaç direncinin indüklenmesi ile ilgili olduğu bilinmektedir. İnsan meme karsinoma (MDA-MB-231) ve fare melanoma (B16F10) hücre hatlarının kullanıldığı bir çalışmada, hücreler önce oksijene maruz bırakılmış, NO inhibitörü ile muamele edilmiş, ardından kemoterapötik ilaçlar verilmiş ve ilaç direnci açısından incelenmiştir. NO'in inhibisyonu, hipoksi ile indüklenmiş kemo-duyarlılığının yükselmesini sağlamıştır. Bu sonuçlara göre, hipoksi aracılığı ile sağlanan ilaç direnci, muhtemelen, endojen NO üretiminin baskılanmasından kaynaklanmaktadır ve NO, tümör hücrelerinde bir kemo-duyarlılık yaratıcı ajan olarak işlev yapmaktadır. Başka bir çalışmada, insan PC-3 ve fare TRAMP-C2 prostat adenokarsinoma hücreleri gliseril trinitrat (NO'in düşük konsantrasyonu) ile birlikte inkübasyonu, doksorobisin'e karşı hipoksi ile indüklenmiş dirençliliği inhibe etmiştir. Ayrıca, NO aracılı kemo-duyarlılık, Eving ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada, MCF-7 insan meme kanseri hücreleri doksorobisin ile muameleden önce NO çözeltisine maruz bırakılmış ve bu çalışma sonucunda doksorobisin ile %40 ve NO ve doksorobisinin kombine uygulanmasında ise sadece %5 sağ kalım olduğu bulunmuştur. Başka bir çalışmada, doksorobisine dirençli epitel kolon hücre hattında (HT29-dx) NO'in kemosensitizasyonda benzer bir rolü olduğu gösterilmiştir. SNAP, GSNO ve SNP gibi farklı NO vericilerinin yanı sıra, NO üretimi indükleyicilerinin (örn: atorvastatin) uygulanması ile, HT29-dx hücrelerin doksorobisine olan dirençleri kısmi olarak geri alınmıştır. Hem Doksorobisin birikiminin, hem NOS aktivitesinin artışı

görülmüştür. Ayrıca, kinetik verilere göre, NO, çoklu ilaç direnci ilişkili proteinlerin, tirozin nitrasyonunu tetiklemiş ve ayrıca doksorobisinin dış-atılımını inhibe etmiş ve bu şekilde, henüz aydınlatılamamış bir mekanizma ile aktive taşıyıcıların (P-glikoprotein) sayısını azaltarak hücrelerin ilaçlara karşı direncini azaltmıştır. konovalova ve arkadaşları, siklofosfamid (CPA) ve NO vericinin birlikte P388 lösemi farelere enjeksiyonunun CPA aktivitesini anlamlı derecede yükselttiğini göstermişlerdir. Ayrıca, NO verici, tümörün sisplatin ve doksorobisine karşı duyarlılığını arttırmıştır. Bunlara ek olarak, melanoma B16 tümörü taşıyan farelerde, CPA ve NO vericinin birlikte enjekte edilmesinin, metastazı önlediği gösterilmiştir. Bonavida ve arkadaşları, subkutan insan prostat karsinoma (PC3) xenograftı taşıyan atimik fareleri, NO verici DETA NONOate, sisplatin veya iki ajanın kombinasyonu ile tedavi etmişler ve bu çalışma sonunda, kombinasyonlu uygulamanın, sadece DETA NONOate veya sadece sisplatin uygulanan gruplara göre daha anlamlı derecede tümörün büyümesini önlediğini göstermişlerdir.

Sonuç olarak NO gibi kemo-duyarlılık kazandırıcı ajanlar, kemoterapötik ilaçların anti- tümörjenik etkisini yükseltebilir. Buna rağmen, bu tümör karşıtı etkilerin mekanizmasını tamamen açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4. KKH'lerinde Apoptoz Sinyal Yolu

Apoptoz aktif, sıkı düzenlenmekte olan ve enerji bağımlı bir hücre ölümü sürecidir (105,106). Memeli hücrelerinde, apoptoz iki farklı yol üzerinden düzenlenmektedir: ekstresek ve intrinsek yollar. Kaspazlar apoptoz yolunda önemli rol sahiplerdir. Kaspaz ailesinin bu iki yolla aktifleşmesi kromatinin yoğunlaşması, DNA'nın parçalanması, membranın kabarması ve hücrenin büzülmesi gibi bir takım hücresel değişimlere neden olur (Şekil 2.5 ve 2.6) (107).



Şekil 2.5. Apoptozis sinyal yolağı şeması (108)

2.4.1. Apoptozisin Ekstresek Yolağı

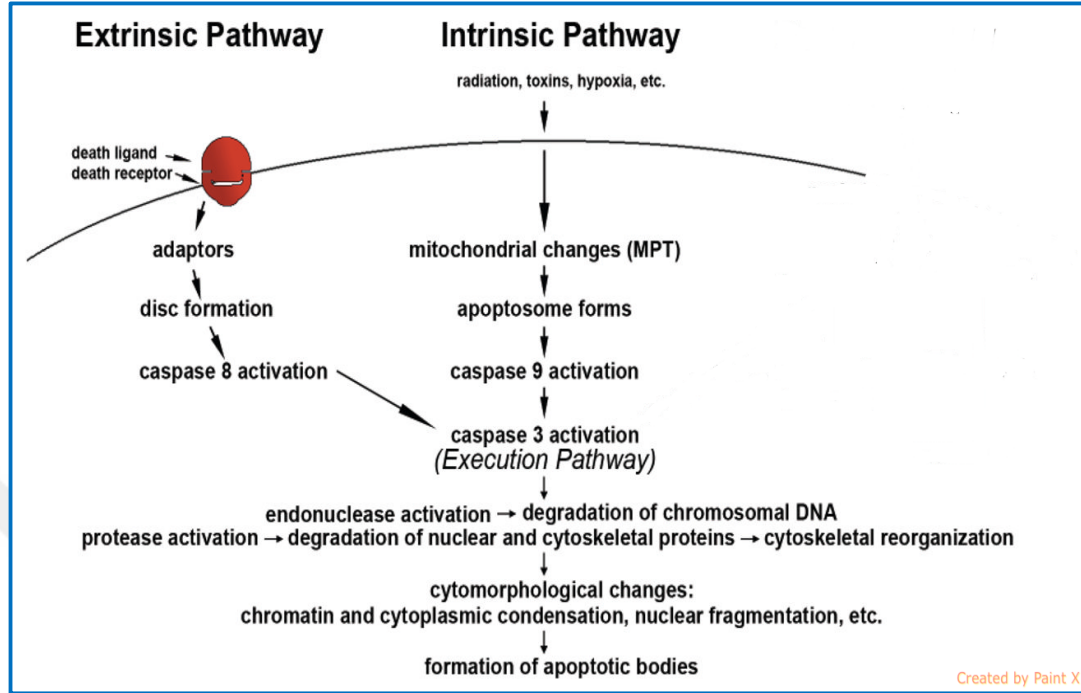
Ekstresek yolak hücre dışı proapoptotik ligandların ölüm reseptörleri olarak da bilinen CD95, sinir büyüme faktörü reseptörü (NGFR) ve TNF'ye bağımlı apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) gibi hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması ile başlar (şekil 2.5 ve 2.6) (109). Reseptöre bağlandıktan sonra, Fas ile ilgili ölüm domeini (FADD) ve prokaspaz-8 ve -10 dan oluşan ölüm indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşturulur (110–112). Oluşan bu kompleks kendi içinde yer alan kaspaz-8 ve -10'u aktifleştirir ve bunun sonucu kaspaz-3 parçalanarak aktifleşip apoptoz sürecini başlatır (113). Ekstresek yolakda, hücresel FLICE

inhibitör proteinin uzun izoformunun (c-FLIP) downregülasyonu, 195. lizinde übikitinasyon ile ortaya çıkmaktadır (114).

2.4.2. Apoptozisin İçsel Yolağı

Mitokondriyal yolak olarak da bilinen içsel yolak, iyonizan radyasyon, sitotoksik ajanlar ve büyüme faktörünün yokluğu gibi bir takım hücre ve DNA hasarına neden olan stres sinyalleri ile indüklenmektedir. Bunlar mitokondrinin dış zarının geçirgenliğinin artışına (MOMP) ve BH3-only proapoptotik B hücreli lösemi/lenfoma (Bcl-2) ailesi proteinin transkripsyonu veya transkripsyon sonrası aktivasyonuna neden olmaktadır (109). Mitokondri permeabilitesi apoptoz kaskatının anahtar aşamasıdır ve Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Mitokondrinin permeabilitesi sitokrom c ve mitokondriadan oluşan ikinci kaspaz aktivatörü (Smac) gibi apoptotik proteinlerin membranlararası alandan sitozole salınmasına izin vermektedir (115,116).

Sitokrom C ve apoptotik proteaz aktivatör factor-1 (Apaf-1)'in birleşmesi, kaspaz-9'u aktive eder, bunun sonucunda kaspaz-3 , -6 ve -7 aktive olur ve bu şekilde apoptoz gerçekleştirilir (109). Apoptoz proteini inhibitörleri (IAP) kaspaz aktivitesini inhibe ederek hem içsel hem de dışsal apoptozu önlemektedir. Bu mekanizma, apoptozu karşı son koruyucu önlemdir (117). İçsel yolakda ölüm sinyali c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ile de aktive edilmektedir, bunun için Bcl-xL'nin serin 62'de fosforillenir ve antiapoptotik etkisi azalır (114). Apoptozun içsel ve dışsal yolaklarının her ikisi de kanser hücrelerinde bozulmuş durumda olup apoptozdan kaçış kanser hücrelerinin temel özelliklerinden biri sayılmaktadır (16,118).



Şekil 2.6. Apoptozisin intrinsek ve ekstrinsek sinyal yolları (119)

2.4.3. KKH'lerinde Apoptozis Sinyal Yolları

KKH'lerinde apoptozun içsel ve dışsal yollarının düzenlenmesi bozuktur. Glioblastoma ve akciğer KKH'lerinde dışsal yolağa aracılık eden ölüm reseptörleri (DR) yüksek düzeyde eksprese olmakta (120) ve kolon KKH'lerinde DR4'ün upregülasyonu kemoterapi direncine neden olmaktadır (121). Ölüm reseptörüne bağımlı apoptozun negatif modülatörü olan FLICE-benzeri inhibitor proteinleri (cFLIP), iki alt tipten oluşmaktadır: uzun cFLIP (cFLIPL) ve kısa cFLIP (cFLIPS) (122,123). CD133+ glioblastoma, meme kanseri, ve T hücreli akut lösemi hücrelerinde, cFLIP'ler upregüle durumdadır (124,125).

cFLIP'lerin siRNA ile susturulması, hücrenin ölüm uyarılarına karşı hassasiyetini geri getirerek KKH'lerinin kendini yenilemesini ve tümör metastazını baskılar (126,127). Ölüm reseptörlerinin yetersiz, c-FLIP'lerin yüksek düzeyde ifadesi TRAIL'e karşı KKH'den zengin nörosfer direncine neden olur (128). Apoptoz inhibitor proteinler (IAP) ailesinden bir anti-apoptoz protein olan survivin, hücre bölünmesi, apoptoz ve pluripotensi düzenler (117,129,130). Survivin hematopoetik kök hücrelerde, nöronal prekürsör hücrelerde, CD34(+)/38(-) AML

kök hücrelerinde, glioblastoma ve astrositoma KKH'lerinde yüksek miktarlarda bulunur (131–133). KKH'lerinde upregüle olan diğer IAP proteinler arasında XIAP, c-IAP1, ve Livin sayılabilir (124,133).

KKH'lerinde içsel yolağın düzenlenmesinde bozukluklar başlıca Bcl-2 ailesi proteinlerde ve DNA hasar yanıtında yansıtılmaktadır. Bcl-2 ailesi proteinler anti-apoptoz proteinleri (Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1) ve pro-apoptotik moleküllerden (Bax, Bak, Bid, Bim, Bik, Noxa and Puma) oluşmaktadır (134). Spesifik bir molekülün ifade düzeyinden çok, anti-apoptotik/ pro-apoptotik oranının dengesizliği hücre sağkalımı ve apoptotik uyarılara hassasiyeti belirlemektedir (134). Tümörlerin çoğunda, KKH'lerde anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinler yüksek düzeyde eksprese olmaktadır (135).

Örneğin, CD133+ glioma KKH'lerinde anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL proteinleri yüksek düzeyde ifade edilmektedir (124,136), glioma KKH'lerinde Mcl-1'in yüksek ifade düzeyi, ABT-737 Bcl-2 inhibitörüne direnç ile orantılıdır (136). Kolon KKH'lerinde, Bcl-2'nin çoğalması apoptoz ve otofajinin inhibisyonuna neden olur (137). Bcl-2 'nin downregülasyonu ve Bax'ın upregülasyonu KKH'lerinde apoptozu indüklemektedir (115,138). Bu nedenle, mitokondriyal ölüm kaskadının inhibisyonu KKH-hedefli kanser tedavi yaklaşımları arasındadır.

DNA hasarına yanıt olarak tümör süpresör p-53-aracılı hücre döngüsünün durdurulması, DNA onarımı, ve apoptoz DNA hasar yanıtı olarak adlandırılır (139). İnsan glioma ksenograftlarından izole edilmiş glioma KKH'leri ve primer glioblastoma DNA hasarı yanıtını aktifleştirmek yoluyla radyo-rezistans oluşturmaktadır. KKH'lerin radyo-direnci P53'ün upstream aktivatörü Chk1 ve Chk2 checkpoint kinazların spesifik inhibitörü ile geri alınabilmektedir (9). Ek olarak, nükleer faktör-kapa B (NF-κB) sinyali KKH'lerinin apoptozunu pro- ve anti-apoptotik proteinlerin ifadesini etkilemek yolu ile regüle etmektedir. Lösemi kök hücrelerinde, NF-κB aktifleşerek sessiz lösemi hücre sayısını artırmaktadır (140,141). Meme KKH'leri parthenolid, pirolidineditiokarbamat, ve dietilditiokarbamat gibi NF-κB yolağı inhibitörlerine apoptoz ve hassasiyet göstermektedir. CD44+ meme KKH'lerinde CD24 ifadesi bu hücrelerde NF-κB

sinyalini bastırarak DNA hasarının indüklediği apoptozu güçlendirmektedir (142–144).

miRNA'lar küçük ve kodlamayan RNA'lardır (ncRNA'lar). Bunlar, protein translasyonunu target mRNA'lara bağlanarak regüle etmektedir (145). miRNA'lar hücrelerin büyümesi, migrasyonu, invazyonu, ve ilaç hassasiyeti ile ilişkilidir (146,147). Tümör hücrelerinde, miRNA ifadesi düzensiz olup onkojen veya tümör süpresör olarak rol oynar. Örneğin, miR-223, miR-122, ve miR-26 karaciğer tümör süpresörü olup miR-130b, miR-221, ve miR-222 ise, onkojenik faktörlerdir (148–152). Ortaya çıkan kanıtlar miRNA'ların stemness anahtar rolü olduğunu gösterir. Örneğin, let-7, miR-21, miR-22, miR-34, miR-101, miR-146a, ve miR-200 miRNA'ları KKH fenotipini etkiler ve işlevini onkojenik sinyal yolları hedefleme yoluyla sürdürür (153). Diğer miRNA'lar KKH'lerin kendini yenilemelerini kontrol ederek onların kaderini etkilemektedir. Örneğin, MiR-34 Notch ve bcl-2 gen ifadesini düzenlemek yoluyla insan pankreas KKH'lerini inhibe etmektedir (154), ve miRNA-34a glioma KKH'lerini çeşitli onkojenleri hedeflemek yoluyla bastırmaktadır (155).

KKH'leri ve non-KKH'leri arasında miRNA ifade seviyesinde fark mevcuttur (156). Örneğin, mir-21 and mir-302 ifadesi KKH'lerinde artmışken let-7a ifadesi azalmıştır. Ek olarak, mir-372, mir-373, ve mir-520c-5p non-KKH'lerde KKH'lere göre yüksek düzeylerde ifade edilmektedir (156).

BÖLÜM III

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan kitler, cihazlar, sarf malzemeleri ve kimyasallar

Çalışmada kullanılan kitler, üretici firma ve katalog bilgileri, kullanılan cihazlar, sarf malzemeleri ve kimyasallar tablo 2.1, 2.2, 2.3 ve 2.4’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kitler ve üretici firma bilgileri.

	<i>Kitin ismi</i>	<i>Üretim firma ve Katalog numarası</i>
1	Count&Viability kit	Milipore / Katalog No: MCH100102
2	Annexin V&Dead Cell kit	Milipore / Katalog No: MCH100105
3	RNeasy Mini Kit	Qiagen / Katalog No: 74104
4	RT ² First Strand Kit	Qiagen / Katalog No: 330401
5	RT ² PCR Array Yükleme Rezervuarı	Qiagen / Katalog No: 338162
6	RT ² SYBR Green qPCR Master Mix	Qiagen / Katalog No: 330522
7	Human Apoptosis RT ² Profiler PCR Array	Qiagen / Katalog No: 330231

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.

1	Muse Cell Analyzer, Milipore
2	İnkübatör, Thermo Scientific
3	Soğutmalı santrifüj, Ependorf
4	İnverted Mikroskop, Shimadzu UV-1208
5	Floresan Mikroskop, Olympus BX 50, Japan
6	Laminer kabin, Esco
7	Su Banyosu, Nüve BM 402
8	Vorteks, Dragonlab
9	Etüv, Heraeus, Germany

10	Real Time-PCR Cihazı, Applied Biosystems 7900
11	Gold Blok Termal Cyclers, Applied Biosystems PCR System 9700
12	NanoDrop ND-100 DNA, RNA ve protein ölçümü için spektrofotometre
13	Çift Kapılı Buzdolabı, Arçelik
14	Mikrosantrifuj, Eppendorf Minispın plus
15	-80°C derin dondurucu, Thermo
16	Dijital hassas terazi, Sartorius

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri

1	PCR tüpleri
2	PBS çözeltisi
3	Pudrasız eldiven
4	Kurutma kağıdı
5	Cam malzemeler (Beher, Erlen ve Mezür)
6	Eppendorf tüp (1,5 mL)
7	Otomatik pipet
8	Steril mikropipetler (10,100,1000 µL)
9	Steril mikropipet uçları (10,100,1000 µL)
10	Seroloji pipetleri (2, 5, 10, 25 mL)
11	PCR tüpleri

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar

1	DETA NONOate (Enzo Life Science, Katalog No: ALX-430-153-M025)
2	Zoledronik asid (Enzo Life Science Katalog No: ALX-430-014-M025)
3	RPMI1640 media
4	FBS (Fetal Bovine Serum)
5	Penisilin/Streptomisin
6	Amfoterisin B
7	PBS (Phosphate Buffer Saline)
8	Tripsin-EDTA
9	L-Glutamine
10	Alkol (% 70'lik Etanol Çözeltisi)
11	Steril distile su
12	Steril deyonize su

3.1.2. Çözeltilerin hazırlanması

3.1.2.1. Zoledronik asid çözeltisinin hazırlanması

Zoledronik asid (ZA), Enzo Life Science (Katalog No: ALX-430-153-M025) firmasından satın alındı. Deneylerde kullanmak üzere akışlı kabin altında ve steril ortamda 25 mg ZA tartılarak 2 ml deiyonize su içinde çözülerek stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözelti 100 µl'lik hacimler halinde -20°C de saklandı. Deney sırasında, stok çözeltide gereken miktarlarda alınarak hücre kültürü medyumunu için gereken konsantrasyonlarda hazırlandı.

3.1.2.2. DETA NONOate çözeltisinin hazırlanması

DETA NONOate, Enzo Life Science (Katalog No: ALX-430-014-M025) firmasından satın alındı. Deneylerde kullanmak üzere akışlı kabin altında ve steril ortamda 25 mg DETA NONOate tartılarak 2 ml deiyonize su içinde çözülerek stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözelti 100 µl'lik hacimler halinde -20°C de saklandı. Deney sırasında, stok çözeltide gereken miktarlarda alınarak hücre kültürü medyumunu için gereken konsantrasyonlarda hazırlandı.

3.1.2.3. %70'lik Etanol Çözeltisinin Hazırlanması

Muse TM cihazında hücre döngüsü deneyleri için %70'lik soğuk etanol (ice cold) kullanılarak hücreler fikse edildi. %70'lik etanol çözeltisini hazırlamak için kabin altında ve steril ortamda absolü etanolden (Merck, Almanya, 1009832500) 70 ml ve steril distile sudan 30 ml ilavesi ile hazırlandı ve . kullanım zamanına kadar -20⁰C'de saklandı.

3.1.2.4. Hücre hattı kültürü için medyumun hazırlanması:

Yüzde bir oranında L-Glutamin içeren RPMI1640 çözeltisine %10 oranında Fötal Bovin Serum , Penisilin/Streptomisin ve Amfoterisin B eklendi. Pipet ile birkaç kez çekilip geri bırakılarak homojen dağılım sağlandı. Hazırlanan medyum, +4⁰ C'de saklandı. Kullanılan maddeler ve oranları Tablo 2.5'de yer almıştır.

Tablo 3.5. Hücre kültürü için hazırlanan medyumun bileşenleri

Solüsyonlar		%	Hacim (ml)
1	RPMI1640 (Lonza, BE12-167F)	1 x	500 ml
2	Fötal Bovin Serum (Biowest, S1810)	% 10	50 ml
3	L-Glutamin (Thermo Scientific, SH3003401)	% 1	5 ml
4	Penisilin/Streptomisin (Thermo Scientific, SV30010)	% 1	5 ml
5	Amfoterisin B (Lonza, 17-836E)	% 1	5 ml

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Hatlarının Temini ve Çoğaltılması

İnsan prostat kanseri hücre hattı (DU-145) Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection=ATCC)'den alındı. Hücreler hazırlanmış medyumla 75 cm²'lik steril Corning polistiren hücre kültürüne özel flasklarda 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda, inkübatörde kültüre edildi.

Hücrelerin pasajlanma işlemi için, flaskların yüzeyinin %80'den fazla miktarda kaplanmış olması (konfluency= >80%) esas alındı. Flasklardaki hücrelerin üzerindeki besiyeri pipet yardımı ile aspire edilip uzaklaştırıldı. Hücreleri temizleyip yıkamak için flasklardaki hücrelerin üzerine PBS ilave edilip ardından aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücre pasajlama işlemi, flask içerisinde tek tabaka halinde olan hücrelere hiçbir zarar vermeden yüzeyden kaldırıp çözelti içinde süspanse ederek başka bir ortama aktarma prensibine dayalıdır. Hücreler tripsin yardımı ile kaldırıldı. Aktarılan hücreli ortam %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de hücreler çoğalıp hücre tabakası oluşturmaya kadar inkübe edildi. Standardizasyon amacı için hücrelere tripan mavisi uygulanarak hemositometre lamında ışık mikroskop altında incelendi. Her pasajlama işleminde hücre morfolojisi, canlılığı ve sayısı kontrol edildi. Tripsin-EDTA 37°C su banyosunda 15 dakika bekletildi. Hücreler 2.5 ml %0.05 Tripsin-EDTA ile muamele edilerek en fazla 4 dakika 37°C, %5 CO₂ ortamında inkübe edilerek flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Sürenin bitiminde hücrelerin flaskın yüzeyinden kopup ayrılması ışık mikroskobu altında gözlemlendi. Tripsin-EDTA ile muamele edilen hücre ortamına en az 5 ml FBS içeren RPMI 1640 medyumunu eklenerek tripsinin aktivesi durduruldu. Flaskta bulunan tüm sıvı pipet ile 15 ml'lik santrifüj tüpüne transfer edilip 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj

edildi. Supernatant uzaklaştırılıp kalan pellet üzerine 2 ml medyum eklendi. Hafif hareketle pellet süspanse edildi ve Muse cihazında sayım işlemine geçildi. Sayım işlemi sonrasında hücreler çoğaltılmak için yeni kültür flasklarına alındı. Hücreler 37°C'de ve % 5 CO₂'li ortamda, inkübatörde kültüre edildi.

3.2.2. Akım Sitometri Cihazında Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Toplanması

DU145 insan prostat kanseri hücreleri %1 L-Glutamin, %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 Amfoterisin B içeren RPMI1640 medyumunda 75 cm²'lik Corning polisitren hücre kültürü flasklarında çoğaltıldı. Ardından hücreler 2.5 ml %0.05 Tripsin-EDTA ile muamele edilerek 4 dakika 37°C, %5 CO₂ ortamlı inkübatörde tutulup hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Bekleme süresi dolduktan sonra, her iki tüpün içine FBS içeren 5 ml medyum eklenerek tripsinin inaktivasyonu sağlandı. Her iki tüpten ayrı ayrı tüm sıvı pipet ile çekilerek 15 ml'lik santrifüj tüplerine transfer edilip 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüplerde kalan pelletin üzerine 5 ml PBS ilave edilip vortekslendi. Her örnekten 20 µl alınıp Muse cihazında sayım yapıldı. Her iki tüpün içinde yaklaşık 3x10⁶ canlı hücrenin var olduğu tespit edildi. Sonrasında bu süspanسیونlar 5 dakika 500 rpm'de santrifüj edilip süpernatantlar uzaklaştırıldı. Ardından tekrar yıkamak amacıyla hücreler ayrı ayrı 1x PBS ile 5 dakika 300 rpm'de santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı.

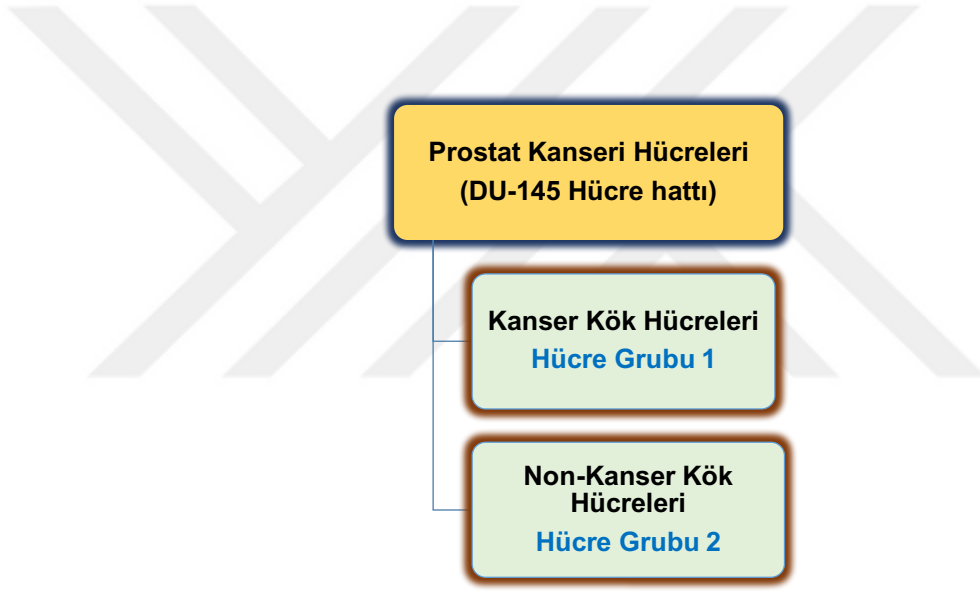
3.2.2.1. DU-145 Hücrelerin ayırımı

DU145 hücreleri içeren tüpe 10 µl CD44-FITC (Clone B-F24, GenProbe USA) ve 10 µl CD133-PE (Miltenyi Biotech, UK) eklendi. Ardından 20 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildikten sonra üzerine 1 ml PBS eklendi. CD133⁺/CD44⁺ yüzey belirteçleri barındıran DU145 insan prostat kanseri hücrelerinin ayırma işlemi floresan hücre ayırma (FACS) akım sitometri yöntemi ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı (AREL)'de bulunan FACS Aria II (Beckton Dickinson) cihazında yapıldı. Ayırılan hücreler, CD133⁺/CD44⁺ (sorting) ve bunun dışında kalan hücreler (non-sorting) olarak sınıflanıp, içlerinde 3'er ml RPMI 1640 mediumu bulunan polisitren Falcon

tüplerinde toplandı. Ayırma işleminden hemen sonra, bu hücreler çoğaltılmak üzere 25 cm²'lik polisitren steril Corning hücre kültürü flasklarına alındı.

3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda, DU-145 insan prostat kanser hücre hattından izole edilen CD133⁺/CD44⁺ hücreler (DU-145-KKH), DU-145 KKH dışında kalan hücreler (DU-145 non-KKH) olmak üzere 2 farklı hücre grubu ile çalışıldı (Şekil 3.1).

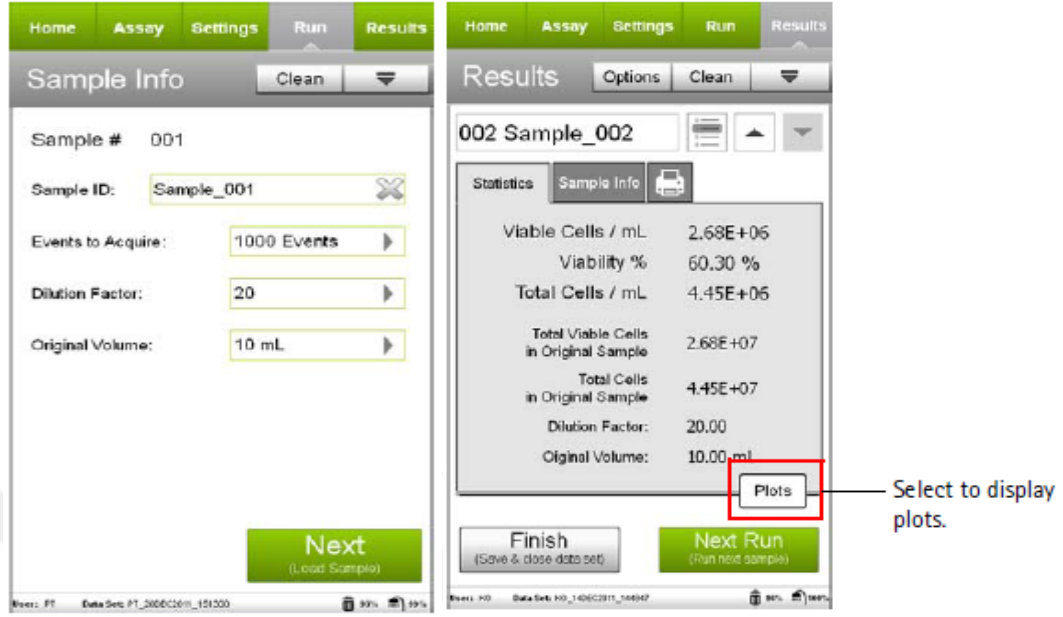


şekil 3.1. Çalışmadaki 2 deney grubu

3.2.4. Hücre Canlılığı ve IC₅₀ değerlerin Belirlenmesi

Hücre canlılığı ve sayımı Muse™ Count & Viability Kiti kullanılarak Muse™ Cell Analyzer cihazı ile belirlendi. Yöntem, özel bir reaktifin içindeki DNA-bağlayıcı boyaların, hücreler tarafından membran bütünlüğünün kaybedilmesi ile ölü ve canlı hücre çekirdeğinin ayrı ayrı boyanması prensibine dayanmaktadır. Altı kuyucuklu plaklara (6-well plate) 3x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde DU-145 KKH ve DU-145 non-KK ekildi. Hücrelerin morfolojisini geri kazanıp plak yüzeyine tutunmaları için 24 saat beklendi. Bekleme süresi dolduktan sonra hücrelerin üzerlerine farklı dozlarda (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 140 µM) Zoledronik asid

eklenerek 24, 48 ve 72 saatlik üç farklı inkübasyon süresi uygulandı. DETA NONOate uygulaması için hücrelerin üzerine (0, 500, 1000 ve 1500 μ M) DETA NONOate eklendi. Kombine muamele için, Hücreler üzerine önce belirlenmiş dozlarda DETA NONOate eklendi, ardından 24 saat inkübasyondan sonra, her grup için belirlenmiş IC₅₀ konsantrasyonunda ZA eklenerek 72 saatlik inkübasyon süresi uygulandı. Kontrol gruplarında ise sadece medyum kullanıldı. Deneyler 3 tekrar şeklinde uygulandı. İnkübasyon süresi dolduktan sonra kuyucuklardaki besiyeri ayrı ayrı pipet ile çekilip her biri etiketlenmiş 5 ml'lik santrifuj tüplerine alındı. Ardından her kuyucuğun içine 0.5'er ml Tripsin-EDTA eklenerek 37°C'de yaklaşık 3 dakika inkübatörde tutularak hücrelerin plak yüzeyinden ayrılması sağlandı. Tripsinin aşırı aktivasyonunu engellemek için her kuyucuğa birer ml serum içeren RPMI 1640 besiyeri eklenerek kuyucuktaki hücreler ayrı ayrı etiketlenmiş santrifüj tüplerindeki sıvıların üzerine eklendi, 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp üzerlerine 2'şer ml besiyeri eklenerek yeniden suspanse edildiler. 1.5 ml'lik steril Eppendorf mikrosantrifüj tüplerine ayrı ayrı hücre süspansiyonlarından 20'şer μ l ve üzerine Muse™ Count & Viability reaktifinden 380 μ l alınarak (1/20 dilüsyon) vorteks ile karıştırılıp 5 dk karanlık ortamda, oda sıcaklığında inkübe edildi ve Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapıldı. Ölçümler esnasında toplam hücre sayısı, canlı hücrelerin sayısı ve yüzdesi kaydedildi. Bu verilerin ışığında ZA'nın hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu (IC₅₀ değeri) hesaplandı.

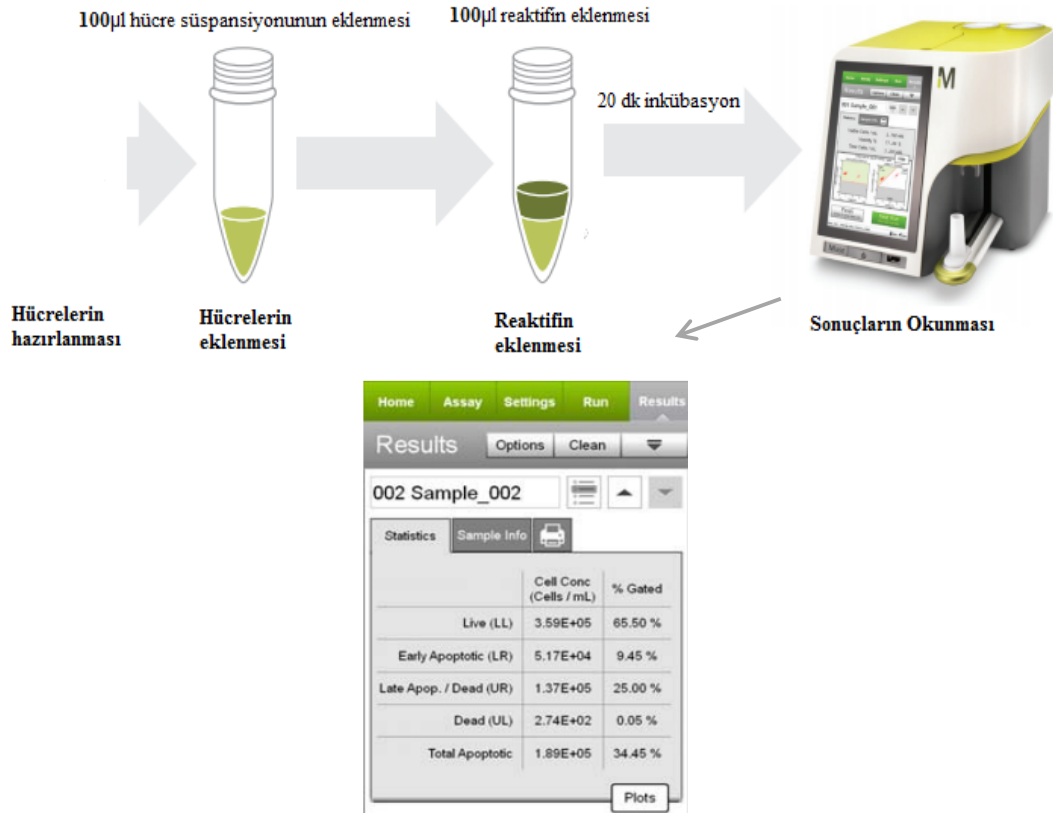


Şekil 3.2. Muse™ Cell Analyzer cihazında hücrelerin canlılık yüzdesi değerlerinin belirlenmesi (157).

3.2.5. Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümü

Hücrelerin apoptozis incelemesi, Muse™ Annexin V & Dead Cell Kiti kullanılarak Muse™ Cell Analyzer cihazı ile yapıldı. Annexin-V fosfatidilserine (PS) bağlanabilen bir proteindir. PS normalde hücre zarının iç yüzeyinde yerleşmiş olan bir fosfolipittir. Apoptotik hücrede hücre zarının dış yüzeyine transloke olur. Annexin-V dış yüzeye transloke olmuş PS'e bağlanarak apoptotik hücrenin görülebilmesini sağlar. Altı kuyucuklu plaklara her kuyucukta 3×10^4 hücre olacak şekilde DU-145 KKH ve DU-145 non-KKH hücreleri ekildi. Hücre morfolojilerinin geri kazanılması ve hücrelerin plak yüzeyine tutunmaları için 24 saat inkübatörde bekletildi. Ardından Zoledronik asidin her hücre grubu için saptadığımız IC_{50} dozları uygulanarak kontrol grubu ile birlikte $37^{\circ}C$, $\%5CO_2$ ortamda 72 saat inkübasyona bırakıldı. DETA NONOate uygulaması için hücrelerin üzerine (0, 500 ve 1000 μM) DETA NONOate eklendi. Kombine muamele için, Hücreler üzerine önce belirlenmiş dozlarda DETA NONOate eklendi, ardından 24 saat inkübasyondan sonra, her grup için belirlenmiş IC_{50} konsantrasyonunda ZA eklenerek 72 saatlık inkübasyon süresi uygulandı. Kontrol

grubu hücrelerine için sadece medyum eklendi. Uygulama süreleri dolduktan sonra her kuyucukdaki besiyeri uzaklaştırılıp her kuyucuğa 2'şer ml 1x PBS eklenerek yıkama işlemi yapıldı ve daha sonra PBS uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından her kuyucuğa 1 ml Tripsin-EDTA eklenip inkübatörde 37⁰C'de yaklaşık 3 dakika bekleterek hücrelerin kuyucuk yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Aşırı tripsin aktivitesini önlemek için her kuyucuğa 2 ml serum içeren RPMI 1640 besiyeri eklenerek her kuyucuktaki hücreler ayrı ayrı etiketlenmiş 5 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten hemen sonra hücrelerin üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış ve üzerlerine 2 ml besiyeri eklenerek yeniden süspanse edilmiştir. 1.5 ml'lik steril Eppendorf mikrosantrifüj tüplerine hücre süspanسیونlarından 100'er µl ve Muse™ Annexin V & Dead Cell reaktifinden 100 µl ilave edilerek oda sıcaklığında, karanlık ortamda, 20 dakika inkübe edildi ve Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapıldı. Deneyler 3 kez tekrar edildi.



Şekil 3.3. Muse™ Cell Analyzer cihazında hücrelerin apoptotik değerlerinin belirlenmesi (158).

3.2.6. İmmunfloresan Yöntemi

Altılı kuyucuklar içine konulmuş özel lamellerin üzerine alınan hücreler, %1 Glutamin içeren RPMI 1640, 10% FBS ve %5 Amfoterisin-Penisilin-Streptomisin içeren medyumda bir gece boyunca inkübe edildi. Hücrelerin morfolojilerini geri kazanıp lamel yüzeyine tutunmaları için 24 saat beklendikten sonra Zoledronik asidin doza ve zamana bağlı olarak belirlenmiş olan IC₅₀ değerlerinde kontrol grubu ile birlikte inkübe edildi. Deney kontrol grubuna ise sadece medium eklendi. Hücreler %4 PFA ile 2 saat süre ile fikse edildikten sonra PBS ile 3 kez yıkandı. Önce %0.1 PBS ve TritonX-100 çözeltisinde 10 dakika ve ardından blocking serumda (Invitrogen, USA) +4°C'de 1 saat bekletildi. Tekrar PBS ile 3 kez yıkanıp Kaspaz-9 (abcam, ab32539), Kaspaz-7 (abcam, ab32522), Kaspaz-4 (abcam, ab25898), BIRC2 (abcam, ab196592), BIRC3 (abcam, ab23423), Bcl-2 (abcam, ab32124), BAX (abcam, ab77566) ve BAD (abcam, ab32445) 1/100 oranında PBS ile dilüe edilip uygulandı. Gece boyunca +4°C'de bekletildi. Uygun sekonder antikor FITC (Abcam, USA) eklenerek 1 saat boyunca +4°C'de bekletildi. Tekrar PBS ile 3 kez yıkanıp DAPI ile kapatılarak Olympus BX 50 marka floresan mikroskopta görüntülendi.

3.2.7. RNA İzolasyonu ve Saflaştırılması

RNA izolasyonu ve saflaştırması için RNeasy Mini Kit'i (Qiagen / Katalog No: 74104) kullanıldı. İzlenen aşamalar kısaca aşağıda açıklanmıştır.

1. Hücreler kaldırılıp sayım yapıldı. 1×10^6 hücre sonraki aşamalar için işleme alındı.
2. Hücrelerin parçalanması: Oluşan pellet, tüpün üzerine parmak ucu ile hafifçe vurularak dağıtıldı. Hücrelerin üzerine 350 µl hücre lizis (RLT) tamponundan ilave edilip vortekslendi.
3. Lizatın homojenize edilmesi: Oluşan lizat pipet ile direkt 2 ml'lik toplama kolonunun içine alınıp "shredder spin column" kolonuna aktarılıp 2 dakika maksimum hız ile santrifüj edildi.
4. Homojenize olmuş lizatın üzerine lizat hacmi kadar %70 etanol ilave edilip pipet yardımı ile karıştırıldı.

5. 2 ml'lik toplama tüpünün içine konulmuş RNeasy spin kolonun içine maksimum 700  l örnek transfer edilip kapağı kapatılıp 15 saniye 10,000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
6. RNeasy spin kolonun üzerine 700  l RW1 tamponu ilave edilip kapağı kapatılıp 15 saniye 10,000 rpm'de spin kolonun membranının yıkanması için santrifüj edildi. Ardından kolon toplama tüpünden çıkarılıp toplanan sıvı atılıp kolon boşaltıldı. Spin kolon tekrar toplama tüpüne konuldu.
7. RNeasy spin kolonun üzerine 500  l RPE tamponu ilave edilip kapağı kapatılıp 15 saniye 10,000 rpm'de spin kolonun membranının yıkaması için santrifüj edildi. Ardından kolon toplama tüpünden çıkarılıp toplanan sıvı atılıp kolon boşaltıldı. Spin kolon tekrar toplama tüpüne konuldu.
8. RNeasy spin kolonun üzerine 500  l RPE tamponu ilave edilip kapağı kapatılıp 2 dakika 10,000 rpm'de spin kolonun membranının yıkanması için santrifüj edildi. Santrifüj aşamasının uzun olduğu spin kolon membranı kurutularak bu şekilde kalmış olan etanol uzaklaştırıldı.
9. RNeasy spin kolonun altındaki toplama tüpü de i tirilip kalması muhtemel tamponun uzaklaştırılması için 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
10. RNA yıkaması: RNeasy spin kolonu 1.5 ml'lik toplama tüpüne konup doğrudan membranın üzerine 50  l RNaz içermeyen su eklendi. Kolonun kapağı kapatılıp 1 dakika 10,000 rpm'de spin RNA'nın yıkanması için santrifüj edildi.
11. Toplama tüpünde toplanan su içindeki RNA sonraki aşamalarda kullanıldı.
12. RNA'nın ölçümü ve kalite kontrolü:  zole edilmiş RNA'nın ölçümü ve kalite kontrolü için NanoDrop ND-100 spektrofotometre kullanıldı. Cihaz RNaz içermeyen su kullanarak k re karşı sıfırlandı. A_{260}/A_{230} oranı 1.7'nin üzerinde ve RNA'nın saflığını gösteren A_{260}/A_{280} oranı 2.0 olarak tespit edildi.
13. Başlangıç için RNA miktarı: her 96'lık plak için total 1  g RNA kullanıldı.

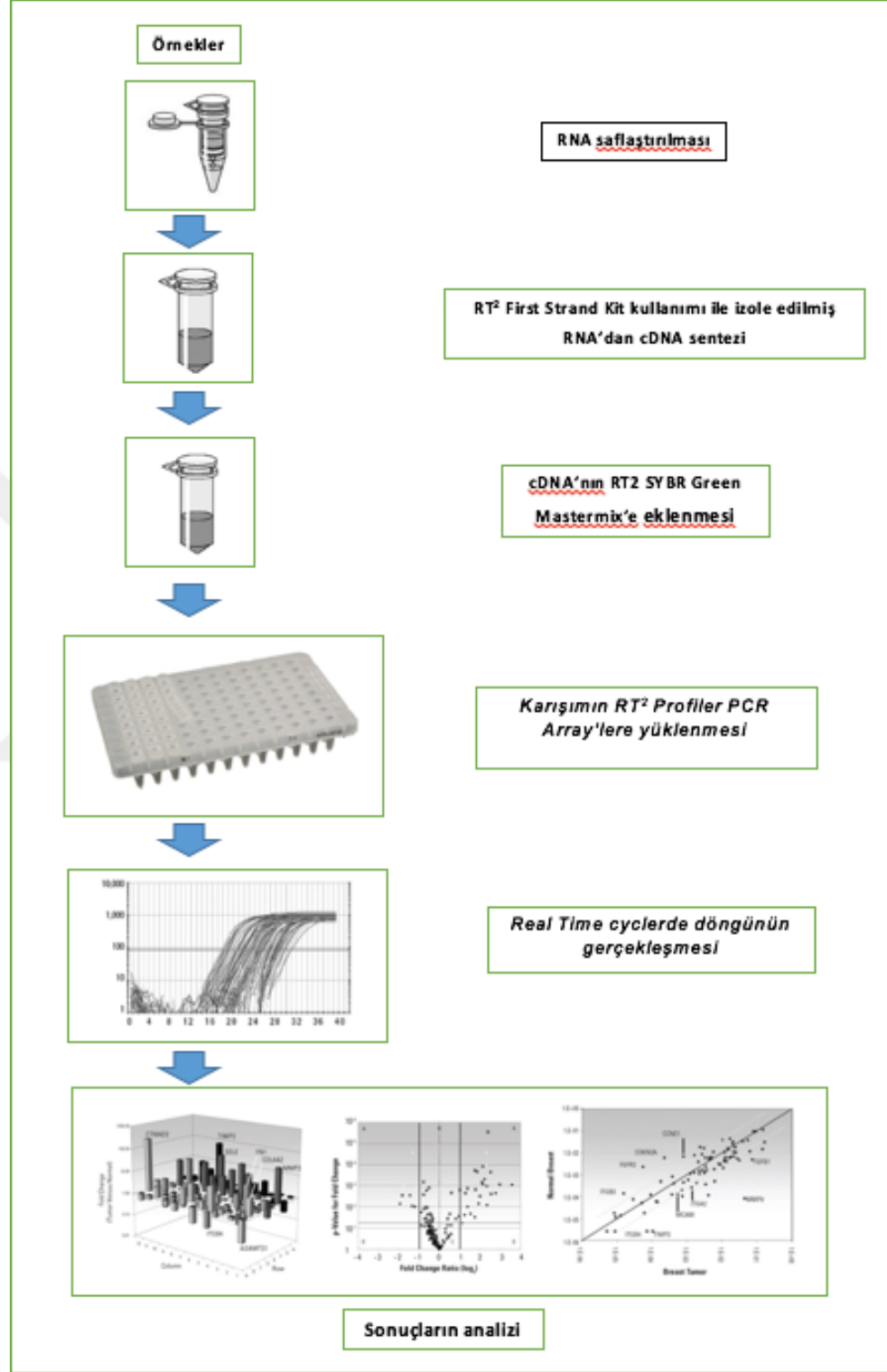
3.2.9.cDNA sentezi

cDNA sentezi için RT² first strand kiti (Qiagen / Katalog No:330401) ve GeneAmp PCR 9700 PCR cihazı kullanıldı.

1. DNA elimine eden karışım hazırlanması için, her plak başına, 1 µg RNA, 2 µl Genomik Eliminasyon (GE) tamponu ve 7 µl RNaz içermeyen su hazırlandı. Karışım yavaşça pipet ile karıştırılıp kısa süre santrifüj edildi. Ardından karışım 5 dakika boyunca 42 °C'de inkübe edilip süre dolduktan sonra en az 1 dakika buzlu ortamda bekletildi.
2. Revers-transkripsiyon karışımı hazırlanması:
Her bir reaksiyon için, 5x BC3 tampondan 4 µl, kontrol P2'den 1 µl, RE3 revers transkriptazdan 2 µl ve RNaz içermeyen sudan 3 µl olmak üzere toplam 10 µl karışım hazırlandı.
3. 10 µl revers-transkriptaz karışımı içeren bir tüpün içine 10 µl DNA eliminasyon karışımından ilave edilip pipet ile karıştırıldı.
4. Karışım 15 dakika 42°C'de inkübe edildi. Süre dolduktan hemen sonra reaksiyonu durdurmak için 5 dakika boyunca 95°C'de inkübe edildi.
5. Her tübe 91 µl RNaz içermeyen su ilave edilip pipet ile defalarca karıştırıldı.
6. Tüpler buzlu ortama bırakılarak soğutuldu.

3.2.10. Gen Ekspresyon Analizi

Gen ekspresyon analizi için izlenmiş prosedürün özeti şekil 3.5'de gösterilmiştir. Bu analiz, Kantitatif Real Time PCR yöntemi ile, apoptozis yolağında görevli 84 gen için tasarlanmış olan Human Apoptosis RT² Profiler PCR Array kiti (Qiagen/ Katalog No: PAHS-012Z) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu sistem, 96 kuyucuklu plak şeklinde olup apoptozis ile ilişkili 84 gen için spesifik olarak tasarlanmış primerler içermektedir. RT² Profiler PCR Array plak deseni Şekil 3.6 de gösterilmiştir. Apoptozis ile ilişkili genlerin isim ve fonksiyonları Tablo 3.6 da yer almaktadır.



Şekil 3.4. Human Apoptosis genes RT² Profiler PCR Array Prosedürü (159).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	HK1	HK2	HK3	HK4	HK5	GDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Housekeeping
genleri

Genomik DNA
kontrolü

Revers-
transkripsiyon
kontrolleri

Pozitif PCR
kontrolleri

Şekil 3.5. RT² Profiler PCR Array plate düzeni (159).

Tablo 3.6. İncelenen apoptozis ile ilişkili genlerin isim ve fonksiyonları

Gen sembolü		Genin açık adı
1	AKT1	Homo sapiens v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
2	APAF1	Homo sapiens apoptotic peptidase activating factor 1
3	AVEN	Homo sapiens apoptosis, caspase activation inhibitor
4	BAD	Homo sapiens BCL2-antagonist of cell death
5	BAG1	Homo sapiens BCL2-associated athanogene
6	BAK1	Homo sapiens BCL2-antagonist/killer 1
7	BAX	Homo sapiens BCL2-associated X protein
8	BBC3	Homo sapiens BCL2 binding component 3
9	BCL2	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 2
10	BCL2L1	Homo sapiens BCL2-like 1
11	BCL2L10	Homo sapiens BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
12	BCL2L11	Homo sapiens BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
13	BCL2L13	Homo sapiens BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)
14	BCL2L2	Homo sapiens BCL2-like 2
15	BID	Homo sapiens BH3 interacting domain death agonist
16	BIK	Homo sapiens BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
17	BIRC2	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 2
18	BIRC3	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 3
19	BIRC5	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 5
20	BOK	Homo sapiens BCL2-related ovarian killer
21	CAD	Homo sapiens carbamoyl-phosphate synt. 2, aspartate transcarb., and dihydroorotase
22	CASP1	Homo sapiens caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
23	CASP10	Homo sapiens caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
24	CASP12	Homo sapiens caspase 12 (gene/pseudogene)
25	CASP14	Homo sapiens caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase
26	CASP2	Homo sapiens caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
27	CASP3	Homo sapiens caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
28	CASP4	Homo sapiens caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
29	CASP5	Homo sapiens caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase
30	CASP6	Homo sapiens caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase
31	CASP7	Homo sapiens caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
32	CASP8	Homo sapiens caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
33	CASP8AP2	Homo sapiens CASP8 associated protein 2
34	CASP9	Homo sapiens caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
35	CFLAR	Homo sapiens CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
36	CRADD	Homo sapiens CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
37	DFFA	Homo sapiens DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
38	DIABLO	Homo sapiens diablo homolog (Drosophila)
39	ENDOG	Homo sapiens endonuclease G
40	FADD	Homo sapiens Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
41	FAM96A	Homo sapiens family with sequence similarity 96, member A
42	FAM96B	Homo sapiens family with sequence similarity 96, member B
43	FAS	Homo sapiens Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
44	FASLG	Homo sapiens Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
45	HMGB1	Homo sapiens high-mobility group box 1
46	HRK	Homo sapiens harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
47	HSP90B1	Homo sapiens heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
48	HTRA2	Homo sapiens HtrA serine peptidase 2

49	LRDD	Homo sapiens leucine-rich repeats and death domain containing
50	MCL1	Homo sapiens myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
51	NFKB1	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
52	NFKB2	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
53	NGFR	Homo sapiens nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
54	PMAIP1	Homo sapiens phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
55	PTEN	Homo sapiens phosphatase and tensin homolog
56	REL	Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)
57	RELA	Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
58	RELB	Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B
59	SOCS2	Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 2
60	SOCS3	Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 3
61	STAT1	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
62	STAT5A	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 5A
63	STAT5B	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 5B
64	TNF	Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
65	TNFRSF10A	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
66	TNFRSF10B	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
67	TNFRSF10C	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c
68	TNFRSF11B	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
69	TNFRSF1A	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
70	TNFRSF1B	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
71	TNFRSF21	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
72	TNFRSF25	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
73	TNFSF10	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
74	TNFSF11	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
75	TNFSF8	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
76	TP53	Homo sapiens tumor protein p53
77	TP53I3	Homo sapiens tumor protein p53 inducible protein 3
78	TRAF1	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 1
79	TRAF2	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 2
80	TRAF3	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 3
81	TRAF4	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 4
82	TRAF5	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 5
83	TRAF6	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 6
84	TRAF7	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 7

3.2.10.1. Gen Ekspresyon Analizi Aşamaları

PCR karışımının bileşenlerinin hazırlanması amacı ile, 96'lık bir plak için 5 ml'lik bir tüpte, Tablo 3.7'de gösterilen maddeler karıştırıldı. SYBR green mastermiksini içeriği Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. PCR karışımının bileşenleri

<i>madde</i>	<i>miktar</i>
2x RT2 Sybr Green Mastermix	1350 µl
Sentezlenmiş cDNA reaksiyonundan	102 µl
RNaz içermeyen su	1248 µl
Total hacim	2700 µl

Tablo 3.8 SYBR green mastermiksini içeriği

SYBR green mastermiksini içeriği
HotStart DNA Taq Polimeraz
PCR tamponu
dNTP Karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
SYBR Yeşil Boya
ROX Pasif Referans Boyası

1. Hazırlanmış PCR bileşenleri karışımı PCR RT² Profiler PCR Array plağına 8 kanallı pipet kullanılarak kuyucuk başına 25 µl olacak şekilde dağıtıldı.
2. Plağın üzeri "optikal-8 cap" filmi ile kapatıldı.
3. Kabarcıkları uzaklaştırmak için plaklar 1 dakika 1000 g'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
4. Real-time cyclus cihazı döngü koşulları Tablo 3.9'da yer almıştır.

Tablo 3.9 PCR için döngü koşulları

Döngü sayısı	Süre	ISI	Açıklama
1	10 dakika	95 °C	DNA Taq Polimerazın aktifleştirilmesi
40	15 saniye 1 dakika	95 °C 60 °C	Fluresans veri toplama

5. Plak cihaza yerleştirilip kapağı kapatıldıktan sonra başlatıldı.

6. 'Real time cycler' yazılımı kullanarak her kuyucuk için threshold döngü (C_T) hesaplandı.
7. Amplifikasyon planının lineer kısmında gözükten en erken amplifikasyon bulunup baseline olarak tanımlandı. Cihaz, gözükten en erken amplifikasyondan 2 döngü öncesinden itibaren okumaya ayarlandı.
8. Amplifikasyon planının log bölümünde, threshold değeri belirlendi. Threshold değerinin arkaplan sinyalinin üst kısmında fakat lineer fazın alt yarı kısmında olması gerekmektedir. Threshold değerinin tüm array ranlarının üzerinden geçmesine dikkat edildi.
9. Tüm kuyucukların C_T değerleri veri analizi için toplandı.
10. PCR'ın spesifitesini doğrulamak için, 'melting curve analizi' yapıldı. Bunun için, real-time cycler yazılımı kullanılarak her kuyucuk için Birinci türev ayrışma eğrisi (first derivative dissociation curve) oluşturuldu. Her reaksiyon için 80 °C'nin üzerinde tek bir pik gözlemlendi.

3.2.10.2. $\Delta\Delta C_T$ Metodu ile Veri Analizi

Veri analizi $\Delta\Delta C_T$ metodu ile gerçekleştirildi. Gruplarında ayrı ayrı PCR sonrasında SDS 2,3 programı kullanılarak elde edilen C_T değerleri analiz edildi. Cut off değeri 35 olduğundan 35'den büyük olan C_T değerleri 35'e sabitlendi. Kontrol kuyucukları Tablo 3.10'da gösterilmiştir.

Tablo 3.10. Kontrol için kullanılan genler

<i>Kuyucuk kodu</i>	<i>Açıklama</i>
H6	İnsan Genomik DNA kontrolü (HGDC)
H7 H8 H9	Ters transkripsiyon kontrolü (RTC)
H10 H11 H12	PCR pozitif kontrol (PPC)

Normalizasyon yapmak amacıyla, apoptozis yolağında görevli genler (GOA) için her bir plakda C_T değerleri kullanılarak ilgili genler ve housekeeping genler (HKG) için ΔC_T değerleri $\Delta C_T = C_T^{GOA} - C_T^{ort\ HKG}$ formülü kullanılarak hesaplandı. İki grup RT² Profiler PCR Array arasında, her bir gen için $\Delta\Delta C_T$ değerleri hesaplandı. Formül:

“ $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (ZA uygulanmış hücre grubu) – ΔC_T (ZA uygulanmamış, kontrol hücreler)”

3.2.10.3. Veri Analizinin Yorumlanması

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (ilaç uygulanmış hücreler) – ΔC_T (ilaç uygulanmamış kontrol hücreler)

- $1 < \Delta\Delta C_T < 2$ ise ilgili gen ilaç uygulanmış grupta up-regüle olduğu ihmal edilebilir
- $2 < \Delta\Delta C_T$ ise ilgili gen ilaç uygulanmış grupta up-regüledir (ekspresyon artmış).
- $0.5 < \Delta\Delta C_T < 1$ ise ilgili gen ilaç uygulanmış grupta down-regüle olduğu ihmal edilebilir
- $\Delta\Delta C_T < 0,5$ ise ilgili gen ilaç uygulanmış grupta down-regüledir.

Her gen için ilaç uygulanmış grupta ilaç uygulanmamış kontrol grubuna göre kat değişimi (FC), $2^{(-Avg\Delta CT)}$ formülü kullanılarak hesaplandı.

Kat değişimi değeri 3'ün üstünde ve -3'ün altında olan genler sırasıyla en anlamlı up-regüle ve en anlamlı down-regüle olan genler olarak tanımlandı.

3.3. İstatiksel Analiz

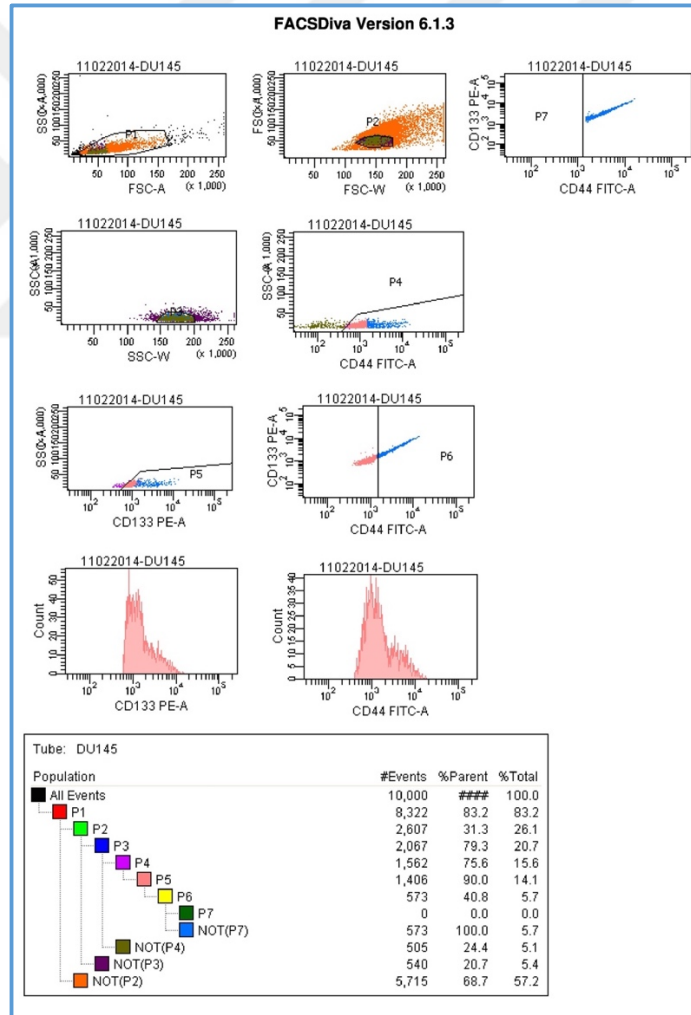
Deneylerde ZA'in sitotoksiste, apoptoz, hücre döngüsü ve gen ekspresyonu analizlerinde her deney üç kez tekrarlandı. ZA ile muamele edilmiş hücreler ile edilmemiş kontrol hücreler arasında anlamlı farklılığın olup olmadığı ve standart sapma değerleri t-test yöntemi ile araştırıldı. Gruplar arasında verilerin karşılaştırılması için tek yönlü ANOVA ve ardından HSD post hoc testleri uygulandı. Karşılaştırmalarda 0.05'ten küçük p değeri ($P < 0.05$) anlamlı olarak kabul edildi.

BÖLÜM IV

4. BULGULAR

4.1. KKH'lerin ayırımı, oran ve saflığının belirlenmesi:

İnsan prostat kanseri DU-145 hücreleri üzerinde CD133 ve CD44 yüzey antijenleri için FACS ile sort yapıldı (Şekil 4.1 ve 4.2). DU-145 KKH hücrelerinin oranı %5.7, non-KKH'lerinin ise %94.3 idi (Şekil 4.1). Hücre popülasyonlarının saflığını belirlemek için 'post sort' analizi yapılarak saflığın >%90 olduğu tespit edildi.

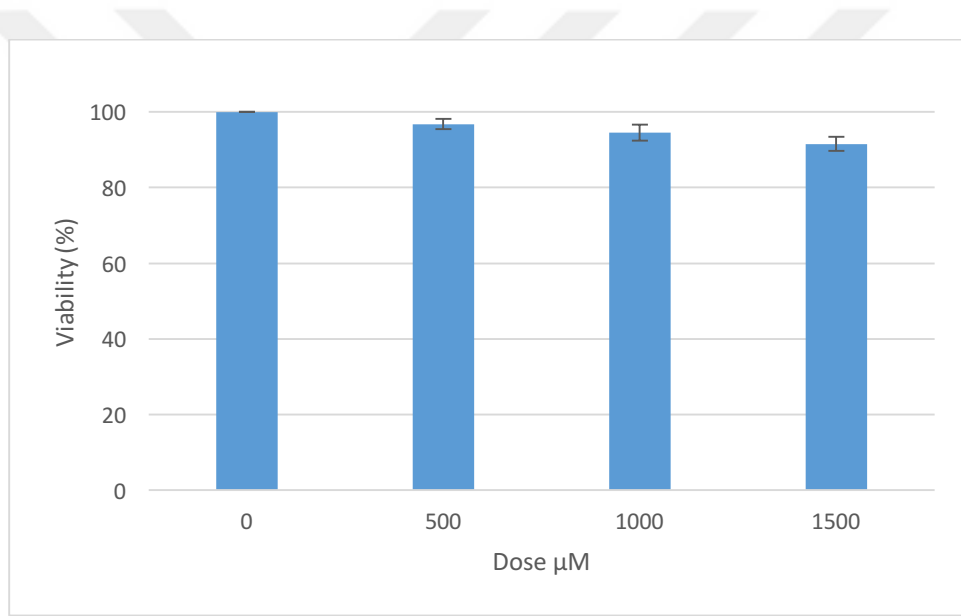


Şekil 4.1. CD133⁺/CD44⁺ prostat kanseri kök hücrelerinin FACS-Aria Cell Sorter ile ayrılması.

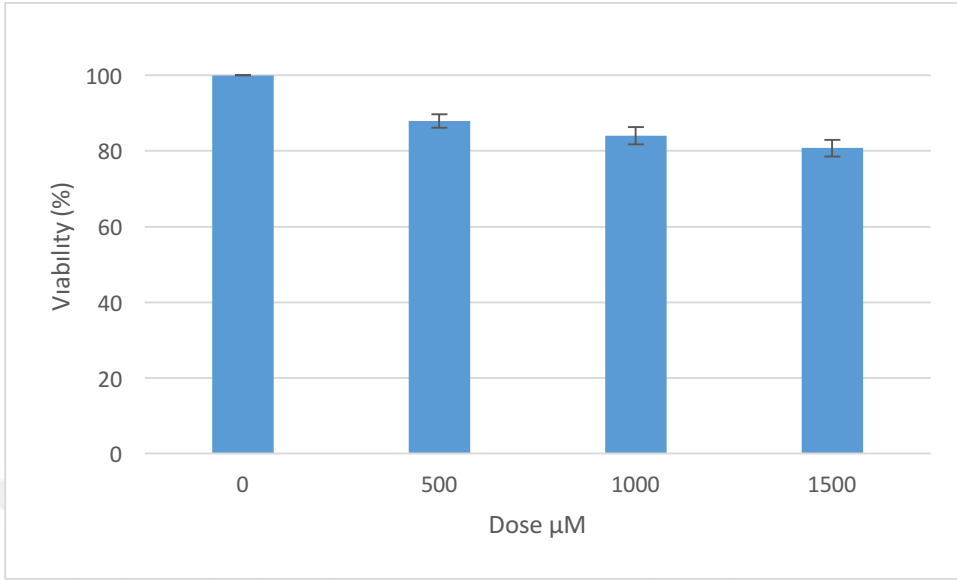
4.2. Canlılık/Viabilite Bulguları

4.2.1. DU-145 insan prostat kanseri hücre kültüründe DETA NONOate'in sitotoksik etkilerinin incelenmesi

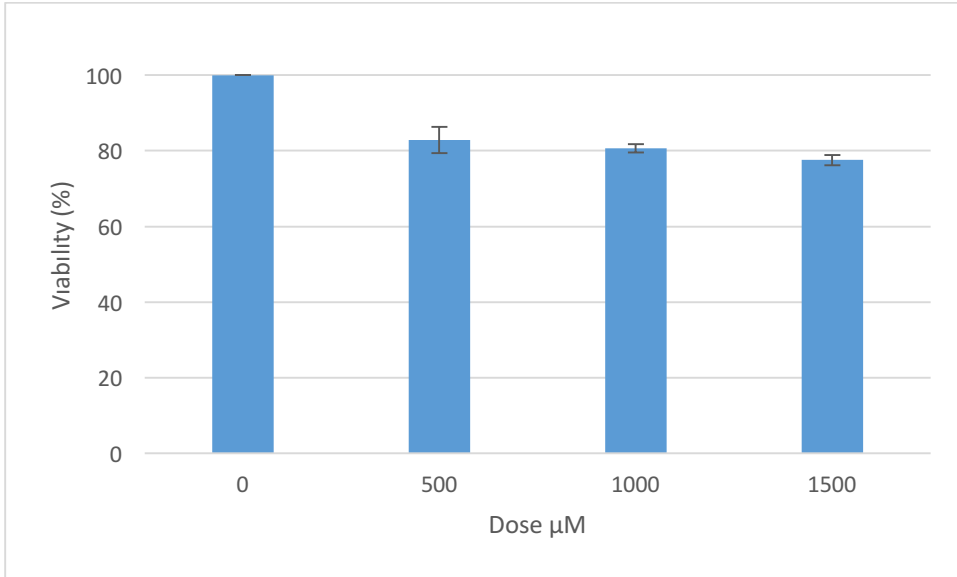
DETA NONOate'in DU-145 insan prostat kanser kök hücreleri (DU-145 KKH) ve kanser kök hücre dışında kalan hücrelerin (DU-145 non-KKH) canlılığı üzerine etkileri, artan dozlara (0, 500, 1000 ve 1500 μ M) ve zamanlara (24, 48 ve 72 saat) bağlı olarak incelendi. Bu bulgular Şekil 4.2 – 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Giderek artan dozlarda DETA NONOat'ın 24. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

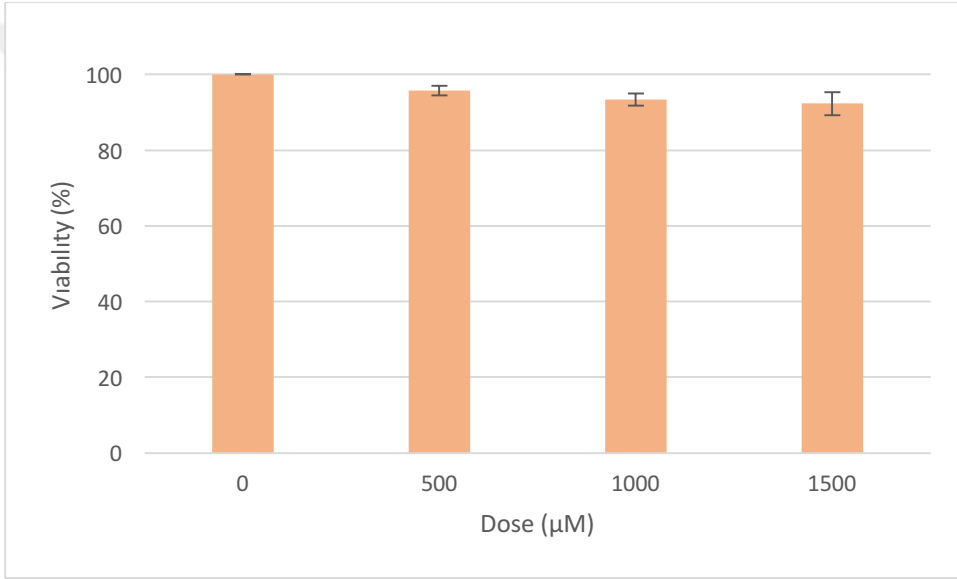


Şekil 4.3. Giderek artan dozlarda DETA NONOat'ın 48. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

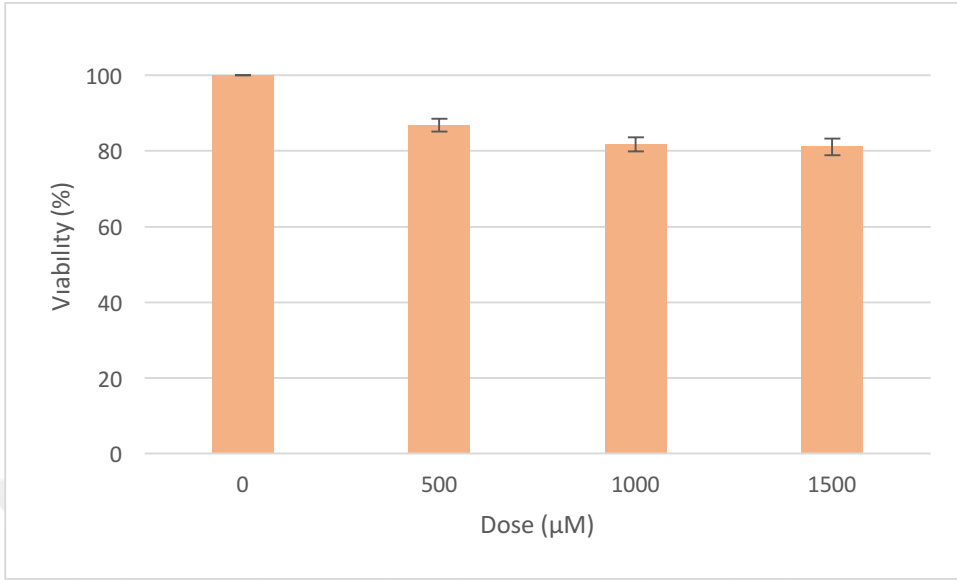


Şekil 4.4. Giderek artan dozlarda DETA NONOat'ın 72. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

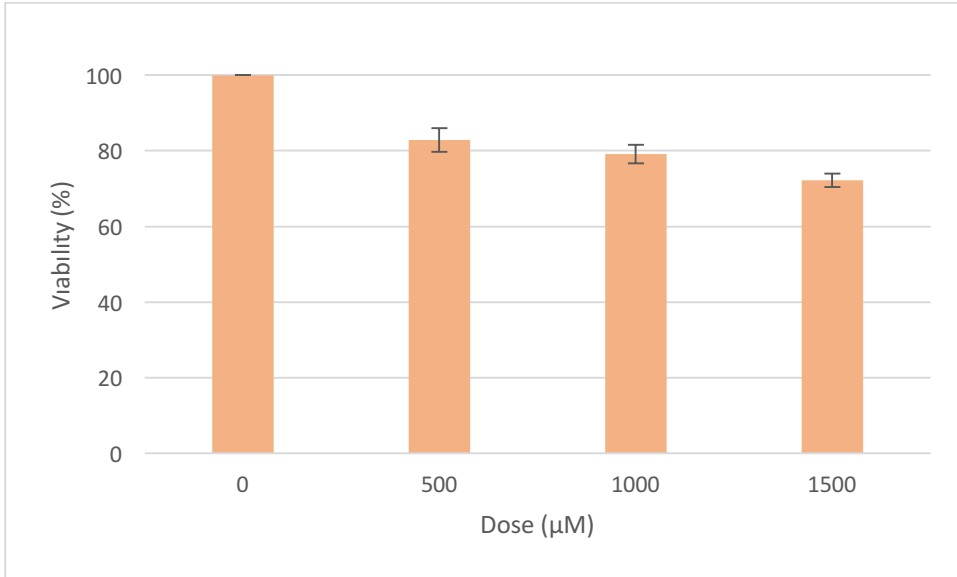
DETA NONOate ile 24 saat muamele sonunda, DU-145 KKH'leri kontrol ile kıyaslandığında 500, 1000 ve 1500 μM DETA NONOate konsantrasyonlarında sırası ile %96.79, %94.49 ve %91.55 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.2). 48 saat muamele sonunda aynı ZA konsantrasyonlarında sırası ile %87.94, %84.01 ve %80.81 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.3). 72. saatte ise DU-145 KKH'leri kontrol ile kıyaslandığında aynı konsantrasyonlarda sırası ile %82.87, %80.60 ve %77.53 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. Giderek artan dozlarda DETA NONOat'ın 24. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

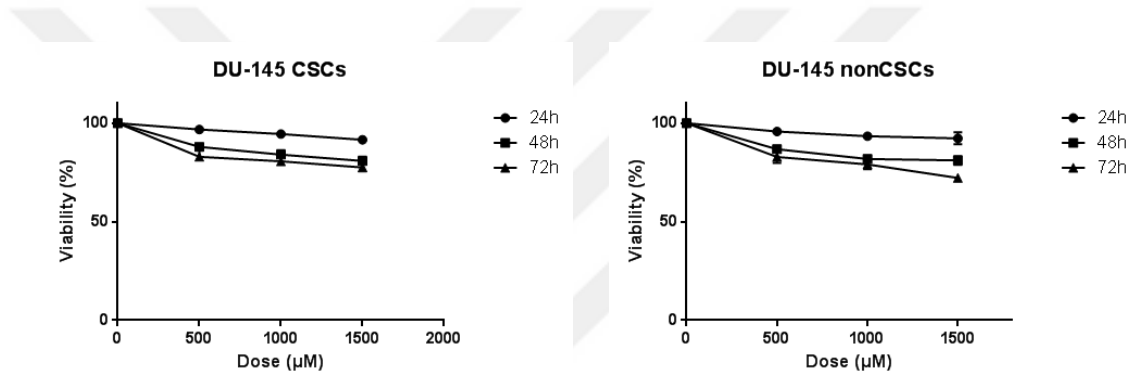


Şekil 4.6. Giderek artan dozlarda DETA NONOat'ın 48. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.



Şekil 4.7. Giderek artan dozlarda DETA NONOat'ın 72. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

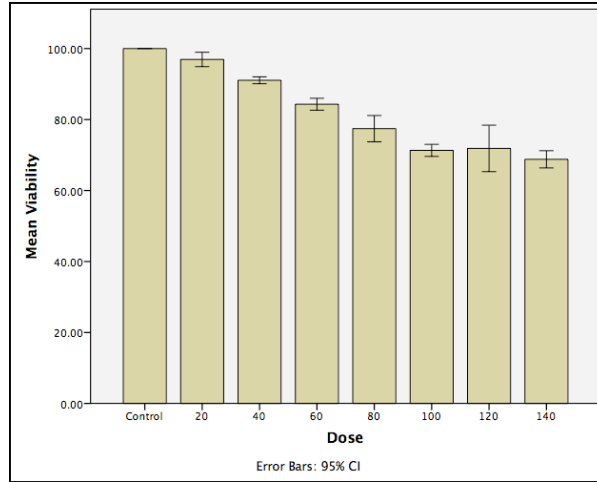
DETA NONOate ile 24 saat muamele sonunda, DU-145 non-KKH'leri kontrol ile kıyaslandığında 500, 1000 ve 1500 μM DETA NONOate konsantrasyonlarında sırası ile %95.76, %93.40 ve %92.29 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.5). 48 saat muamele sonunda aynı DETA NONOate konsantrasyonlarında sırası ile %86.80, %81.76 ve %81.09 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.6). 72. saatte ise DU-145 KKH'leri kontrol ile kıyaslandığında aynı konsantrasyonlarda sırası ile %82.85, %79.10 ve %72.21 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.7).



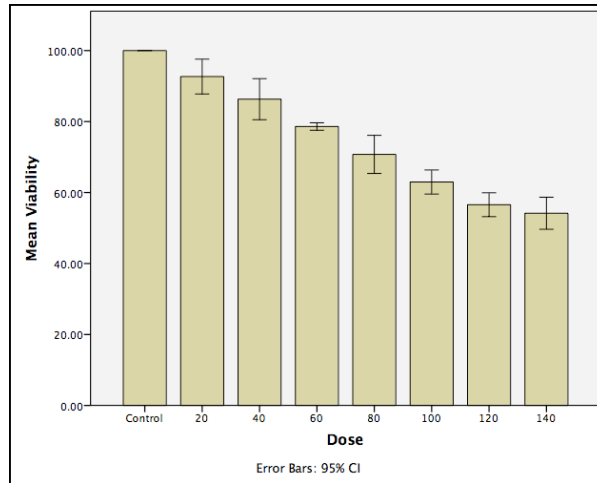
Şekil 4.8. DETA NONOate'ın farklı doz ve sürelerde tüm gruplarda elde edilen hücre canlılığı değerleri.

4.2.2. DU-145 insan prostat kanseri hücre kültüründe ZA'in sitotoksik etkilerinin incelenmesi

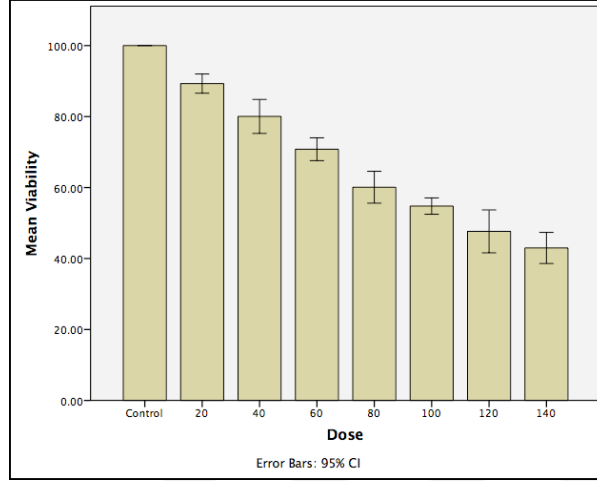
Zoledronik asidin DU-145 insan prostat kanser kök hücreleri (DU-145 KKH) ve kanser kök hücre dışında kalan hücrelerin (DU-145 non-KKH) canlılığı üzerine etkileri, artan dozlara (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 140 μM) ve zamanlara (24, 48 ve 72 saat) bağlı olarak incelendi. Bu bulgular Şekil 4.9 – 4.14' ve 4.15'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Giderek artan dozlarda ZA'ın 24. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

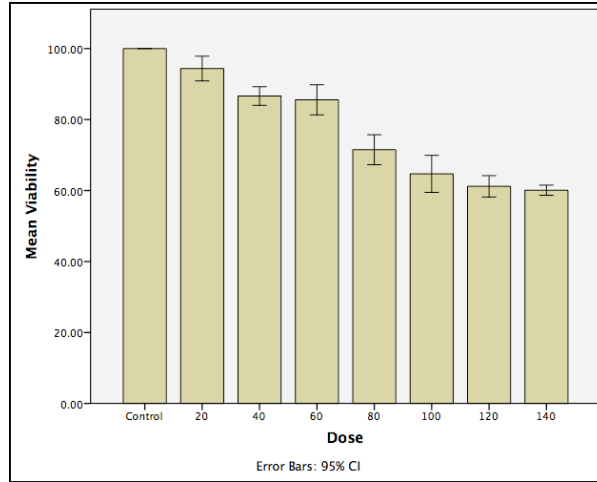


Şekil 4.10. Giderek artan dozlarda ZA'ın 48. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

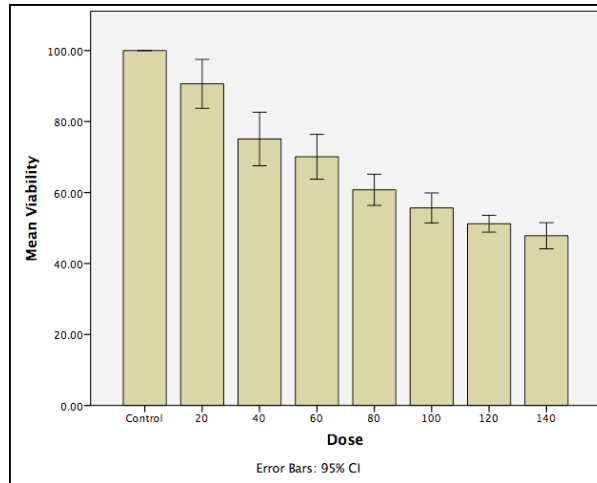


Şekil 4.11. Giderek artan dozlarda ZA'in 72. saatte DU-145 KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

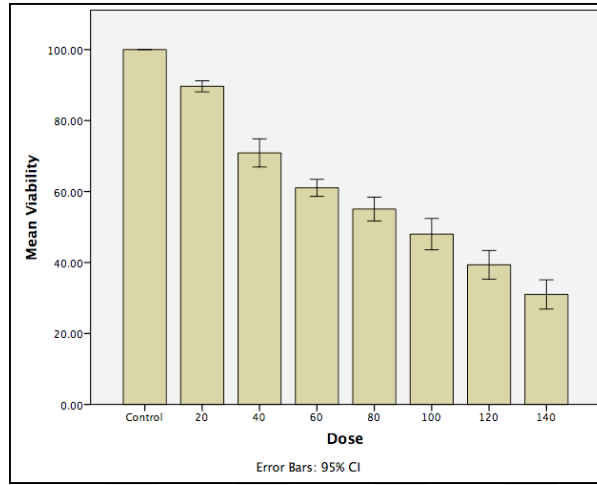
ZA ile 24 saat muamele sonunda, DU-145 KKH'leri kontrol ile kıyaslandığında 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 140 μM ZA konsantrasyonlarında sırası ile %96.94, %91.07, %84.32, %77.44, %71.32, %71.87 ve %68.79 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.9). 48 saat muamele sonunda aynı ZA konsantrasyonlarında sırası ile %92.68, %86.31, %78.61, %70.75, %62.97, %56.57 ve %54.17 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.10). 72. saatte ise DU-145 KKH'leri kontrol ile kıyaslandığında aynı konsantrasyonlarda sırası ile %89.29, %80.04, %70.80, %60.08, %54.78, %47.65 ve %42.98 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.12. Giderek artan dozlarda ZA'nın 24. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.



Şekil 4.13. Giderek artan dozlarda ZA'nın 48. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

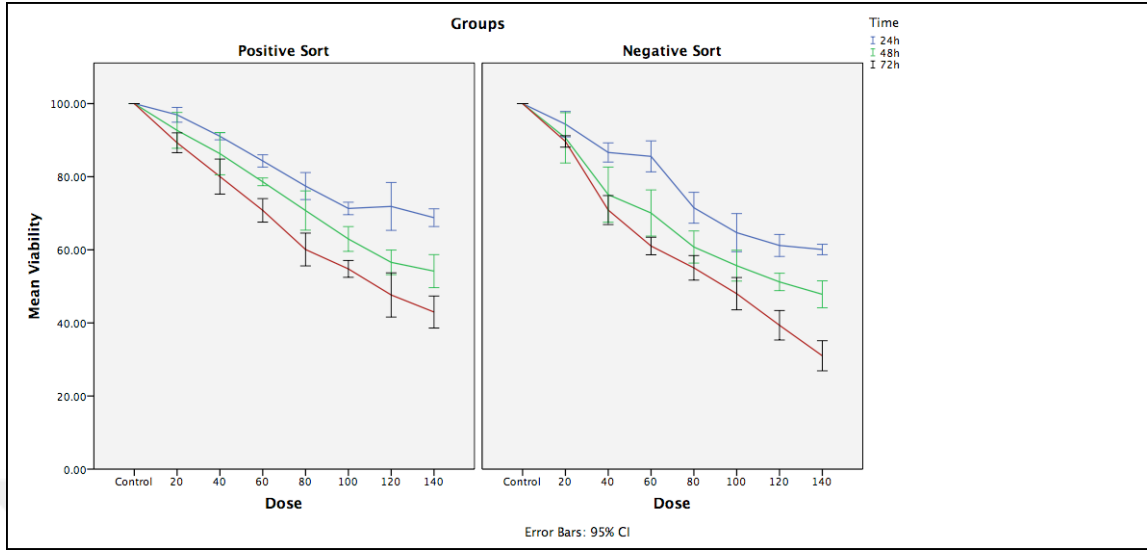


Şekil 4.14. Giderek artan dozlarda ZA'nın 72. saatte DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığı üzerindeki etkileri.

Zoledronik asid ile 24 saat muamele sonunda, DU-145 non-KKH'leri kontrol ile kıyasladığında 20, 40, 60, 80, 100, 120 ve 140 µM ZA konsantrasyonlarında sırası ile %94.37, %86.63, %85.57, %71.51, %64.70, %61.19 ve %60.09 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.12). 48 saat muamele sonunda aynı ZA konsantrasyonlarında sırası ile %90.63, %75.09, %70.07, %60.77, %55.67, %51.22 ve %47.82 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.13). 72. saatte ise DU-145 non-KKH'leri kontrol ile kıyasladığında aynı ZA konsantrasyonlarında sırası ile %89.65, %70.88, %61.04, %55.07, %48, %39.35 ve %31.01 oranlarında viabilite saptandı (Şekil 4.14).

4.3. IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi

Viabilite sonuçlarına göre her bir grup için IC₅₀ değeri hesaplandı. Buna göre prostat kanseri DU-145 KKH'leri için IC₅₀ değeri 108 µM ve 72 saat, DU-145 non-KKH'leri için 96 µM ve 72 saat olarak hesaplandı.



Şekil 4.15. Tüm gruplarda ZA'nin giderek artan doz ve sürelerde elde edilen hücre canlılığı değerleri ve IC_{50} değerlerini gösteren grafikler. *Positive sort:* KKH'leri, *Negative sort:* non-KKH'leri

4.4. DU-145 insan prostat kanseri hücre kültüründe DETA NONOate ve ZA'nin birlikte uygulamasının sitotoksik etkilerinin incelenmesi

DETANONOate ve Zoledronik asidin birlikte uygulanması DU-145 insan prostat kanser kök hücreleri (DU-145 KKH) ve kanser kök hücre dışında kalan hücrelerin (DU-145 non-KKH) canlılığı üzerine etkileri, DETA NONOate'ın 500 ve 1000 μM dozlarına ve ZA'nin IC_{50} değerindeki dozuna ve zamana (72 saat) bağlı olarak incelendi.

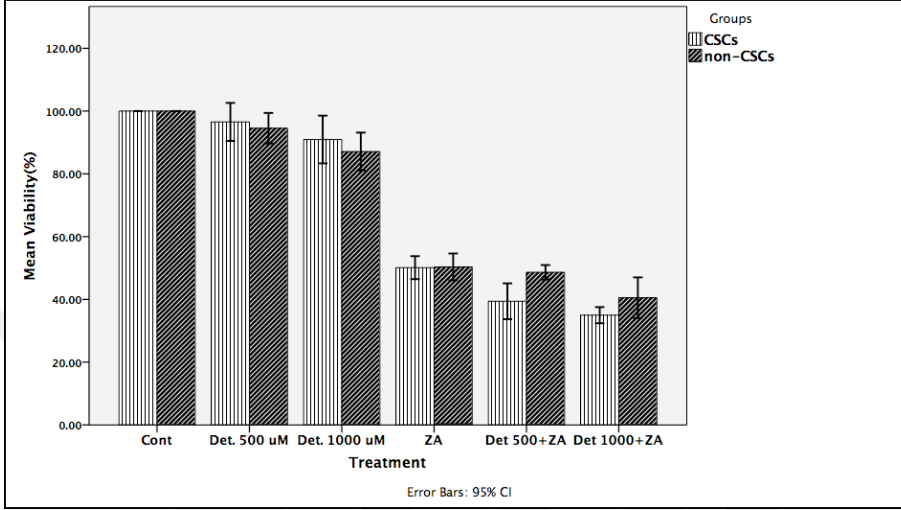
KKH'lerinde:

500 μM DETA NONOate ve IC_{50} konsantrasyonunda ZA uygulanan hücrelerde 39.40 % oranında viabilite saptandı. 1000 μM DETA NONOate ve IC_{50} konsantrasyonunda ZA uygulanan hücrelerde ise 34.97 % oranında viabilite saptandı. Bu bulgular Şekil ve 4.16'de gösterilmiştir.

non-KKH'lerinde:

500 μM DETA NONOate ve IC_{50} konsantrasyonunda ZA uygulanan hücrelerde 48.64 % oranında viabilite saptandı. 1000 μM DETA NONOate ve IC_{50}

konsantrasyonunda ZA uygulanan hücrelerde ise 40.52 % oranında viabilite saptandı. Bu bulgular Şekil ve 4.16'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. DETA NONOate ve Zoledronik asidin insan prostat DU-145 KKH (CSCs) ve non-KKH'lerin (non-CSCs) üzerinde viabilite etkisi

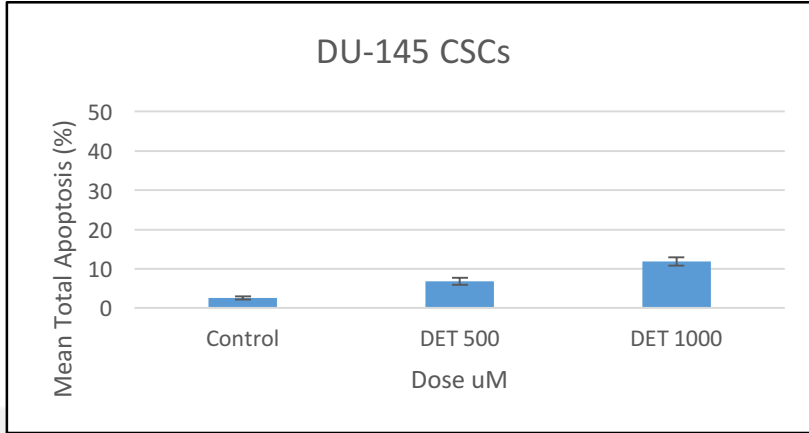
4.5. Apoptozis deneyleri bulguları

4.5.1. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültüründe DETA NONOate'in Apoptotik Etkileri

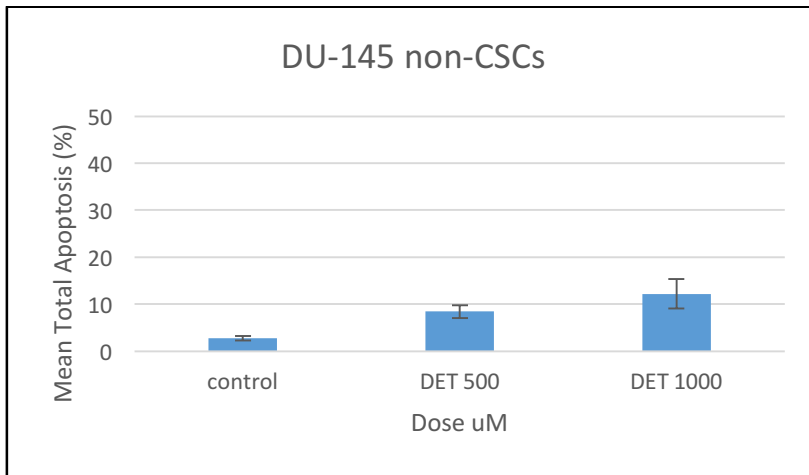
DETA NONOate'in DU-145 KKH'lerine ve DU-145 non-KKH'lerine apoptotik etkisi incelendi. DETA NONOate'in bu hücreler üzerine apoptotik etkisi Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay kiti ile belirlendi. Apoptotik etki canlı hücreler (live cells), erken apoptotik hücreler (early apoptosis), geç apoptotik hücreler (late apoptosis) ve ölmüş hücreler (dead cells) üzerinden değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.17 ve 4.18'de gösterilmiştir.

500 μ M ve 1000 μ M DETA NONOate ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde total apoptoz oranı sırası ile %6.8 ve %13.07, edilmeyenler ise %2.2 olarak saptandı.

500 μ M ve 1000 μ M DETA NONOate ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde total apoptoz oranı sırası ile %8.42 ve %12.21, edilmeyenler ise %2.74 olarak saptandı.



Şekil 4.17. DETA NONOate'ın 500, 1000 μ M konsantrasyonları ile 72 saat muamele edilen DU-145 KKH'lerinde bulunan "total apoptoz" değerleri.



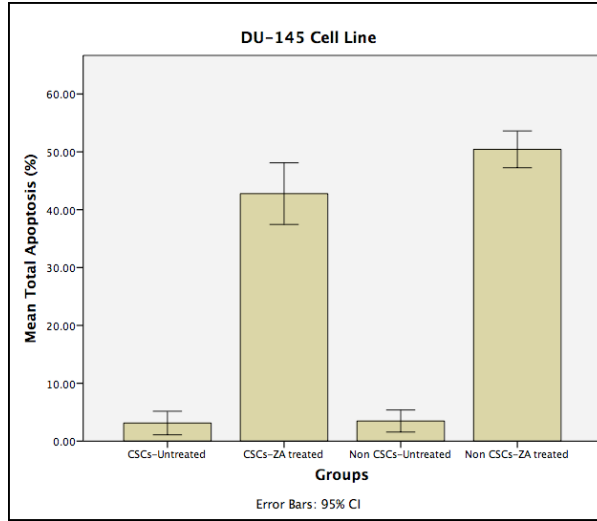
Şekil 4.18. DETA NONOate'ın 500, 1000 μ M konsantrasyonları ile 72 saat muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde bulunan "total apoptoz" değerleri.

4.5.2. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültüründe Zoledronik asidin Apoptotik Etkileri

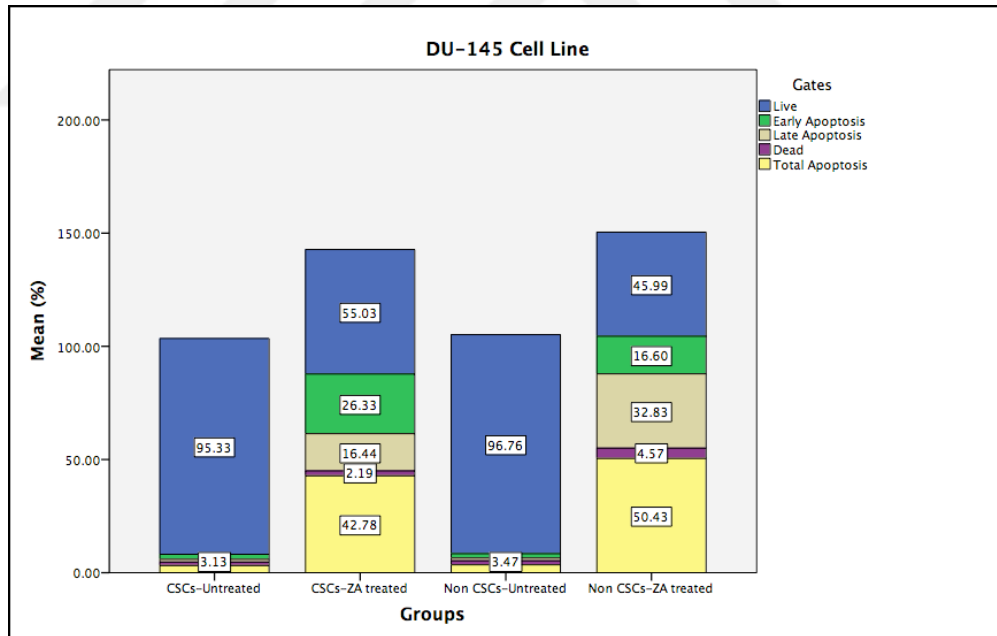
Zoledronik asidin DU-145 KKH'lerinde ve DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığına olan etkilerinin apoptoza bağlı olup olmadığı incelendi. ZA'in bu hücreler üzerine apoptotik etkisi Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay kiti ile belirlendi. Apoptotik etki canlı hücreler (live cells), erken apoptotik hücreler (early apoptosis), geç apoptotik hücreler (late apoptosis) ve ölmüş hücreler (dead cells) üzerinden değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.19 – 4.22'de gösterilmiştir.

Zoledronik asidin DU-145 KKH'lerindeki sitotoksik etkisine göre belirlenen IC₅₀ değerine (108 µM, 72 saat) paralel olarak ZA ile muamelenin toplam apoptotik değerlerde anlamlı bir artışa neden olduğu saptandı (ZA ile muamele edilen KKH'leri: %42.78, edilmeyenler %3.13, p<0.001, Şekil 4.19 - 4.21). ZA ile muamele edilen DU-145 KKH'lerindeki erken apoptotik yüzde değeri ZA ile muamele ile edilmeyenler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırası ile %26.33 ve %2.24, p<0.001, Şekil 4.20). Aynı şekilde, geç apoptotik yüzde değeri de ZA ile muamele ile edilmeyenler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artmış bulundu (sırası ile %16.44 ve %1.22, p<0.001, Şekil 4.20).

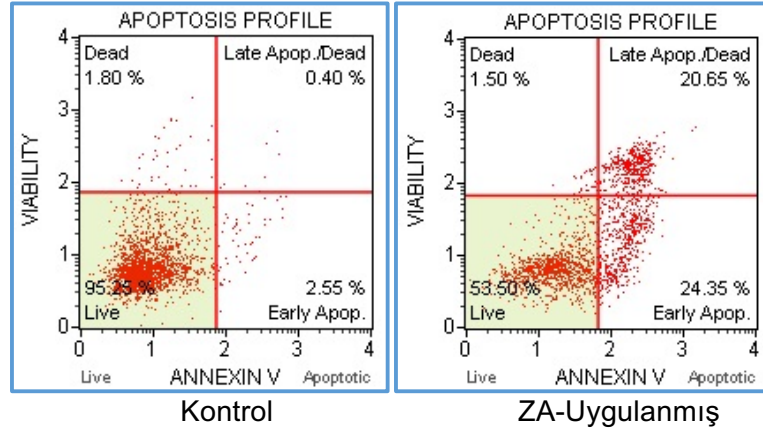
Zoledronik asidin DU-145 non-KKH'lerindeki sitotoksik etkisine göre belirlenen IC₅₀ değerinde (96 µM, 72 saat) ZA ile muamelenin toplam apoptotik değerlerde anlamlı bir artışa neden olduğu saptandı (sırası ile: %50.43 ve %3.47, p<0.001, Şekil 4.19 - 4.20 ve 4.22). Erken apoptotik yüzde değerinde de ZA ile muamele ile edilmeyenler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu (sırası ile: %16.60 ve %1.91, p<0.001, Şekil 7.20). Aynı şekilde, geç apoptotik yüzde değeri de ZA ile muamele ile edilmeyenler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırası ile: %32.83 ve %1.23, p<0.001, Şekil 4.20).



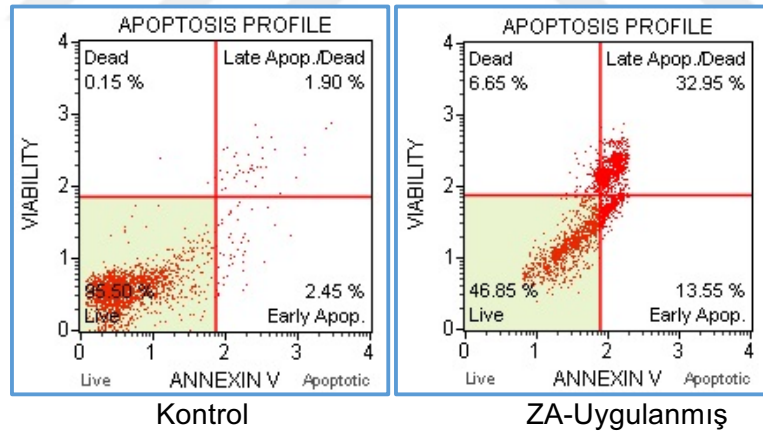
Şekil 4.19. Zoledronik asidin IC₅₀ dozu (108 µM) ile 72 saat muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde bulunan "total apoptosis" değerleri.



Şekil 4.20. Zoledronik asidin IC₅₀ dozu ile 72 saat muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde bulunan apoptotik değerler.



Şekil 4.21. Zoledronik asidin IC_{50} dozu ile 72 saat muamele edilen ($108 \mu M$) DU-145 KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptozis ve erken apoptozis yüzde değerlerini gösteren bir örnek.



Şekil 4.22. Zoledronik asidin IC_{50} değerindeki dozuyla 72 saat muamele edilen DU-145 non-KKH kültürlerinde canlı, ölü, geç apoptozis ve erken apoptozis yüzde değerlerini gösteren bir örnek.

4.5.3. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültüründe DETA NONOate ve Zoledronik asidin birlikte uygulamasının Apoptotik Etkileri

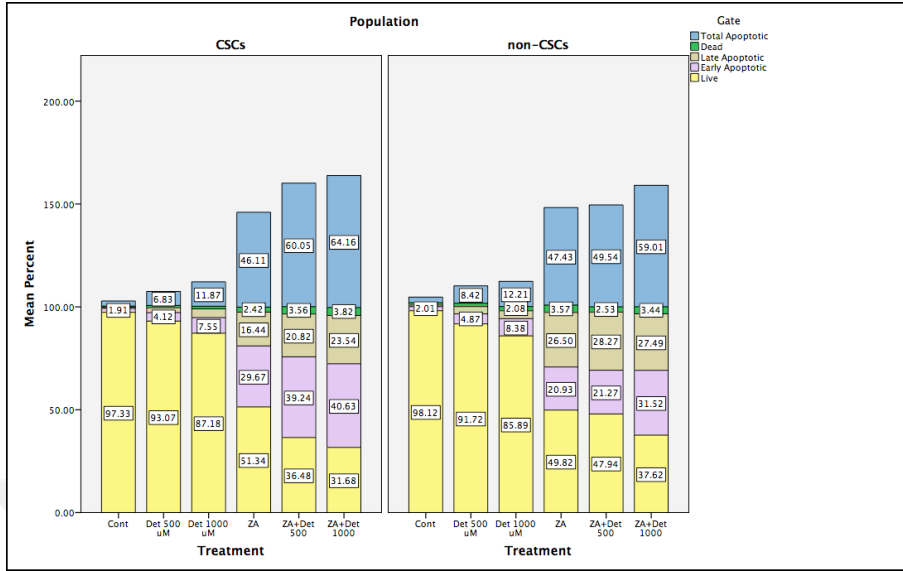
DETA NONOate ve Zoledronik asidin birlikte uygulanması DU-145 KKH'lerinde ve DU-145 non-KKH'lerinde hücre canlılığına olan etkilerinin apoptoza bağlı olup olmadığı incelendi. Bu uygulamanın hücreler üzerine apoptotik etkisi Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay kiti ile belirlendi. Apoptotik etki canlı hücreler (live cells), erken apoptotik hücreler (early apoptosis), geç apoptotik hücreler (late apoptosis) ve ölmüş hücreler (dead cells) üzerinden değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.23 ve 4.24'de gösterilmiştir.

DU-145 KKH'lerinde DETA NONOate'ın 500 µM konsantrasyonu ve Zoledronik asidin DU-145 KKH'lerindeki belirlenen IC₅₀ değerine (108 µM, 72 saat) birlikte olarak, muamelenin toplam apoptotik değerlerde anlamlı bir artışa neden olduğu saptandı (birlikte muamele edilen KKH'leri: %60.05, sadece ZA ile muamele edilenler %46.11 ve muamele edilmeyenler %1.91, Şekil 4.23 ve 4.24).

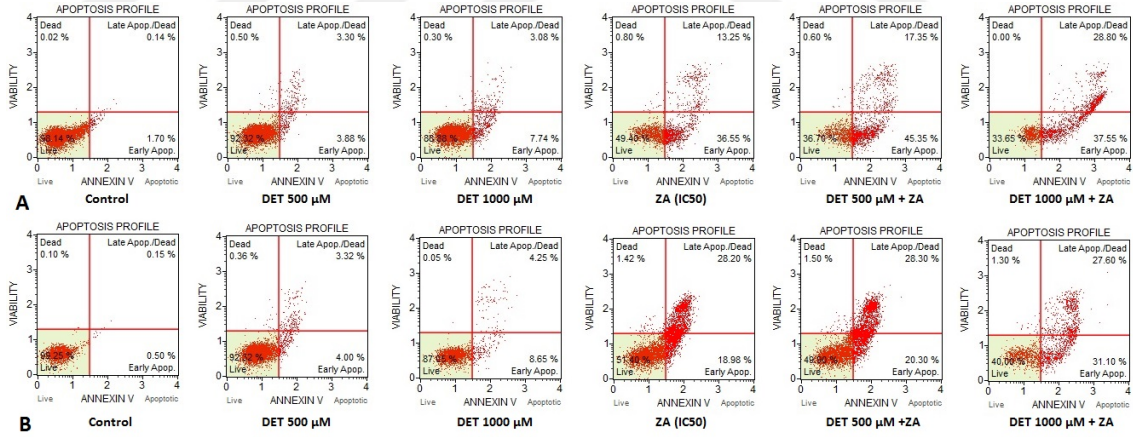
DU-145 KKH'lerinde DETA NONOate'ın 1000 µM konsantrasyonu ve Zoledronik asidin DU-145 KKH'lerindeki belirlenen IC₅₀ değerine (108 µM, 72 saat) birlikte olarak, muamelenin toplam apoptotik değerlerde anlamlı bir artışa neden olduğu saptandı (birlikte muamele edilen KKH'leri: %64.16, sadece ZA ile muamele edilenler %46.11 ve muamele edilmeyenler %1.91, Şekil 4.23 ve 4.24).

DU-145 non-KKH'lerinde DETA NONOate'ın 500 µM konsantrasyonu ve Zoledronik asidin non-DU-145 KKH'lerindeki belirlenen IC₅₀ değerine (96 µM, 72 saat) birlikte olarak, muamelenin toplam apoptotik değerlerde anlamlı bir artışa neden olmadığı saptandı (birlikte muamele edilen KKH'leri: %49.54, sadece ZA ile muamele edilenler %47.43 ve muamele edilmeyenler %2.01, Şekil 4.23 ve 4.24).

DU-145 non-KKH'lerinde DETA NONOate'ın 1000 µM konsantrasyonu ve Zoledronik asidin DU-145 non-KKH'lerindeki belirlenen IC₅₀ değerine (96 µM, 72 saat) birlikte olarak, muamelenin toplam apoptotik değerlerde anlamlı bir artışa neden olduğu saptandı (birlikte muamele edilen KKH'leri: %59.01, sadece ZA ile muamele edilenler %47.43 ve muamele edilmeyenler %2.01, Şekil 4.23 ve 4.24).



Şekil 4.23. DETA NONOate ve Zoledronik asid ile birlikte muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde bulunan apoptotik değerler.



Şekil 4.24. DETA NONOate ve Zoledronik asid ile birlikte muamele edilen DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde canlı, ölü, geç apoptosis ve erken apoptozis yüzde değerlerini gösteren bir örnek.

4.6. Gen ekspresyon deneyleri

4.6.1. İnsan Prostat Kanseri DU-145 Hücre Kültürlerinde Zoledronik asidin Apoptozis ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerine etkileri

Gen ekspresyonunu incelemek amacı ile Human Cell RT² Profiler™ PCR Array Kiti (SABiosciences, PAHS-405F-12) kullanıldı ve test sonuçları kitin satın alındığı firmanın yazılımıyla analiz edildi. Kısaca, gruptaki gen ifade değişimleri, baz alınan kontrol grubundaki değişimlerin katı cinsinden belirlendi. Kat değişim (FC-Fold change) analizi yapılarak 3'den büyük kat değişimleri her bir prob için anlamlı artış ve azalış olarak belirtildi. Bulgular Tablo 4.1 ve 4.2 de verilmiştir.

KKH'leri

DU-145 KKH'leri IC₅₀ dozunda 72 saat boyunca ZA ile inkübe edilerek apoptoz ile ilişkili olan genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile incelendi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, 6 gende anlamlı değişim gözlemlendi. *CASP9*, *CASP4*, *BAX* ve *BAD* genlerinin ekspresyon düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu (Ortalama ± Standart sapma, sırası ile: FC = 4.507 ± 0.73, 4.339 ± 0.07, 3.589 ± 0.23 ve 3.458 ± 0.38, Tablo 4.1 ve Şekil 4.25). *BIRC3*, *BIRC2* ve *BCL2* genlerinin ekspresyon düzeylerinin ise anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Ortalama ± Standart sapma, sırası ile: FC = -4.755 ± 0.30, -4.449 ± 0.32 ve -4.545 ± 0.47, Tablo 4.1 ve Şekil 4.25).

Tablo 4.1. IC₅₀ dozu ve 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.

Gen Sembolu		Ortalama ± Standart sapma	
1	AKT1	-1.240	±0.29
2	APAF1	1.309	±0.29
3	AVEN	-1.300	±0.23
4	BAD	3.458	±0.38

5	BAG1	1.306	±0.21
6	BAK1	1.146	±0.23
7	BAX	3.589	±0.23
8	BBC3	1.160	±0.07
9	BCL2	-4.545	±0.47
10	BCL2L1	-1.208	±0.03
11	BCL2L10	1.204	±0.20
12	BCL2L11	1.172	±0.27
13	BCL2L13	-1.199	±0.28
14	BCL2L2	-1.415	±0.46
15	BID	1.436	±0.38
16	BIK	1.035	±0.02
17	BIRC2	-4.449	±0.32
18	BIRC3	-4.755	±0.30
19	BIRC5	1.431	±0.16
20	BOK	1.334	±0.46
21	CAD	1.232	±0.09
22	CASP1	1.204	±0.10
23	CASP10	1.252	±0.16
24	CASP12	-1.313	±0.29
25	CASP14	1.149	±0.15
26	CASP2	2.226	±0.25
27	CASP3	1.049	±0.02
28	CASP4	4.339	±0.07
29	CASP5	1.196	±0.10
30	CASP6	1.343	±0.14
31	CASP7	1.241	±0.07
32	CASP8	2.222	±0.83
33	CASP8AP2	-1.354	±0.26
34	CASP9	4.507	±0.73
35	CFLAR	-1.361	±0.28
36	CRADD	1.267	±0.27
37	DFFA	-2.145	±0.14
38	DIABLO	1.363	±0.33
39	endoG	1.205	±0.14
40	FADD	1.267	±0.25
41	FAM96A	1.370	±0.08
42	FAM96B	-1.744	±0.20
43	FAS	1.032	±0.03
44	FASLG	1.137	±0.12
45	HMGB1	-1.184	±0.10
46	HRK	-1.274	±0.28
47	HSP90B1	2.742	±0.28
48	HTRA2	-1.264	±0.31
49	LRDD	1.085	±0.03
50	MCL1	1.156	±0.07
51	NFKB1	2.502	±0.07

52	NFKB2	-1.128	±0.02
53	NGFR	1.253	±0.17
54	PMAIP1	1.239	±0.19
55	PTEN	1.273	±0.36
56	REL	1.195	±0.31
57	RELA	1.086	±0.07
58	RELB	-1.082	±0.01
59	SOCS2	1.566	±0.12
60	SOCS3	1.349	±0.27
61	STAT1	2.095	±0.08
62	STAT5A	1.429	±0.27
63	STAT5B	1.103	±0.05
64	TNF	1.606	±0.04
65	TNFRSF10A	-1.417	±0.32
66	TNFRSF10B	-1.429	±0.29
67	TNFRSF10C	1.415	±0.35
68	TNFRSF11B	1.062	±0.02
69	TNFRSF1A	-1.226	±0.23
70	TNFRSF1B	1.264	±0.11
71	TNFRSF21	-1.157	±0.15
72	TNFRSF25	-1.073	±0.07
73	TNFSF10	-1.201	±0.22
74	TNFSF11	1.373	±0.29
75	TNFSF8	-1.263	±0.14
76	TP53	1.368	±0.11
77	TP53I3	1.096	±0.04
78	TRAF1	1.341	±0.33
79	TRAF2	1.110	±0.10
80	TRAF3	1.118	±0.05
81	TRAF4	1.371	±0.45
82	TRAF5	1.236	±0.07
83	TRAF6	1.127	±0.08
84	TRAF7	1.211	±0.10

Tablo 4.2. IC₅₀ doz ve süresi boyunca DU-145 non-KKH'lerine Zoledronik asid uygulanarak RT-PCR analizi sonucunda apoptozis ile ilişkili genlerinin elde edilen ekspresyon değışiklikleri kat cinsinden ilaç uygulanmamış kontrol hücrelere göre gösterilmiştir.

Gen Sembolu		Ortalama ± Standart sapma	
1	AKT1	1.066	±0.06
2	APAF1	-1.353	±0.04
3	AVEN	-1.244	±0.10
4	BAD	3.442	±0.24
5	BAG1	0.911	±0.74
6	BAK1	-1.216	±0.17
7	BAX	2.488	±0.47
8	BBC3	-0.872	±0.61
9	BCL2	-4.488	±0.15
10	BCL2L1	-1.090	±0.92
11	BCL2L10	1.176	±0.04
12	BCL2L11	-0.845	±0.38
13	BCL2L13	1.283	±0.23
14	BCL2L2	1.113	±0.04
15	BID	1.102	±0.06
16	BIK	-1.108	±0.06
17	BIRC2	-3.151	±0.40
18	BIRC3	-3.160	±0.20
19	BIRC5	-1.051	±0.06
20	BOK	-1.258	±0.32
21	CAD	1.254	±0.11
22	CASP1	1.135	±0.18
23	CASP10	1.518	±0.27
24	CASP12	-1.454	±0.36
25	CASP14	1.213	±0.15
26	CASP2	1.180	±0.05
27	CASP3	2.193	±0.28
28	CASP4	1.087	±0.01
29	CASP5	-1.144	±0.15
30	CASP6	-1.434	±0.26
31	CASP7	4.981	±0.74
32	CASP8	1.118	±0.14
33	CASP8AP2	1.050	±0.05
34	CASP9	-1.059	±0.03
35	CFLAR	-1.347	±0.32
36	CRADD	-1.242	±0.10
37	DFFA	1.606	±0.32
38	DIABLO	-1.360	±0.22

39	endoG	1.126	±0.06
40	FADD	-1.221	±0.12
41	FAM96A	-1.280	±0.30
42	FAM96B	1.473	±0.40
43	FAS	-1.151	±0.12
44	FASLG	-1.112	±0.07
45	HMGB1	-1.343	±0.28
46	HRK	-1.250	±0.28
47	HSP90B1	-1.365	±0.23
48	HTRA2	1.336	±0.36
49	LRDD	-1.153	±0.15
50	MCL1	-1.078	±0.06
51	NFKB1	1.141	±0.15
52	NFKB2	-1.226	±0.38
53	NGFR	1.069	±0.05
54	PMAIP1	-1.416	±0.32
55	PTEN	1.372	±0.34
56	REL	-1.171	±0.10
57	RELA	-1.153	±0.06
58	RELB	1.225	±0.07
59	SOCS2	1.495	±0.15
60	SOCS3	1.347	±0.40
61	STAT1	1.274	±0.13
62	STAT5A	-1.115	±0.08
63	STAT5B	-1.277	±0.23
64	TNF	1.682	±0.39
65	TNFRSF10A	1.203	±0.08
66	TNFRSF10B	1.522	±0.38
67	TNFRSF10C	-1.413	±0.32
68	TNFRSF11B	-1.278	±0.19
69	TNFRSF1A	-1.201	±0.14
70	TNFRSF1B	-1.438	±0.36
71	TNFRSF21	-1.379	±0.23
72	TNFRSF25	-1.067	±0.01
73	TNFSF10	1.460	±0.24
74	TNFSF11	-1.100	±0.04
75	TNFSF8	1.323	±0.47
76	TP53	-1.136	±0.04
77	TP53I3	1.369	±0.17
78	TRAF1	-1.153	±0.07
79	TRAF2	-1.233	±0.14
80	TRAF3	1.245	±0.14
81	TRAF4	1.194	±0.30
82	TRAF5	1.271	±0.07
83	TRAF6	1.136	±0.09
84	TRAF7	-1.214	±0.15

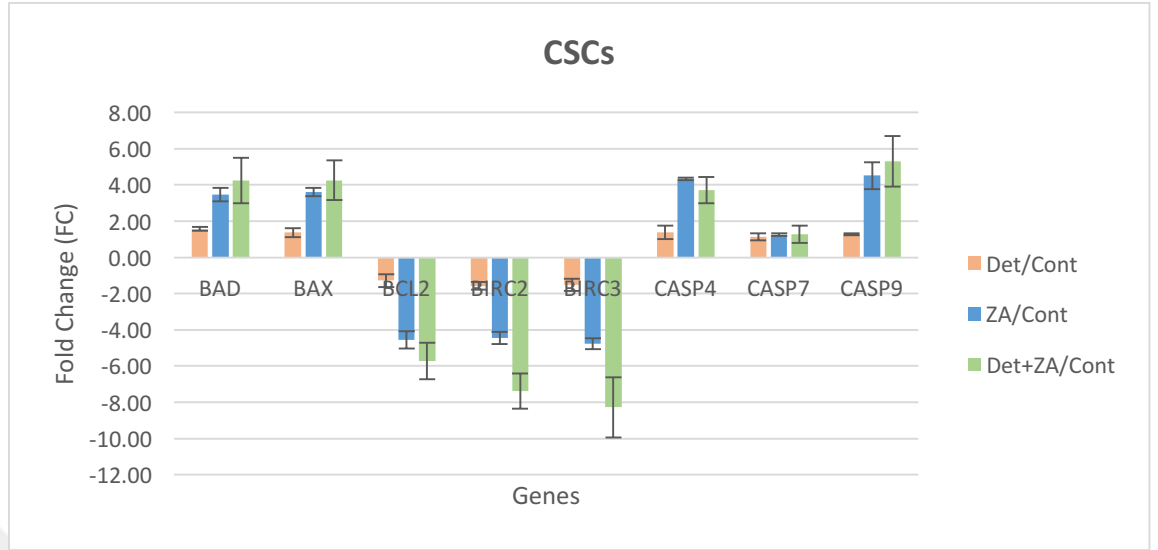
Tablo 4.3. DETA NONOate, ZA ve DETANONOate ile ZA'in birlikte uygulanması sonrası, DU-145 KKH ve non-KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.

Gen Sembolu	Açıklama	Det/kont.	FC: KKH'leri			FC: non-KKH'leri		
			ZA/Cont.	Det+ZA/kont.		Det/kont.	ZA/kont.	Det+ZA/kont.
<i>BAD</i>	BCL2-Associated Agonist of Cell Death	1.573±0.12	3.458±0.38	4.237±1.25		1.331±0.36	3.442±0.24	3.142±0.40
<i>BAX</i>	BCL2-Associated X Protein	1.362±0.26	3.589±0.23	4.253±1.10		1.307±0.18	2.488±0.47	3.188±0.43
<i>BCL2</i>	B-Cell CLL/Lymphoma 2	-1.279±0.36	-4.545±0.47	-5.716±1.01		-1.284±0.39	-4.488±0.15	-4.922±0.94
<i>BIRC2</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 2	-1.576±0.21	-4.449±0.32	-7.389±0.98		-1.354±0.26	-3.151±0.40	-3.717±1.03
<i>BIRC3</i>	Baculoviral IAP Repeat Containing 3	-1.517±0.34	-4.755±0.30	-8.278±1.66		-1.434±0.26	-3.160±0.20	-3.827±1.36
<i>CASP4</i>	Kaspaz 4	1.378±0.37	4.339±0.07	3.711±0.72		1.328±0.26	1.087±0.01	1.421±0.57
<i>CASP7</i>	Kaspaz 7	1.127±0.19	1.241±0.07	1.282±0.47		1.308±0.37	4.981±0.74	4.414±1.41
<i>CASP9</i>	Kaspaz 9	1.271±0.07	4.507±0.73	5.300±1.40		1.369±0.17	2.392±0.56	2.759±0.81

KKH'leri:

Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde ekspresyon seviyesi anlamlı artan *BAD*, *BAX*, *CASP4* ve *CASP9* genlerinde, DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edildikten sonra aynı genlerin ekspresyon seviyesi artmış oldu, ancak sadece ZA ile uygulandığı değerlerden anlamlı bir fark göstermedi (Ortalama ± Standart sapma, sırası ile: FC = 4.237 ± 1.25, 4.253 ± 1.10, 3.711 ± 0.72 ve 5.300 ± 1.40, Tablo 4.3 ve Şekil 4.27).

Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde ekspresyon seviyesi anlamlı azalan *BIRC2*, *BIRC3* ve *Bcl-2* genlerinde, DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edildikten sonra aynı genlerin ekspresyon seviyesinde düşüş oldu, ancak *BIRC2* ve *BIRC3* genlerinde ekspresyon seviyesi sadece ZA ile uygulandığı değerlerden anlamlı derecede daha da düşüş gösterdi. *Bcl-2* geni ise sadece ZA ile uygulandığı değerlerden anlamlı bir fark görülmedi (Ortalama ± Standart sapma, sırası ile: FC = -7.389 ± 0.98, -8.278 ± 1.66 ve -5.716 ± 1.01, Tablo 4.3 ve Şekil 4.27).

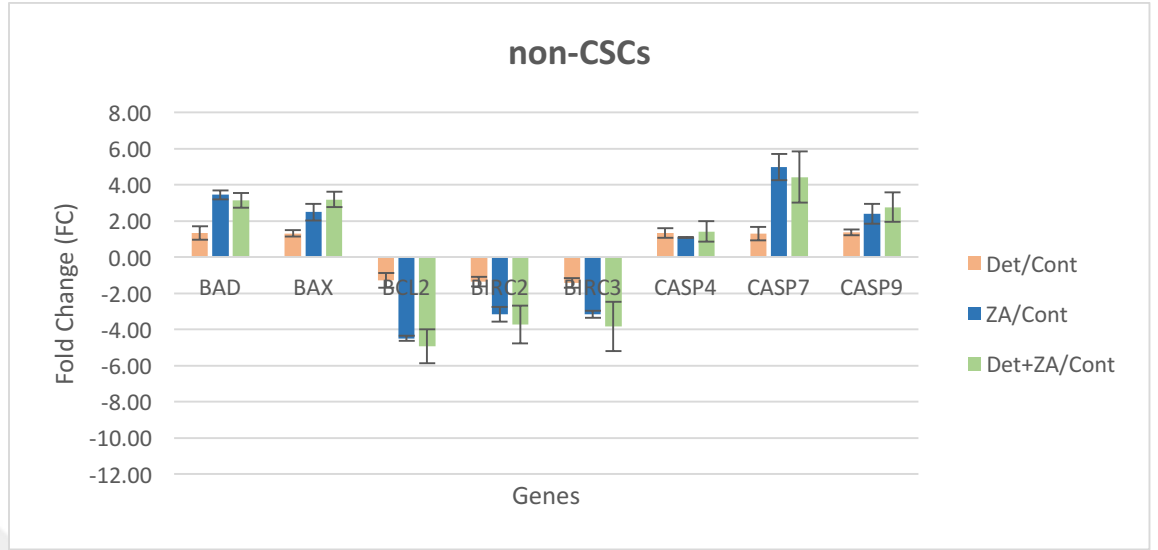


Şekil 4.27. DETA NONOat'ın 500 µM konsantrasyonu ile muamele edilen, IC₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate ve ZA ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.

non-KKH'leri:

Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde ekspresyon seviyesi anlamlı artan *BAD* ve *CASP7* genlerinde, DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edildikten sonra aynı genlerin ekspresyon seviyesi artmış oldu, ancak sadece ZA ile uygulandığı değerlerden anlamlı bir fark göstermedi (Ortalama ± Standart sapma, sırası ile: FC = 3.142 ± 0.40 ve 4.414 ± 1.41, Tablo 4.3 ve Şekil 4.28).

Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde ekspresyon seviyesi anlamlı azalan *BIRC2*, *BIRC3* ve *Bcl-2* genlerinde, DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edildikten sonra aynı genlerin ekspresyon seviyesi azalmış oldu, ancak sadece ZA ile uygulandığı değerlerden anlamlı bir fark göstermedi (Ortalama ± Standart sapma, sırası ile: FC = -4.922 ± 0.94, -3.717 ± 1.03 ve -3.827 ± 1.36, Tablo 4.3 ve Şekil 4.28).



Şekil 4.28. DETA NONOat'ın 500 μ M konsantrasyonu ile muamele edilen, IC₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate + ZA ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerde RT-PCR analizi ile belirlenen ekspresyon değişikliklerinin ilaç uygulanmamış hücrelerdekine (kontrol) göre kat değişimi (FC) cinsinden değerleri.

4.7. DETA NONOate ve Zoledronik asidin gen ifadesini anlamlı etkilediği apoptotik proteinlerin İmmunofloresans boyama yöntemi ile doğrulanması

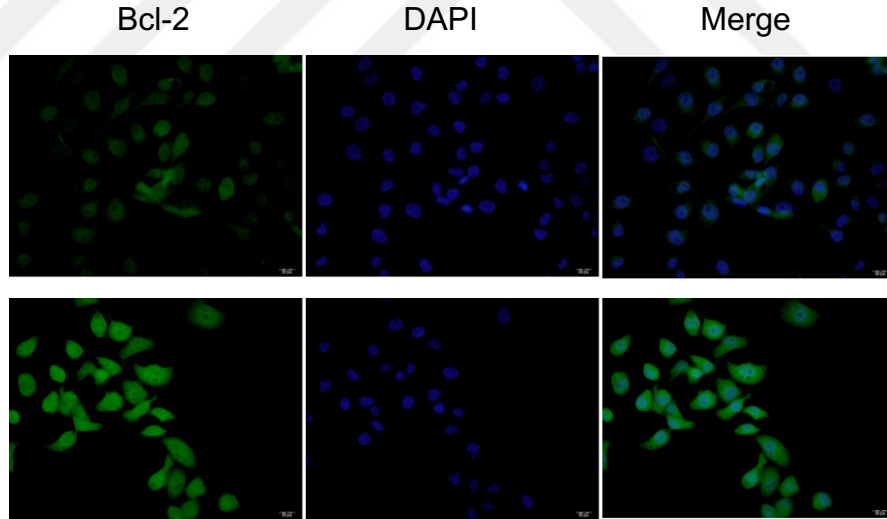
DETA NONOat'ın 500 μ M konsantrasyonu ile muamele edilen, IC₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edilen DU-145 KKH ve DU-145 non-KKH'de hücrelerinde, gen ifadelerinde anlamlı değişiklik bulunan apoptotik proteinler, immunofloresan boyama yöntemi ile incelendi. DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edilmiş ve gen ekspresyonunda sadece ZA ile muamele edilmiş hücrelerin gen ekspresyonundan anlamlı derecede değişiklik göstermiş olan genlerin proteinlerinde ortaya çıkan değişimler incelendi.

KKH'lerinde, ZA ile muamele edilmeyen kontrol grubu ile kıyaslandığında, Kaspaz-9, Kaspaz-4 ve BAD pro-apoptotik proteinlerinde floresans miktarında artış görülürken, BIRC2, BIRC3 ve Bcl-2 anti-apoptotik proteinlerinde floresans miktarında azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.29 - 4.40).

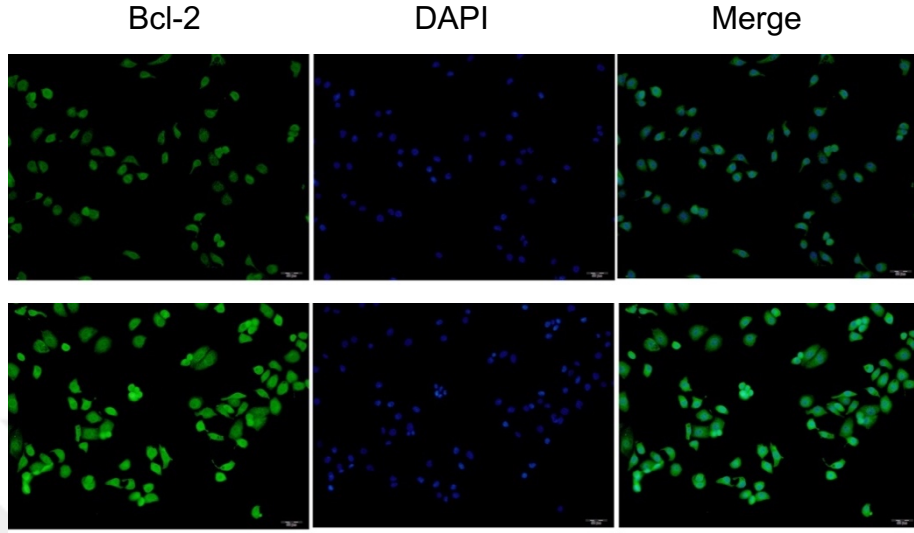
KKH'lerinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında, DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edilen hücrelerde, sadece ZA ile muamele edilmiş hücrelere göre, BIRC 2 ve BIRC3 proteinlerinde floresans miktarında azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.41 - 4.44).

Non-KKH'lerinde, ZA eklenmeyen kontrol grubu ile kıyaslandığında, Kaspaz-3 ve BAX pro-apoptotik proteinlerinin floresan miktarında artış, BIRC2, BIRC3 ve Bcl-2 anti-apoptotik proteinlerindeki floresansda ise azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.29 - 4.40).

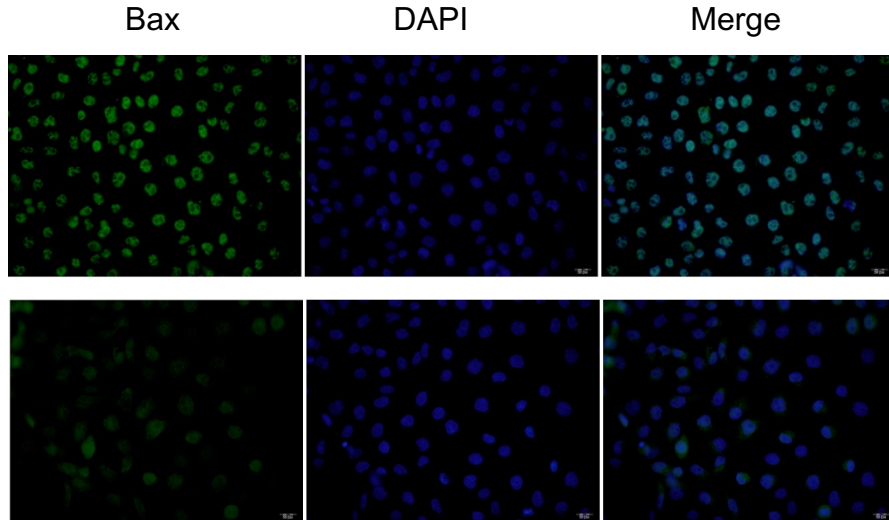
Non-KKH'lerinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında, DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edilen hücrelerde, sadece ZA ile muamele edilmiş hücrelere göre, BIRC 2 ve BIRC3 proteinlerinde floresans miktarında anlamlı bir değişiklik tespit edilemedi (Şekil 4.41 - 4.44).



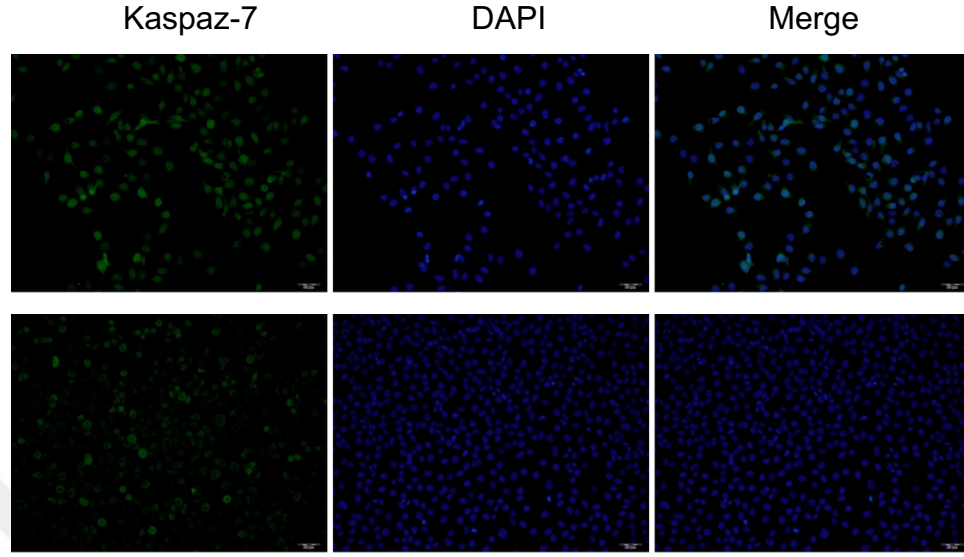
Şekil 4.29. IC₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bcl-2 proteininde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



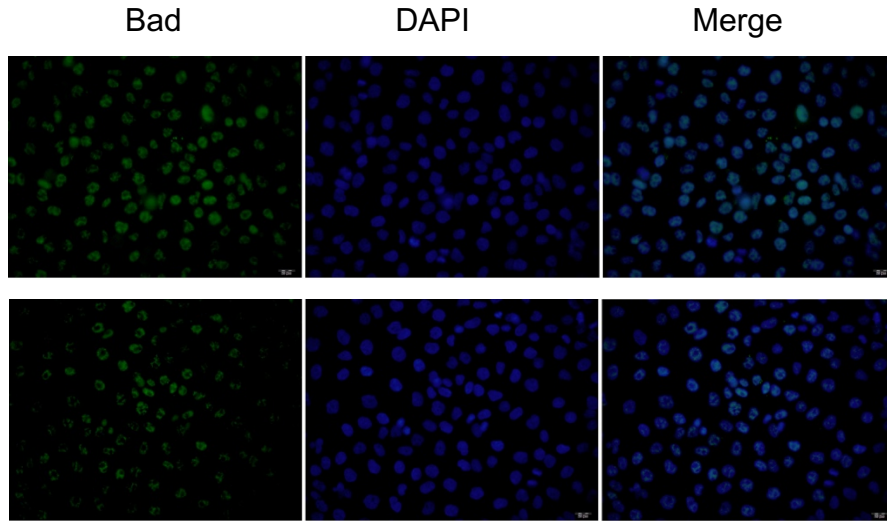
Şekil 4.30. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Bcl-2 proteininde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



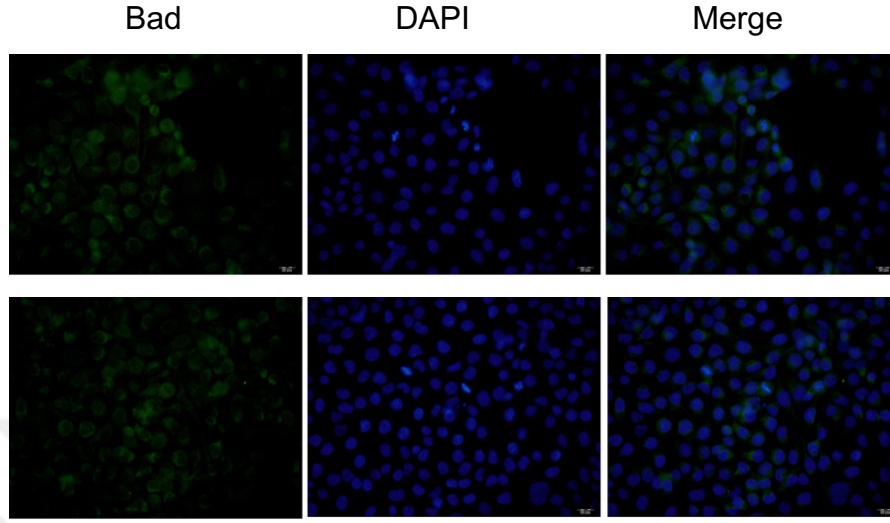
Şekil 4.31. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bax protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



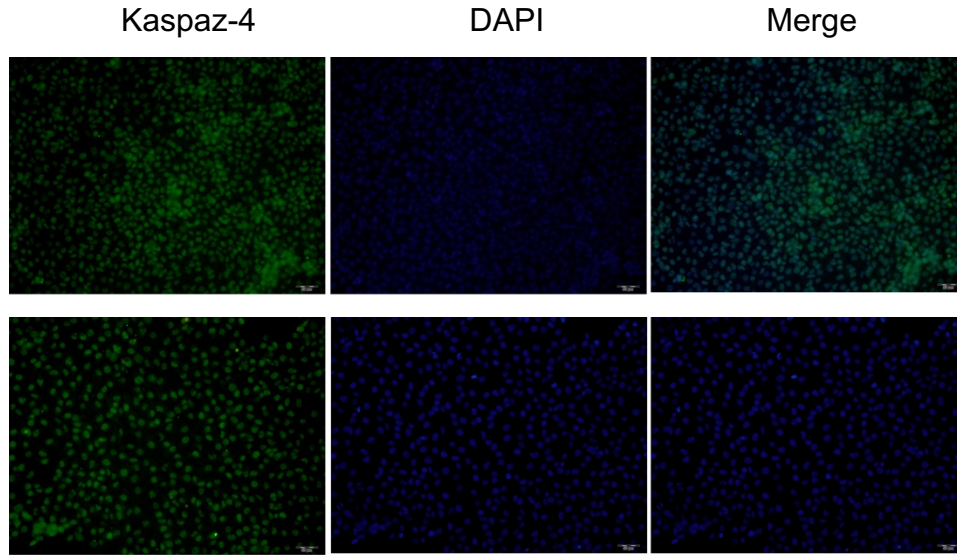
Şekil 4.32. IC₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Kaspaz-7 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



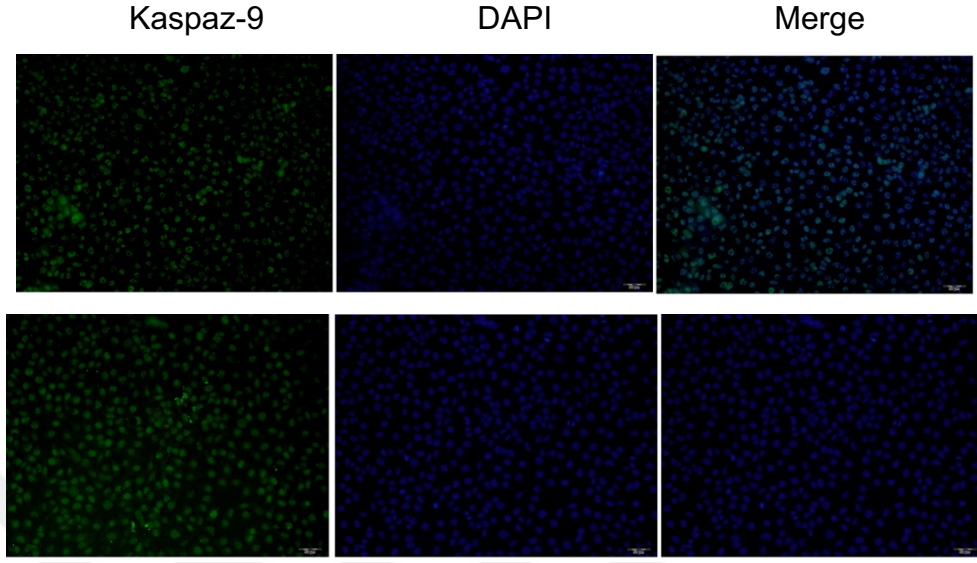
Şekil 4.33. IC₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Bad protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



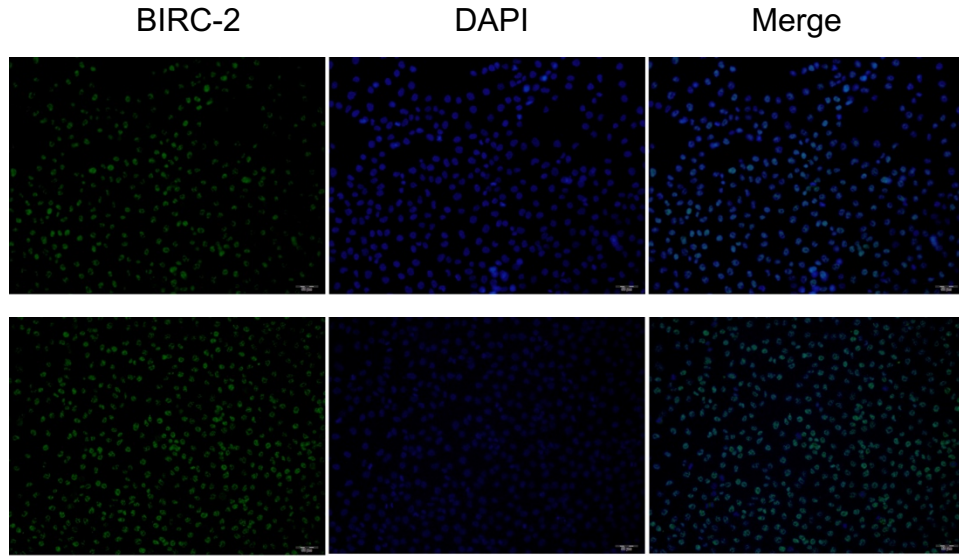
Şekil 4.34. IC₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde Bad protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



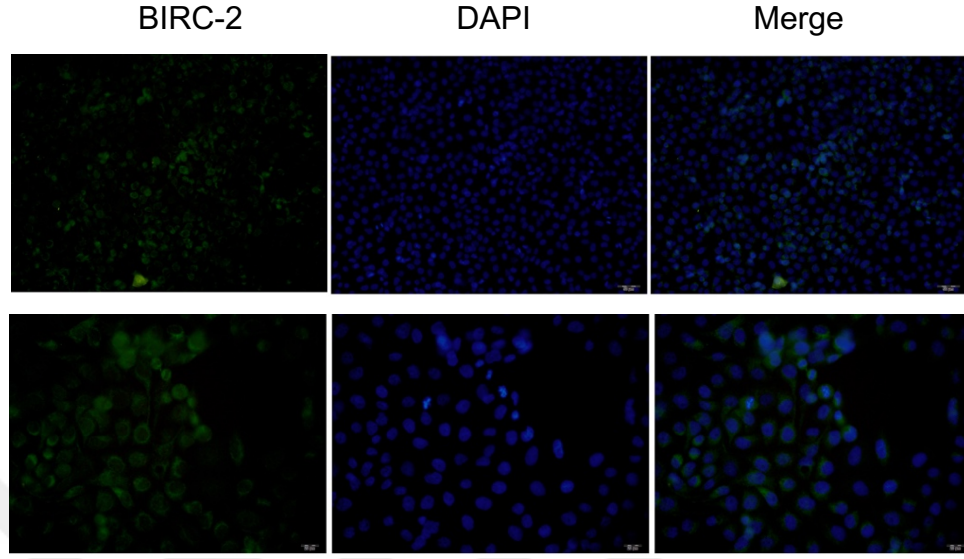
Şekil 4.35. IC₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Kaspaz-4 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



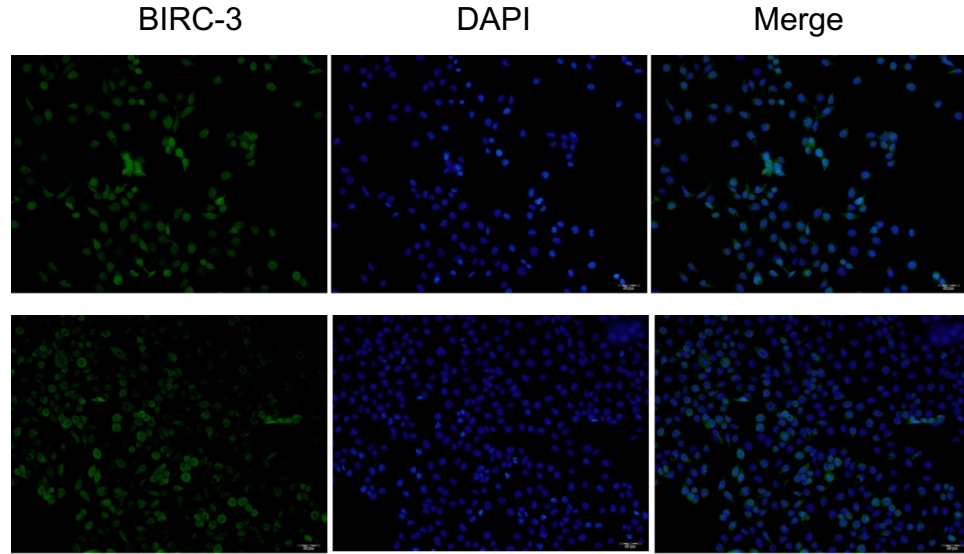
Şekil 4.36. IC₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde Kaspaz-9 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



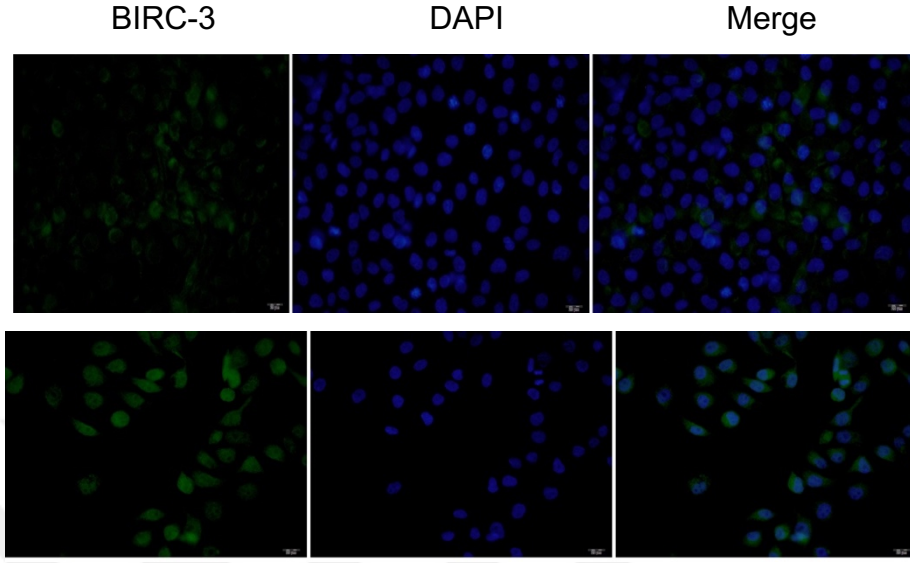
Şekil 4.37. IC₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC-2 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



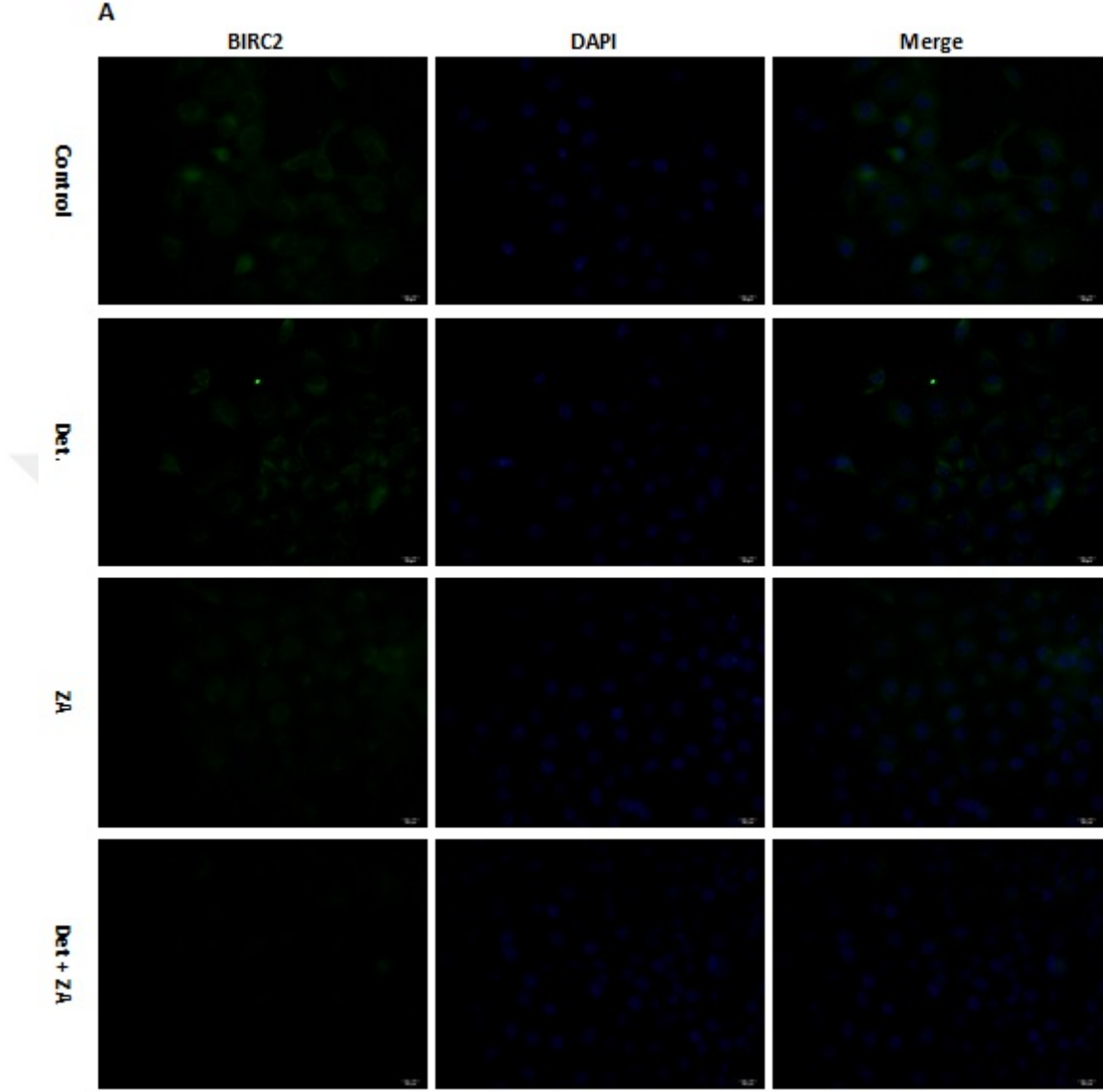
Şekil 4.38. IC₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC-2 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



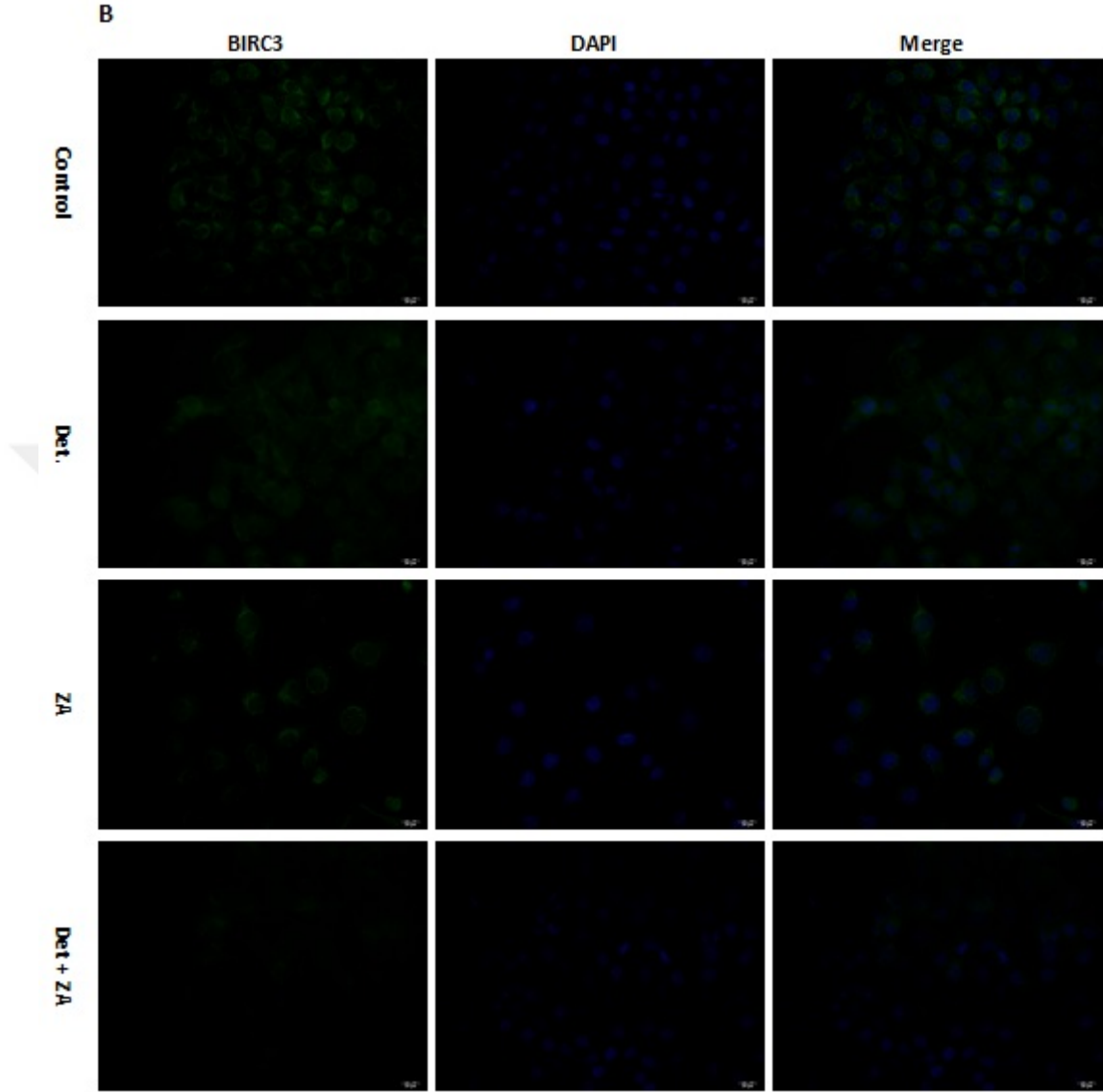
Şekil 4.39. IC₅₀ dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC-3 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



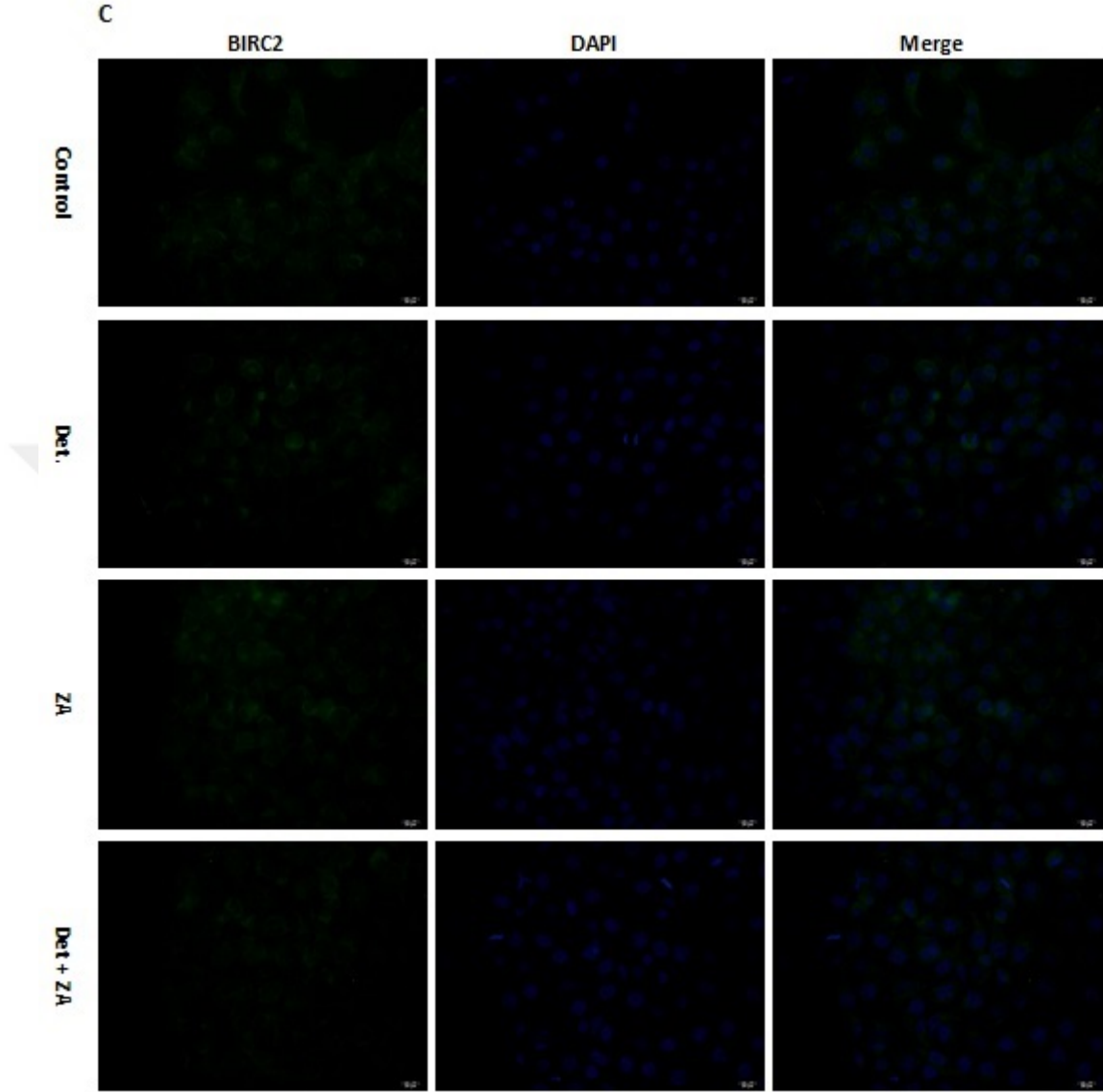
Şekil 4.40. IC_{50} dozunda 72 saat süre ile Zoledronik asid ile muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC-3 protein'inde ortaya çıkan değişimler (üst sıra: ZA ile muamele edilmiş hücreler; alt sıra: kontrol hücreler).



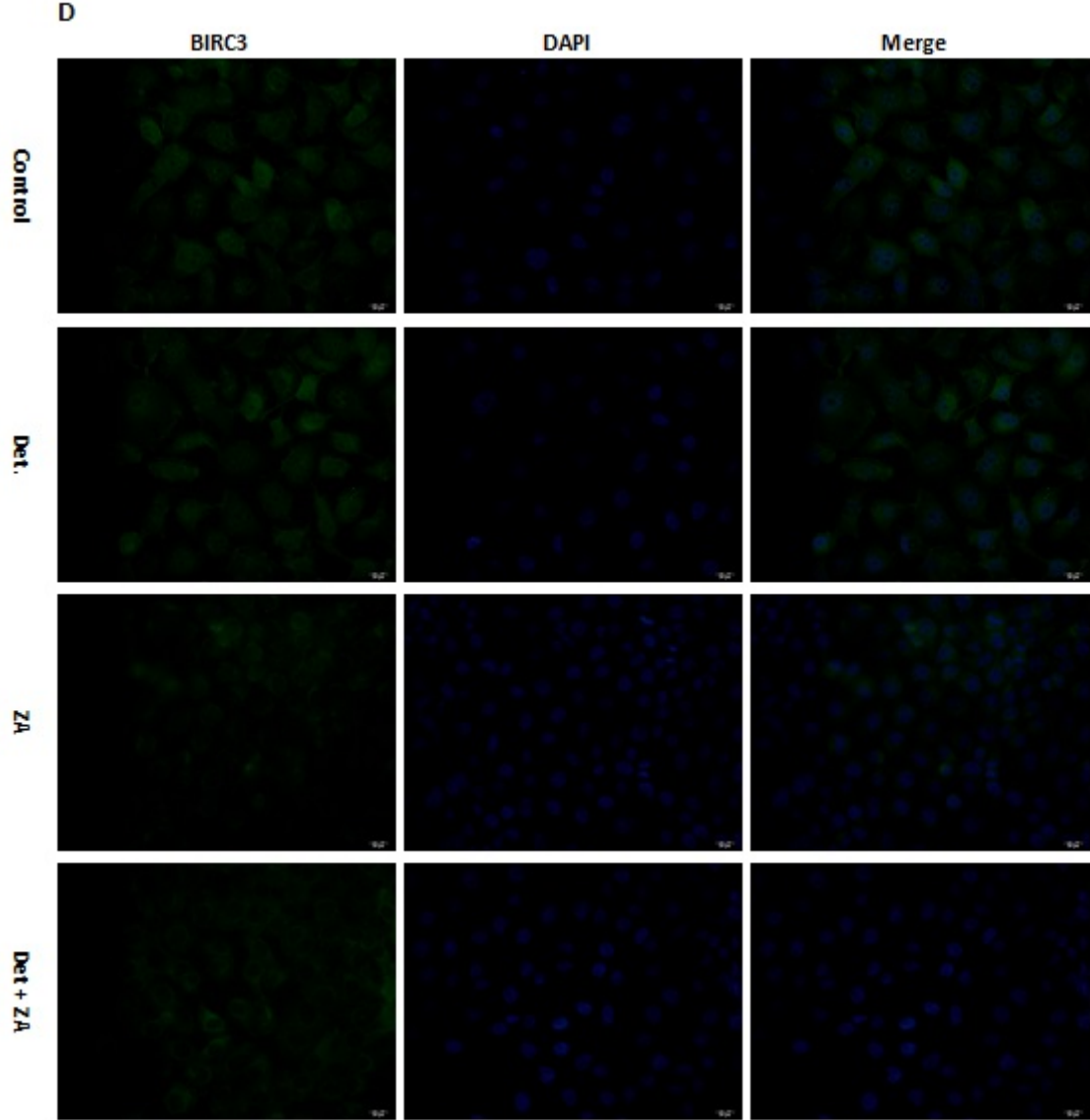
Şekil 4.41. DETA NONOat'ın 500 μ M konsantrasyonu ile muamele edilen, IC₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC2 proteininde ortaya çıkan değişimler.



Şekil 4.42. DETA NONOat'ın 500 μ M konsantrasyonu ile muamele edilen, IC₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edilen DU-145 KKH'lerinde BIRC3 proteininde ortaya çıkan değişimler.



Şekil 4.43. DETA NONOat'ın 500 μ M konsantrasyonu ile muamele edilen, IC₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC2 proteininde ortaya çıkan değişimler.



Şekil 4.44. DETA NONOat'ın 500 μ M konsantrasyonu ile muamele edilen, IC₅₀ dozunda Zoledronik asid ile muamele edilen ve DETA NONOate ve ZA ile birlikte muamele edilen DU-145 non-KKH'lerinde BIRC3 proteininde ortaya çıkan değişimler.

BÖLÜM V

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda prostat kanserlerinde ZA'in doğrudan kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini ve bu etkinin DETA NONOate ile daha arttığını saptadık. Bu bulgular daha önce yayınlanmış pek çok pre-klinik çalışmanın sonucu ile tutarlıdır. Örnek verecek olursak; Han ve arkadaşları, ZA'in SW480 insan kolon kanseri hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkilerini ve mekanizmasını inceledikleri bir çalışmada ZA'in konsantrasyon ve zamanla artan biçimde bu hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hücreleri apoptoza götürdüğünü ve bunu mitokondri permeabilitesini artırıp sitokrom C'nin sitozole salınmasını artırarak gerçekleştirdiğini ortaya koymuşlardır (160). ZA'in insan fibrosarkoma hücrelerindeki anti kanser etkileri üzerinde çalışan bir grup ise ZA'in sitotoksik ve apoptotik etkilerini farklı dozlarda (0-10 µM) ve diğer antitümör ajanlarla birlikte vererek incelemişler ve ZA'in insan fibrosarkoma hücre hattında proliferasyonu doğrudan inhibe ettiğini ve diğer antitümör ajanlarla birlikte verildiğinde bunların tedavi etkinliğini arttırabileceğini bildirmişlerdir (161). Aynı grup deneysel bir hayvan modelinde de ZA ile çalışmış ve klinik dozlardaki ZA'in farelerde osteosarkomanın spontan akciğer metastazını inhibe ettiğini görmüşlerdir (98). Akciğer kanserinde hem *in vitro* (insan akciğer kanser hücre hatları) hem de *in vivo* (akciğer kanseri xenograft fare modeli) ortamda ZA'in prenilasyonu inhibe ederek Ras ailesi onkoproteinlerin aberran aktivasyonunu engellediği, bu yolla anti-proliferatif ve apoptotik etki gösterdiği ve akciğer kanserinin tedavisinde diğer kemoterapötiklerle birlikte kullanıldığında sinerjik etki ile tedaviye karşı oluşan direncin üstesinden gelinmesine yardımcı olduğu ortaya konmuştur (162). ZA özellikle metastatik/tümörijenik potansiyeli yüksek olan prostat ve meme kanser hücre hatlarında kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılamakta ve apoptozu survivin ve kaspaz-3 ve -7'de down regülasyon yolu ile indüklemektedir (104). Bu literatürlerin ışığında kendi sonuçlarımızı incelersek; üzerinde çalıştığımız 2 farklı hücre grubuna ait IC₅₀ değerlerine baktığımızda ZA'in sitotoksik etkisinin DU-145 hücrelerinde non-KKH'leri üzerinde daha belirgin

olduğu idi. Bu bulgular prostat KKH'lerinin ZA'e karşı non-KKH'lerine göre daha dayanıklı olduğunu göstermektedir. Prostat KKH'lerinin ZA'in anti-proliferatif etkilerine karşı non-KKH'lerinden daha dirençli olması anlamlı ve KKH'lerinin malignite potansiyelini destekleyen bir bulgu olarak açıklanabilir.

Son yıllarda yeni çıkan ajanlar içinde, NO indükleyen veya NO verici ajanlar bulunmaktadır. NO çok sayıda biyolojik etkisi olan ve bol miktarda bulunan bir moleküldür. Klinikte kalp damar hastalıklarında kullanılmaktadır. Ayrıca, kanser önleyici bir ajan olarak ve daha yakın zamanda ise tümör hücrelerin ilaca dayanıklılığının kırılmasında yeni bir terapötik olarak tanınmıştır. Bir çok çalışmalarda, DETA NONOate gibi NO vericilerin ve sitotoksik terapi kombinasyonunun tedavide anlamlı derecede etkili olduğu gösterilmiştir. Huerta-Yepeç ve arkadaşları, YY1 ve BclXL genlerinin prostat kanserinde aşırı ifade olduğunu saptamışlar. Bu araştırmacılar YY1 ve BclXL genlerinin DETA NONOate ile inhibisyonunu indüklemişler ve bu şekilde hem *in vitro* ve hem *in vivo*'da ilaç direncinin geri alımını sağlamışlar (163). Çalışmamızın viabilite sonuçlarına baktığımızda, DETA NONOate ve ZA'in birlikte uygulanması, hem KKH'leri ve hem non-KKH'leri hücreleri üzerinde, tek ZA uygulanması sonuçlarına göre daha belirgin sitotoksik etki gösterdi. ZA ile birlikte DETA NONOate'ın 500 µM konsantrasyonunun uygulanmasında, KKH'lerinde non-KKH'lerine göre anlamlı sitotoksik etki saptadık, benzer etki non-KKH'lerine daha fazla yani 1000 µM DETA NONOate uygulanırken sağlandı.

Bu çalışmada yanıtını aradığımız önemli bir soru ZA'in DETA NONOate ile birlikte kullanımının sitotoksik etkisinin apoptoz yolu ile olup olmadığıdır. ZA'in kanser hücreleri üzerinde apoptotik etkisinin olduğunu gösteren bir çok yayın bulunmaktadır. İnsan meme MCF-7 ve MDA-MB 231 hücre hatlarında ZA'in apoptotik etkilerinin incelendiği bir araştırmanın sonuçlarında ZA'in bu hücreler üzerinde apoptotik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (164). Avcı ve arkadaşları bu yıl içinde yayınladıkları çalışmada U87MG glioblastoma multiforme hücrelerinde ZA'in ERN1, TLR2 ve IRF5 genlerinin ifadesini indüklemek yolu ile apoptotik etki gösterdiğini bildirmektedirler (165). Yaptığımız AnnexinV testlerinin sonuçları ZA'in hem KKH'leri ve hem non-KKH'leri hücreleri üzerinde anlamlı

apoptotik etkisi olduğunu gösterdi. Sonuçlarımız, ZA'in DETA NONOate ile birlikte uygulandığında, KKH'lerinde non-KKH'lerine göre daha belirgin apoptotik etki oluşturduğunu ortaya koydu. Bu bulgular, DETA NONOate'ın ZA ile birlikte uygulanmasının apoptotik etkisinin KKH'lerinde non-KKH'lerine göre daha anlamlı olduğunu gösterdi.

Kaspazlar apoptozu geri dönüşümsüz biçimde indükleyen önemli bir protein ailesidir. Mezotelyoma MSTO-211H hücre hattında ZA'in apoptotik etki mekanizmasının small interfering RNA (siRNA) ile gen susturma yöntemi kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada mezotelyoma hücrelerinde kaspaz 3, 7, 8, 9 ve poliADP-riboz polimeraz (PARP) proteinlerinde aktifleşme tespit edilmiştir (166). Diğer bir çalışmada Ullen ve arkadaşları ZA'in üç farklı renal kanser hücre hattı üzerinde etkilerini araştırmışlar, ZA'in bu hücrelerde kaspaza bağımlı apoptotik etkisini ortaya koymuşlardır (101). Yine diğer bir güncel çalışmada Varol ve arkadaşları PC3 prostat kanseri hücre hatlarında ve onların docetaxele dirençli türlerinde ZA'in sitotoksik ve apoptotik etkilerini incelemişler ve ZA'in dozunun arttığı oranda prostat kanseri hücrelerinde DNA fragmentasyonu ve kaspaz-3 ile -7'nin aktifleştiğini tespit etmişlerdir (167). ZA'in, özellikle tümörjenik potansiyeli yüksek hücrelerde (PC3, MCF 7) tümörjenik etkisi düşük ya da bulunmayan hücre hatlarına (LNCaP, MCF 10a) kıyasla daha etkin bir biçimde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve survivin, kaspaz 3 ve 7-üzerinden apoptozu indüklediği bildirilmektedir (104). Bizim çalışmamızda da ZA'in prostat KKH'lerinde kaspaz-9 ve-4 ve non-KKH'lerinde kaspaz-7'nin hem gen ifadesini hem de protein düzeyini arttırdığını saptamış olmamız yukarıdaki araştırma sonuçları ile uyum göstermektedir. ZA'in DETA NONOate ile birlikte uygulandığında, bu genlerin ifade seviyesinin ZA'in tek uygulanması durumunun arasında bulunan sonuçlar arasında anlamlı bir değişiklik bulunmadı.

Bcl-2 ailesi proteinleri intrinsek mitokondrial apoptotik yolak ve tümör nekroz faktör ile tetiklenen ekstrinsek apoptotik yolak üzerinden düzenleyebildiklerinden apoptotik yanıt açısından önemlidirler (168). ZA'in bu protein ailesinde anlamlı değişiklikler oluşturduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu bağlamda, Wang ve arkadaşları ZA'in apoptotik etkilerini HeLa,

SiHa ve CaSki olmak üzere üç farklı insan serviks kanseri hücre hattında incelediklerinde Bcl-2 ve BAX moleküllerinin seviyelerinde değişiklik tespit etmiş ve bu durumun ZA'in apoptotik etkisi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (169). Ottewell ve arkadaşları fare modeli kullanarak *in vivo* ortamda klinik dozlarda önce doksorubisin ve ardından ZA verildiğinde erken evre meme tümörlerinin büyümesi üzerine olan etkileri incelemişlerdir. Önce doksorubisin ardından ZA verildiğinde subkutan meme tümörünün büyümesi ve kemik metastazı engellenmiş, ilaçların iki ayrı tedavi şeklinde uygulanması kombine tedaviye göre daha etkili bulunmuştur. Tümörler incelendiğinde yüksek düzeyde apoptoz göstermişler, gen analizlerinde BCLXL proteininde artış ve kaspaz-3,-8,ve -9'da aktifleşme tespit edilmiştir (170). Uzun süreli ZA tedavisi ZA direncine neden olabilir ve bu durumda kanser hücrelerinin apoptotik aktivitesi de azalır. Bu bağlamda Aoyagi ve arkadaşları A549 ve H1650 küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinin ZA'e direncinin mekanizmasını araştırmışlardır. Araştırmacılar bu hücreleri devamlı olarak ZA ile muamele ederek dirençli bir popülasyon elde etmişler ve bu hücrelerde BCL-2 ailesi genlerinin ifadesini inceleme altına almışlardır. ZA'e direnç gösteren hücrelerde BCL-2 ailesi genleri içinde sadece BAX geninde anlamlı bir ifade azalması tespit etmişlerdir. Bu durum ZA direncinden BAX genindeki down-regülasyonun kısmen sorumlu olabileceğini düşündürmüştür (171). Bizim çalışmamızda, BCL-2 ailesi proteinlerden BCL-2 proteini hem prostat KKH hem de non-KKH'lerinde anlamlı down-regüle bulunmuştur. Bu aileden Bad proteininin ise gen ifadesi ve hücrede bulunan protein seviyesi hem KKH ve non-KKH'lerinde anlamlı düzeyde yüksek bulundu. BAX geni ise sadece KKH'lerinde anlamlı yüksek bulundu. ZA'in DETA NONOate ile birlikte uygulandığında, bu genlerin ifade seviyesinin ZA'in tek uygulanması durumun arasında bulunan sonuçlar arasında anlamlı bir değişiklik bulunmadı.

Mitokondri aracılı apoptotik süreç mitokondriyal permeabilite değişikliği ile başlar, ardından sitokrom C ve apoptoz indükleyici factor gibi apoptojenik faktörlerin salınımı gerçekleşir (172,173). sitozolde sitokrom c/Apaf-1/prokaspaz-9 apoptozom kompleksi apoptozu başlatan kaspaz-9'u aktive eder, bu da yolağın devamındaki diğer efektör kaspazların aktivasyonuna yol açar.(174). Bcl-2 ailesi

proteinleri, voltaj-bağımlı anyon kanalı gibi mitokondriyal kanallarla etkileşerek mitokondriyal permeabiliteyi düzenlerler (175,176). Bu ailenin BAX ve Bid gibi pro-apoptotik etkili üyeleri apoptotik faktörlerin salınımını uyarır. Bizim çalışmamızda ZA uygulaması prostat KKH'lerinde antiapoptotik etkili Bcl-2 ekspresyonunu azaltıp kaspaz-9, 4, BAX ve Bad gibi pro-apoptotik etkili proteinlerin miktarlarında artışa neden oldu. Bu bulgular, prostat KKH'lerinde ZA ile indüklenen apoptozun mitokondri-bağımlı intrinsek yoldan kaspaz-9 ve Bcl-2 ailesi proteinlerin modülasyonu ile gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Apoptozda önemli role sahip diğer bir protein, apoptotik proteinlerin inhibitörüdür (IAP). İlk olarak Baculovirus'ta, ardından Drosophila ve memelilerde de tanımlanan anti-apoptotik etkili bir protein ailesidir (177). Bu proteinlerin kaspaz aktivitesinin düzenlemesi, hücre bölünmesi ve sağ kalım yollarının düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Şimdiye kadar bu proteinlerden tanımlananlar NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein; BIRC1), cIAP1 ve cIAP2 (sırayla cellular inhibitor of apoptosis 1 ve 2; BIRC2 ve BIRC3), XIAP (X-chromosome binding IAP; BIRC4), survivin (BIRC5), BRUCE (Apollon; BIRC6), livin (BIRC7) ve Ts-IAP (testis-specific IAP; BIRC8) 'dir (178). IAP proteinlerin onkogeneze ve antitümöral tedavideki dirençte katkısı olduğu gösterilmiştir. IAP proteinlerin overekspresyonu lösemi, B hücreli lenfoma gibi çeşitli kanserlerde tespit edilmiştir. Ayrıca Deveruax ve ark., IAP1 ve IAP2 proteinlerinin kaspaz-9 ve ardından kaspaz-3 ve -7 proteinini inhibe ettiğini göstermişlerdir (24). Bu projede incelediğimiz IAP ailesi proteinleri arasında, BIRC2 (IAP1) ve BIRC3 (IAP2) proteinlerinin anlamlı şekilde down regüle olduğunu saptadık. Hem KKH'leri hem de non-KKH'lerinde ZA ile muamele BIRC2 ve BIRC3 proteinlerinde down-regülasyona neden oldu. Bizim bulgularımızda, hücreler ZA ile muamele edildiğinde IAP1 ve IAP2 proteinlerin azalması ve kaspaz-3, -4 ve -9'ta yükselme literatürdeki çalışmaların sonuçları ile uyumludur. ZA'in DETA NONOate ile birlikte uygulanmasında, KKH'lerinde hem BIRC2 ve hem BIRC3 genlerinin ifadesinde ZA'in tek uygulanması durum ile karşılaştırıldığında anlamlı azalış görüldü. Non-KKH'lerinde ise, anlamlı değişiklik bulunmadı.

Azotlu bifosfonatların izoprenoid sentezini inhibe ettikleri bilinmektedir (179). Bu bileşikler izoprenoid difosfat lipidlerin analogu gibi davranarak farnezil pirofosfat sentazı inhibe ederler, bunun sonucunda Ras, Rac ve Rho ailesi gibi küçük G proteinlerin transasyon sonrası farnezilasyonu inhibe olur (180). Bu bilgilerin ışığında, bifosfonatların indüklediği apoptozun mekanizması olarak mevalonat yolağının inhibisyonu üzerinde önemle durulmaktadır (181–184). Gobel ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, MDA-MB-231, MDA-Bone ve MDA-Met gibi çeşitli meme kanseri hücre hatlarında statin ve ZA ile mevalonat yolağı inhibe edildiğinde kaspaz-3 ve -7’de aktifleşme ve apoptoz düzeyinde anlamlı artış olduğu gösterilmiştir (185). Bizim çalışmamızda da prostat KKH’lerinde kaspaz-7 ve -4’de aktifleşme ile ortaya konduğu gibi apoptozun non-KKH’lerine göre anlamlı bir şekilde indüklendiği gözlemlendi. KKH’lerinde saptadığımız bu apoptotik indüksiyonun nedeni mevalonat yolağının ZA tarafından inhibisyonu olabilir. Bu savı destekleyecek daha ayrıntılı çalışmaların mekanizmaların aydınlatılmasında yararlı olacağı kanaatindeyiz.

Önceki araştırmalar, BIRC2 ve BIRC3’ün nükleer faktör-kB (NF-kB) sinyalizasyon ve apoptozunun düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (187). NF-kB ve hedef genleri, kanserin tüm özelliklerinde mediatör olarak katkıda bulunmuştur (188,189) ve anti-apoptoz ve sağkalımda büyük bir role sahiptirler. DU-145 hücrelerinin NF-kB’yi aktive eden sürekli aktif Ikb kinaz kompleksine (IKK) sahip oldukları bulunmuştur. Böylece, NF-kB’nin sürekli aktivasyonu, DU-145 hücre hattının apoptozu uyaran terapötik ajanlara karşı direncinde merkezi bir rol oynamaktadır (190,191). Çalışmamızda BIRC2 ve BIRC3 proteinlerinin DETA NONOate ve ZA tarafından down regülasyonunun, aneksin V deneylerinde görüldüğü gibi NF-kB yolağını inhibe edebileceği ve hücreleri apoptoza duyarlı hale getirebileceği sonucu olabilir. Huerta-Yepe ve arkadaşları, DETANONOate’in prostat kanseri hücrelerindeki NF-kB aktivitesi üzerindeki etkisini inceledi ve DETANONOate’in NF-kB aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiğini gösterdi (192). Bu şekilde NO, hücreleri apoptoza duyarlı hale getirebileceği ve ZA’in bu hücrelerde apoptozu indükleyebileceği bir mekanizma olabilir.

Bu çalışmada, Det. Ve ZA'in, KKH'lerdeki BIRC2 ve BIRC3'ün belirgin şekilde down regülasyonu ile, bu hücrelerdeki non-KKH'lere kıyasla daha fazla apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Diğer taraftan, insan prostat kanserinde KKH'lerin artmış NF- κ B sinyali olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur (191). Bu nedenle, NO'in önleyici etkisinin daha güçlü olabileceğini ve ZA ile apoptoz indüksiyonu için hücreleri sentitize edebileceğini düşündürebilmektedir.

BÖÜM VI

6. Sonuç ve Öneriler

Kanser kök hücreleri kendi kendini yenileyebilme ve farklı tümör alt tiplerine dönüşebilme özelliğine sahip küçük bir hücre popülasyonu olarak, tümör yığını oluşturarak diğer daha düşük tümör oluşturma potansiyeline sahip hücrelerden (non-Kanser kök hücre) ayrılmaktadırlar. Tümörün tekrarlamasından, uzak metastazdan, anjiyogenezden ve ilaç direncinden kanser kök hücrelerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kanserlerin çoğunda, radyoterapi iyi bir noninvaziv tedavi seçeneği ve yüksek sağkalım oranları sunarken, kanser kök hücreleri üzerine etkili olmadıkları için tedavinin etkinliği de düşük olabilmektedir. Her ne kadar kanser kök hücreleri tümör kitlesinin çok küçük bir oranını oluştursa da tedaviye direncin ortaya çıkmasında başrolü oynarlar. Bu nedenle kanser tedavisi için temel olarak kanser kök hücrelerini ortadan kaldıracak daha etkili ajanların geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler, ZA'in ve onun DETA NONOate ile birlikte uygulanmasının özellikle DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH'lerinde doza ve zamana bağımlı olarak sitotoksik ve apoptotik etkiye neden olduğunu göstermektedir. DETA NONOate ve ZA'in insan prostat kanseri DU-145 KKH ve non-KKH'leri üzerindeki apoptotik etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

1. Bu çalışma DETA NONOate ve ZA'in KKH'leri üzerindeki etkilerini inceleyen ilk çalışmadır.
2. DETA NONOate ve ZA'in ve onların birliktr uygulanmasının insan prostat kanseri DU-145 hücrelerinden izole edilen KKH ve non-KKH'lerinde hem doza bağımlı ve hem zamana bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ortaya konmuştur
3. ZA'in IC₅₀ değeri 72. saatte DU-145 KKH'leri için 108 µM, non-KKH'lerinde ise 96 µM olarak hesaplandı. DETA NONOate ise bir IC₅₀ değei bulunmadı.
4. ZA'in prostat kanseri DU-145 KKH'leri üzerindeki sitotoksik etkisinin non-KKH'lerine göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi.
5. IC₅₀ dozunda ZA ile muamele edilen ve DETA NONOate ile birlikte muamele edilen her 2 deney grubunda apoptozun indüklendiği saptandı.
6. ZA'in ve DETA NONOate ile birlikte muamele edilen prostat kanseri DU-145 KKH'leri üzerindeki apoptotik etkisinin non-KKH'lerine göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi.
7. IC₅₀ dozunda ZA ile 72 saat muamele edilen prostat kanseri DU-145 KKH'lerinde apoptoz ile ilişkili genlerin ifadesinde oluşan değişimler incelendiğinde pro-apoptotik kaspaz-9 ve -4, BAD ve BAX genlerinin ifadesinde artış gözlenirken anti-apoptotik BCL-2, BIRC2 ve BIRC3 genlerinin ifadesinde azalışın olduğu görüldü.
8. Aynı doz ve süre ile ZA uygulanan prostat kanseri DU-145 non-KKH'lerinde ise pro-apoptotik olan *kaspaz-7* ve *BAD* genlerin ifadesinde artış, anti-apoptotik *BCL-2*, *BIRC2* ve *BIRC3* genlerinin ifadesinde azalış saptandı.
9. ZA ile uygulanan DU-145 KKH'lerinde ifade seviyesinde anlamlı değişim bulunan genlerde, DETA NONOate ile birlikte muamele dildikten sonra, *BIRC2* ve *BIRC3* genlerinin ifadesinde daha fazla azalış saptandı.

10. ZA ile uygulanan DU-145 non-KKH'lerinde ifade seviyesinde anlamlı değişim bulunan genlerde, DETA NONOate ile birlikte muamele dildikten sonra, genlerinin ifadesinde anlamlı bir değişim saptanmadı.
11. protein düzeyleri immünofloresans muamele edilen yöntemi ile kalitatif olarak değerlendirildi. Deęerlendirme sonuçları ifade seviyesinde anlamlı değişim bulunan genlerle uyumlu idi.

Hücre kültürü çalışması ile ortaya koyduğumuz ZA'in ve onun DETA NONOate ile birlikte uygulanması, prostat KKH'leri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin deneysel hayvan modelleri ile de desteklenmesi ve olumlu sonuçlar alındığı takdirde klinikte özellikle meme kanserinin adjuvan kemoterapisinde kullanılan bu ajanın prostat başta olmak üzere diğer kanser türlerinde de kullanılarak KKH'lerine bağlı olarak gelişen kanser nüksü ve ilaç direnci gibi olumsuz klinik durumların üstesinden gelinmesine katkı yapacağı kanaatindeyiz.

BÖLÜM VII

7. KAYNAKLAR

1. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105–11.
2. Hong I, Lee H, Nam J. Cancer Stem Cells : The “ Achilles Heel ” of Chemo-Resistant Tumors. 2015;2–22.
3. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res*. Nature Publishing Group; 2012;22(3):457–72.
4. Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*. 2007;6(19):2332–8.
5. Chen K, Huang Y, Chen J. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(6):732–40.
6. BRUCE WR, VAN DER GAAG H. A QUANTITATIVE ASSAY FOR THE NUMBER OF MURINE LYMPHOMA CELLS CAPABLE OF PROLIFERATION IN VIVO. *Nature*. 1963;199:79–80.
7. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2008;10(2):R25.
8. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983–8.
9. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756–60.
10. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009;7(3):330–8.
11. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- 2009;106(38):16281–6.
12. Lee TKW, Castilho A, Cheung VCH, Tang KH, Ma S, Ng IOL. CD24 + Liver Tumor-Initiating Cells Drive Self-Renewal and Tumor Initiation through STAT3-Mediated NANOG Regulation. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):50–63.
 13. Ibrahim EE, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, Spencer-Dene B, Hossaini S, Abuzinadah M, et al. Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms. *Stem Cells*. 2012;30(10):2076–87.
 14. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):973–8.
 15. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Ferrando U, Camussi G. Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. *FASEB J*. 2008;22(10):3696–705.
 16. Hanahan D. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
 17. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821–8.
 18. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445(7123):111–5.
 19. Zhang M, Behbod F, Atkinson RL, Landis MD, Kittrell F, Edwards D, et al. Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68(12):4674–82.
 20. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*. 2003;17(10):1253–70.
 21. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary

- progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(2):618–23.
22. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009;458(7239):780–3.
 23. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(9):672–9.
 24. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004;64(19):7011–21.
 25. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(25):15178–83.
 26. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645–8.
 27. O'Brien C a, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445(7123):106–10.
 28. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1310–6.
 29. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. 2007;25(11):1315–21.
 30. Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*. 2005;65(10):4320–33.
 31. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and

- Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):313–23.
32. Beier D, Schulz JB, Beier CP. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. *Mol Cancer*. 2011;10(1):128.
 33. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One*. 2008;3(6).
 34. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24-/low/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(24):1777–85.
 35. LaBarge MA. The difficulty of targeting cancer stem cell niches. *Clin Cancer Res*. 2010;16(12):3121–9.
 36. Lacerda L, Pusztai L, Woodward WA. The role of tumor initiating cells in drug resistance of breast cancer: Implications for future therapeutic approaches. *Drug Resist Updat*. 2010;13(4–5):99–108.
 37. Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Kong D, Banerjee S, et al. Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resist Updat*. 2010;13(4–5):109–18.
 38. Dou J, Gu N. Emerging strategies for the identification and targeting of cancer stem cells. *Tumor Biol*. 2010;31(4):243–53.
 39. Corbeil D, Marzesco AM, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB. The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. *FEBS Letters*. 2010. p. 1659–64.
 40. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TKW, Wo JYH, Ng IOL, et al. Identification and Characterization of Tumorigenic Liver Cancer Stem/Progenitor Cells. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2542–56.
 41. Horst D, Scheel SK, Liebmann S, Neumann J, Maatz S, Kirchner T, et al.

- The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *J Pathol.* 2009;219(4):427–34.
42. Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133+ cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett.* 2010;289(2):151–60.
 43. Naor D, Sionov R V, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res.* 1997;71:241–319.
 44. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai H-C, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res.* 2008;68(11):4311–20.
 45. Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, et al. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol Rep.* 2009;22(5):1129–34.
 46. Yang YM, Chang JW. Bladder cancer initiating cells (BCICs) are among EMA-CD44v6+ subset: novel methods for isolating undetermined cancer stem (initiating) cells. *Cancer Invest.* 2008;26(7):725–33.
 47. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells.* 2009;27(5):1006–20.
 48. Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, Matsuzaki S, Tanaka F, Mimori K, et al. CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Annals of surgical oncology.* 2008. p. 2927–33.
 49. Lee CJ, Dosch J, Simeone DM. Pancreatic cancer stem cells. *J Clin Oncol.* 2008;26(17):2806–12.
 50. Dubrovskaya A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maira SM, Garcia-Echeverria C, et al. The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(1):268–73.

51. Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, Tin VP, Cheng LC, Sihoe AD, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One*. 2010;5(11):e14062.
52. Lee HJ, Choe G, Jheon S, Sung S-W, Lee C-T, Chung J-H. CD24, a Novel Cancer Biomarker, Predicting Disease-Free Survival of Non-small Cell Lung Carcinomas: A Retrospective Study of Prognostic Factor Analysis from the Viewpoint of Forthcoming (Seventh) New TNM Classification. *J Thorac Oncol*. Elsevier; 2016 Aug 14;5(5):649–57.
53. Kristiansen G, Winzer K-J, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:4906–13.
54. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(7035):843–50.
55. Zhao C, Blum J, Chen A, Kwon HY, Jung SH, Cook JM, et al. Loss of β -Catenin Impairs the Renewal of Normal and CML Stem Cells In Vivo. *Cancer Cell*. 2007;12(6):528–41.
56. Bryan T. MacDonald; Keiko Tamai and Xi He. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Biol*. 2009;17(1):9–26.
57. Yin L, Velazquez OC, Liu Z-J. Notch signaling: emerging molecular targets for cancer therapy. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(5):690–701.
58. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287(5785):795–801.
59. Lee JJ, Von Kessler DP, Parks S, Beachy P a. Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. *Cell*. 1992;71(1):33–50.
60. Mohler J, Vani K. Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development*. 1992;115(4):957–71.
61. Tabata T, Eaton S, Kornberg TB. The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev*. 1992;6(12 PART B):2635–45.

62. Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(6):697–720.
63. Black W, Vasiliou V. The aldehyde dehydrogenase gene superfamily resource center. *Hum Genomics.* 2009;4(2):136–42.
64. Cheung a MS, Wan TSK, Leung JCK, Chan LYY, Huang H, Kwong YL, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK.* 2007;21(7):1423–30.
65. Ginestier C, Hur M, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1:555–67.
66. Prasmickaite L, Enges??ter B, Skrbo N, Hellenes T, Kristian A, Oliver NK, et al. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity does not select for cells with enhanced aggressive properties in malignant melanoma. *PLoS One.* 2010;5(5).
67. Rasper M, Sch??fer A, Piontek G, Teufel J, Brockhoff G, Ringel F, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. *Neuro Oncol.* 2010;12(10):1024–33.
68. Ma S, Chan KW, Lee TK, Tang KH, Wo JY, Zheng BJ, et al. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol Cancer Res.* 2008;6(7):1146–53.
69. Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck.* 2010;32(9):1195–201.
70. Carpentino JE, Hynes MJ, Appelman HD, Tong Z, Steindler DA, Scott EW, et al. Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer. *Cancer*

- Res. 2009;69(20):8208–15.
71. Van Den Hoogen C, Van Der Horst G, Cheung H, Buijs JT, Lippitt JM, Guzmán-Ramírez N, et al. High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate cancer. *Cancer Res.* 2010;70(12):5163–73.
 72. Lagas JS, Vlaming MLHH, Schinkel AH. Pharmacokinetic assessment of multiple ATP-binding cassette transporters: the power of combination knockout mice. *Mol Interv.* 2009;9(3):136–45.
 73. Ejendal KFK, Hrycyna C a. Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. *Curr Protein Pept Sci.* 2002;3(5):503–11.
 74. Gangavarapu KJ, Azabdaftari G, Morrison CD, Miller A, Foster B a, Huss WJ. Aldehyde dehydrogenase and ATP binding cassette transporter G2 (ABCG2) functional assays isolate different populations of prostate stem cells where ABCG2 function selects for cells with increased stem cell activity. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(5):132.
 75. Li W-Q, Li Y-M, Tao B-B, Lu Y-C, Hu G-H, Liu H-M, et al. Downregulation of ABCG2 expression in glioblastoma cancer stem cells with miRNA-328 may decrease their chemoresistance. *Med Sci Monit.* 2010;16(10):HY27-Y30.
 76. de Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, Pflugfelder SC, Li D-QQ. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells.* 2005;23(1):63–73.
 77. Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F, Kalthoff H. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2007;6(1):92–7.
 78. Herpel E, Jensen K, Muley T, Warth A, Schnabel PA, Meister M, et al. The cancer stem cell antigens CD133, BCRP1/ABCG2 and CD117/c-KIT are not associated with prognosis in resected early-stage non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2011;31(12):4491–500.
 79. Chen Z, Liu F, Ren Q, Zhao Q, Ren H, Lu S, et al. Suppression of ABCG2

- inhibits cancer cell proliferation. *Int J Cancer*. 2010;126(4):841–51.
80. Russell RGG. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone*. 2011;49(1):2–19.
 81. Von Baeyer H HK. Acetodiphosphorige Saure. *Berichte Dtsch Chem Ges*. 1897;20:1973–1978.
 82. Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res*. 2002;4(1):30–4.
 83. Francis MD, Russell RGG, Fleisch H. Diphosphonates Inhibit Formation of Calcium Phosphate Crystals in vitro and Pathological Calcification in vivo. *Science* (80-). 1969;165(3899):1264–6.
 84. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*. 2011. p. 34–41.
 85. Rogers MJ, Brown RJ, Hodkin V, Blackburn GM, Russell RG, Watts DJ. Bisphosphonates are incorporated into adenine nucleotides by human aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;224(3):863–9.
 86. Pelorgeas S, Martin JB, Satre M. Cytotoxicity of dichloromethane diphosphonate and of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate in the amoebae of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. A ³¹P NMR study. *Biochem Pharmacol*. 1992;44(11):2157–63.
 87. Auriola S, Frith J, Rogers MJ, Koivuniemi A, Mönkkönen J. Identification of adenine nucleotide-containing metabolites of bisphosphonate drugs using ion-pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1997;704(1–2):187–95.
 88. Frith JC, Mönkkönen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res*. 1997;12(9):1358–67.
 89. Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Näpänkangas JP, Ylitalo K V, Mönkkönen J,

- Rogers MJ, et al. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol*. 2002;61(5):1255–62.
90. Amin D, Cornell SA, Perrone MH, Bilder GE. 1-hydroxy-3-(methylpentylamino)-propylidene-1,1-bisphosphonic acid as a potent inhibitor of squalene synthase. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res*. 1996;46(8):759–62.
 91. Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:241–69.
 92. Konstantinopoulos PA, Karamouzis M V, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(7):541–55.
 93. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992;70(3):389–99.
 94. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992;70(3):401–10.
 95. Zerial M, Stenmark H. Rab GTPases in vesicular transport. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5(4):613–20.
 96. Zekri J, Mansour M, Karim SM. The anti-tumour effects of zoledronic acid. *J Bone Oncol*. Elsevier; 2014 Mar;3(1):25–35.
 97. Koto K, Murata H, Kimura S, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, et al. Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents. *Oncol Rep*. 2010;24(1):233–9.
 98. Koto K, Horie N, Kimura S, Murata H, Sakabe T, Matsui T, et al. Clinically relevant dose of zoledronic acid inhibits spontaneous lung metastasis in a murine osteosarcoma model. *Cancer Lett*. 2009;274(2):271–8.
 99. Zwolak P, Manivel JC, Jasinski P, Kirstein MN, Dudek AZ, Fisher J, et al. Cytotoxic effect of zoledronic acid-loaded bone cement on giant cell

- tumor, multiple myeloma, and renal cell carcinoma cell lines. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92(1):162–8.
100. Tamura T, Shomori K, Nakabayashi M, Fujii N, Ryoke K, Ito H. Zoledronic acid, a third-generation bisphosphonate, inhibits cellular growth and induces apoptosis in oral carcinoma cell lines. *Oncol Rep.* 2011;25(4):1139–43.
101. Ullen A, Schwarz S, Lennartsson L, Kalkner KM, Sandstrom P, Costa F, et al. Zoledronic acid induces caspase-dependent apoptosis in renal cancer cell lines. *Scand J Urol Nephrol.* 2009;43(2):98–103.
102. Koizumi M, Nakaseko C, Ohwada C, Takeuchi M, Ozawa S, Shimizu N, et al. Zoledronate has an antitumor effect and induces actin rearrangement in dexamethasone-resistant myeloma cells. *Eur J Haematol.* 2007;79(5):382–91.
103. Di Salvatore M, Orlandi A, Bagalà C, Quirino M, Cassano A, Astone A, et al. Anti-tumour and anti-angiogenetic effects of zoledronic acid on human non-small-cell lung cancer cell line. *Cell Prolif.* 2011;44(2):139–46.
104. Almubarak H, Jones A, Chaisuparat R, Zhang M, Meiller TF, Scheper M a. Zoledronic acid directly suppresses cell proliferation and induces apoptosis in highly tumorigenic prostate and breast cancers. *J Carcinog.* 2011;10:2.
105. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med.* 2005;258(6):479–517.
106. He Y-C, Zhou F-L, Shen Y, Liao D-F, Cao D. Apoptotic Death of Cancer Stem Cells for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):8335–51.
107. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):231–41.
108. Cellsignal. Regulation of Apoptosis Overview [Internet]. Cell. 2014. p. 2014. Available from: <https://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-apoptosis-regulation>

109. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(3–4):325–31.
110. Kischkel FC, Lawrence D a, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity.* 2000;12(6):611–20.
111. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, et al. Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8. *J Biol Chem.* 2001;276(49):46639–46.
112. Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. TRAIL signalling: Decisions between life and death. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2007. p. 1462–75.
113. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci.* 2005;118:265–7.
114. Song X, Kim SY, Lee YJ. Evidence for Two Modes of Synergistic Induction of Apoptosis by Mapatumumab and Oxaliplatin in Combination with Hyperthermia in Human Colon Cancer Cells. *PLoS One.* 2013;8(8).
115. Hockenbery DM. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2010. p. 476–89.
116. Ma X, Zhou J, Zhang CX, Li XY, Li N, Ju RJ, et al. Modulation of drug-resistant membrane and apoptosis proteins of breast cancer stem cells by targeting berberine liposomes. *Biomaterials.* 2013;34(18):4452–65.
117. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* 2006;7(10):988–94.
118. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature.* 2004;432(7015):307–15.
119. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
120. Signore M, Ricci-Vitiani L, De Maria R. Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd;* 2013;332(2):374–82.

121. Dr T, Sussman RT, Ricci MS, Hart LS. Chemotherapy-Resistant Side-Population of Colon Cancer Cells ND ES SC RIB ND ES SC RIB. 2007;6(9):1490–5.
122. Kataoka T. The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol*. 2005;25(1):31–58.
123. Micheau O. Cellular FLICE-inhibitory Protein: An Update. In: *Apoptosis and Cancer Therapy: From Cutting-edge Science to Novel Therapeutic Concepts*. 2008. p. 120–56.
124. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*. 2006;5:67.
125. Zabalova R, McDermott L, Stantic M, Prokopova K, Dong LF, Neuzil J. CD133-positive cells are resistant to TRAIL due to up-regulation of FLIP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(4):567–71.
126. Zabalova R, Stantic M, Prokopova K, Dong LF, Neuzil J. Cancer cells with high expression of CD133 exert FLIP upregulation and resistance to TRAIL-induced apoptosis. In: *BioFactors*. 2009. p. 231–5.
127. Piggott L, Omidvar N, Marti Perez S, French R, Eberl M, Clarkson RW. Suppression of apoptosis inhibitor c-FLIP selectively eliminates breast cancer stem cell activity in response to the anti-cancer agent, TRAIL. *Breast Cancer Res*. 2011;13(5):R88.
128. Ding L, Yuan C, Wei F, Wang G, Zhang J, Bellail AC, et al. Cisplatin restores TRAIL apoptotic pathway in glioblastoma-derived stem cells through up-regulation of DR5 and down-regulation of c-FLIP. *Cancer Invest*. 2011;29(8):511–20.
129. Fukuda S, Foster RG, Porter SB, Pelus LM. The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34+ cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2002;100(7):2463–71.
130. Leung CG, Xu Y, Mularski B, Liu H, Gurbuxani S, Crispino JD. Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and

- maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *J Exp Med*. 2007;204(7):1603–11.
131. Pennartz S, Belvindrah R, Tomiuk S, Zimmer C, Hofmann K, Conradt M, et al. Purification of neuronal precursors from the adult mouse brain: Comprehensive gene expression analysis provides new insights into the control of cell migration, differentiation, and homeostasis. *Mol Cell Neurosci*. 2004;25(4):692–706.
 132. Carter BZ, Qiu Y, Huang X, Diao L, Zhang N, Coombes KR, et al. Survivin is highly expressed in CD34(+)38(-) leukemic stem/progenitor cells and predicts poor clinical outcomes in AML. *Blood*. 2012;120(1):173–80.
 133. Jin F, Zhao L, Zhao HY, Guo SG, Feng J, Jiang XB, et al. Comparison between cells and cancer stem-like cells isolated from glioblastoma and astrocytoma on expression of anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes. *Neuroscience*. 2008;154(2):541–50.
 134. Kelly PN, Puthalakath H, Adams JM, Strasser A. Endogenous bcl-2 is not required for the development of Emu-myc-induced B-cell lymphoma. *Blood*. 2007;109(11):4907–13.
 135. Madjd Z, Mehrjerdi AZ, Sharifi AM, Molanaei S, Shahzadi SZ, Asadi-Lari M. CD44+ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. *Cancer Immun*. 2009;9(August 2008):1–7.
 136. Tagscherer KE, Fassl a, Campos B, Farhadi M, Kraemer a, Böck BC, et al. Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. 2008;27(52):6646–56.
 137. Wu S, Wang X, Chen J, Chen Y. Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Elsevier Inc.; 2013;434(4):898–903.
 138. Wang L, Guo H, Yang L, Dong L, Lin C, Zhang J, et al. Morusin inhibits human cervical cancer stem cell growth and migration through attenuation of NF- κ B activity and apoptosis induction. *Mol Cell Biochem*. 2013;379(1–2):7–18.

139. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(12):979–87.
140. Guzman ML. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood.* 2001;98(8):2301–7.
141. Warner JK, Wang JCY, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene.* 2004;23(43):7164–77.
142. Zhou J, Zhang H, Gu P, Bai J, Margolick JB, Zhang Y. NF-κB pathway inhibitors preferentially inhibit breast cancer stem-like cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;111(3):419–27.
143. Birnie R, Bryce SD, Roome C, Dussupt V, Droop A, Lang SH, et al. Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. *Genome Biol.* 2008;9(5):R83–2008–9–5–r83. Epub 2008 May 20.
144. Ju JH, Jang K, Lee KM, Kim M, Kim J, Yi JY, et al. CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modulating NF-κB signaling in CD44-expressing breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2011;32(10):1474–83.
145. Dalmay T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene.* 2006;25(46):6170–5.
146. Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Letters.* 2009. p. 116–26.
147. Tu H-F, Lin S-C, Chang K-W. MicroRNA aberrances in head and neck cancer: pathogenetic and clinical significance. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;21(2):104–11.
148. Wong QWL, Lung RWM, Law PTY, Lai PBS, Chan KYY, To KF, et al. MicroRNA-223 Is Commonly Repressed in Hepatocellular Carcinoma and Potentiates Expression of Stathmin1. *Gastroenterology.* 2008;135(1):257–69.
149. Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the

- hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene*. 2009;28(40):3526–36.
150. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(1):264–9.
 151. Ma S, Tang KH, Chan YP, Lee TK, Kwan PS, Castilho A, et al. MiR-130b promotes CD133+ liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Cell Stem Cell*. 2010;7(6):694–707.
 152. Wong QWL, Ching AKK, Chan AWH, Choy KW, To KF, Lai PBS, et al. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res*. 2010;16(3):867–75.
 153. Bao B, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Bao G, Ali S, et al. Targeting CSC-related miRNAs for cancer therapy by natural agents. *Curr Drug Targets*. 2012;13(14):1858–68.
 154. Ji Q, Hao X, Zhang M, Tang W, Meng Y, Li L, et al. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One*. 2009;4(8).
 155. Guessous F, Zhang Y, Kofman A, Catania A, Li Y, Schiff D, et al. microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle*. 2010. p. 1031–6.
 156. Golestaneh AF, Atashi A, Langroudi L, Shafiee A, Ghaemi N, Soleimani M. miRNAs expressed differently in cancer stem cells and cancer cells of human gastric cancer cell line MKN-45. *Cell Biochem Funct*. 2012;30(5):411–8.
 157. EMD Millipore Corporation I. Muse™ Count & Viability Kit User ' s Guide. 2013;MCH100102:1–101.
 158. EMD Millipore Corporation I. Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit. 2013;MCH100105.
 159. QIAGEN. RT Profiler PCR Array manual. 2011.

160. Fu-Shi Han¹, Mou-Bin Lin², Hui-Yuan Zhu³, Ying-Qun Chen⁴, Wei Shui¹ J-MX. Anti-proliferation effect of zoledronic acid on human colon cancer line SW480. *Asian Pac J Trop Med*. 2015;8(11):881–8.
161. Koto K, Murata H, Kimura S, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, et al. Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents. *Spandidos Publications*; 2010;24(1):233–9.
162. Xie F, Li P, Gong J, Zhang J, Ma J. The bisphosphonate zoledronic acid effectively targets lung cancer cells by inhibition of protein prenylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Nov 27;467(4):664–9.
163. Huerta-Yepez S, Baritaki S, Baay-Guzman G, Hernandez-Luna M a., Hernandez-Cueto A, Vega MI, et al. Contribution of either YY1 or BclXL-induced inhibition by the NO-donor DETANONOate in the reversal of drug resistance, both in vitro and in vivo. YY1 and BclXL are overexpressed in prostate cancer. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2013;29:17–24.
164. Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami HA, Croucher PI, Rostami-H A, et al. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer*. 2001 Apr 20;84(8):1126–34.
165. Biray Avci C, Kurt CC, Tepedelen BE, Ozalp O, Goker B, Mutlu Z, et al. Zoledronic acid induces apoptosis via stimulating the expressions of ERN1, TLR2, and IRF5 genes in glioma cells. *Tumor Biol. Tumor Biology*; 2016;37(5):6673–9.
166. Okamoto S, Jiang Y, Kawamura K, Shingyoji M, Tada Y, Sekine I, et al. Zoledronic acid induces apoptosis and S-phase arrest in mesothelioma through inhibiting Rab family proteins and topoisomerase II actions. *Cell Death Dis. Nature Publishing Group*; 2014;5(11):e1517.
167. Varol U, Degirmenci M, Karaca B, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, et al. Zoledronic acid increases cytotoxicity by inducing apoptosis in hormone and docetaxel-resistant prostate cancer cell lines. *Tumour Biol*. 2015;36(2):779–86.

168. Frenzel A, Grespi F, Chmielewski W, Villunger A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis*. 2009;14(4):584–96.
169. Wang IT, Chou SC, Lin YC. Zoledronic acid induces apoptosis and autophagy in cervical cancer cells. *Tumour Biol*. 2014;35(12):11913–20.
170. Ottewill PD, Monkkonen H, Jones M, Lefley D V, Coleman RE, Holen I. Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(16):1167–78.
171. Aoyagi T, Morii T, Ohtsuka K, Ohnishi H, Tajima T, Yoshiyama A, et al. Lung cancer cell line sensitivity to Zoledronic acid is BAX-dependent. *Anticancer Res*. 2013;33(12):5357–63.
172. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. Macmillan Magazines Ltd.; 2000 Oct 12;407(6805):770–6.
173. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):441–6.
174. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*. 1997;91(4):479–89.
175. Tsujimoto Y, Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochimie*. 2002 Feb;84(2–3):187–93.
176. Rostovtseva TK, Antonsson B, Suzuki M, Youle RJ, Colombini M, Bezrukov SM. Bid, but Not Bax, Regulates VDAC Channels. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13575–83.
177. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie a E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*. 1998;17(25):3247–59.
178. Robak PS and T. Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs) as Potential Molecular Targets for Therapy of Hematological Malignancies. *Current Molecular Medicine*. 2011. p. 633–49.

179. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res.* 1998;13(4):581–9.
180. Dunford JE, Rogers MJ, Ebetino FH, Phipps RJ, Coxon FP. Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of Rac, Cdc42, and Rho GTPases. *J Bone Miner Res.* 2006;21(5):684–94.
181. Senaratne SG, Mansi JL, Colston KW. The bisphosphonate zoledronic acid impairs Ras membrane [correction of impairs membrane] localisation and induces cytochrome c release in breast cancer cells. *Br J Cancer.* 2002 May 6;86(9):1479–86.
182. Shipman CM, Croucher PI, Russell RGG, Helfrich MH, Rogers MJ. The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Res.* 1998;58(23):5294–7.
183. Rogers MJ. New Insights Into the Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. *Curr Pharm Des.* 2003;9(32):2643–58.
184. Segawa H, Kimura S, Kuroda J, Sato K, Nogawa M, Yuasa T, et al. The anti-leukemic efficacy of the third generation bisphosphonate ONO5920/YM529. *Leuk Res.* 2005;29(4):451–7.
185. Göbel A, Thiele S, Browne AJ, Rauner M, Zinna VM, Hofbauer LC, et al. Combined inhibition of the mevalonate pathway with statins and zoledronic acid potentiates their anti-tumor effects in human breast cancer cells. *Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd;* 2016;375(1):162–71.
186. Yamato A, Soda M, Ueno T, Kojima S, Sonehara K, Kawazu M, et al. Oncogenic activity of BIRC2 and BIRC3 mutants independent of nuclear factor- κ B-activating potential. *Cancer Sci.* 2015;106(9):1137–42.
187. Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(8):561–74.
188. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.*

Elsevier Inc.; 2011;144(5):646–74.

189. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18(49):6853–66.
190. Gasparian A V, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, et al. The role of IKK in constitutive activation of NF- κ B transcription factor in prostate carcinoma cells. 2002;
191. Rajasekhar VK, Studer L, Gerald W, Socci ND, Scher HI. Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF- κ B signalling. *Nat Commun*. Nature Publishing Group; 2011;2(1):113–66.
192. Huerta-Yepez S, Vega M, Jazirehi A, Garban H, Hongo F, Cheng G, et al. Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-kappa B and inhibition of Bcl-xl expression. *Oncogene*. 2004;23(29):4993–5003.
193. Kubista B, Trieb K, Sevelde F, Toma C, Arrich F, Heffeter P, et al. Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells. *J Orthop Res*. 2006;24(6):1145–52.
194. Evdokiou A, Labrinidis A, Bouralexis S, Hay S, Findlay DM. Induction of cell death of human osteogenic sarcoma cells by zoledronic acid resembles anoikis. *Bone*. Elsevier; 2016 Nov 19;33(2):216–28.
195. Forsea A-M, Müller C, Riebeling C, Orfanos CE, Geilen CC. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit cell cycle progression in human melanoma cells. *Br J Cancer*. 2004 Aug 16;91(4):803–10.
196. Kuroda J, Kimura S, Segawa H, Kobayashi Y, Yoshikawa T, Urasaki Y, et al. The third-generation bisphosphonate zoledronate synergistically augments the anti-Ph⁺ leukemia activity of imatinib mesylate. *Blood*. 2003;102(6):2229–35.

Özgeçmiş

1978 yılında İran'ın Maragheh şehrinde doğmuştur. 2001 yılında Tebriz Üniversitesinin Doğa bilimleri Fakültesi'nde Biyoloji -hayvansal bilimleri- bölümünde lisans eğitimini tamamlamıştır. 2003 - 2009 yılları arasında lise biyoloji öğretmeni olarak çalıştı. 2009 yılında Urmiye Tıp Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başlamış ve 2012 yılında üniversitenin tüm yüksek lisans öğrencilerin arasında birinci olarak mezun oldu. 2013 yılında Türkiye'ye taşınıp Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Araştırma ilgisi kanser araştırmaları üzerinde olduğundan 2014 yılında Ege Üniversitesi Temel Onkoloji bölümünde Kanser Biyolojisi ve İmmünolojisi programında ikinci yüksek lisans eğitimine başladı. 2014 yılında FEBS- Netherland tarafından bir aylık uluslararası araştırma fellowşipi kazandı. Doktora eğitimine başladığından itibaren, 6 BAP projesi ve bir TÜBİTAK 1003 projesinde araştırmacı olarak görev almıştır. Evlidir ve bir yaşında bir erkek çocuğu bulunmaktadır.