

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KANSER HÜCRELERİNDE ERKEN KEMOTERAPİ
CEVABININ ^{99m}Tc-TETROFOSMİN İLE *İN VİTRO*
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Elif TABAR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT

Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu:622.02.01

Sunuş Tarihi:23.07.2010

Bornova-İZMİR

2010

Elif Tabar tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Kanser hücrelerinde erken kemoterapi cevabının ^{99m}Tc-Tetrofosmin ile *in vitro* değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

Raportör Üye :

Üye :

ÖZET

KANSER HÜCRELERİNDE ERKEN KEMOTERAPİ CEVABININ ^{99m}Tc-TETROFOSMİN İLE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

TABAR, Elif

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT

Temmuz 2010, 61 Sayfa

Radyoişaretli bileşikler, proliferasyon, agresiflik gibi tümör karakteristiklerinin değerlendirilmesinde, kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser tedavilerinin etkinliğinin belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir. ¹⁸F, ^{99m}Tc, ¹²⁴I vb. ile işaretlenen bileşiklerle tedaviden sonra hücre canlılığındaki azalmanın değerlendirilmesi ile apoptozun dedeksiyonu yapılabilmektedir.

Rutinde miyokardiyal perfüzyon görüntüleme ajanı olarak kullanılan ^{99m}Tc-Tetrofosmin'in aynı zamanda meme tümörü de dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde akümüle olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmanın amacı; Cisplatin uygulanmış MCF-7 meme kanser hücre hattında, tedavi sonrası ^{99m}Tc-Tetrofosmin tutulum oranına bağlı olarak kemoterapi değerlendirilmesinde ^{99m}Tc-Tetrofosmin etkinliğinin belirlenmesidir.

Annexin V ve TUNEL yöntemleriyle MCF-7 meme kanser hücre hattında Cisplatinin farklı dozlarıyla oluşturulan apoptotik etki incelendiğinde doz artışıyla beraber apoptoz oranında arttığı gözlenmiştir. MCF-7 hücre hattında kemoterapi gruplarında ^{99m}Tc-Tetrofosmin'in tutulumu kontrol grubuna göre daha düşüktür. Tutulum oranı ve apoptoz oranı arasındaki negatif ilişki kemoterapi cevabının ^{99m}Tc-Tetrofosmin ile değerlendirilme potansiyeli olabileceğini göstermektedir.

^{99m}Tc-Tetrofosmin'in meme kanserinde erken kemoterapi cevabının değerlendirilmesinde görüntüleme ajanı olarak kullanılabilmesi muhtemel görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: MCF-7, meme kanseri, apoptoz, ^{99m}Tc-Tetrofosmin, cisplatin

ABSTRACT**EVALUATION OF EARLY CHEMOTHERAPY RESPONSE IN TUMORS BY ^{99m}Tc-TETROFOSMIN**

TABAR, Elif

MSc, Institute of Nuclear Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT

July 2010, Pages 61

Radiolabeled molecules have an important role to evaluate tumour characteristics such as aggressiveness, and to identify the effectiveness of cancer treatments such as chemotherapy and radiotherapy. ¹⁸F, ^{99m}Tc, ¹²⁴I etc. labeled molecules can be used apoptosis detection by estimating decrescent cell viability after therapy.

^{99m}Tc-Tetrofosmin which is used as a myocardial perfusion imaging agent in a routine, at the same time is known to accumulate in various tumours including breast tumour.

The aim of this study to assess of efficacy of ^{99m}Tc-Tetrofosmin at evaluation of chemotherapy depend on the uptake ratios of ^{99m}Tc-Tetrofosmin after treatment in MCF-7 breast cancer cell lines where cisplatin applied.

When we examined the apoptotic ratios which induced with different dose of Cisplatin in MCF-7 breast cancer cells by using Annexin V and TUNEL methods, it was observed that the rate of apoptosis increased with soaring dose. The uptake rates of ^{99m}Tc-Tetrofosmin in MCF-7 cell line in the chemotherapeutic groups were lower than its in the control group (p<0.01). The negative correlation between uptake ratios and apoptotic rates shows that ^{99m}Tc- Tetrofosmin can have a potential for evaluating chemotherapy response.

^{99m}Tc-Tetrofosmin might be probably used as an imaging agent for estimation of early chemotherapy response in breast cancer.

Key words: MCF-7, breast cancer, apoptosis, ^{99m}Tc-Tetrofosmin, cisplatin

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmakla kalmayıp, her konuda benim yanımda olan beni destekleyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatma Yurt Lambrecht'a,

Enstitümüzün laboratuvarında her türlü çalışma imkanını sağlayan Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı başkanı ve enstitü müdürümüz Sayın Prof. Dr. Perihan ÜNAK'a,

Çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan, Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında çalışma imkanı sağlayan Sayın Doç. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e,

Tez çalışmamda bana yardımcı olan canım arkadaşlarım Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencileri Müsteyde YÜCEBAŞ ve Tuğçe BALCI'ya,

İyi, kötü her anımda yanımda olan, beni destekleyen, en kötü anımda beni mutlu edebilen sevgili eşim Emre TABAR'a,

Hayatımın her aşamasında benimle birlikte olan onlara sahip olduğum için kendimi hep şanslı hissettiğim canım annem ve biricik kardeşime

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1 Kanser ve Meme Kanseri	5
2.2 MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı	5
2.3 Kanser Tedavisinde Sitotoksik Kemoterapi	6
2.3.1 DNA hasarı oluşturan ajanlar	7
2.4 Sitotoksosite Analizleri	8
2.4.1 IC ₅₀ (İnhibitör Konsantrasyon Oranı)	8
2.4.2 Tripan mavisi boyası canlılık testi	9
2.4.3 XTT Testi	10
2.5 Apoptoz	11

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

2.5.1 Apoptozda görülen temel kimyasal ve morfolojik değişiklikler	13
2.5.2 Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler	17
2.5.2.1 Annexin V yöntemi	18
2.5.2.2 TUNEL yöntemi	20
2.5.3 Apoptozun <i>in vivo</i> dedeksiyonu.....	21
2.5.3.1 Radyoişaretli Annexin V türevleri	21
2.6 Protein Analizi	26
2.7 Teknesyum-99m (^{99m} Tc) Kimyası	26
2.7.1 ^{99m} Tc-Tetrofosmin.....	28
3. MATERYAL VE METOD	30
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	30
3.2 MCF-7 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	32
3.2.1 MCF-7 hücrelerinin dondurulması	33

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.2 Dondurulmuş MCF-7 hücrelerinin çözülmesi.....	33
3.2.3 MCF-7 hücrelerinin pasajlanması.....	34
3.2.4 MCF-7 hücre canlılığının belirlenmesi	34
3.3 Sitotoksikite Testleri.....	35
3.3.1 Cisplatinin MCF-7 hücrelerinde IC ₅₀ dozunun belirlenmesi.....	35
3.4 Deney Düzeninin Kurulması ve Cisplatin Uygulanması.....	37
3.5 Apoptoz Testleri	37
3.5.1 Annexin V-EGFP yöntemi	37
3.5.2 TUNEL yöntemi	38
3.6 Protein Analizi.....	40
3.7 Tetrafosmin'in Na ^{99m} TcO ₄ ile İşaretlenmesi.....	41
3.8 ^{99m} Tc-Tetrafosmin'in Kalite Kontrolü.....	42
3.9 ^{99m} Tc-Tetrafosmin'in MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerine Bağlanması.....	42
3.10 İstatistiksel Analizler.....	43
4.BULGULAR	44
4.1 Sitotoksikite Testleri Sonuçları	44

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.1.1 Cisplatinin MCF-7 meme kanseri hücre hattında IC ₅₀ dozunun belirlenmesi	44
4.2 Apoptoz Testleri Sonuçları.....	45
4.2.1 Annexin V yöntemi ile elde edilen sonuçlar	46
4.2.2 TUNEL yöntemi ile elde edilen sonuçlar.....	47
4.3 Protein Analizi Sonuçları	50
4.4 ^{99m} Tc-Tetrofosmin'in Kalite Kontrol Sonuçları	50
4.4.1 RTLC ile elde edilen sonuçlar	50
4.5 ^{99m} Tc-Tetrofosmin'in MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Tutulum Sonuçları	54
5.SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	56
KAYNAKLAR DİZİNİ	58
ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Hücre döngüsünün safhaları.....	6
2.2 Cisplatinin etki mekanizması	8
2.3 IC ₅₀ oranı	9
2.4 Tripan mavisi boyası ile canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesi.....	9
2.5 Neubauer Hemasitometresi	10
2.6 XTT'nin formazana dönüşümü	11
2.7 a) Parmak aralarındaki dokunun ortadan kaldırılması b) Amfibi gelişiminde kuyruğun ortadan kaldırılması c) Gereksiz hücrelerin ortadan kaldırılması d) Zararlı hücrelerin eliminasyonu	13
2.8 Apoptoz ve nekroz karşılaştırması.....	15
2.9 Elektron mikroskopunda apoptoza giden bir hücre.....	16
2.10 Annexin V'in fosfotidilserine bağlanması	19
2.11 Floresan mikroskopunda apoptotik hücrelerin görünümü	20
2.12 ⁹⁹ Mo'nun bozunum şeması.....	27
2.13 ^{99m} Tc-Tetrofosmin kimyasal yapısı	29

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 XTT testi ile cisplatinin sitotoksitesisi.....	44
4.2 Tripan mavisi testi ile cisplatinin sitotoksitesisi.....	45
4.3 MCF-7 hücre hattında Annexin V yöntemi ile kontrol ve cisplatin gruplarında apoptoz.....	46
4.4 Annexin-V yöntemi ile değerlendirilen cisplatinin doza bağlı etkisi.....	47
4.5 MCF-7 hücre hattında 4. gün 25 µM'lık cisplatin dozunun TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin gösterilmesi.....	48
4.6 MCF-7 hücre hattında TUNEL yöntemi ile kontrol ve cisplatin gruplarında apoptoz.....	49
4.7 TUNEL yöntemi ile değerlendirilen cisplatinin doza bağlı etkisi.....	49
4.8 ^{99m} Tc-Tetrofosmin'in aseton/diklorometan (35/65) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı	51
4.9 ^{99m} TcO ₄ ⁻ in aseton/diklorometan (35/65) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı	52
4.10 İndirgenmiş ^{99m} Tc'un aseton/diklorometan (35/65) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı.....	52
4.11 ^{99m} Tc-Tetrofosmin'in etanol/amonyak/su (2/1/5) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı.....	53
4.12 ^{99m} TcO ₄ ⁻ in etanol/amonyak/su (2/1/5) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

4.13 İndirgenmiş ^{99m}Tc 'un etanol/amonyak/su (2/1/5) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı 54

4.14 MCF-7 hücre hattında kontrol ve cisplatin gruplarında protein gramı başına düşen % aktiviteleri 55

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Apoptoz görüntülemenin tıptaki uygulamaları.....	25
2.2 Protein analiz teknikleri ve örnekleri.....	26
4.1 MCF-7 hücre hattında kontrol ve cisplatin gruplarında protein analizi sonucu bulunan protein miktarları.....	50
4.2 Rf değerleri.....	50
4.3 ^{99m} Tc-Tetrofosmin'in MCF-7 hücre hattında kontrol ve cisplatin gruplarındaki tutulumu	55

1. GİRİŞ:

Sık görülmesi ve ölüme neden olma oranının yüksek olması nedeniyle bir halk sağlığı sorunu haline gelen kanser hastalığında, tümör boyutlarındaki artış hücre proliferasyonu ve hücre kaybı arasındaki dengenin sonucudur. Günümüzde kullanılan farklı etki mekanizmalarına sahip kemoterapötiklerinde apoptoz ile etki gösterdiği anlaşıldıktan sonra tümör kinetiği konusundaki çalışmalar apoptoz üzerine yoğunlaşmıştır.

Genlerle düzenlenen programlanmış bir hücre ölümü olan apoptoz, nekrozdan farklı olarak inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri bir mekanizma ve organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Bu süreçte meydana gelen kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon, hücre büzülmesi, hücrenin iç yüzeyinde bulunan fosfolipidlerin molekülünün hücrenin dışına çıkması ve apoptotik cisimcikler olarak tanımlanan membranla çevrili veziküllerin oluşumu apoptoza özgü morfolojik değişikliklerdir. Apoptoz sırasında meydana gelen metabolik ve fizyolojik değişikliklerin bilinmesi tümörlü dokuların görüntülenmesini, teşhisini ve klinik bilgilerin elde edilmesini sağlar (Maxwell et al., 2009).

Yapılan çalışmaların çoğunda kemoterapi sonrası apoptozda artış olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle tümörlü dokunun kemoterapiye verdiği yanıtın apoptoz ile ilgili olduğu bilinmekte ve apoptozun kemoterapi yanıtını değerlendirmede kullanılan parametrelerden biri olduğu düşünülmektedir. Kemoterapi ile tedavinin erken safhalarında tümörlü dokuda meydana gelen değişikliklerin izlenmesi gereksiz kemoterapinin önlenmesi açısından önemlidir. Bu aynı zamanda tedavi masraflarının azalmasına ve etkin tedavi sürecine olanak sağlar (Kapucuoğlu vd., 2000).

Tümörlü dokuda meydana gelen apoptozun, diğer bir ifadeyle erken kemoterapi cevabının değerlendirilmesi için tümörün lokalizasyonu ve yayılımıyla ilgili metabolik bilgilere ihtiyaç vardır. Ancak günümüzde kullanılan bilgisayarlı tomografi (CT), ultrason ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi yöntemlerle kemoterapi cevabının değerlendirilmesi, oluşan anatomik değişikliklere bağlı olarak ancak tedavinin ileriki safhalarında mümkün olabilmektedir. Çünkü, tümör hücrelerindeki anatomik değişiklikler, tedavi süresince oluşan metabolik değişikliklerden daha sonra meydana gelir. Tedavinin erken safhalarında kemoterapi etkisi bu yöntemlerle görüntülenemez. Nükleer tıpta

kullanılan radyoişaretli bileşikler, hücre ölümlerinin, proliferasyon, agresiflik gibi tümör karakteristiklerinin belirlenmesi ve kanser tedavilerinin etkinliğinin değerlendirilmesi için daha etkili ve daha spesifiktir. Bu nedenle apoptoz görüntüleme çalışmalarında radyoişaretli bileşiklerin önemi gittikçe artmaktadır (Liang et al., 2008; Brauer, 2003).

Flor-18-flordeoksiglikoz (^{18}F -FDG) pozitron emisyon tomografi (PET) tümör hücrelerinde erken kemoterapi cevabının değerlendirilmesinde, CT, ultrason ya da MRI'dan daha iyi bir yöntemdir. PET erken teşhisi, tedaviyi planlamada kanserin hangi safhada olduğunun belirlenmesini ve tümör hücrelerinin çoğalma aktivitesini gösteren radyoişaretli bileşiğin konsantrasyonu ve lokalizasyonu ile hastalığın gidişatının değerlendirilmesini sağlar. Ancak, ^{18}F üretimi siklotron ile olur ve PET görüntüleme araçları oldukça pahalıdır. Bu nedenle PET, single photon emission tomografi (SPECT) ile karşılaştırıldığında kullanımı biraz sınırlanmaktadır. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ uygun yarı ömrü ve maliyetinin ucuz olması nedeniyle SPECT'de yaygın olarak kullanılan bir izotoptur (Liang et al., 2008).

Tümörlü dokuda apoptozun radyoişaretli bileşiklerle değerlendirilmesi ile ilgili araştırmalar mevcuttur. Liang ve arkadaşları tarafından bir çalışmada $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-DG ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -dietilentriaminpentaasetik asit-deoksiglikoz)'in tümör hücrelerinde ve hayvan modellerinde erken kemoterapi etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılma potansiyelini incelemişlerdir ve kemoterapi uygulanmayan kontrol grubundaki apoptoz oranının, kemoterapi gruplarındaki apoptoz oranına göre oldukça düşük olduğunu bulmuşlardır ve $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-DG'nin kemoterapi cevabının değerlendirilmesinde moleküler görüntüleme ajanı olarak kullanılabilmesi sonucuna varmışlardır (Liang et al., 2008).

Perek ve ark.larının $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glukarat'ın ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GLA) tümör hücrelerinde apoptoz ve nekrozun değerlendirilmesiyle ilgili yaptıkları çalışmada, kemoterapi ajanıyla oluşturulan apoptotik hücrelerde $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GLA tutulumunun (%6) ve yüksek sıcaklıkla oluşturulan nekrotik hücrelerde $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GLA tutulumunun (%12) kontrol hücrelerine oranla daha yüksek olduğunu saptamışlardır. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GLA'nın kanserli hastalarda hastalığın takibinde ve spesifik olarak tümörlü dokuda nekrozun değerlendirilmesinde daha faydalı bir ajan olarak kullanılabilmesini belirtmişlerdir (Perek et al., 2008).

Zhao ve ark.larının yaptığı diğer bir çalışmada ^{99m}Tc işaretli duramycin'in apoptoz sırasında hücre dışına transfer olan fosfotidiletanolamin (PtdE) molekülüne bağlandığını ve apoptoz görüntülümde kullanılabilirliğini araştırmışlardır. ^{99m}Tc -duramycin'in radyoişaretlemeden sonra yüksek spesifiklik ve PtdE'ye bağlanma potansiyeli olduğunu bulmuşlar ve sıçanlarda yapılan biyodağılım çalışmasında oldukça iyi bir farmakokinetiğe sahip olduğunu belirlemişlerdir (Zhao et al., 2008).

Denoyer ve ark.ları U937 insan lösemi hücre hattında oluşturulan apoptoz ile ^{99m}Tc -(V)DMSA (^{99m}Tc -dimerkaptosüksinikası) tutulumunu *in vivo* ve *in vitro* olarak incelemişler ve çalışmada canlı ve apoptotik hücrelerde ^{99m}Tc -(V)DMSA tutulumunun oldukça farklı olduğunu ve ^{99m}Tc -(V)DMSA'nın tümör değerlendirilmesinde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (Denoyer et al., 2004).

Bovine lactadherin apoptoz sırasında hücre yüzeyine çıkan fosfotidilserin molekülüne C1C2 domainine yüksek bağlanma ilgisine sahiptir. Bu nedenle Waehrens ve arkadaşları ^{99m}Tc -HYNIC-bovine lactadherin'in apoptoz dedeksiyonunda kullanılma potansiyelini araştırmışlardır. HL60 lösemi hücre hattında yaptıkları çalışmada bovine lactadherinin PS'in yüzeyinde bulunan fosfolipit içeren yüzeye Annexin-V'tan daha yüksek afiniteyle bağlandığını ve apoptotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılabilecek bir ajan olduğunu belirtmişlerdir (Waehrens et al., 2007).

^{99m}Tc -Tetrofosmin rutinde miyokardiyal perfüzyon görüntüleme ajanı olarak kullanılan katyonik lipofilik difosfindir. Bu radyoişaretleli molekülün aynı zamanda bazı neoplazmalar ve tümörlü dokunun tespit edilmesinde de kullanıldığı bilinmektedir. ^{99m}Tc -Tetrofosmin sintigrafisinin primer ve metastatik meme kanserinde, tiroid kansinomlarında, beyin tümörlerinde ve lenfomalarda yüksek duyarlılık ve spesifikliğe sahip olduğu bilinmektedir (Kim et al,2002). Yapılan çalışmalarda; ^{99m}Tc -Tetrofosmin meme kanseri sintigrafisi ve pek çok metastaz lezyonların görüntülenmesinde yüksek ayırma gücüne sahip olduğu belirlenmiştir (Schillaci et al., 1997).

Bu çalışma ile MCF-7 meme kanser hücre hattında bir kemoterapi ilacı olan Cisplatinin farklı dozlarının apoptotik etkisi ^{99m}Tc -Tetrofosmin ile değerlendirilmiştir. Kemoterapi ajanı uygulanmış hücreler ve uygulanmayan

kontrol hücrelerindeki ^{99m}Tc -Tetrofosmin tutulumları arasındaki korelasyona bağlı olarak, kemoterapötik etki ve apoptoz görüntülenebilirliği ortaya konmuştur.

2. GENEL BİLGİLER:

2.1 Kanser ve Meme Kanseri:

Kanser; vücuttaki kontrollü bölünebilme yeteneğini kaybetmiş, sağlıklı olmayan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasdır. Kanser hücreleri hastalığın seyrine ve büyüklüğüne göre vücudun her yerine yayılabilirler. Bu kontrolsüz oluşan kanser hücreleri birikerek tümörleri oluştururlar. Kanser hücreleri bağımlı oldukları tümörden ayrılırlarsa kan ve lenf dolaşımı ile vücudun her tarafına yayılırlar. Bu durum vücut için çok tehlikeli olup, genelde ölümlerle sonuçlanmaktadır.

Önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunu haline gelen kanser, ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Batı toplumlarında her yıl 250-350 kişiden biri kansere yakalanmaktadır. 60 yaşın üzerindeki grupta ise kanser sıklığı çok artmakta 300 kişide 4-5 civarına yükselmektedir. Ülkemizde kesin istatistikler bulunmamakla birlikte insidansın bunun yarısı kadar olduğu tahmin edilmektedir (www.kanser.org).

Meme kanseri ise, akciğer kanserinden sonra, dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanser türüdür. Her 8 kadından birinin hayatının belirli bir zamanında meme kanserine yakalanacağı bildirilmektedir. Erkeklerde de görülmekle beraber, kadın vakaları erkek vakalarından 100 kat fazladır. 1970'lerden bu yana meme kanserinin görülme sıklığında artış yaşanmaktadır ve bu artışa modern, Batılı yaşam tarzı sebep olarak gösterilmektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde görülme sıklığı, dünyanın diğer bölgelerinde görülme sıklığından daha fazladır. Her yıl 44000'de bir kadın meme kanserinden ölmektedir Meme kanseri, yayılmadan önce, erken tespit edilirse, hasta %96 yaşam şansına sahiptir (www.kanser.org).

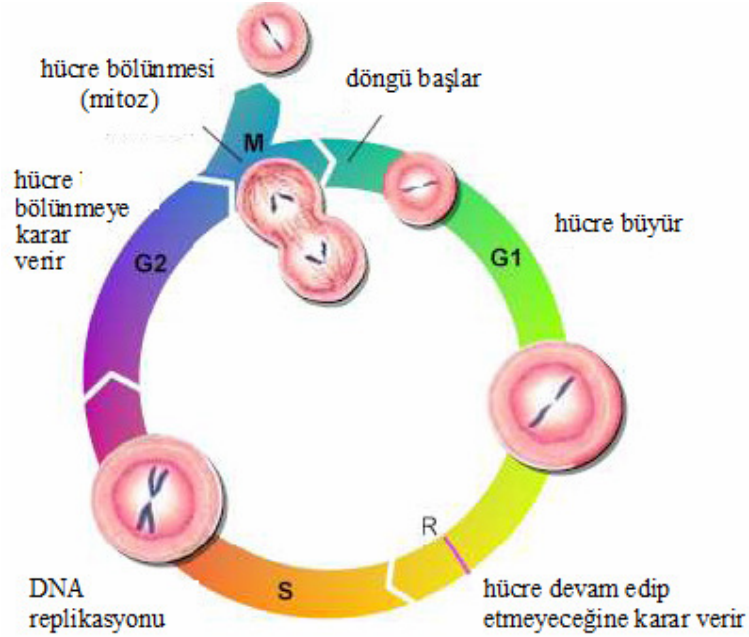
2.2 MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı:

İnsan kanserlerinden üretilmiş devamlı hücre hatları, laboratuvar çalışmalarında ve *in vitro* kanser araştırmalarında model olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek oranda homojenite göstermeleri, donmuş stoklardan kolaylıkla üretilebilmeleri, sınırlı koşullarda bile sınırsız üreme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedirler.

MCF-7 meme kanseri hücre hattı, 1970 yılında beyaz ırka mensup, 69 yaşındaki bir kadından izole edilmiştir. Meme bezlerinde adenokarsinom görülen hastanın epitelyal hücreleri kültüre edilmiştir.

2.3 Kanser Tedavisinde Sitotoksik Kemoterapi:

Sitotoksik kemoterapi, invazif tümörleri kontrol etmek için uygulanan başlıca klinik yöntemdir. Sitotoksik kemoterapi ajanları esas olarak hücre döngüsünü etkilemektedir. Hücre döngüsü 5 safhadan oluşmaktadır: G_0 , G_1 , S, G_2 ve M (Şekil 2.1). Ara fazlar olan G_0 , G_1 ve G_2 hücrenin aktif DNA replikasyonun meydana geldiği S fazına ve mitoz bölünmenin meydana geldiği M fazına hazırlandığı zaman periyotlarıdır. Bu nedenle hazırlık safhası olarak isimlendirilir. Hücrelerin döngüden çıktığı ve replikasyon işleminin pasif olduğu faz G_0 fazıdır. Dinlenme halindeki hücreler büyüme faktörleriyle uyarıldığında, G_0 fazından G_1 fazına geçerler. G_1 fazı hücrede moleküler değişikliklerin meydana gelmesiyle karakterize edilen, hücrenin büyüdüğü ve S fazında meydana gelen DNA replikasyonuna hazırlandığı safhadır (Prendergast, G.C. and Jaffee, E.M., 2007).



Şekil 2.1. Hücre döngüsünün safhaları

DNA hasarı oluşturan çoğu ilaç ve kanser ilaçlarının antimetabolit sınıfları, hücre ölümünü tetikleyen DNA sentez sürecine hasar vermek için G_1 ve S fazını

etkilerler. İkinci ara faz G_2 , S fazından sonra meydana gelen ve mitoz bölünmenin meydana geldiği M fazına hazırlandığı ikinci büyüme periyodudur. M fazında üretilen mitotik iğ iplikleri kanser ilaçlarının antimitotik sınıfının hedefidir. Hücre bölünmesi ya da sitokinezin fiziksel süreçleri, hücre kromozolarının ayrılması ve iki yavru hücre oluşmasının tamamlandığı M fazının sonunda meydana gelir. Bu süreç tamamlandığında hücre ya olgunlaşma ve replikasyon için hücre döngüsünün G_1 fazına ya da dinlenme fazı olan G_0 ' a girer ve bölünmeyi durdurur (Prendergast, G.C. and Jaffee, E.M., 2007).

Sitotoksik kemoterapötikler, normal ve malignan hücreleri, hücre döngüsünün bir ya da daha fazla fazında rol alarak etkilerler. Her iki hücre tipinde de hasar sonucu ölüm gerçekleşmesine rağmen, normal hücreler küçük hasarları tamir etme konusunda daha iyi bir yeteneğe sahiptir ve buna bağlı olarak neoplastik hücrelerle karşılaştırıldığında daha yüksek hayatta kalma oranına sahiptir. Malignan hücrelerin nispeten daha hassas olmaları kemoterapi ile klinikte yararlı etkilere ulaşabilmek için ana faktör olmuştur. Kemoterapi ilaçları faza spesifik olarak etki edebilirler ya da genel olarak döngüdeki hücreleri, hücre döngüsü boyunca etkileyebilirler. Bazı durumlarda, hücreler çeşitli ajanların sitotoksik etkileri için hassas olabilirler, bu yüzden kemoterapinin tüm etkileri hücre döngüsüne spesifik olmayabilir (Prendergast, G.C. and Jaffee, E.M., 2007).

Klinik öncesi ve klinik çalışmalarda, siklofosomid, Cisplatin, paclitaxel gibi sitotoksik kemoterapi ajanlarının bağışıklık baskılayıcı aktivite gösterdiği tanımlanmıştır. Kanser araştırmalarının bu alanı oldukça ilgi çekici bir bölümdür ve kanserin klinik tedavisi için sitotoksik ajanların uygunluğunu ortaya koymaktadır (Prendergast, G.C. and Jaffee, E.M., 2007).

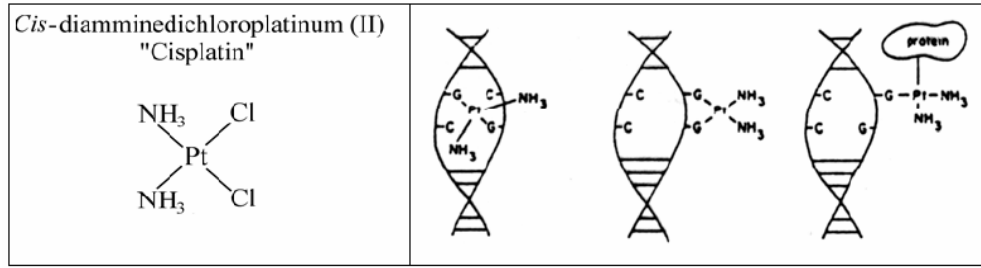
2.3.1 DNA hasarı oluşturan ajanlar:

DNA hasarı oluşturan kanser kemoterapi ajanları, alkilleyici ajanlar, topoizomeraz inhibitörleri ve platin bileşikleri olmak üzere 3 alt sınıfa ayrılırlar. DNA hasarı oluşturan ajanların ilk keşfedilmesi ve 1950'li yıllarda daha da geliştirilmesiyle kanserin klinik tedavi için en çok kullanılan ilaç sınıfı haline gelmiştir (Prendergast, G.C. and Jaffee, E.M., 2007).

Cisplatin:

Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan platin bileşikleri, DNA zincirlerine zincir arası ve zincir içi çapraz bağlarla bağlanarak hasar verir (Şekil 2.2). Bu bileşikler hücre döngüsüne spesifik değildir (Prendergast, G.C. and Jaffee, E.M., 2007).

Cisplatin (cis-diamminedikloroplatınium) DNA'nın iki farklı bölgesinde, DNA sentezi ve transkripsiyonunun engellenmesine yol açan çapraz bağlar oluşturan küçük bir moleküldür (Prendergast, G.C. and Jaffee, E.M., 2007). Cisplatin'in klorin gurupları, DNA'nın yapısındaki nükleofilik atomlar ile yer değiştirir, adenin ve guaninin N-7 pozisyonlarına bağlanarak etki eder (Sartor, 1998).



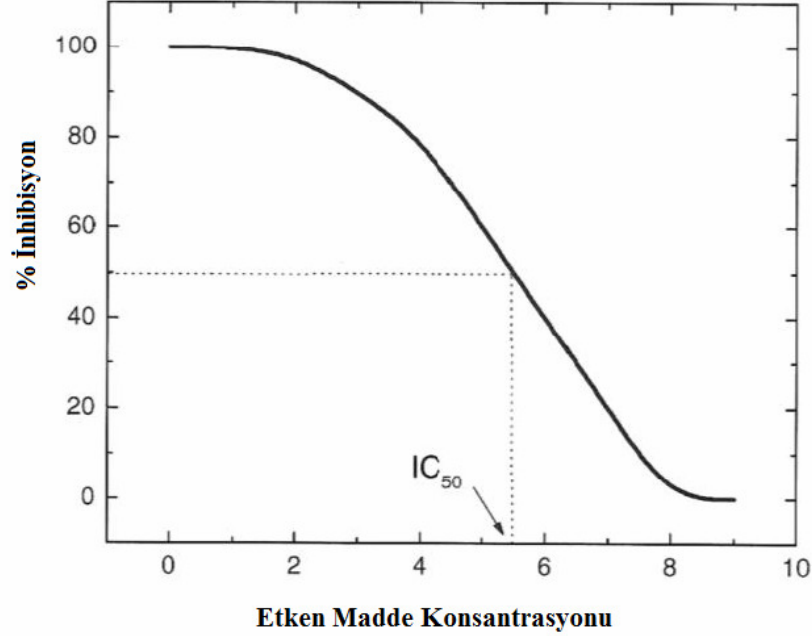
Şekil 2.2. Cisplatinin etki mekanizması

2.4 Sitotoksite Analizleri:

Sitotoksite testleri çeşitli hücre kültürlerinde kullanılan kimyasal bileşiklerin toksisitesini belirlemek için kullanılan *in vitro* metodlardır. Toksik kimyasallar hücrenin temel fonksiyonlarını etkilerler ve bu toksisite hücresel hasarın değerlendirilmesiyle ölçülebilir. *In vitro* sitotoksite testlerinin gelişimi çok sayıdaki bileşiğin potansiyel toksisitesini hızlı bir şekilde ölçme gerekliliğinden ortaya çıkmıştır.

2.4.1 IC₅₀ (İnhibitör Konsantrasyon Oranı):

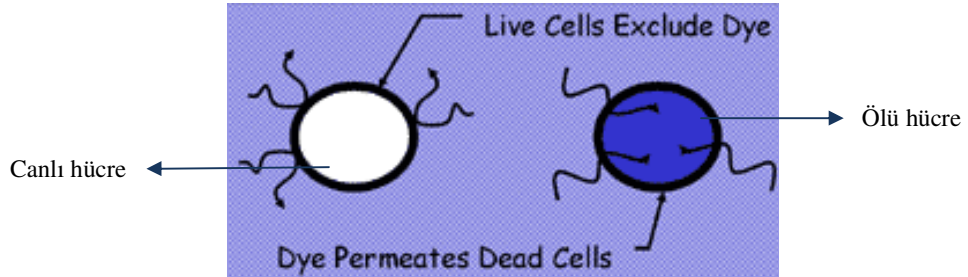
IC₅₀; koloni formasyonunda, µM düzeyde, %50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonudur. Sensivitedeki farklılıklar eğri üzerinden tespit edilmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. IC₅₀ oranı (Numanoğlu' dan, 2008)

2.4.2 Tripan mavisi boyası canlılık testi:

Canlı hücrelerin zarar görmemiş hücre membranları renksizdir. Çünkü hücre membranlarının seçici geçirgen olması nedeniyle, tripan mavisi boyasını absorplayamazlar. Tripan mavisi boyası sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebilir. Böylece, ışık mikroskobu altında canlı hücrelerin ölü hücrelerden ayırt edilmesinde kullanılır (Şekil 2.4). Hızlı ve ucuz bir yöntem olmakla birlikte hücre sayımı için çok küçük bir hacim yeterlidir (www.wikipedia.org).



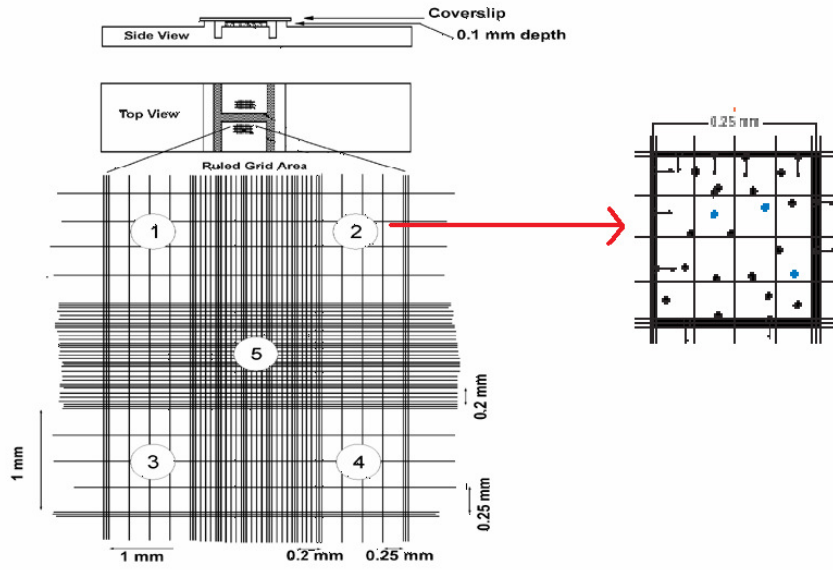
Şekil 2.4. Tripan mavisi boyası ile canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesi

Sayım için en çok kullanılan Neubauer hemositometresidir ve iki eşdeğer bölme sahiptir (Şekil 2.5). Sayma odacığının derinliği 0.1 mm'dir. Hücre süspansiyonu odacığa mikro pipetler yardımıyla aktarılır. Hücreler, karelerin üçlü çizgilerle çevrelenmiş olduğu merkezi bölmelerde sayılır. Bu bölmelerin alanı 1 mm^2 'dir. Böylece hacmi 1 mm^3 olur. Bu alandaki tüm hücreler sayılırsa (N):

$N=0.1 \text{ mm}^3$ 'te mevcut hücre sayısı

1 mL yani 1 cm^3 'teki hücre sayısı= $N \times DF \times 10^4$ olur.

DF: Dilüsyon Faktörü



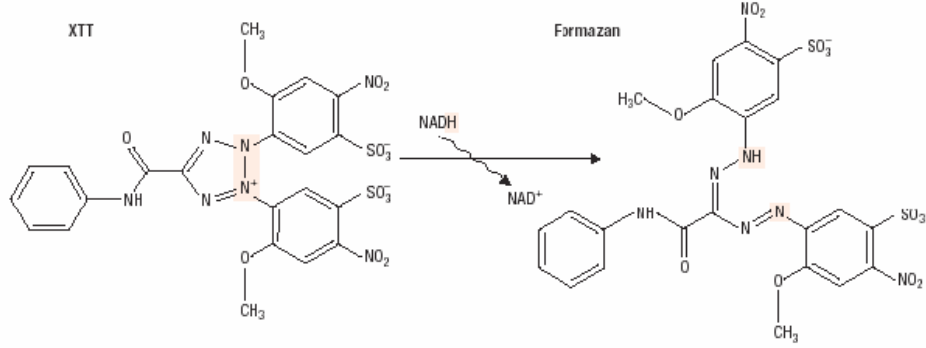
Şekil 2.5 Neubauer Hemositometresi (Numanoğlu'ndan, 2008)

2.4.3 XTT testi:

Tetrozolyum tuzları prensibine dayanan kolorimetrik bir metot olan XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide), proliferasyon ölçümü prosedürünü geniş ölçüde kolaylaştırmıştır. Bu kit hücre proliferasyonun çeşitli büyüme faktörleri ve besin bileşenleri ile ikili olarak ölçümü prensibine dayanmaktadır (Roche Diagnostics).

Yöntem Prensipleri:

Metabolik olarak aktif olan hücrelerin sarı tetrazolyum tuzu olan XTT'nin turuncu formazan boyasına dönüştürmesi prensibine dayanmaktadır (Şekil 2.6). Bu dönüşüm sadece canlı hücrelerde meydana gelmektedir. Formazan boyası sulu çözeltilerde çözünebilir ve direk olarak mikropalak okuyucu ile ölçülebilir (Roche Diagnostics).



Şekil 2.6. XTT'nin formazana dönüşümü

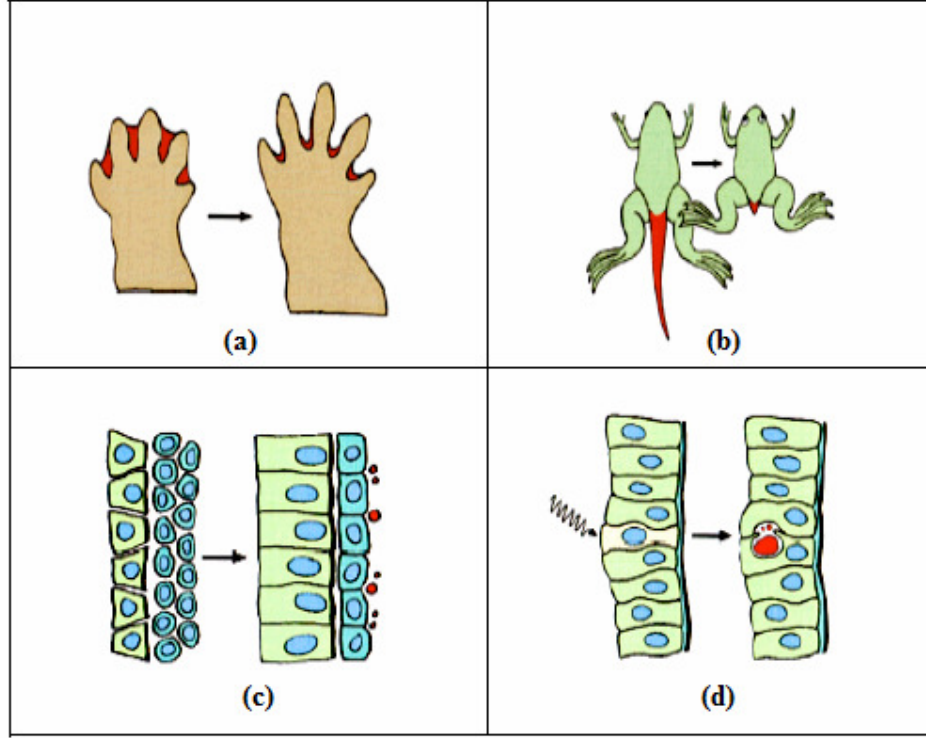
Yöntem, 96 kuyucuklu plâtelere kültür edilmiş hücrelerin, XTT solüsyonuyla 4-24 saat inkübe edilmesi sonucu oluşan turuncu formazan boyasının spektrofotometrik olarak mikropalak okuyucu ile ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir. Kuyucuklardaki canlı hücre sayısı ile mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi arasında doğru orantı vardır. Buna bağlı olarak oluşan turuncu formazan boyası absorbans ile gözlenir (Roche Diagnostics).

2.5 Apoptoz:

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J.F. Kerr tarafından nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Eski bir Yunan terimi olan apoptoz, apo(=ayrı) ve ptosis(=düşen) kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmuş, yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Bugün de bu terimi kullanmak uygundur ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü anlatır. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

Programlanmış hücre ölümü, hücre ölümünün erişkin dokularının korunmasında ve embriyo gelişiminde anahtar rol oynayan normal fizyolojik bir biçimdir. Erişkinlerde, programlanmış hücre ölümü, hücre proliferasyonunun dengelenmesi ve dokularda var olan toplam hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur. Örneğin, kemik iliğindeki sürekli üretimi dengelemek için, insanlarda günlük 5×10^{11} kadar kan hücresi programlanmış hücre ölümü ile ortadan kaldırılır. Ek olarak, programlanmış hücre ölümü organizmanın bir bütün olarak iyiliği için hasarlı ve tehlikeli potansiyeli olan hücrelerin ortadan kaldırılması yoluyla, bir savunma mekanizması sağlar. Virüsle enfekte hücreler sıklıkla programlanmış hücre ölümüne girer, böylece yeni virüs partiküllerinin oluşumu engellenir ve virüsün konak organizma içinde yayılımı sınırlanır. DNA hasarı gibi diğer saldırılar da programlanmış hücre ölümünü uyarır. DNA hasarı durumunda, programlanmış hücre ölümü, kanser gelişimine yol açabilecek mutasyonları taşıyan hücreleri ortadan kaldırır (Güneş, 2003). Ayrıca, aktive edilmiş lenfositlerin direkt apoptoz vasıtasıyla kendi antijenlerini elimine ettikleri görülür. Böylece apoptotik hücre miktarında görülen bir artış, dengenin olumsuz yönde bozulmasına; Alzheimer ve Parkinson gibi dejeneratif hastalıklardan ülseratif kolitler, AIDS gibi kronik hastalıklara ve hatta immünolojik hastalıklara bile neden olabilir (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

Gelişim sırasında, programlanmış hücre ölümü, birçok dokudaki istenmeyen hücrelerin elimine edilmesinde anahtar rol oynar. Örneğin, programlanmış hücre ölümü, amfibi gelişimi sırasında larva dokusunun ortadan kaldırılması, el ve ayak parmaklarının oluşumu sırasında, parmak aralarındaki dokunun ortadan kaldırılmasında, omuriliğin şekillenmesinde, erkek fetüslerde müller kanalının tahribatı esnasında ve menstrual siklus gibi birçok olayda görülür (Şekil 2.7) (Güneş, 2003).



Şekil 2.7. a) Parmak aralarındaki dokunun ortadan kaldırılması b) Amfibi gelişiminde kuyruğun ortadan kaldırılması c) Gereksiz hücrelerin ortadan kaldırılması d) Zararlı hücrelerin eliminasyonu

2.5.1 Apoptozda görülen temel kimyasal ve morfolojik değişiklikler:

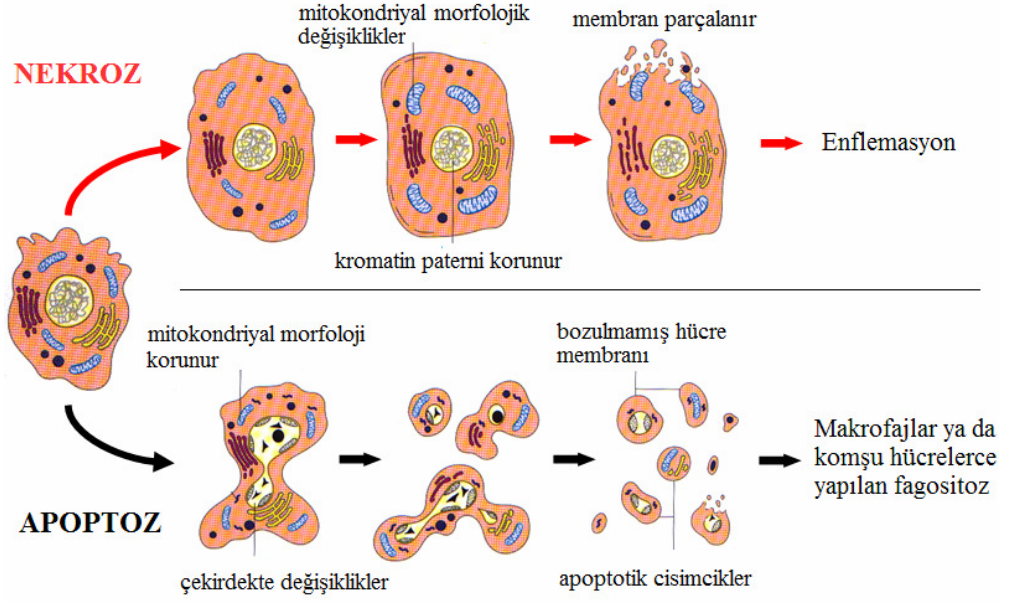
Apoptozu ilk olarak tanımlayan Kerr, doktora tezinde karaciğerin portal venöz kan akışının akut cerrahi kesilmesine bağlı olarak hepatik parankimanın hızlı involüsyonunu anlamaya çalışmıştır. İskemik hepatik loplardan, normal dokunun adacıkları arasında yer aldığını ve yer yer kondanse haldeki nükleer kromatin noktaları içeren sitoplazmanın yuvarlak küçük veziküllere dönüştüğünü bulmuştur. Bu veziküller daha sonra mononükleer fagositler tarafından ortadan kaldırılmaktadır. Bu hücrelerin öldüğü açıkça ortada olmasına rağmen inflamasyon olmadığı için nekrozdan farklı bir proses olduğunu düşünmüştür. Ayrıca, yuvarlak veziküller içeren mitokondri ve ribozomların proses boyunca değişmediğini gözlemlemiştir. Yuvarlak veziküllerin tomurcuklar ya da ölen hücrelerin yüzeylerinden yapılar oluşturarak kümeler halinde toplandığını belirtmiştir. Kerr, bu yeni tip hücre ölümünün, membran bütünlüğünün bozulduğu ve hücrenin şişmesini takiben çevre dokularla bağlantının kaybolduğu ve lokal

inflamasyonun gerekleŖtiđi nekrozdan tamamen farklı olduğunu aıklamıŖtır. Kerr karaciğerde gözlemlediği bu hücrelerin boyutlarında artıŖ meydana gelmesinden dolayı bu yeni tip hücre ölümünü ‘bzŖme’ nekrozu olarak tanımlamıŖtır (Blankenberg, 2008).

Searle ve Kerr’in beraber yaptığı alıŖmalarda, bazal hücre karsinomasının histolojik örneklerinde apoptozla ilgili deliller bulmuŖlardır. alıŖma grubu, apoptotik hücre bolluğunu çok sayıda mitotik hücrenin (bölünen hücreler) olmasına rağmen tümör hücrelerinin yavaŖ büyüme hızıyla aıklamıŖlardır. Aynı zamanda kanserli hastalarda radyoterapi uygulanan bölgelerde apoptoz oranında artıŖ olduğunu gzlemlemiŖlerdir (Blankenberg, 2008).

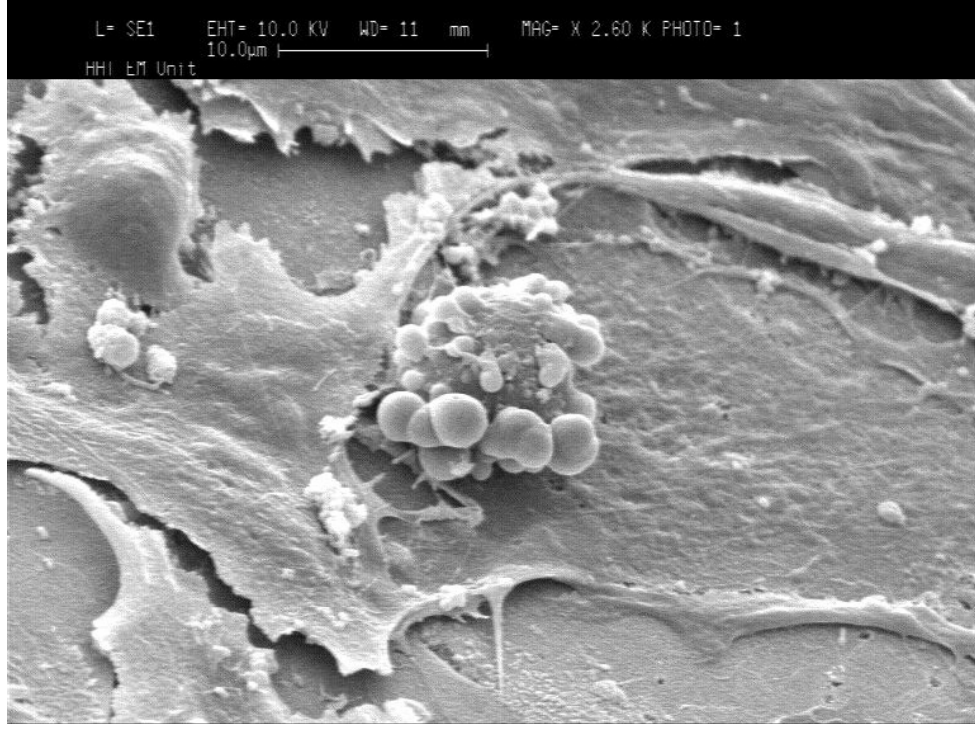
Kerr ve alıŖma grubu tarafından apoptoz tanımlanmasına rağmen, apoptozun biyolojik mekanizması ve yol izi hala bilinemiyordu. Devam eden alıŖmalarla apoptozda meydana gelen histolojik deđiŖiklikler Kerr tarafından detaylandırıldı (Blankenberg, 2008).

Apoptoz morfolojik olarak zgndr, nekrozda apoptozdan farklı olarak hücrenel bzŖme yerine ŖiŖme olur, bu patolojik hücre ölümü yani nekrozun erken belirtisidir. Nekrozun klasik nedenleri ise hipertermi, oksidatif fosforilasyon-Krebs siklusu ya da glikolizisin inhibisyonu, otolizis, hipoksi ve eŖitli toksinlerdir. Hücre tarafından genlerle programlanmayan ve eŖitli dıŖ etkenlerle gerekleŖen nekrotik hücre ölümünde, enerji depolarında ani azalma ile birlikte hücre zarının geçirgenliği bozulur ve sodyum ile suyun hücre içine girmesine neden olur, böylece hücre ŖiŖer. Ayrıca hücreyle birlikte mitokondrilerde de ŖiŖme gözlenir, diğer organeller ise plazma içinde dağılır. ŖiŖme sonucunda hücre zarı patlar ve bütünlüğünü kaybeder, proteolitik enzimler içeren plazma, hücreler arası boŖluđa sızar, doku çevresinde inflamasyon ile birlikte zedelenme oluŖturur (Ŗekil 2.8) (Tomatır, 2003).



Şekil 2.8. Apoptoz ve nekroz karşılaştırması

Apoptoz, hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterize edilir. Hücresel büzüşmenin nedeni, Na^+ , K^+ , Cl^- taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasında sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarım alan hücreler hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur; bu yapı 'zeoizis' olarak tanımlanır (Şekil 2.9). Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır (Tomatır, 2003).



Şekil 2.9. Elektron mikroskobunda apoptoza giden bir hücre

Plazma ve çekirdek kondansasyonunu takiben kromatin kümelenmesi meydana gelir. Kromatindeki değişikliklerin başlamasının hemen öncesinde sitozolik Ca^{++} düzeyinde önemli bir artış olmaktadır. Kromatin kondansasyonu, nukleozomlar arasındaki bağlantı bölgelerinin ayrılması ile karakterizedir. 180-200 baz çiftinden oluşan parçalar, elektroforezde ip merdiven (ladder) görüntüsü oluşturur (Tomatır, 2003).

Apoptoza uğrayan hücrede laminin ve aktin filamentlerinin kesilmesi sonucu sitoplazma çekilmeye ve küçülmeye başlar. Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte kondensasyon başlar ve çoğu zaman çekirdek kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle at nalı biçiminde görülür. Hücre büzölmeye ve küçölmeye devam eder ve makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edebileceği membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimler meydana gelir. Çekirdekte hücre gibi büzöşür ve bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nöklear porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşır (Bkz. Şekil 2.7) (Güleş ve Eren, 2008).

İki katlı lipit tabakada fosfolipit asimetrisi, hücre zarının bir özelliğidir. Fosfolipidler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin (PE) ve dış tabakada bulunan fosfatidilkolin (PC) asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu PS'nin dış yüzey tabakaya yerleşmesi ile sonuçlanır. Bu durum, apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptoz 30-60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir ve stabilizasyonu apoptozu engellemektedir. Apoptotik hücrelerin dokudan uzaklaştırılması ve yerine yenilerinin konması ise günlük 1×10^{11} hücre olarak tahmin edilmektedir ve bu yetişkin bir bireyin toplam vücut ağırlığının her 18-24 ayda bir değişimine eşittir (Tomatır, 2003).

2.5.2 Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler:

Apoptotik indeks, apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranı ile belirlenmektedir. Bunun için öncelikle apoptozun hücrelerde görünür hale getirilerek belirlenmesi gerekir (Güleş ve Eren, 2008).

Apoptozu saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptoz terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar veriliyordu, oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. Aktif kaspaz-3 tayini, fosfatidilserin molekülü) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir (Ulukaya, 2003).

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler şunlardır:

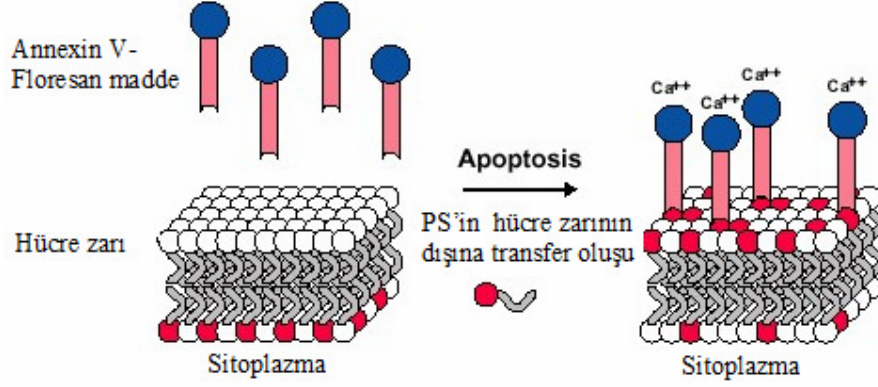
- Morfolojik görüntüleme yöntemleri
- İmmunohistokimyasal yöntemler
- Biyokimyasal yöntemler
- İmmunolojik yöntemler
- Moleküler biyoloji yöntemleri

Apoptoz herhangi bir metotla tespit edildikten sonra bir başka metotlada doğrulanmalıdır (Ulukaya, 2003).

2.5.2.1 Annexin V yöntemi:

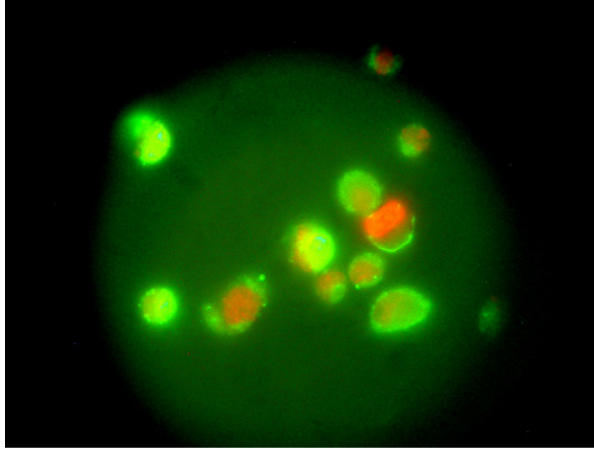
Annexin V 36 kDa molekül ağırlığında, kalsiyum ve fosfolipit bağlayıcı bir protein ve annexin ailesinin önemli bir üyesidir. Çeşitli organlarda en az 160 üyesi tanımlanmıştır. Bunlar oldukça korunmuş, çoğunlukla hücre içi proteinlerdir ve ağırlıklı olarak dokularda dağılmıştır. Özellikle, oldukça yüksek konsantrasyonda plasentada ve düşük konsantrasyonlarda endotelial hücrelerde, böbrekte, miyokardiyumda, iskeletial kaslarda, deride ve monositlerde bulunur. Şimdiye kadar 13 tane insan annexin üyesi tanımlanmıştır (Schoenberger, 2008; Blankenberg, 2008).

Annexin V, öncelikle antitrombotik etkisiyle önemlidir. Fakat, aynı zamanda apoptoza giden bir hücrede normalde iç yüzeyde yerleşmiş olan fosfotidilserin (PS) molekülleri hücre zarının dış yüzeyine transloke olur. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı ve DNA degregasyonunun olmadığı hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Annexin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfotidilserine bağlanan bir moleküldür. PS, fosfoglisericit ailesine aittir ve birincil gliserin hidroksil grubu fosforik asite esterlenirken, diğer iki hidroksil grubu yağ asitlerine esterlenir. Bu nedenle, fosfoglisericit nonpolar ucun yanında, polar uçta içerir. Fosfotidilserinde L-serin aminoasidinin hidroksil grubu fosforik asite esterlenir. Normalde, PS nonpolar yağ asitleriyle hücre zarının iç kısmında bulunur ve pozitif yüklü amino grubu ve negatif yüklü hidroksil grubu hücrenin iç yüzeyine doğru açıkta bulunur. Bu pozisyonda, PS annexinin çeşitli türlerine bağlanabilir ve Ca^{+2} konsantrasyonuna bağlı olarak çok sayıda hücresel proseslerin düzenlenmesine katkıda bulunur (Güleş ve Eren, 2008; Schoenberger et al., 2008).



Şekil 2.10. Annexin V'nin fosfatidilserine bağlanması (www.bdbiosciences.ca)

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar apoptoz sırasında PS molekülünün hücre zarının dış yüzeyine çıkmasının, hücre tipine ve apoptotik yol izine bağlı olduğunu göstermiştir. Dış yüzeye çıkan PS molekülü Annexin V ile yüksek spesifiklik ve afiniteyle bağlanır (Şekil 2.10). Annexin V floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC- Annexin V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Annexin V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (yeşil floresans) ve non-vital boya olan propidium iodide (kırmızı flüoresans) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (Şekil 2.11) (Güleş ve Eren, 2008; Schoenberger et al., 2008).



Şekil 2.11. Floresan mikroskobunda apoptotik hücrelerin görünümü (<http://bbg-aura.gaia.com>)

2.5.2.2 TUNEL yöntemi:

DNA'nın spesifik endonukleaz aktivitesi aracılığı ile oligonükleozomal büyüklükteki 180-200 baz çiftlik fragmanlara degradesyonu birçok hücre tipinde apoptoz sırasında meydana gelen en temel biyokimyasal olaydır (Numanoğlu, 2008).

Apoptozda meydana gelen DNA fragmentasyonun belirlenmesi için Gavrielli ve ark.ları tarafından oluşturulan ilk yöntem TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling) tekniğidir. Bu yöntem, DNA zincirinin 3' OH bölgesine biyotinle konjuge edilmiş nükleotidleri eklemekle görevli terminal transferaz enziminin etkisini ortaya çıkarmıştır (Numanoğlu, 2008).

Birçok akım sitometrik yöntem hücre döngüsü ve antijen ekspresyonu gibi diğer parametrelerin ölçümüyle paralel olarak DNA fragmentasyonunun kantitatif analizine de olanak sağlamaktadır. Bu metotların en sık kullanılanı TUNEL yöntemidir (Numanoğlu, 2008) .

Hücre ölümü sırasında, hücrelerde ışığı yayma açılarında hücre büyüklüğünü ve granüllülüğünü yansıtan bir takım değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler, akım sitometrisi kullanılarak belirlenebilir. Bu gibi değişiklikler, canlı hücrelerin, ölü hücrelerin ve apoptoza girmekte olan hücrelerin ayırt edilmesinde de kullanılabilir. Apoptotik hücreler karakteristik olarak, DNA zincir

kırıklarını sergilemektedir ve bunlar TUNEL yöntemi ve akım sitometresi kullanılarak belirlenebilir (Numanoğlu, 2008).

TUNEL yöntemi, DNA zincir kırığının 3'hidroksil terminal ucuna biyotinlenmiş dUTP nükleotidinin eklenmesi prensibine dayanmaktadır. Bu reaksiyon DNA'nın 3'hidroksil terminal ucuna tekrarlayan bir biçimde deoksiribonükleotit ekleyen terminal transferaz enzimi tarafından katalizlenmektedir. Flouresanlanmış avidin, bir sonraki reaksiyonda görev alır ve DNA zincir kırıklıklarını flouresanla işaretler. Böylelikle DNA zincir kırıkları akım sitometrisi yöntemiyle belirlenebilir. TUNEL doku yapısına zarar vermeden in situ apoptotik verilerin elde edilmesini sağlar (Numanoğlu, 2008).

2.5.3 Apoptozun *in vivo* dedeksiyonu:

Apoptoz, organ gelişimi, doku homeostazisi ve istenmeyen hücreleri elimine ederek immun sistemi düzenleme gibi pek çok fizyolojik olayda önemli rol oynayan programlı hücre ölümüdür. Ancak, yaşam ve ölüm sinyalleri arasındaki denge hücre ölümüne doğru kayarsa, apoptotik program buna bağlı olarak çeşitli patolojik durumlarla sonuçlanır (Çizelge 2.1). Aşırı apoptoz, akut miyokardiyal enfarktüs (AMI), kronik kalp yetmezliği, doku uyuşmazlığı, felç, nörodejenaratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson) gibi dokuların fonksiyonlarında gittikçe artan kayıplarla sonuçlanır. Tam tersi durumlarda, yetersiz apoptoz sonucu meydana gelen sistemik lopus eritramatozus (SLE) ve romatoid artrit gibi otoimmun hastalıklar meydana gelir. Ayrıca, normal apoptotik süreçte meydana gelen aksaklıklar, aşırı hücre çoğalmasına ve bunu takiben tümör gelişimine neden olur. Çoğu ilacın yararlı ve zararlı etkileri apoptotik süreçteki rolleriyle alakalıdır. Bu nedenle, invazif olmayan durumlarda apoptozun olduğu alanın ve hızın *in vivo* görüntülemesi, hastalığın aktifliği ve terapötiklerin etkisinin belirlenmesinde yararlı klinik bilgiler elde edilmesini sağlayacaktır (Çizelge 2.1) (Lahorte et al, 2004).

2.5.3.1 Radyoişaretli Annexin V türevleri:

Halojenlenmiş Annexin V Bileşikleri:

Annexin V ve türevleri, çoğunlukla ^{123}I , ^{125}I , ^{124}I ve ^{18}F gibi halojenlerle işaretlenmiştir. Böylelikle, apoptoz araştırmalarında görüntüleme uygulamalarında, tek foton emisyon bilgisayarlı tomografiden (SPECT),

otoradyografi ve pozitron emisyon tomografisine (PET) kadar oldukça geniş bir alandan faydalanılması sağlanır. Kısmen ^{99m}Tc -Annexin V radyoligand grubuna benzer şekilde, halojenlenmiş Annexin V direk ya da in direk işaretleme metotlarıyla elde edilir (Lahorte et al, 2004).

$^{123}\text{I}/^{125}\text{I}$ -Annexin V ile *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmış ve hücre dışına çıkan PS molekülünün dedeksiyonunda faydalanılabileceği açıkça gösterilmiştir. Normal ve orak hücre eritrositleri, aktive edilmiş kan plateletleri ve doku faktörünü (TF) ifade eden fibroblastlar veya ovaryum karsinom hücreleri ile radyoligand bağlanma deneylerini içeren iyotlanmış Annexin V ile *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Esasında, radyoiyotlanmış Annexin V'ın, tavşan ve domuzlarda, trombositlerde direk görüntüleme ajanı olarak potansiyeli *ex vivo* olarak çalışılmıştır. $^{123}\text{I}/^{125}\text{I}$ -Annexin V'ın tavşanlarda kalça kemiğindeki ve domuzlarda karotid arteritteki (şahdamarı) trombositlerin seçici olarak hedef olduğu gözlenmiştir (Lahorte et al, 2004).

Rekombinant insan Annexin V proteininin, optimum koşullarda, sırasıyla % 75-85 işaretleme verimiyle, kan plateletlerinde ve apoptotik lenfositlerde yeterli biyolojik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Lahorte et al, 2004).

^{123}I Annexin V ile sıçanlarda sepsis ile indüklenmiş miyokardiyal işlev bozukluğunda, kontrol hayvanlarına oranla radyoligand tutulumunda önemli miktarda artış olduğu gözlenmiştir (Lahorte et al, 2004).

^{124}I m-IBA-Annexin V (^{124}I -3-iyodo benzoat-Annexin V) ile HL60 insan lösemi hücre hattında yapılan, sıcaklıkla indüklenmiş apoptoz dedeksiyonunda, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, ^{124}I m-IBA-Annexin V'ın HL60 lösemi hücrelerine karşı potansiyeli olduğu ispatlanmıştır (Lahorte et al, 2004).

Ziljstra ve ark. ları (2003) tarafından yapılan 4- ^{18}F florobenzilannexin V'ın (4- ^{18}F FBA) PS içeren lipozomlarda ve UV ile ışınlanmış Jurkat T-hücre lenfoblastlarında *in vitro* biyolojik aktivite çalışmasında, 4- ^{18}F FBA % 80-85 PS içeren lipozomlara hızlı ve yüksek spesifiklik ile bağlanma gösterdiği ve apoptotik Jurkat T hücrelerinde, apoptotik olmayan Jurkat T hücrelerine göre, zamanla artan en az % 60 bağlanma gösterdiği belirtilmiştir (Lahorte et al, 2004).

^{99m}Tc- Annexin V Bileşikleri:

Tartışmasız, ^{99m}Tc-Annexin V, bugüne kadar üzerinde en çok çalışılan ve apoptoz dedeksiyonunda yaygın olarak kullanılan, PS markerıdır. Her biri farklı biyolojik davranışlar gösteren farklı şelat ve koligandlar kullanılarak, farklı gruplar ile çeşitli ^{99m}Tc-Annexin V radyoligandları geliştirilmiştir. ^{99m}Tc diğer radyonüklitlerle karşılaştırıldığında pek çok avantaja sahiptir. ^{99m}Tc izotopu, SPECT görüntüleme için ucuz olma ve kolay elde edilebilme gibi optimal radyonüklit özelliklerine sahiptir ($t_{1/2}$: 6,01 sa, $E_{max\gamma}$ 0,141 MeV) (Lahorte et al, 2004).

^{99m}Tc-N₂S₂-Annexin V'in akut kalp nakli uyumsuzluğu olan hastalarda apoptotik ve nekrotik hücre ölümlerinin *in vivo* dedeksiyonunda yararlı bir radyoligand olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca, radyoligand akciğer ve meme kanserli hastalarda kemoterapi ya da radyoterapiyle indüklenmiş apoptozu tayin etmede başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Lahorte et al, 2004).

Yayınlanan çok sayıdaki *in vivo* hayvan çalışmalarında, ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V (^{99m}Tc-6-hidrazinopyridin-3-karboksilik asit-Annexin V) 'ın apoptotik hücre ölümlerini görüntülemek için SPECT radyoligandı olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V'in, iyi bir *in vivo* görüntüleme potansiyeli ve anti kanser ilaçlarının terapötik etkisini belirlemesi nedeniyle apoptoz markerı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Lahorte et al, 2004).

Farklı hayvan modellerinde ^{99m}Tc-Etilendisistein (EC)-Annexin V tutulumu tümör hücrelerinde apoptoz oluşturularak değerlendirilmiş sıçanlarda apoptotik ovaryum ve memede enjeksiyondan sonra 15 dakika-2saat aralığında tutulumunun düzenli olarak arttığını görmüşlerdir. Bu sonuç radioligand temizlenmesinde hızlı bir şekilde olduğunu göstermiştir ve radyoligandın nükleer tıpta kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Lahorte et al, 2004).

^{99m}Tc-süksinid dihidrazid (SDH)-Annexin V ile yapılan bir çalışmada ise ^{99m}Tc-SDH-Annexin V'in enjeksiyondan 24 saat sonra plazma veriminin % 94 olduğu bulunmuştur. Farelerde fotodinamik terapiyle indüklenmiş *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda tümörde apoptoz teşhisinde biyopotansiyelinin olduğu belirtilmiştir (Lahorte et al, 2004).

Diğer Radyoşaretli Annexin V Bileşikleri:

¹¹C işaretli Annexin V ile yapılan çalışmalarda ise programlı hücre ölümünü görüntüleme bu bileşiğin uygun bir PET ligandı olmadığı belirtilmiştir. Bunun nedeni ¹¹C'nun apoptoz sürecinin *in vivo* görüntülenmesi için yeterli derecede uzun yarı ömre sahip olmamasıdır ($t_{1/2}$: 20,39 dakika) (Lahorte et al, 2004).

Li ve ark.larının (2002) yaptıkları çalışmada % 98 radyokimyasal verimle işaretlenen ¹¹¹In-DTPA-PEG-Annexin V (¹¹¹In-Dietilenetriaminpentaasetik asit-poly etilen glikol-Annexin V)'in tümör oluşturulmuş sıçanlarda paclitaxel ile indüklenen apoptozda, tümör hücrelerinde radyoligand tutulumu ve apoptotik indeks arasında oldukça iyi bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. ¹¹¹In'in uygun yarı ömrü ($t_{1/2}$:2,81 gün) düşük gama enerjisi nedeniyle ($E_{max\gamma}$: 0,172, 0,247 MeV) tümörde apoptozun görüntülenmesinde uygun bir radyoligand olduğu düşünülmektedir (Lahorte et al, 2004).

McQuade ve ark.ları (2003) DOTA (1,4,7,10-tetraazasiklodekane-N,N',N''-N'''-tetraasetik asit) ile konjuge edilmiş Annexin V'in ⁶⁴Cu ile işaretlenmesiyle alternatif bir PET radyonüklidinin elde edilebileceğini rapor etmiştir. ^{94m}Tc ile karşılaştırıldığında ⁶⁴Cu'ün daha uzun bir yarı ömre sahip olmasıyla ($t_{1/2}$: 12,7 saat) insanlarda apoptoz görüntülenmesinde daha uygun bir süreye sahip olduğu ancak radyofarmasötüğün düşük β^+ enerjisi nedeniyle ($E_{max\beta^+}$: 0,578, 0,65 MeV) azalan radyasyonun hasta organları için özellikle böbrek, dalak ve karaciğer gibi organlarda soruna neden olacağını belirtmişlerdir. Buna rağmen ⁶⁴Cu- DOTA- Annexin V'in PET radyofarmasötüğü olarak apoptoz görüntüleme klinik uygulamalarda kullanılmasının uygun olacağı belirtilmiştir (Lahorte et al, 2004).

⁶⁴Cu-DOTA-Annexin V bileşiklerindeki gelişmelerden sonra, ⁶⁷Ga ve ⁶⁸Ga radyoizotoplarıyla da çalışmalar yapılmıştır. ⁶⁸Ga'un yüksek enerjili pozitron emisyon karakteristiği ($t_{1/2}$: 1,135 saat, $E_{max\beta^+}$: 1,19 MeV) böbrek, karaciğer gibi spesifik organlarda yüksek radyoizotop tutulumu nedeniyle bu radyoizotopun klinikteki uygulamasını kısıtlamaktadır. Buna karşılık ⁶⁷Ga-DOTA-Annexin V'in ($t_{1/2}$: 3,26 gün saat, $E_{max\gamma}$: 0,300 MeV, 0,393 MeV) daha uzun yarı ömrü sayesinde gama emisyonuyla SPECT kameralarla apoptoz sürecinin kapsamlı *in vivo* görüntülenmesine olanak sağladığı belirtilmiştir (Lahorte et al, 2004).

Çizelge 2.1. Apoptoz görüntülemenin tıptaki uygulamaları

Tıp Alanı	Patolojik durumlar ve tıp uygulamaları
Onkoloji	Solid ve hematolojik tümörlerde kemoterapi, radyoterapi ve hormon indüklenmiş apoptoz görüntülenmesi Tümör dedeksiyonu Terapi cevabı değerlendirilmesi
Kardiyoloji	Akut kalp nakli uyuşmazlığı Akut miyokardiyal enfarksiyon (AMI) Antrasiklin-indüklenmiş kardiyotoksikliği ARVD ve iskeletelyal kas apoptozu CHF CAD ve damar sertliği Enfeksiyöz endokardit (miyokardit) İntrakardiyak tümör gelişimi Miyokardiyal işlev bozuklukları Miyokardiyal iskemi- reperfüzyon hasarı
Doku nakli uyuşmazlığı	Karaciğer, akciğer ve kalp doku nakli uyuşmazlıkları
Enfeksiyon ve enflamasyon	Bakteriyal ve viral enfeksiyonlar MODS Septik şok
Nöroloji	Nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer, Huntington hastalıkları, çoklu ve amiyotrofik lateral skleroz) Travma (Omurilik ve beyin hasarı)
Metabolik hastalıklar	Diabet (Tip I)
Otoimmün hastalıklar	Annexinopathies Romatoid artrit SLE İnflamatuvar barsak hastalığı
İskeletle ilgili hastalıklar	Osteoartrit
Renal hastalıklar	Akut renal bozukluk Kronik renal atrofi ve renal fibröz Glomerül hastalıklar Polikistik renal hastalıklar

AMI, akut miyokardiyal enfarksiyon; ARVD, aritmojenik sağ ventrikül displazi; CAD, Koroner arter hastalığı; CHF, konjestif kalp yetmezliği; MODS, çoklu organ fonksiyon bozukluğu sendromu; SLE, sistemik lupus eritematozus

2.6 Protein Analizi:

Protein miktar tayini genellikle protein örneklerinin, kromatografik, elektroforetik ve immunokimyasal tekniklerle izolasyon, ayrılma ve analiz işlemleri için gereklidir. Mevcut protein miktarı ve saflığına bağlı olarak protein konsantrasyonuna karar vermek için farklı metotlar kullanılır (www.thermoscientific.com).

Protein araştırmalarında sıklıkla kullanılan kolorimetrik, reaktif kullanılmasına dayanan protein analiz teknikleri geliştirilmiştir. Reaktife eklenen protein konsantrasyonuna bağlı olarak renk değişimi gözlenmektedir. Bilinen miktarda referans proteinin standart eğrisine göre protein miktarına karar verilir. Bu protein analiz teknikleri dayandığı kimyasal prensibe bağlı olarak iki gruba ayrılır (Çizelge 2.2) (www.thermoscientific.com).

Çizelge 2.2. Protein analiz teknikleri ve örnekleri

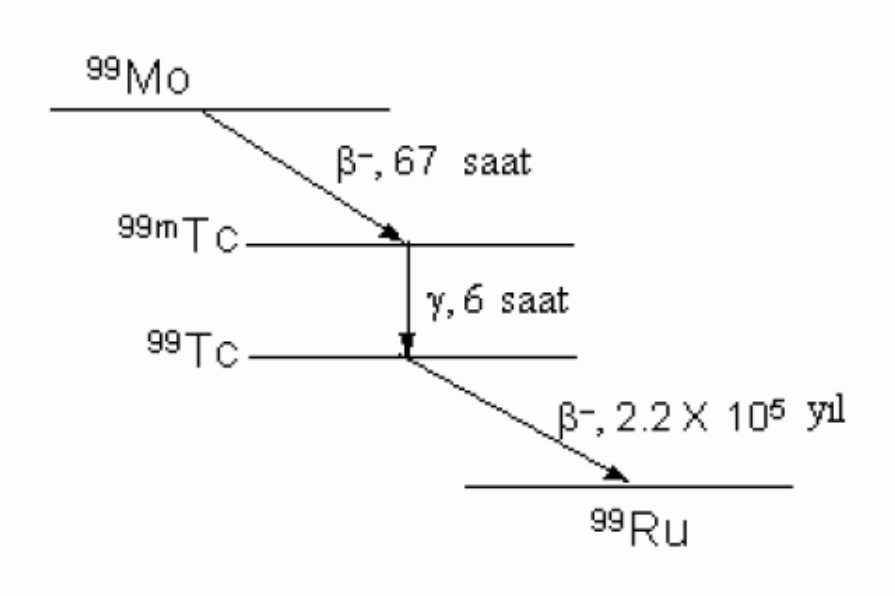
Dayandığı prensip	Protein Analiz Tekniği
Protein-bakır şelatlama ve indirgenmiş bakır ile sekonder dedeksiyon	BCA Modifiye Lowry
Protein boya bağlanması ve bağlanan boya ile renk değişimine bağlı olarak direkt dedeksiyon	Coomassie (Bradford)

2.7 Teknesyum-99m (^{99m}Tc) Kimyası:

Teknesyum Molibden'in radyoaktif bozunumundan elde edilen yapay bir elementtir. 43. element olan Teknesyum 1937 yılında Carlo Perrier ve Emilio Segre tarafından keşfedilmiştir. Molibden şeritlerin, 8 MeV enerjili dteronlarla siklotrona bombardıman edilmesiyle, yeni, daha kısa yarı ömürlü ($t_{1/2}$: 6 saat) Tc olarak isimlendirilen radyoaktif seriler elde edilir (Zolle, 2007).

⁹⁹Mo/^{99m}Tc jeneratörü 1965 yılında Brookhaven Ulusal Laboratuvarında klinik uygulamalar için yapılmıştır. ^{99m}Tc, jeneratörden perteknetat formunda elde edilir (Zolle, 2007).

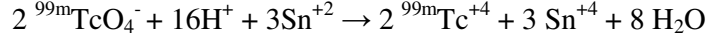
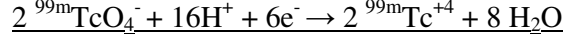
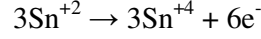
^{99}Mo yarı ömrü 66 saat, 740-780 keV enerjili beta bozunumu ile % 87'si $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 'a, % 13'ü ^{99}Tc 'a dönüşür. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ yarıömrü 6,02 saat olup 140 keV enerjili gama saçarak izomerik geçiş ile ^{99}Tc 'a dönüşür. ^{99}Tc beta yayılımı ile ve $2,1 \times 10^5$ yıl yarı ömürlü ^{99}Ru 'a bozunur (Şekil 2.12). Bir santimetrede spesifik gama doz katsayısı 0,8 R/h/mCi'dir (www.inönü.edu.tr, 2009).



Şekil 2.12. ^{99}Mo 'nun bozunum şeması

Teknesyum elementi periyodik Çizelgenun 7B grubunda, Manganez ve Renyum arasında yer almaktadır. +7 den -1'e 8 oksidasyon basamağı vardır. En stabil olduğu oksidasyon basamakları +7, +5, +4, +3, +1 ve 0 dır. Stabilesinin en zor olduğu oksidasyon basamakları ise, +6, +2 ve -1'dir. En yüksek oksidasyon basamağı $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratöründen elüe edilen perteknetat anyonundaki (TcO_4) +7 olduğu durumdur. +7 değerlikli olduğu durumda diğer bileşiklerle direk olarak birleşmez. Bunun için daha alt oksidasyon düzeylerine indirgenmelidir. Çeşitli indirgen ajanlar; kalay klorür, kalay sitrat, kalay tartarat, konsantre HCl, sodyum borohidrit, ditionit, demir sülfat v.b. bu amaçla kullanılmaktadır (www.inönü.edu.tr, 2009).

Kalay klorür ile kimyasal reaksiyon



^{99m}Tc 'un ideal nükleer özellikleri, radyonüklit jeneratör sistemi olarak dünyada kullanımı ve yeni işaretleme tekniklerindeki gelişmeler nedeniyle hızlı gelişme göstermiştir. Kalay iyonlarının kitlerde indirgeyici olarak kullanılmaları ^{99m}Tc radyofarmasötiklerinin gelişmesinde yeni bir çığır açmıştır. İşaretleme prosedürleri kitlerin hazırlanmasıyla kolaylaşmıştır. İşaretleme için, steril olan kitler, liyofilize formdaki kimyasal içerikler ticari olarak kullanıma hazırdır ve hastaya uygulanmadan kısa bir süre önce ^{99m}Tc farmasötikleri hazırlanır. ^{99m}Tc aktivitesi kitin içine eklenene kadar el ile müdahale minimumdur. Bazı durumlarda reaksiyon karışımı ısıtılırsa işaretleme verimi artan bir performans gösterir (Zolle,2007).

^{99m}Tc farmasötikleri organ spesifiktir ve akciğer (emboli), kalp (iskemi/damar tıkanıklığı) ve beyin (perfüzyon bozukluğu) gibi organlarda kan akışını belirlemede, tiroid, karaciğer (fagositik fonksiyon), böbrek ya da hepatobilyer (karaciğer ve safra yolları) sisteminin fonksiyonel durumunu değerlendirmede ve tümörlerin kas yapısındaki metastatik büyümelerinin belirlenmesinde kullanım için uygundur (Zolle, 2007).

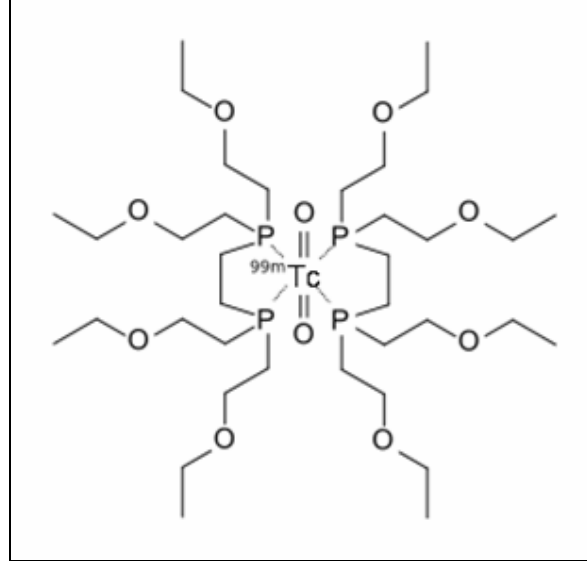
2.7.1 ^{99m}Tc -Tetrofosmin:

Yeni bir katyonik-lipofilik bileşik olan [$^{99m}\text{Tc}(\text{tetrofosmin})_2\text{O}_2$] $^{+}$ (Şekil 2.14), eterle işlevselleştirilmiş difosfin ligand 1,2-bis[bis(2-etoksietil)fosfino]etan, miyokardiyal perfüzyon görüntülemesinde kullanmak için sentezlenmiş ve geliştirilmiştir (Şekil 2.13). Bileşiğin yapısı ^{99}Tc analoglarının X ışınları kristalografisi ile belirlenmiştir. ^{99m}Tc 'un diğer alkali fosfin bileşikleriyle karşılaştırıldığında, tetrofosmin büyük ölçüde, hedef olmayan dokulardan özellikle kan ve karaciğerden artan temizlenme gösterir. Bu nedenle, liyofilize edilmiş kit formülasyonu geliştirilmiştir. Kit, hazırlandıktan 8 saat sonra bile oda sıcaklığında radyokimyasal saflığını korumaktadır (Kelly et al, 1993).

Kim ve ark. ları ^{99m}Tc -MIBI ve ^{99m}Tc -Tetrofosmin'in meme, beyin, özefagus, tiroid, paratiroid ve diğer organlara ait tümörlerde akümüle olduklarını belirtmişlerdir (Kim et al, 2002; Bernard et al., 1998).

Berghammer ve ark. ları meme, akciğer ve tiroid kanserinde ^{99m}Tc -Tetrofosmin ile sintigrafinin oldukça yüksek duyarlılık ve spesifikliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir (Berghammer et al., 1999).

Schilaci ve ark. ları'nın 55 meme kanserli hasta ve kontrol grubu olarak 10 sağlıklı birey ile yaptıkları araştırmada sırasıyla duyarlılık ve spesifiklik oranının % 91 ve 94 olduğunu ve kontrol grubunda hiç tutulum olmadığını gözlemleyerek meme kanserli hastalarda tetrofosmin sintigrafisinin yararlılığını ispatlamışlardır (Schillaci et al., 1997).



Şekil 2.13. ^{99m}Tc -Tetrofosmin kimyasal yapısı

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar:

- Tetrafosmin kit (Myoview)
- Na ^{99m}TcO₄ (E.Ü. Tıp Fak. Nükleer Tıp Anabilim Dalı)
- SnCl₂. 2H₂O (Merck)
- Serum Fizyolojik (%0.9 NaCl)
- TLC-SG (Merck 105554)
- Aseton (CH₃COCH₃) (Merck)
- Etanol (C₂H₅OH) (Merck)
- Asit-sitrat-dekstroz tampon solüsyonu (ACD) (Eczacıbaşı-Baxter)
- Diklorometan (Merck)
- Amonyak (Merck)
- Steril kültür kapları (flask) (Corning)
- Çok kuyucuklu plateler (16, 24, 96) (Corning)
- RPMI 1640 (Biological Industries)
- DMEM (Biological Industries)
- Tripsin (Biological Industries)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Biological Industries)Tripan Mavisi Boyası (%0.5 (w/v) fizyolojik tuz içinde) (Biological Industries)Tunel

- Cell Proliferation Kit (Biological Industries)
- Annexin V-EGFP Apoptoz Dedeksiyon Kiti (BioVision)
- DeadEnd Fluorometrik TUNEL Kit (Promega)
- Bradford reagent protein assay kit (Fermentes)
- Cd(Te) (Kadmiyum-Telleryum) Dedektörlü RAD 501 markalı tek kanallı analizör (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC Scanner (Bioscan AR-2000) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Doz Kalibratörü AtomLabTM 100 Plus) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- CO₂'li inkübatör (Thermo) (E.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- Otomatik mikropipetler (Eppendorf) (E.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- Laminar Air Flow (Heraeus) (E.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- İnverted Mikroskop (Olympus, Japan) (E.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- Işık mikroskobu (Olympus, Japan) (E.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- Floresan Mikroskop (Olympus, Japan) (E.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- Mikroplak okuyucu (Spektrofotometre) (Thermo) (E.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Tümörde erken kemoterapi cevabının ^{99m}Tc -Tetrofosmin ile *in vitro* değerlendirilmesi amacıyla yaptığımız çalışmamızda;

- MCF-7 hücrelerinin dondurulması
- MCF-7 hücrelerinin çözülmesi
- MCF-7 hücrelerinin, hücre kültürü ortamında çoğaltılması ve pasajlanması
- Hücre canlılığının ve IC_{50} dozunun belirlenmesi
- Deneyin kurulması ve MCF-7 meme kanser hücre hattına Cisplatin ile kemoterapi uygulanması
- Hücrelerde oluşturulan apoptotik etkinin Annexin V ve TUNEL yöntemi ile saptanması
- Cisplatin ile apoptoz oluşturulan hücrelerde ^{99m}Tc ile işaretli Tetrofosmin'in tutulumunun ölçülmesi

3.2 MCF-7 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi:

Meme kanseri hücrelerinde, erken kemoterapi cevabının etkisini ^{99m}Tc -Tetrofosmin ile araştırmayı amaçladığımız çalışmamız *in vitro* koşullarda hücre kültürü yöntemleri kullanılarak yapıldı ve çalışmamızda model olarak MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanıldı.

Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin *in vitro* ortamda yaşayıp, çoğalabilmeleri için uygun koşullar ve gerekli besiyeri maddeleri sağlanmalıdır. İnaktif serum, besiyeri ortamına, hücrelerin gereksinimlerini karşılamak ve tampon görevi görmesi nedeniyle mutlaka eklenmelidir. Çalışmamızda kullandığımız besiyeri ortamı %10 fetal bovin serum (PBS), %1 L-glutamin, 100 IU/mL penisilin ve 10 mg/mL streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeridir. RPMI-

1640 besiyeri ile üretilen MCF-7 meme kanseri hücre hattı 37⁰C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde çoğaltıldı.

3.2.1 MCF-7 hücrelerinin dondurulması:

- 1) Flasklerde bulunan yeterli yoğunluğa ulaşmış hücreler tripsinizasyon işlemi ile yapışmış oldukları yüzeyden kaldırıldı.
- 2) Falkon tüplere alınan hücrelerin üzerine besi ortamı ilave edilerek 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücrelerin konulacağı 1,5 mL'lik cryo tüpler hazırlandı ve buz içerisine batırıldı.
- 3) Fötal Bovin Serum (FBS) / DMSO: 9/1 oranında karıştırılarak hazırlandı.
- 4) Santrifüj sonrasında üst kısımdaki süpernatant atıldı ve cryo tüplerle birlikte buz içerisine alındı. Dip kısmında hücrelerin bulunduğu falkon tüp içerisine 750 µL (FBS) / DMSO konularak resüspanse edildi.
- 5) Karışım cryo tüplere aktarılarak, -86⁰C'ye kaldırıldı.

3.2.2 Dondurulmuş MCF-7 hücrelerinin çözülmesi:

- 1) -86⁰C'ye dondurulup kaldırılmış olan hücreler 37⁰C'ye alındı.
- 2) DMSO'nun hücre canlılığı üzerindeki negatif etkisini azaltmak amacıyla, cryo tüp içerisine hızlı bir şekilde besi ortamı eklenerek, çözülen hücreler pastör pipeti yardımıyla falkon tüp içerisine alındı.
- 3) Falkon tüpe yaklaşık 10 mL besi yeri ilave edilerek, hücreler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 4) Santrifüj işlemi sonrası, süpernatant atılarak, dipte kalan hücrelerin üzerine tekrar besi ortamı ilave edilerek 2. kez 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 5) Santrifüj sonrası, supernatant atılarak, hücrelerin üzerine 8 mL besi yeri ilave edildi ve 75 cm²'lik flasklara aktarıldı.

6) Flasklar, 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüve kaldırıldı.

Flasklar belirli zaman aralıklarında kontrol edildi, çoğalmalarını sağlamak amacıyla kullanılan eski besi yerleri dökülerek, ortamları değiştirildi ve flask yüzeyini kaplayan hücrelerin devamlılığını sağlamak amacıyla pasaj yapıldı.

3.2.3 MCF-7 hücrelerinin pasajlanması:

- 1) MCF-7 hücreleri monolayer hücreler oldukları için, hücreleri kaldırmak için tripsinizasyon işlemi uygulandı. Bunun için ortama 4 mL tripsin eklendi ve 5 dakika inkübatörde bekletildi.
- 2) Hücrelerin üzerine 8 mL besi ortamı eklendi ve 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlandı.
- 3) Üst kısımdaki süpernatant atılarak, hücrelerin üzerine tekrar 8 mL besi ortamı eklendi ve 2 flaska ayrı ayrı paylaştırılarak, flastaki ortamlar 8 mL'ye tamamlandı.
- 4) Flasklar, 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüve kaldırıldı.

3.2.4 MCF-7 hücre canlılığının belirlenmesi:

Hücre canlılığının belirlenmesinde, MCF-7 kanser hücrelerine, tripan mavisi boya testi uygulandı. Canlı hücrelerin tripan mavisi boyasını metabolize edilerek, dışarı atması nedeniyle beyaz renkte, tripan mavisi boyasını metabolize edememeleri nedeniyle ölü hücreler mavi renkte görüldü.

- 1) Monolayer MCF-7 hücrelerini kaldırmak için tripsinizasyon işlemi uygulandı.
- 2) Tripsinizasyon işleminden sonra, hücre süspansiyonundan 50 µL alınarak 96 kuyucuklu planelere konuldu ve üzerine 50 µL tripan mavisi boyası eklendikten sonra Neubauer lamında, ışık mikroskobu ile hücre sayımı yapıldı.

Tripan mavisi boya testinin sonuçlarına göre hücreler her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde Cisplatinin IC₅₀ dozunu belirlemek üzere planelere ekildi.

3.3 Sitotoksisite Testleri:

3.3.1 Cisplatinin MCF-7 hücrelerinde IC₅₀ dozunun belirlenmesi:

IC₅₀ dozu, bir inhibitörün hedefinin %50'sini öldürmek için gerekli olan konsantrasyonu belirtmektedir.

Cisplatinin IC₅₀ dozu ‘‘Cell Proliferation Kit’’ kullanarak XTT testi ve Tripan mavisi boya testi ile belirlendi.

XTT kit içersinde, XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) ajanı ve aktivasyon ajanı yer almaktadır. Reaktifler 50/1 XTT ajanı (Labelling reagent)/ aktivasyon ajanı (electron coupling reagent) olacak şekilde karıştırılarak XTT solüsyonu hazırlanır. XTT bir tetrazolium tuzu olmakla beraber metabolik olarak aktif olan hücrelerde mitokondride bulunan dehidrogenaz enzimiyle parçalanarak suda çözünebilen formazana dönüşmektedir. Formazandan kaynaklanan turuncu rengin yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantılıdır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan turuncu renk yoğunluğuna bağlı olarak, mikropalak okuyucuda 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunarak hücre canlılığı belirlenir.

Cisplatinin MCF-7 hücrelerinde IC₅₀ dozu XTT ve Tripan Mavisi Testi ile belirlendi. Bunun için, 96 kuyucuklu plate'ler kullanılarak 24-96 saatlik bir deney düzeneği kuruldu.

XTT ve Tripan Mavisi Boyası Testi Protokolü:

- 1) 75 cm²'lik flasklere ekilen ve çoğalan hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla tripsinizasyon işlemi uygulandı.
- 2) Tripsinizasyon işleminden sonra, hücreler üzerine besi ortamı ilave edildi ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 3) Santrifüj sonrasında, üst kısımdaki süpernatant atıldı, dipte kalan hücreler üzerine 1 mL besiyeri eklendi.

- 4) Hücre sayımı için hücre solüsyonundan 50 µL alındı, üzerine 50 µL Tripan mavisi boyası eklendi ve hücre canlılığını belirlemek için Neubauer lamında sayım yapıldı.
- 5) 1., 2., 3. ve 4. gün için 96 kuyucuklu plate'ler ayrı ayrı hazırlandı ve IC₅₀ dozunu belirlemek üzere Cisplatinin 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µM'lık konsantrasyonları XTT testi için 3 farklı sıra (her konsantrasyon için 3 farklı değer olacak şekilde) ve Tripan mavisi boya testi için bir sıra ayrıldı.
- 6) Neubauer lamında sayılan hücreler gerekli dilüsyon yapıldıktan sonra, hazırlanan 96 kuyucuklu planelere her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde ekildi.
- 7) Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklendi ve hazırlanan 4 günlük deney düzeneğinin ilk sırası Cisplatin uygulanmadan kontrol grubu olarak ayrıldı ve diğer kuyucuklara Cisplatinin 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µM'lık konsantrasyonları (Cisplatin 10 mg/20 mL flakon içerisinde gerekli konsantrasyonları sağlayacak hacimlerde kullanıldı) uygulandı.
- 8) 1. günlük deney düzeneği için, hücreye belirlenen farklı Cisplatin konsantrasyonları uygulandıktan 24 saat sonra, XTT testi için ayrılan kuyucukların her birine hazırlanan XTT solüsyonundan 50 µL eklendi. Madde eklenmesinden yaklaşık 4 saat sonra plate'in her bir kuyucuğunun absorbans değeri (OD) mikropak okuyucuda 450 nm ve 630 nm dalga boylarında ölçüldü.
- 9) Aynı işlem, madde verilmesinden 48, 72 ve 96 saat sonra 2., 3. ve 4. günlük plate'ler için tekrarlandı.
- 10) Plate'lerde bulunan tripan mavisi boyası testi için ayrılan kuyucuklarda bulunan serumlu besi ortamı enjektör yardımıyla çekilirken, ortamdaki serumu uzaklaştırmak için 50 µL serumsuz ortam hücrelerin kurumasına izin vermeden kuyucuklara ilave edildi. Aynı şekilde serumlu ortam çekilip, 50 µL tripsin ilave edilerek inkübatörde 5 dakika beklendi. Tripsin ile kaldırılan hücrelerin üzerine 100 µL serumlu besiyeri eklenerek hücreler süspanse edildi. Süspansiyondan 50 µL alınarak, 50 µL tripan mavisi boyası ile karıştırıldı ve Neubauer lamında hücre sayımı yapıldı.

- 11) XTT testi ve tripan mavisi boya testi sonuçlarına göre, cisplatinin MCF-7 hücrelerinde IC₅₀ dozu belirlendi.

3.4 Deneý Düzeneyinin Kurulması ve Cisplatin Uygulanması:

Cisplatinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 4 gün sürecek bir deneý düzeneyi ve 4 farklı hücre grubu oluşturuldu:

1. Grup: Kontrol grubudur. Bu gruptaki MCF-7 hücrelerine herhangi bir muamele yapılmadı.
2. Grup: Bu gruptaki hücreler, cisplatinin IC₅₀ dozunun bir alt dozu seçilerek 20 µM Cisplatine maruz bırakıldı.
3. Grup: Bu gruptaki hücreler, cisplatinin IC₅₀ dozuna (25µM) maruz bırakıldı.
4. Grup: Bu gruptaki hücreler, cisplatinin IC₅₀ dozunun bir üst dozu seçilerek 30 µM Cisplatine maruz bırakıldı.

Cisplatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla apoptoz testleri ve ^{99m}Tc-Tetrofosmin ile işaretleme çalışmaları gerçekleştirildi.

3.5 Apoptoz Testleri:

3.5.1 Annexin V-EGFP yöntemi:

Annexin V-EGFP apoptoz dedeksiyon kiti, apoptozun erken evrelerde gözlenmesi prensibine dayanır. Çoğu hücre tipi, membran fosfolipidi olan fosfotidilserini (PS), plazma membranının iç yüzeyinden, dış yüzeyine transfer eder. PS molekülü hücre yüzeyine çıktığında, güçlendirilmiş yeşil floresan proteininin (EGFP- enhanced green fluorescent protein) PS'e doğal olarak yüksek afinitesi olan bir protein olan Annexin V'a bağlanması ile boyanarak kolaylıkla dedekte edilebilir. Ayrıca, ikinci bir boya olan propidyum iyodür kullanılarak canlı hücreler, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücreler birbirinden ayırt edilebilir.

Annexin V- EGFP Test Protokolü:

- 1) Her kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde 4 farklı hücre grubu 6 kuyucuklu plate'lere ekilerek deney düzeneği kuruldu.
- 2) Kuyucuklardaki hücreleri kaldırmak için tripsinizasyon işlemi uygulandı ve hücreler 1,5 mL'lik eppendorflara konuldu.
- 3) Hücreler 2500 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı.
- 4) Üst kısımdaki supernatant atıldı ve dipte kalan hücreler üzerine 500 μ L bağlayıcı tampon ilave edilerek resüspanse edildi.
- 5) Üzerine 5 μ L Annexin V-EGFP ve 5 μ L propidyum iyodür eklendi.
- 6) Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra 4 hücre grubundan da lam üzerine örnek damlatılarak üzerine lamel kapatıldı ve floresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm) ve kırmızı filtreleri (620 nm) ile inceleme yapıldı.

3.5.2 TUNEL yöntemi:

TUNEL yöntemi hücre popülasyonundaki apoptotik hücrelerin spesifik dedeksiyonu ve miktar tayini için geliştirilmiştir. Fluometrik TUNEL sistemi ile hücre dizilerinde apoptozun önemli biyokimyasal ayırt edici özelliği olan çekirdekdeki DNA fragmentasyonu ölçülmektedir. Apoptotik hücrelerdeki fragmente DNA'nın 3'-OH ucuna, rekombinant enzim terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi (rTdT) ile fluresin-12-dUTP eklenir. Fluresin-12-dUTP ile DNA boyanır ve floresan mikroskop ya da flow sitometri ile ölçülür.

DeadEndTM Fluorometrik TUNEL Test Protokolü:

- 1) Her kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde 4 farklı hücre grubu 6 kuyucuklu plate'lere ekilerek deney düzeneği kuruldu.
- 2) Kuyucuklardaki hücreleri kaldırmak için tripsinizasyon işlemi uygulandı ve hücreler 1,5 mL'lik eppendorflara konuldu.

- 3) Hücreler 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı.
- 4) Üst kısımdaki supernatant atıldı ve üzerlerine 1mL PBS eklendi ve yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
- 5) Ardından pellet halindeki hücreler üzerine 3:1 oranında hazırlanmış olan metanol: asetik asit (fiksatif) karışımı eklendi.
- 6) 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek, bu işlem 3 kez gerçekleştirildi.
- 7) Son santrifüj ardından hücre pelleti üzerine 30 µL fiksatif eklendi.
- 8) Her hücre grubu pozitif kontrolle birlikte çalışıldı, her hücre grubu için 2 adet lam hazırlandı ve +4 °C'ye kaldırıldı.
- 9) Her hücre solüsyonundan mikropipet yardımıyla 15 µL alınarak hazırlanan lamlar üzerine damlatıldı ve yayıldı.
- 10) Kuruyan lamlar daha sonra önceden hazırlanan cam şale içerisindeki % 4'lük metanolsüz formaldehitin PBS (pH: 7,4) içerisindeki çözeltisine aktarılarak +4 °C'de 25 dakika beklendi.
- 11) Ardında hücrelerin daha geçirgen hale gelebilmesi için lamlar PBS ile hazırlanmış olan % 0,2 Triton-X çözeltisi içinde 5 dakika bekletildi.
- 12) Lamlar PBS ile 5'er dakika süreyle 3 kez yıkandı.

Pozitif kontrol için DNase uygulaması:

- a) Pozitif kontrol lamında bulunan hücreler üzerine 100 µL DNase I tamponu [40 mM Tris-HCl (pH: 7,9), 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂] eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi
- b) Sıvı uzaklaştırıldı ve 5,5-10 ünite/mL DNase I içeren 100 µL DNase I tamponu ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- c) Lamlar üzerindeki fazla sıvı uzaklaştırıldı ve 3-4 kez deiyonize su ile yıkandı.

Bu basamaktan sonraki aşamalar pozitif kontrol lamları ve diğer lamlarla birlikte yürütüldü.

- 13) Yıkama işleminden sonra lamlar üzerine 100 µL equilibration tamponu eklendi ve 10 dakika bekletildi.
- 14) Bu sırada rTdT inkübasyon tamponu hazırlandı: 90 µL equilibration tamponu, 10 µL nükleotit karışımı ve 2 µL rTdT enzimi.
- 15) 5-10 dakika sonunda lamlarda bulunan fazla sıvı uzaklaştırılarak yerine nükleotit karışımı eklendi ve üzerine lamel kapatıldı. 37 °C'de nemli etüvde 60 dakika bekletildi.
- 16) Oda sıcaklığında 2XSSC içinde reaksiyonun durması için 15 dakika bekletildi.
- 17) Lamlar PBS içerisinde 5 dakika yıkandı ve bu işlem 3 kez tekrar edildi.
- 18) Lamlar içerisinde 1mg/1mL olacak şekilde hazırlanmış propidyum iyodit solüsyonu içerisinde 15 dakika bekletildi.
- 19) Lamların kurumasından sonra üzerine % 50'lik gliserol damlatılarak lam ile kapatıldı ve floresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm) ve kırmızı (620 nm) filtreler ile inceleme yapıldı.

3.6 Protein Analizi:

Protein analizi Bradford yöntemiyle yapılmıştır. Bradford reaktifi, kullanıma hazır, hızlı ve protein konsantrasyonunu hassas bir şekilde ölçen yöntemdir.

Bradford protein analizi Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması prensibine dayanır. Bu bağlanma sonucu oluşan renk değişikliği ile çözeltinin 465-595 nm'de absorbansı ölçülür.

Bradford Reagent Test Protokolü:

- 1) Her kuyucukta 1×10^6 hücre bulunan 4 farklı hücre grubu olacak şekilde plate'e ekilerek deney düzeneği kuruldu.

- 2) Plate içerisindeki hücreler serumsuz besiyeri ile 3 kez yıkandı.
- 3) Yıkanan hücrelerin üzerine 500 µL içerisinde SDS bulunmayan native sample buffer eklendi ve her hücre grubu ayrı eppendorf içerisinde alındı.
- 4) Hücreler kaldırıldıktan sonra proteaz enzimini inhibe etmek için 5 dakika sıcak su banyosu içerisinde bekletildi ve 5 dakika 12.000 rpm de santrifüj edildi.
- 5) Stok çözeltilerden derişimi 25, 20, 15, 10, 5, 2.5, 1,25 µg/mL olan standartlar (BSA) hazırlanır.
- 6) Plate içerisine 120 µL hazırlanan standartlar ve kontrol grubu, 20 µM, 25 µM, 30 µM'lık Cisplatin gruplarından aynı miktarda örnek konuldu.
- 7) Üzerlerine 120 µL Bradford reaktifi eklendi ve 5 dakika karıştırıldı.
- 8) Plate 595 nm'de her bir kuyucuğun absorbans değeri mikropak okuyucu ile ölçüldü.
- 9) Her bir standartın absorbansının okunması ile standart bir eğri oluşturuldu.
- 10) Bilinmeyen örneklerin absorbansları standart eğriyle karşılaştırılarak protein konsantrasyonları bulundu.

3.7 Tetrofosmin'in Na^{99m}TcO₄ ile İşaretlenmesi:

Liyofilize haldeki kit 0,23 mg tetrofosmin, 30 µg kalay klorid dihidrat, 0,32 mg disodyum sülfosalisilat ve 1,0 mg sodyum glukonat içermektedir. pH liyofilizasyondan önce nitrojen atmosferi altında ayarlanmıştır.

0,23 mg tetrofosmin 7,5 mL suda çözüldü. Stok solusyonundan 3µg/100µL tetrofosmin alınarak üzerine 5 µL SnCl₂ (1mg/1mL) ilave edildi. Karışımdan 5 dakika argon gazı geçirildi ve 1 mCi Na^{99m}TcO₄ ile işaretlenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

3.8 ^{99m}Tc-Tetrofosmin'in Kalite Kontrolü:

^{99m}Tc-Tetrofosmin'in ince tabaka kağıt kromatografisi ile kalite kontrolünde silika jel kaplı, kalınlıkları 0,1 mm olan 20 x 20 cm boyutlarındaki aliminyum tabakalar kullanıldı. Tabakalar 1,5 x 10 cm'lik şeritler halinde kesildi. şeritlerin başlangıç noktasından 0,5 cm yükseklikteki noktaya kapiler yardımıyla ^{99m}Tc-Tetrofosmin damlatıldı. Solvent sistemi olarak 3 banyo kullanıldı.

1. Aseton/diklorometan (35/65)
2. Etanol/amonyak/su (2/1/5)
3. ACD (Antikoagülan sitrat dekstroz çözeltisi)

TLC'ler banyo ortamlarına yerleştirildi ve çözenler yeterli yüksekliğe ulaştığında şeritler banyolardan çıkarılarak kurutuldu. Kurumuş şeritler üzerleri kağıt bantla kaplanarak BioScan TLC-tarayıcıda taratıldı (Bioscan AR-2000 Washington DC). Elde edilen kromatogramlardan radyoişaretlenme verimi ve ^{99m}Tc-Tetrofosmin'in Rf değeri (bileşiğin yürüdüğü mesafe/çözgenin yürüdüğü mesafe) tespit edildi.

3.9 ^{99m}Tc-Tetrofosmin'in MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerine Bağlanması:

1. Her kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde 4 farklı hücre grubu ve her hücre grubunun 3 tekrarı olacak şekilde 24 kuyucuklu plate'lere deney düzeneği kuruldu.
2. Hücreler tripsinizasyon ile kaldırılarak 1,5 mL'lik eppendorflara tüplere alındı.
3. Her bir tüpte $1 \mu\text{g}/50\mu\text{Ci}$ (Arbab et al, 1996) ^{99m}Tc-Tetrofosmin olacak şekilde hücrelerin olduğu eppendorflara eklendi.
4. Eppendorftaki ^{99m}Tc-Tetrofosmin tutulumunu saptamak için içerisinde hücre bulunmayan eppendorflara $1\mu\text{g}/50\mu\text{Ci}$ ^{99m}Tc-Tetrofosmin ilave edildi.
5. Cd(Te) dedektöründe eppendorfların aktiviteleri sayıldı. Aynı işlemler 3 kez tekrarlandı.

6. ^{99m}Tc -Tetrofosmin ile hücreler 2 saat inkübe edildikten sonra, tutulum olmayan hücreleri elimine etmek için hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. Aynı işlemler hücrelerin olmadığı eppendorflar içinde tekrarlandı.
7. Yıkama işleminden sonra hücrelerin Cd(Te) dedektöründe aktiviteleri sayıldı. İçerisinde hücre bulunmayan eppendorflardaki tutulumlar, içerisinde hücre bulunan eppendorflardan çıkarılarak hücrelerdeki net tutulumlar bulundu.
8. Tümör hücrelerinde ^{99m}Tc -Tetrofosmin tutulum oranı hesaplandı.

3.10 İstatistik Analizler:

In vitro hücre tutulum çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 16 programı ile yapıldı. Annexin V ve TUNEL yöntemiyle bulunan hücre gruplarındaki apoptotik oran regresyon analizi ve farklı gruplardaki ^{99m}Tc -Tetrofosmin tutulumları varyans one-way ANOVA analizi ile hesaplandı. Sonuçların standart sapma değerleri bulundu ve p değeri <0.05 olanlar anlamlı kabul edilmektedir.

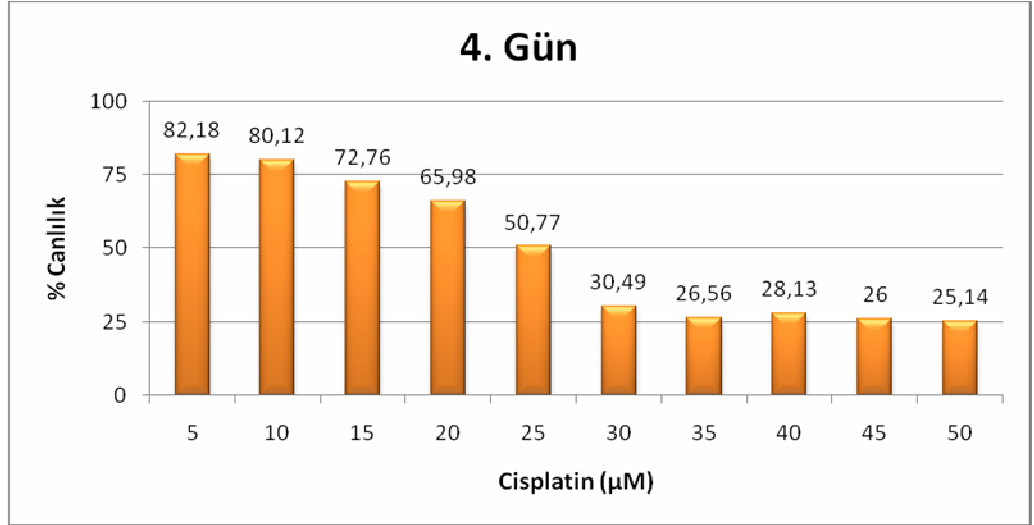
4. BULGULAR:

Cisplatinin meme kanseri hücrelerindeki kemoterapötik etkisi ve ^{99m}Tc -Tetrofosmin tutulumu MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılarak çalışıldı.

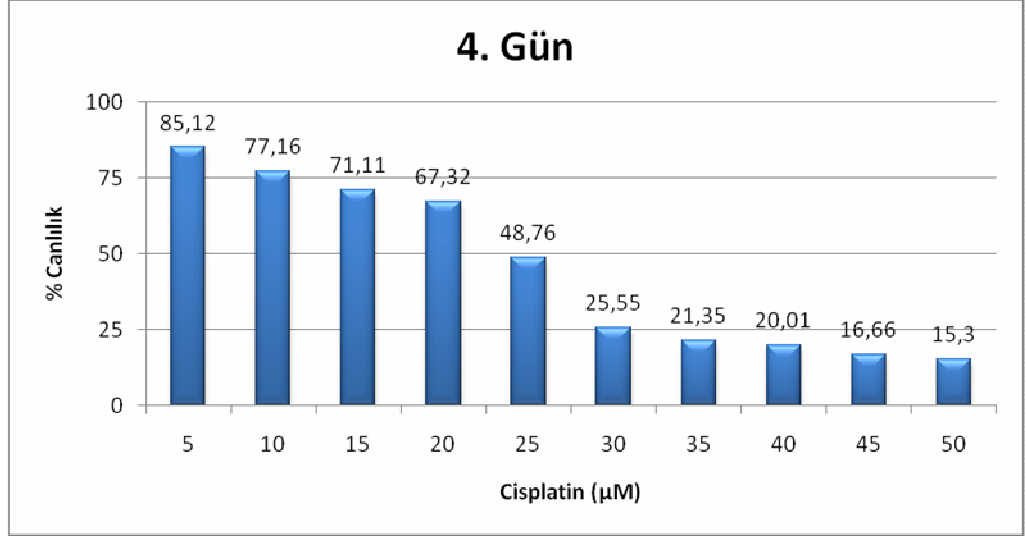
4.1 Sitotoksosite Testleri Sonuçları:

4.1.1 Cisplatinin MCF-7 meme kanseri hücre hattında IC_{50} dozunun belirlenmesi:

MCF-7 hücre serisinde Cisplatinin IC_{50} dozu XTT (Şekil 4.1) ve tripan mavisi testi (Şekil 4.2) ile 4. gün 25 μM olarak belirlendi.



Şekil 4.1. XTT testi ile cisplatinin sitotoksitesisi



Şekil 4.2. Tripan mavisi testi ile cisplatinin sitotoksitesitesi

4.2 Apoptoz Testleri Sonuçları:

Cisplatinin 25 µM olarak belirlenen IC₅₀ dozu, bunun bir alt ve üst dozu kullanılarak, bu dozların MCF-7 hücre hattındaki apoptotik etkileri Annexin V ve TUNEL yöntemleriyle belirlemek amacıyla 4 çalışma grubu oluşturuldu.

1. Grup: Kontrol grubudur. Bu gruptaki MCF-7 hücrelerine herhangi bir muamele yapılmadı.
2. Grup: Bu gruptaki hücreler, Cisplatinin IC₅₀ dozunun bir alt dozu seçilerek 20 µM cisplatine maruz bırakıldı.
3. Grup: Bu gruptaki hücreler, Cisplatinin IC₅₀ dozuna (25µM) maruz bırakıldı.
4. Grup: Bu gruptaki hücreler, Cisplatinin IC₅₀ dozunun bir üst dozu seçilerek 30 µM cisplatine maruz bırakıldı.

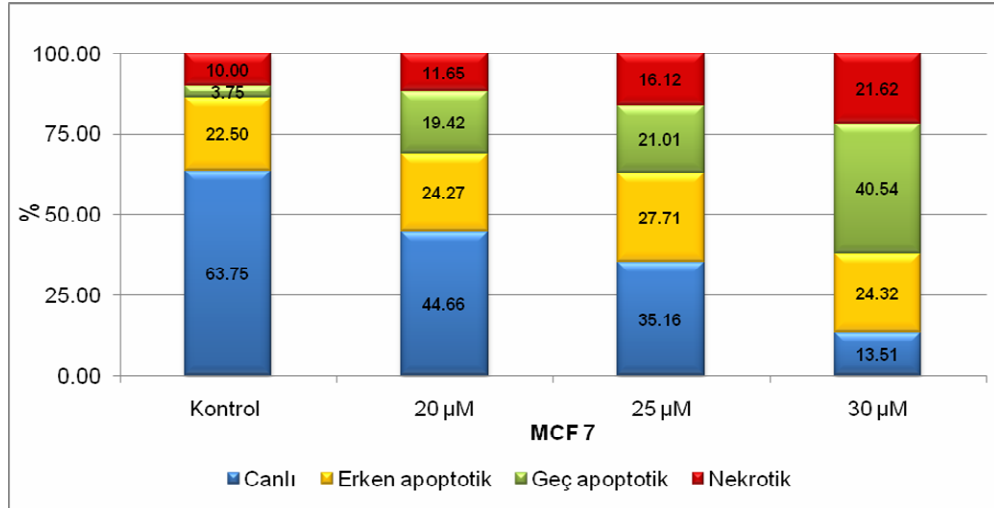
4.2.1 Annexin V yöntemi ile elde edilen sonuçlar:

Annexin V-EGFP (yeşil floresans) ve non-vital boya olan propidium iodide (kırmızı flüoresans) kullanılarak floresan mikroskop altında MCF-7 hücre hattında canlı hücreler (EGFP-PI+), erken apoptotik hücreler (EGFP-PI+) geç apoptotik (EGFP+PI-) veya nekrotik hücreler (EGFP+PI+) incelendi.

Annexin V yöntemi ile MCF-7 hücre hattında Cisplatin gruplarında (20, 25 ve 30 μM) apoptotik etki incelendiğinde, kontrol grubunda toplam apoptotik hücre oranı %25,95, 20 μM 'lık kemoterapi grubunda % 43,69, 25 μM 'lık kemoterapi grubunda % 48,72 ve 30 μM 'lık kemoterapi grubunda % 64,86 olarak bulunmuştur.

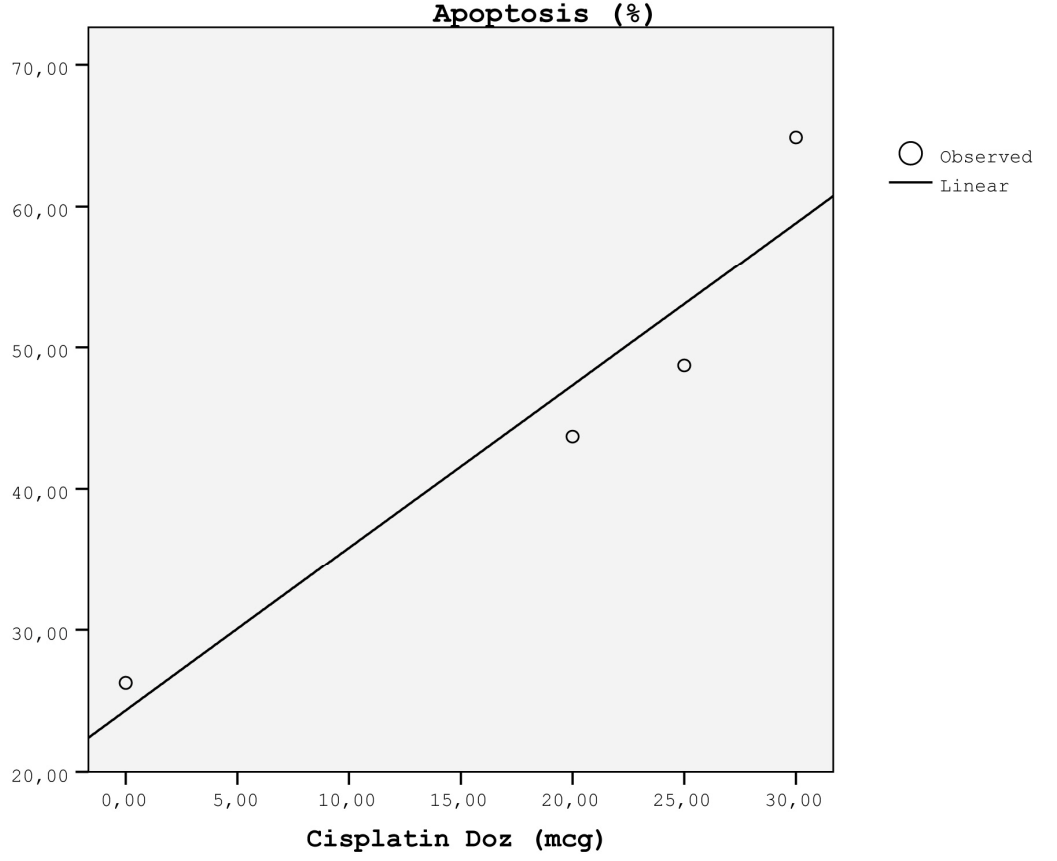
MCF-7 meme kanser hücrelerinde saptanan apoptoz kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 20, 25 ve 30 μM Cisplatin uygulamasından sonra sırasıyla 166, 185 ve 247 katlık bir artış olduğu gözlemlendi.

MCF-7 meme kanser hücrelerinde kontrol grubu ve kemoterapi gruplarında Cisplatin dozu (20, 25 ve 30 μM) arttıkça nekrozda 117, 161 ve 216 katlık bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. MCF-7 hücre hattında Annexin V yöntemi ile kontrol ve cisplatin gruplarında apoptoz

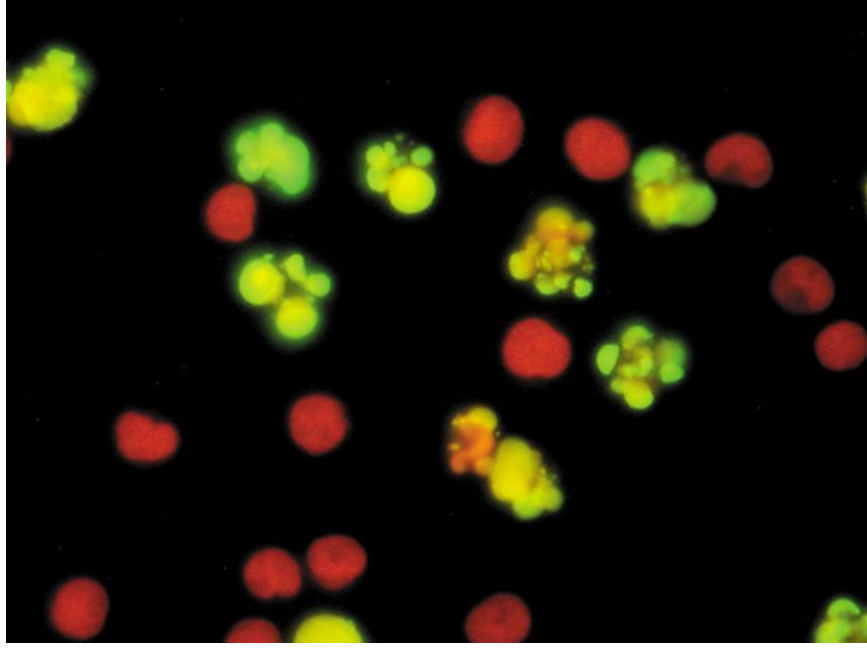
Annexin-V yöntemi ile değerlendirilen Cisplatinin doza bağlı apoptotik etkisi % 90,5 ilişkili olarak anlamlı bulundu (R: 0,910 p=0,001) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Annexin-V yöntemi ile değerlendirilen cisplatinin doza bağlı etkisi

4.2.2 TUNEL yöntemi ile elde edilen sonuçlar :

Apoptoz ile DNA'da oluşan kırık bölgelerinin 3' -OH uçlarına terminal deoksिनükleotidil transferaz enzimi tarafından yeşil floresan işaretli dUTP eklenerek fragmentasyonun saptanmasını sağlayan bu yöntemde Cisplatin' in 20 μM , 25 μM ve 30 μM 'lık dozlarının oluşturdukları apoptotik etki MCF-7 hücre hattında araştırıldı. Floresan mikroskopta apoptotik hücreler yeşil renkte görülmektedir (Şekil 4.5).

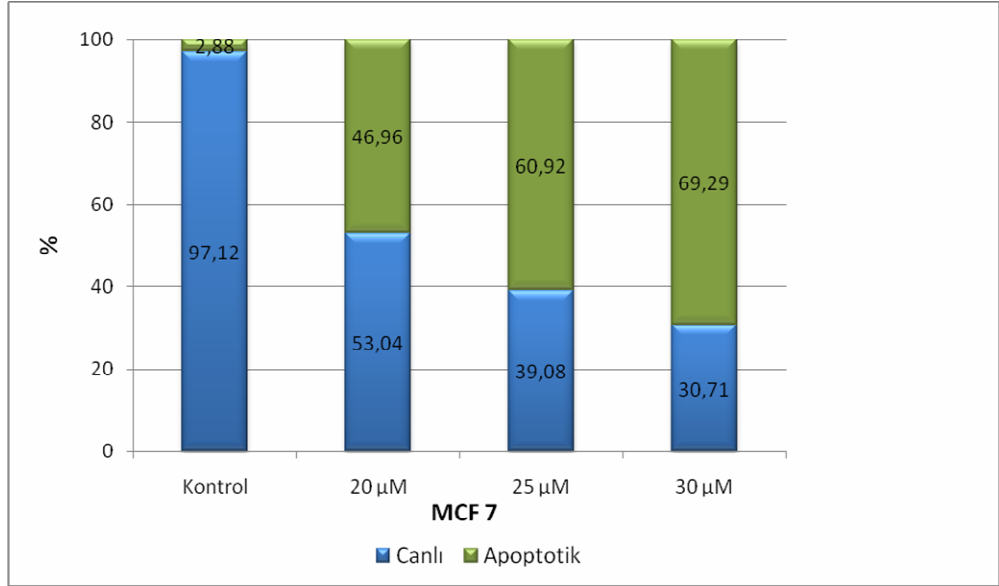


Şekil 4.5. MCF-7 hücre hattında 4. gün 25 μM 'lık cisplatin dozunun TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin gösterilmesi

TUNEL yöntemi ile saptanan apoptoz değerlendirildiğinde MCF-7 hücre hattında kontrol grubu ve Cisplatin gruplarında uygulanan Cisplatin miktarı arttıkça apoptoz oranında artış olduğu gözlemlendi.

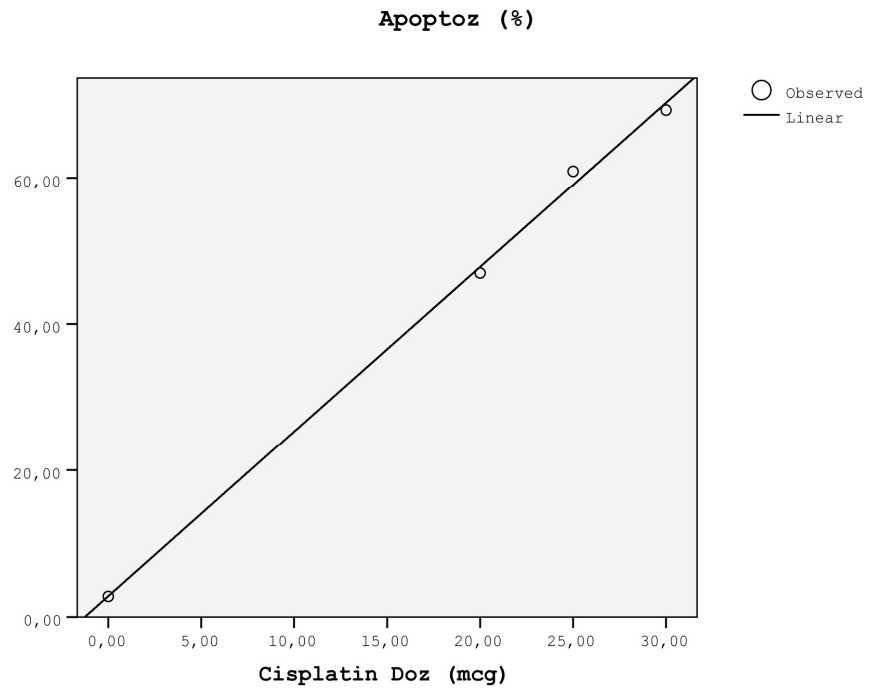
Kontrol grubu, 20, 25 ve 30 μM 'lık Cisplatin gruplarında ki apoptotik hücre oranı sırasıyla % 2,88, % 46,96, % 60,92 ve % 69,29 olarak bulunmuştur (Şekil 4.6).

20, 25 ve 30 μM 'lık Cisplatin dozu uygulanan hücre gruplarındaki apoptoz oranı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 1630, 2115 ve 2405 kat artış olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.6. MCF-7 hücre hattında TUNEL yöntemi ile kontrol ve cisplatin gruplarında apoptoz

TUNEL yöntemi ile değerlendirilen Cisplatinin doza bağlı apoptotik etkisi % 99,8 ilişkili olarak anlamlı bulundu (R: 0,999 p=0,001) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. TUNEL yöntemi ile değerlendirilen cisplatinin doza bağlı etkisi

4.3 Protein Analizi Sonuçları:

Bradford reagent micro assay protein kit ile MCF-7 hücre hattında kontrol ve cisplatin grubunda protein içeriği belirlendi. Protein içeriği kontrol grubunda 0,39 g, 20 μ M cisplatin uygulanmış hücre grubunda 0,20 g, 25 μ M cisplatin uygulanmış hücre grubunda 0,12 g ve 30 μ M cisplatin uygulanmış hücre grubunda 0,04 g olarak bulundu.

Çizelge 4.1. MCF-7 hücre hattında kontrol ve cisplatin gruplarında protein analizi sonucu bulunan protein miktarları

Hücre grupları	Protein (g)
Kontrol	0,39
20 μ M	0,20
25 μ M	0,13
30 μ M	0,04

4.4 ^{99m}Tc -Tetrofosmin'in Kalite Kontrol Sonuçları:

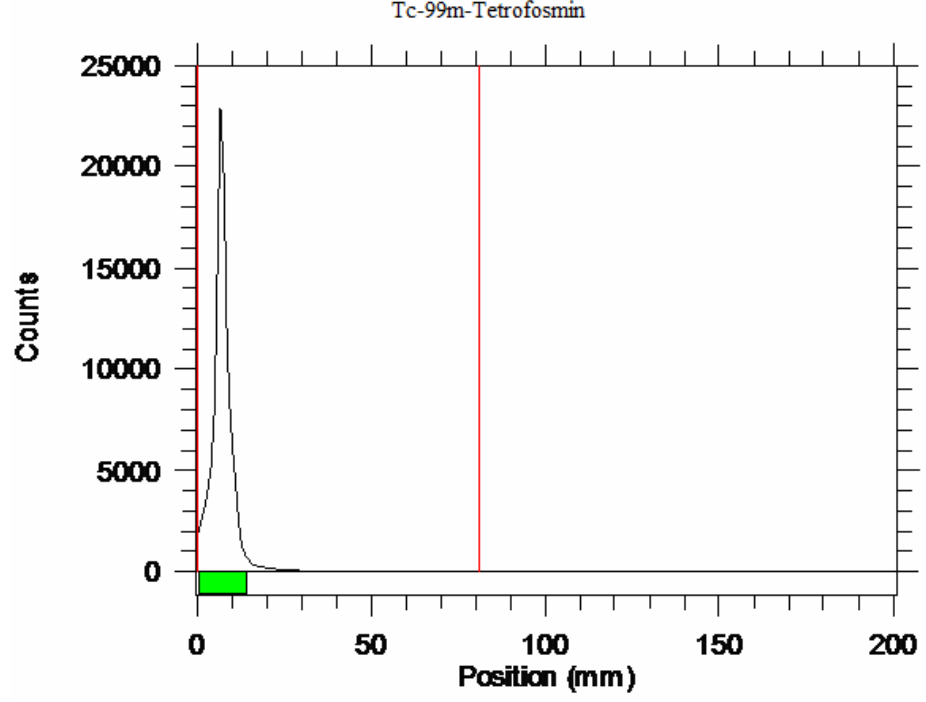
4.4.1. RTLC ile elde edilen sonuçlar:

^{99m}Tc -Tetrofosmin'in kalite kontrolünde RTLC yönteminde kullanılan banyo çözeltileri Aseton/diklorometan (35/65), Etanol/amonyak/su (2/1/5) ve ACD' dir. ^{99m}Tc -Tetrofosmin, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve indirgenmiş ^{99m}Tc 'a ait Rf değerleri Çizelge 4.1' de yer almaktadır.

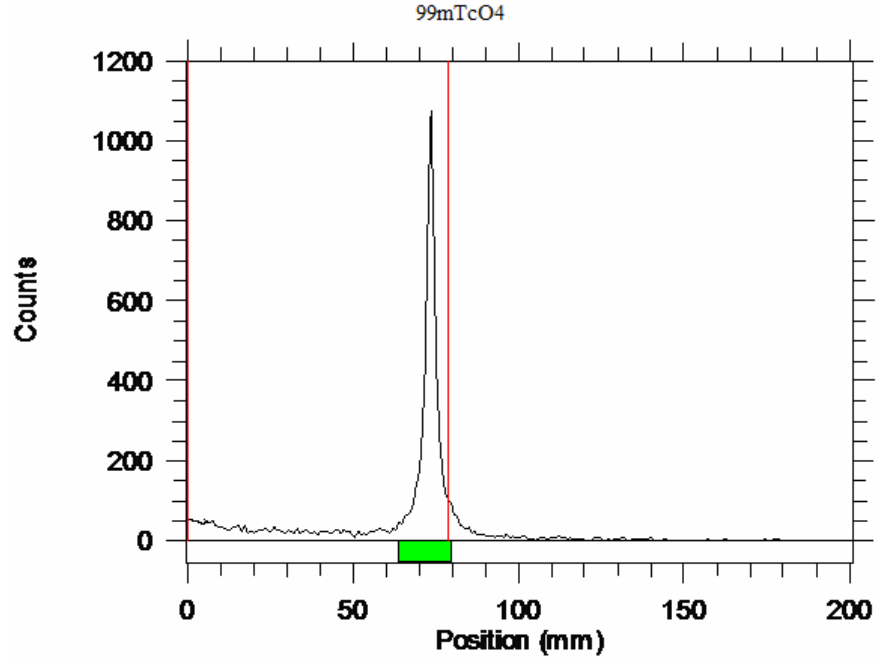
Çizelge 4.2. Rf değerleri

Banyolar	^{99m}Tc -Tetrofosmin	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	İndirgenmiş ^{99m}Tc
Aseton/diklorometan (35/65)	0,08	0,92	0,01
Etanol/amonyak/su (2/1/5)	0,42	0,91	0,03
ACD	0,02	0,92	0,89

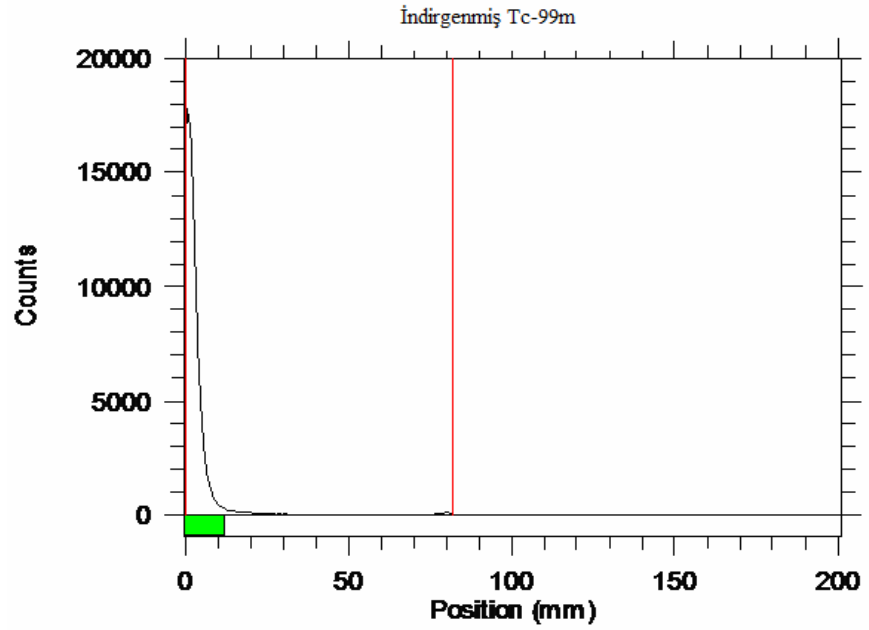
^{99m}Tc -Tetrofosmin, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve indirgenmiş ^{99m}Tc 'a ait aseton/diklorometan (35/65) banyosu kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramları Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 'da, etanol/amonyak/su (2/1/5) banyosu kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramları Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de görülmektedir.



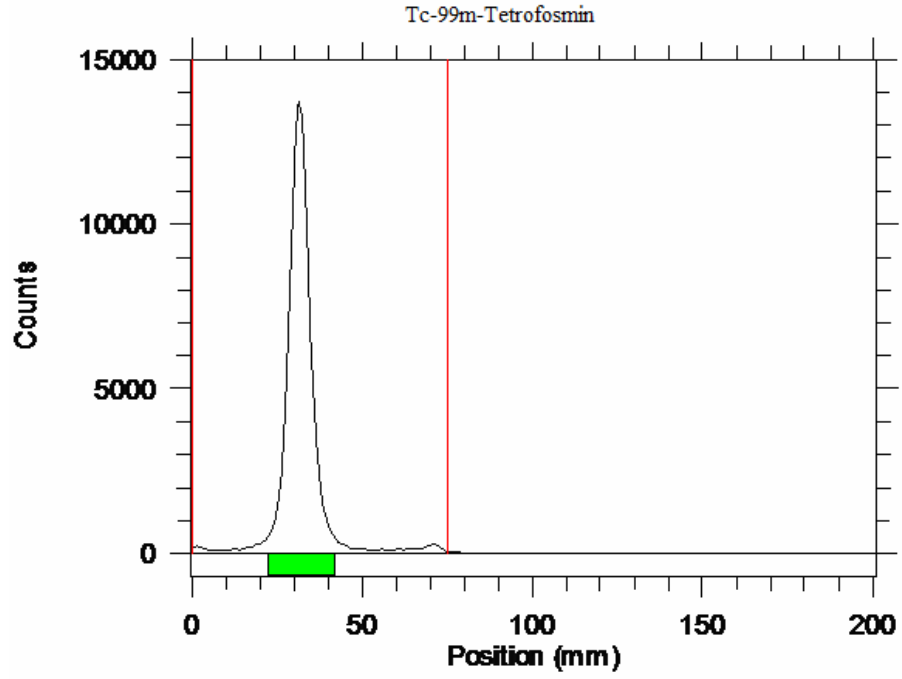
Şekil 4.8. ^{99m}Tc -Tetrofosmin'in aseton/diklorometan (35/65) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



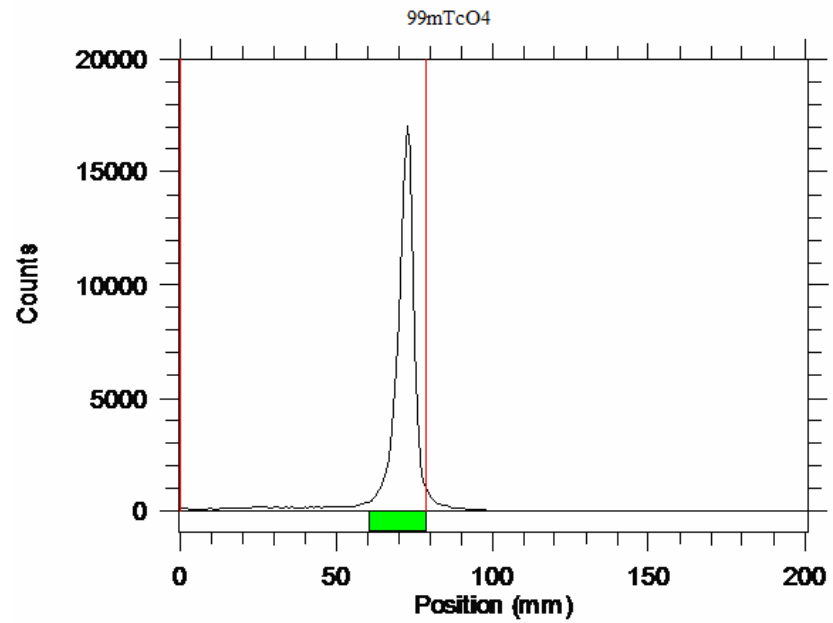
Şekil 4.9. $^{99m}\text{TcO}_4^-$ in aseton/diklorometan (35/65) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



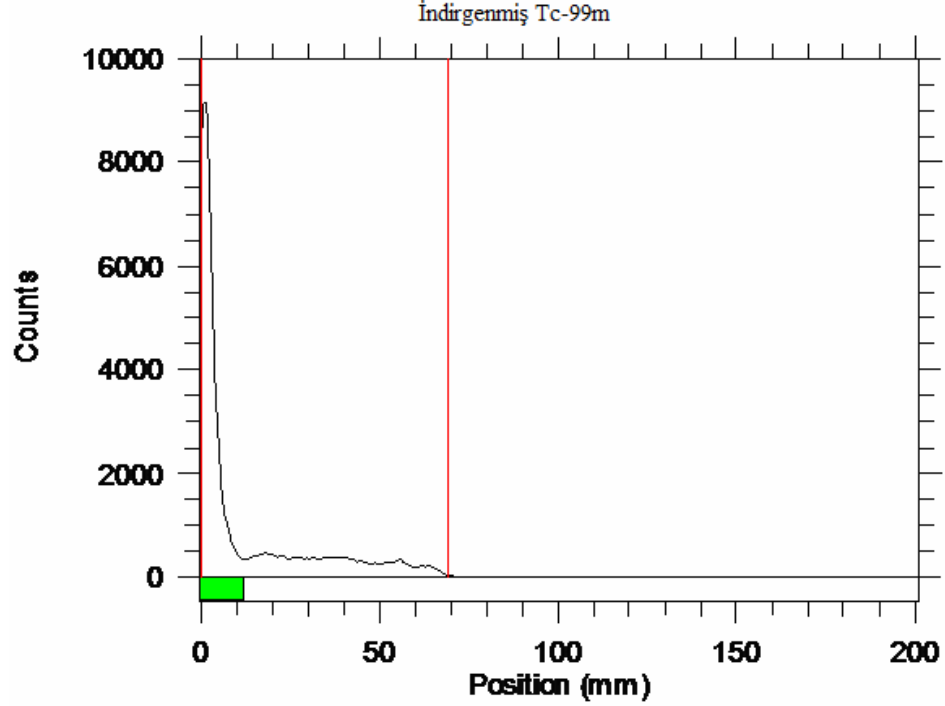
Şekil 4.10. İndirgenmiş ^{99m}Tc 'un aseton/diklorometan (35/65) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



Şekil 4.11. ^{99m}Tc -Tetrofosmin'in etanol/amonyak/su (2/1/5) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



Şekil 4.12. $^{99m}\text{TcO}_4^-$ in etanol/amonyak/su (2/1/5) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



Şekil 4.13. İndirgenmiş ^{99m}Tc 'un etanol/amonyak/su (2/1/5) çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı

İşaretili bileşiğin RTLC kromatogramları incelendiğinde aseton/diklorometan (35/65) banyosunda $^{99m}\text{TcO}_4^-$ sona yürümüş, indirgenmiş ^{99m}Tc başlangıçta kalmıştır. ^{99m}Tc -Tetrofosmin, indirgenmiş ^{99m}Tc göre daha fazla yürümüştür. Etanol/amonyak/su (2/1/5) banyosunda ise $^{99m}\text{TcO}_4^-$ sona yürümüş, indirgenmiş ^{99m}Tc başlangıçta kalmıştır. İşaretili bileşiğin ise Rf değeri ise ortada çıkmıştır. Her iki banyoda da Rf değerleri farklılık göstermektedir. İşaretili bileşiğe ilişkin pikin RTLC kromatogramlarına göre hesaplanan bağlanma verimi % $94,6 \pm 2,5$ olarak bulunmuştur.

4.5 ^{99m}Tc -Tetrofosmin'in MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Tutulum Sonuçları:

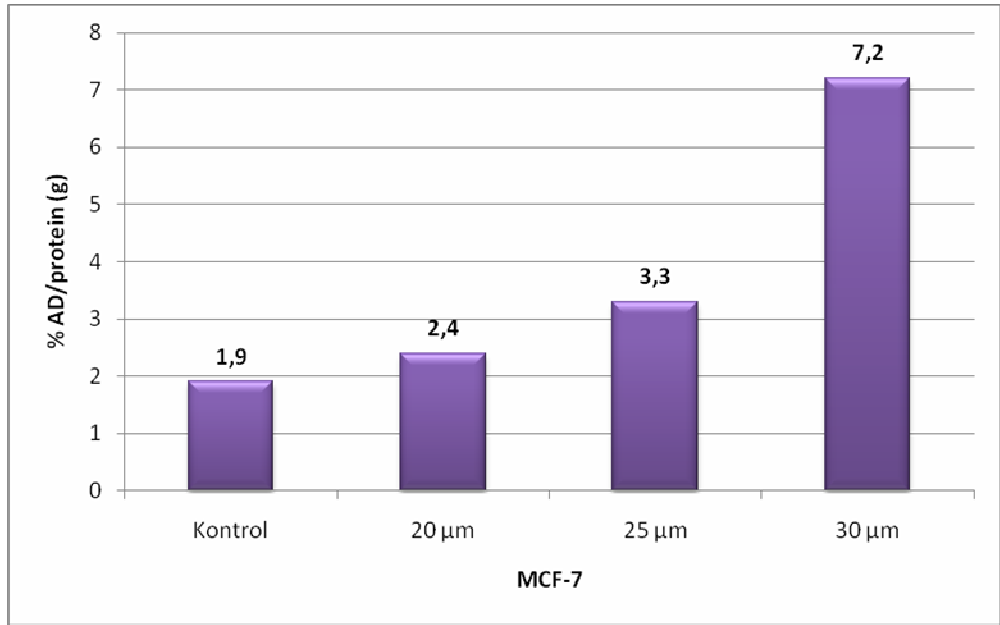
MCF-7 meme kanser hücre hattında kontrol grubunda ^{99m}Tc -Tetrofosmin tutulumu % $0,75 \pm 0,07$ olarak hesaplandı. Cisplatin uygulanmasından sonra ^{99m}Tc -Tetrofosmin'in 20 μM 'lık doz uygulanmış hücrelerde % $0,49 \pm 0,04$, 25 μM 'lık dozda % $0,42 \pm 0,1$ ve 30 μM 'lık dozda % $0,29 \pm 0,1$ olarak bulunmuştur (Şekil 3.13). Kontrol ve Cisplatin (20 μM , 25 μM ve 30 μM) grupları arasındaki varyans analizi sonuçları anlamlı olarak bulunmuştur ($p < 0,01$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.3 ^{99m}Tc -Tetrofosmin 'in MCF-7 hücre hattında kontrol ve cisplatin gruplarındaki tutulumu

Grup	MCF-7
Kontrol grubu	$0,75 \pm 0,07$
Cisplatin grubu (20 μM)	$0,49 \pm 0,04$
Cisplatin grubu (25 μM)	$0,42 \pm 0,1$
Cisplatin grubu (30 μM)	$0,29 \pm 0,1$
F	28,302
p	0,000

Güven aralığı % 95, (n=3)

MCF-7 hücre hattında tüm gruplarda % ^{99m}Tc -Tetrofosmin tutulumları, Bradford reagent micro assay protein kit ile bulunan protein içeriğine (Çizelge 4.3) bölünerek proteinin gramı başına düşen doz değerleri hesaplandı (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. MCF-7 hücre hattında kontrol ve cisplatin gruplarında protein gramı başına düşen % aktiviteleri

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada MCF-7 meme kanser hücre hattında ^{99m}Tc-Tetrofosmin tutulumu ve farklı dozlardaki kemoterapi grupları arasındaki apoptotik oranı karşılaştırılmıştır.

Tetrofosmin'in ^{99m}Tc radyonüklidi ile işaretlenmesi ile elde edilen ^{99m}Tc-Tetrofosmin'in işaretleme verimi % 94,6 ± 2,5 olarak saptanmıştır.

Tassone ve ark.larının MCF-7 hücre hattında yaptığı çalışmada cisplatinin IC₅₀ değerini 2, gün 60-70 µM olarak bulmuşlardır (Tassone et al., 2003). Çalışmamızda ise MCF-7 hücre hattında cisplatinin IC₅₀ değeri 4, gün 25 µM olarak bulunmuştur (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2) (Tassone et al., 2003).

IC₅₀ dozu, bir alt ve bir üst doz olan 20 µM ve 30 µM'lık dozların apoptotik etkileri Annexin V ve TUNEL yöntemleriyle belirlenmiş ve etken madde uygulanmayan kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Annexin V yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre kemoterapi ajanının dozu arttıkça apoptoz oranının da arttığı saptanmıştır. MCF-7 meme kanser hücrelerinde kontrol grubunda erken apoptoz oranı % 22,50 ve geç apoptoz oranı % 3,75 iken, 20 µM'lık Cisplatin grubunda erken apoptoz oranı % 24,27, geç apoptoz oranı % 19,42, 25 µM'lık Cisplatin grubunda erken apoptoz % 27,71, geç apoptoz oranı % 21,01, 30 µM'lık Cisplatin grubunda erken apoptoz % 24,32, geç apoptoz oranı ise % 40,54 olarak bulunmuştur (Şekil 4.3). Kontrol, 20 µM, 25 µM ve 30 µM'lık Cisplatin grupları için toplam apoptotik oran sırasıyla % 26,25, % 43,69, % 48,72 ve % 64,86' dır.

TUNEL yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre kemoterapi ajanının dozu artırıldığında apoptotik hücre sayısında artış gözlenmiştir, TUNEL yöntemiyle kontrol grubu, 20, 25 ve 30 µM'lık Cisplatin gruplarında ki apoptotik oran sırasıyla % 2,88, % 46,96, % 60,92 ve % 69,29 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5).

Liang ve ark.larının yaptığı bir çalışmada A549 akciğer kanseri hücre hattında cisplatinin ve MCF-7 meme kanseri hücre hattında paclitaxelin farklı dozlarının etkisi ^{99m}Tc-DTPA-DG tutulumuna bağlı olarak karşılaştırılmış ve kemoterapi ajanlarının dozları artırıldığında, bizim çalışmamıza benzer şekilde hücrelerde işaretli bileşiğin tutulumunun azaldığını belirtmişlerdir. A549 akciğer

kanser hücre hattında ^{99m}Tc -DTPA-DG tutulumunun kontrol grubunda $\% 0,79 \pm 0,1$, $5 \mu\text{g/mL}$ 'lik cisplatin dozunda $\% 0,59 \pm 0,07$ ve $10 \mu\text{g/mL}$ 'lik cisplatin dozunda $\%0,44 \pm 0,02$ olarak bulmuşlardır. MCF-7 meme kanseri hücre hattında ise ^{99m}Tc -DTPA-DG tutulumunu kontrol grubunda, 7 , 14 ve $28 \mu\text{g/mL}$ 'lik paklitaxel dozlarında ise sırasıyla $\% 0,65 \pm 0,18$, $0,31 \pm 0,08$, $\% 0,28 \pm 0,05$ ve $\% 0,26 \pm 0,03$ olarak bulmuşlardır (Liang et al., 2008). Perek ve ark. ları tarafından yapılan bir çalışmada U937 insan lösemi hattında etaposide ile apoptoz oluşturulmuş ve kontrol grubu ile farklı etaposide dozlarının uygulandığı hücre grupları ^{99m}Tc -glukarat ile işaretlenerek proteinin mg'ındaki $\%$ aktivitelerini ($\%AD/ \text{mg}$ protein) karşılaştırmışlardır. Apoptoz gruplarındaki bu oranın kontrol grubuna göre daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir (Perek et al., 2008), Denoyer ve ark.larının U937 insan lösemi hattında yaptığı bir çalışmada hücrelerde etaposidin apoptotik etkisi ^{99m}Tc -DMSA tutulumuna bağlı olarak incelenmiş ve bunun sonucunda $\%AD/\text{mg}$ oranının apoptotik hücre oranının artışıyla azaldığını gözlemlemişlerdir (Denoyer et al., 2004). Bizim çalışmamızda da her iki çalışmaya benzer şekilde kontrol grubunda ($1,9 \%$ AD/g) bu oran $20 \mu\text{M}$ ($2,4 \%$ AD/g), $25 \mu\text{M}$ ($3,3 \%$ AD/g) ve $30 \mu\text{M}$ 'lık ($7,2 \%$ AD/g) kemoterapi grubuna göre daha düşüktür.

Bu çalışmada, MCF-7 meme kanseri hücre hattında kontrol ve kemoterapi gruplarında ^{99m}Tc -Tetrofosmin tutulumu karşılaştırılmıştır. Tutulumun kontrol grubunda daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4,2). Cisplatinin uygulanan MCF-7 hücre grubunda doz artışa bağlı ^{99m}Tc -Tetrofosmin tutulumunda azalma olduğu bulunmuştur. Cisplatinin meme tümör hücresinde belirgin olarak gösterdiği apoptoz nedeniyle etkili bir kemoterapötik ajan olarak değerlendirilmiştir. Apoptotik etkinin cisplatin konsantrasyonu ile birlikte arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak ^{99m}Tc -Tetrofosmin'in kemoterapi grubunda düşük tutulum göstermesi kemoterapi sonucu artan apoptoz olduğunu söyleyebiliriz. Bu nedenle kemoterapi oranı arttıkça, hücre tutulumunda azalma meydana gelmiştir. Cisplatinin artan konsantrasyonlarında azalan tümör hücre sayısı, ^{99m}Tc -Tetrofosmin tutulumunda düşüğe neden olmakta ve ^{99m}Tc -Tetrofosmin'in meme kanseri hücrelerine özgün bağlanma potansiyelinin olduğunu da göstermektedir.

Sonuç olarak, ^{99m}Tc -Tetrofosmin' in meme kanserinde kemoterapi cevabını değerlendirmede yeni bir radyodiagnostik görüntüleme ajanı olarak kullanılabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Altunkaynak, B.Z., Özbek, E.**, 2008, Programlanmış hücre ölümü: apoptoz nedir?, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6:93-104s.
- Arbab, A.S., Koizumi, K., Toyama, K., Araki, T.**, 1996, Uptake of Technetium-99m-tetrofosmin, Technetium-99m-MIBI, and Thallium-201 in tumor cell lines, *J. Nucl. Med.*, 37:1551-1556.
- Berghammer, P., Obwegeser, R., Müllauer-Ertl, S., Karanikas, G., Wiltschke, C., Kubista, E., Sinzinger, H., Zielinski, C.**, 1999, 99m-Tc-Tetrofosmin scintigraphy and breast cancer, *Gynecol. Oncology*, 73:87-90p.
- Bernard, B.F., Krennig, E.P., Breeman, W.A., Ensing, G., Benjamins, H., Bakker, W.H., Visser, T.J., Jong, M.**, 1998, ^{99m}Tc-MIBI, ^{99m}Tc-Tetrofosmin and ^{99m}Tc-Q12 in vitro and in vivo, *Nucl. Med. Biol.*, 25:233-240p.
- Blankenberg, F.G.**, 2008, In vivo detection of apoptosis, *J. Nucl. Med.*, 49:81-95p.
- Brauer, M.**, 2003, In vivo monitoring of apoptosis, *Prog. Neuro-Psychopharm. Biol. Psych.*, 27:323-331p.
- Denoyer, D., Perek, N., Le Jeune, N., Frere, D., Sabido, O., Clotagatide, A., Dubois, F.**, 2004, In vitro and in vivo evaluation of influence of type III NaPi co-transporter activity during apoptosis on ^{99m}Tc-(V)DMSA uptake in human leukaemic cell line U937, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 31:1421-1427p.
- Güleş, Ö., Eren, Ü.**, 2008, Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2:73-78s.
- Güneş, H. V.**, 2003, Moleküler Hücre Biyolojisi, 475s.
- Kapucuoğlu, N., Boduroğlu, E.C., Ercihan, E., Aktepe, F., Pak, I.**, 2000, Lokal ileri meme karsinomunda kemoterapiye yanıtın apoptosis ile ilişkisi, *Patoloji Bülteni*, 17:14-17s.
- Kelly, J.D., Forster, A.M., Higley, B., Archer, C.M., Booker, F.S., Canning, L.R., Chiu, K.W., Edwards, B., Gill, H.K., McPartlin, M., Nagle, K.R., Latham, I.A., Pickett, R.D., Storey, A.E., Webbon, P.M.**, 1993, Technetium-99m-tetrofosmin as a new radiopharmaceutical for myocardial perfusion imaging, *J. Nucl. Med.*, 43:222-227p.
- Kim, S.J., Kim, I.J., Kim, Y.K.**, 2002, Tc-99m MIBI, Tc-99m-Tetrofosmin and Tc-99m-(V)-DMSA accumulation in recurrent malignant thyoma, *Clin. Nucl. Med.*, 27:30-33p.
- Lahorte, C.M.M., Vanderheyden, J.L., Steinmetz, N., Van de Wiele, N., Dierckx, R.A., Slegers, G.**, 2004, Apoptosis-detecting radioligand: current state of the art and future perspectives, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 31:887-919p.
- Liang, J., Chen, Y., Huang, Z., Zhao, Y., He, L.**, 2008, Early chemotherapy response evaluation in tumors by ^{99m}Tc-DTPA-DG, *Cancer Biother Radiopharm.*, 23:363-370p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maxwell, D., Chang, Q., Zhang, X., Barnett, E.M., Piwnica-Worms, D.,** 2009, An improved cell-penetrating, caspase-activatable, near-infrared fluorescent peptide for apoptosis imaging, *Bioconjugate Chem.*, 20:702-709.
- Numanoğlu, S.,** 2008, Östrojen bağımlı meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) genistein ve hiperterminin kombine etkisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 170s.
- Perek, N., Sabido, O., Le Jeune, N., Prevot, N., Vergnon, J.M., Clotagatide, A., Dobois, F.,** 2008, Could ^{99m}Tc -glucarate be used to evaluate tumor necrosis? In vitro and in vivo studies in leukaemic tumor cell line U937, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 35:1290-1298p.
- Prendergast, G.C. and Jaffee, E.M.,** 2007, Cancer Immunotherapy: Immun suppression and tumor growth, 409p.
- Roche Diagnostics,** Cell Proliferation Kit II, XTT.
- Sartor, J.R.,** 1998, Drug Resistance in breast cancer: Effect of BLC-2 level on the responsiveness of two mammary carcinoma cell line to chemotherapeutic agents, MSc Thesis, The University of British Columbia, 176p.
- Schillaci, O., Scopinaro, F., Danielli, R., Picardi, V., Tavolaro, R., Cannas, P., Colella, A.C.,** 1997, Scintimammography with technetium-99m tetrafosmin scintigraphy to evaluate breast lesions, *Anticancer Res.*, 17:1623-1626p.
- Schoenberger, J., Bauer, J., Moosbauer, J., Eilles, C., Grimm, D.,** 2008, Innovative strategies in in vivo apoptosis imaging, *Current Med. Chem.*, 15:187-194p.
- Tassone, P., Tagliaferri, P., Perricelli, A., Blotta, S., Quaresima, B., Martelli, M.L., Goel, A., Barbieri, V., Costanzo, F., Boland, C.R., Venuta, S.,** 2003, BRCA I expression modulates chemosensitivity of BRCA I defective HCC1937 human breast cancer cells, *Brit. J. Cancer*, 88:1285-1291.
- Tomatır, A.G.,** 2003, Apoptoz: Programlı hücre ölümü, *T. Klin. J. Med. Sci.*, 23:499-508s.
- Ulukaya E.,** www20.uludag.edu.tr/eulukaya (Erişim Tarihi: 2009)
- Zhao, M., Li, Z., Brughenagen, S.,** 2008, ^{99m}Tc -labelled duramycin as a novel phosphatidylethanolamine-binding molecular probe, *J. Nucl. Med.*, 49:1345-1353p.
- Zolle, I.,** 2007, Technetium-99m pharmaceuticals preparation and quality control in nuclear medicine.
- Waehrens, L.N., Rasmussen, J.T., Heegaard, C.W., Falborg, L.,** 2007, Preparation and in vitro evaluation of ^{99m}Tc -labelled bovine lactadherin as a novel radioligand for apoptosis detection, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 50:211-217p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

http://en.wikipedia.org/wiki/Trypan_blue (Erişim Tarihi: 2009)

<http://www.kanser.org/toplum/knedir.php> (Erişim Tarihi: 2009)

<http://web.inonu.edu.tr/~ekaraca/Rad.farma.not.htm> (Erişim Tarihi: 2009)

http://www.bdbiosciences.ca/canada/pharming/en/product_pages/annexinV/Annexin_Assay.jpg (Erişim Tarihi: 2010)

<http://bbg-aura.gaia.com/photos/34/331479/large/DSCN7749.jpg> (Erişim Tarihi: 2010)

<http://www.thermoscientific.com>

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İzmit'te doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi İzmit'te tamamladıktan sonra 2004 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladım ve 2008 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım ve halen burada eğitimimi sürdürmekteyim.