

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HMG-KOA REDÜKTAZ İNHİBİTÖRLERİNİN MEME ADENOKARSİNOM
HÜCRE HATTI MCF-7 ÜZERİNDE HÜCRE PROLİFERASYONU VE
HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI (APOPTOZ VE OTOFAJİ) ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Tuğba DEMİRCİ

Histoloji ve Embriyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2010

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HMG-KOA REDÜKTAZ İNHİBİTÖRLERİNİN MEME ADENOKARSİNOM
HÜCRE HATTI MCF-7 ÜZERİNDE HÜCRE PROLİFERASYONU VE
HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI (APOPTOZ VE OTOFAJİ) ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Tuğba DEMİRCİ

Histoloji ve Embriyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU

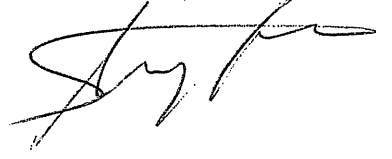
ANKARA

2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı ve Danışmanı: Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu
Hacettepe Üniversitesi



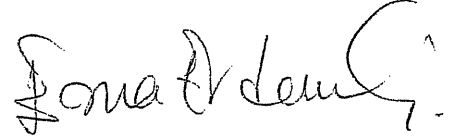
Üye: Prof. Dr. A. Nur Çakar
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Esin Aşan
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Esra Erdemli
Ankara Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Petek Korkusuz
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki doktora tez çalışmam sırasında eşsiz destek ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Prof. Dr. Sevdâ Müftüoğlu'na ve eğitimim boyunca her türlü bilgi birikimlerini ve deneyimlerini paylaşan tüm değerli hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitimim boyunca, en zor günlerimde bana destek olan, yardımlarını asla esirgemeyen asistan arkadaşlarıma ve tüm bölüm personellerine sevgilerimi ve teşekkürlerimi iletirim.

Doktora tez hazırlama döneminde zaman konusunda anlayışlarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı'na teşekkürlerimi sunarım.

Sonsuz desteğini ve sevgisini her zaman yanımda hissettiğim annem, babam, kardeşim Uğur ve Meltem Ablam'a teşekkür ederim.

Y gracias a la mas grande de mis suertes, Luis. Sin ti no hubiera a sido posible esta tesis.

ÖZET

Demirci T., HMG-CoA Redüktaz İnhibitörlerinin Meme Adenokarsinom Hücre Hattı MCF-7 üzerinde hücre proliferasyonu ve hücre ölüm mekanizmaları (apoptoz ve otofaji) üzerine etkisinin incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Programı Tezi, Ankara, 2010. Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda görülme sıklığı en yüksek olan kanser türüdür. Meme kanseri ölüme yol açması açısından ise akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alır. Birçok kanser de olduğu gibi meme kanserinde de yeni tedavilerin geliştirilmesi amacıyla çalışmalar yürütülmektedir. Günümüzde en çok serebrovasküler ve kardiyovasküler hastalıkları önlemek için kullanılan ve kolesterol sentezini hidroksi-metil glutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz enzimi inhibisyonu ile spesifik olarak bloke eden statinler, son çalışmalarda kanser tedavisinde umut vadeden ilaçlar olarak gösterilmektedir. Statinlerin kanser hücre dizilerinde sitotoksik etkilerinin araştırıldığı birçok yayın bulunmasına karşın meme kanser hücrelerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Kanser hücrelerinde tedaviye yönelik çalışılan ölüm çeşitlerinden biri de otofajidir. Otofaji, hücrenin stres altında iken hasarlı organellerini ve makromoleküllerini yıkması olarak tanımlanan yeni bir hücre ölüm çeşididir. Son yıllarda farklı hücre hatları üzerinde otofajik etkileri gösterilmiş olan statinlerin, meme kanseri hücrelerinde otofajik mekanizmalar üzerine etkisine ilişkin literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu çalışmada statinlerin meme kanser hücrelerindeki otofajik mekanizmalar üzerine olan etkisi incelenmiştir. Aynı zamanda meme kanseri hücrelerinde apoptoz ve otofaji arasındaki ilişkinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda statin grubu ilaçlardan atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin farklı konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele sonrasında, MCF-7 insan meme adenokarsinom hücrelerinde ilaç doz artışına paralel hücre proliferasyonlarında azalma saptanmıştır. Bunlardan en etkin sitotoksiteye sahip olan ilaç grubu fluvastatin olarak bulunmuştur. 24 saat atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin 10µM, 20µM ve 80µM konsantrasyonları ile muamele edilen hücre gruplarında TUNEL yöntemi ile elde edilen apoptoz sonuçları, doz artışına paralel apoptotik hücre yüzdesinde artış olduğunu göstermiştir. 80µM konsantrasyon uygulanan gruplarda hücrelerin birçoğunda nekrotik özellikler izlenmiştir. Klinikte en yaygın kullanım alanına sahip olan atorvastatinin 10µM, 20µM ve 80µM konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 hücre gruplarına immunohistokimya yöntemi uygulanarak hücrelerde kaspaz3 ile apoptoz; beclin-1 ve LC3 belirteçleri ile otofaji gösterilmiştir. Meme adenokarsinom hücrelerinin ELISA ve immunohistokimyasal çalışmalarımızı destekleyen nitelikteki elektron mikroskopik incelemelerinde; hücrelerde apoptotik, otofajik ve nekrotik ince yapı değişiklikleri saptanmıştır. Sonuç olarak statinlerin sitotoksik etki mekanizmalarına farklı bir bakış açısı getiren çalışmamız, statinlerin MCF-7 meme adenokarsinom hücrelerinde apoptoz mekanizmalarının yanı sıra otofajik mekanizmalar üzerinden de etkili olduğunu gösteren ilk çalışmadır. MCF-7 hücrelerinde apoptoz ve otofaji ilişkisini daha net ortaya koyacak, otofaji inhibitörleri kullanılarak planlanacak ileri çalışmalara bilgi kaynağı oluşturacaktır.

Anahtar kelimeler: Statin, Hücre Proliferasyonu, Otofaji, Apoptoz, Meme kanseri

Destekleyen Kurum: Hacettepe Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Bölümü

ABSTRACT

Demirci T., Evaluation of the effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors on the cell proliferation and cell death mechanisms (apoptosis and autophagy) of the breast adenocarcinoma cell line MCF-7. Breast cancer is the most common cancer worldwide among women and is the second leading cause of cancer deaths. In recent years many studies about the new treatment modalities of breast cancer have been conducted. Statins, mostly used for the prevention of cardiovascular and cerebrovascular diseases, block cholesterol synthesis by specific inhibition of HMG-CoA reductase. In the last few years, use of statins gained interest for cancer prevention and treatment. Although there are many articles that indicate cytotoxic effects of statins on cancer cells, the exact mechanism of antiproliferative and antiapoptotic effects of them on breast cancer cells is not clearly understood. Autophagy is a new insight about death pathways and it is defined as the process by which cells recycle their own unessential organelles and components under stress conditions. Autophagic effects of statins on different kinds of cancer cell lines are well known but the effects of statins on breast cancer cells have not been investigated in aspect of autophagy. Therefore, our aim was to determine if statins induce autophagy in breast cancer cells. We further investigated the relationship between apoptosis and autophagy specifically induced by statins in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. In this study, it is found that treatment of MCF-7 breast cancer cells with different concentrations of atorvastatin, simvastatin, fluvastatin inhibited the proliferation of the cells in 24 and 48 hours. Fluvastatin appeared to induce a more evident proliferation inhibition. After tumor cells were treated with 10, 20 and 80 μ M concentrations for 24 hours, increase in apoptosis of MCF-7 cells were detected by concentration-dependent manner in TUNEL stainings of cells. When tumor cells were treated with 80 μ M statin for 48 hours, necrotic morphologic changes were more prominent. By 24 and 48 hours after Atorvastatin 10 μ M, 20 μ M and 80 μ M treatment, in MCF-7 cells apoptosis was detected by caspase 3 and autophagy was observed by beclin-1 and LC3 immunofluorescence staining. We further confirmed this observations with electron microscopic analysis, which showed apoptotic, autophagic and necrotic morphological changes in MCF-7 cells.

Finally, our results present the first demonstration of autophagy of MCF-7 cells induced by statins. Thus our study establish a novel mechanism for apoptotic and antiproliferative effects of statins on breast cancer cells. To determine the exact relationship between apoptosis and autophagy induced by statins, further studies should be conducted by using autophagy inhibitors. In this work, showing the autophagic effects of statins on breast cancer cells, will provide the scientific foundation for subsequent research of new treatment modalities of breast cancer.

Keywords: Statin, Cell Proliferation, Autophagy, Apoptosis, Breast Cancer

Supported by Hacettepe University Histology-Embryology Department

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. MEME EMBRİYOLOJİSİ	4
2.2. MEME HİSTOLOJİSİ	5
2.3. MEME KANSERİ	6
2.3.1. Meme Kanseri Etiyopatogenez	7
2.3.2. Meme Kanserinde Hücrel Değişim	8
2.3.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri	9
2.3.4. Meme Kanseri Sınıflandırılması	9
2.3.5. Meme Kanserinde Tedavi Yaklaşımları	9
2.4. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI	11
2.4.1. Apoptoz	11
2.4.1.a. Apoptozda Hücrede Gözlenen Değişiklikler:	13
2.4.1.b. Apoptoz Mekanizmaları	14
2.4.1.c. Apoptozda Rol Oynayan Moleküller	16
2.4.2. Nekroz	18
2.4.3. Otofaji	18
2.4.3.a. Otofaji Kontrol Mekanizmaları	23
2.4.3.b. Otofaji ve Hücre Ölümü İlişkisi	25
2.4.3.c. Otofaji ve Apoptoz İlişkisi	25

2.4.3.d. Otofaji ve Apoptoz Arasındaki Moleküler Bağlantılar	27
2.4.3.e. Otofaji ve Kanser	29
2.4.3.f. Otofaji ve Meme Kanseri	31
2.5. STATİNLER	34
2.5.1. Statin ve Kanser	35
2.5.2. Statin ve Meme Kanseri	35
2.5.3. Statin ve Otofaji	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. GEREÇLER	37
3.1.1. Hücre Hattı ve Hücre Kültürü	39
3.1.1.a. Hücrelerin çözülmesi	39
3.1.1.b. Hücrelerin çoğaltılması ve idamesi	39
3.1.2. İlaçların Eldesi ve Hazırlanması	40
3.1.2.a. Kullanılan dilusyonların hazırlanması	40
3.2. YÖNTEMLER	40
3.2.1. Hücre canlılığı ve sitotoksikite testi	40
3.2.2. Apoptoz için terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) metodu	41
3.2.3. ELISA	42
3.2.4. Immunohistokimyasal inceleme	42
3.2.5. Elektron mikroskop incelemesi	43
4. BULGULAR	44
4.1. MCF-7 hücrelerinin faz kontrast mikroskobu inceleme bulguları	44
4.2. Statinlerin MCF-7 hücrelerinde doz ve zamana bağlı sitotoksik etkilerinin WST testi ile değerlendirme bulguları	47
4.3. Statin grubu ilaçların MCF-7 hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin değerlendirilme bulguları	61
4.3.1. TUNEL yöntemi ile elde edilen bulgular	61
4.3.1.a. Apoptotik hücre indeksi bulguları	83
4.3.2. Atorvastatinin MCF-7 hücrelerindeki apoptotik etkisinin kaspaz 3 immunreaktivite bulguları	88

4.4. Statin grubu ilaçların MCF-7 hücreleri üzerine otofajik etkilerinin değerlendirilme bulguları	92
4.4.1. Atorvastatinin MCF-7 hücrelerindeki otofajik etkisinin beklin-1 immunreaktivite bulguları	92
4.4.2. Atorvastatinin MCF-7 hücrelerindeki otofajik etkisinin LC3 immunreaktivite bulguları	97
4.4.3. Atorvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki otofajik etkisinin sito ELİSA yöntemi ile LC3 Bulguları	102
4.5. Atorvastatinin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksik etkisinin ışık ve elektron mikroskopik inceleme bulguları	104
4.5.1. Atorvastatinin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksik etkisinin ışık mikroskobu inceleme bulguları	104
4.5.1.a. Nekrotik hücre indeksi bulguları	108
4.5.2. Atorvastatinin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksik etkisinin elektron mikroskobu inceleme bulguları	109
5. TARTIŞMA	126
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	136
7. KAYNAKLAR	138

SİMGELER ve KISALTMALAR

2-DG	: 2-deoksi-D-glukoz
3-MA	: 3-metil adenin
5-FU	: 5-Florourasil
AEBS	: Antiestrogen-binding site
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive edici Faktör
APO3L	: Apoptosis Antigen-3 Ligand
Atg	: Autophagy
BECN	: Beklin
DAPK	: Death Associated Protein Kinase
DRAM	: Damage-Regulated Autophagy Modulator
ER	: Endoplazma Retikulumu
FE	: Fosfotidiletanolamin
HMG-KoA	: Hidroksi Metil Glutaril Koenzim A
IAP	: Inhibitor of Apoptosis
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LAMP-2	: Lysosomal-associated membrane protein 2
MAP-LC3	: Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
NCCD	: Nomenclature Committee on Cell Death
PARP	: Poli ADP Riboz Polimeraz
PAS	: Preautophagosomal structure
PI3F	: phosphoinositol 3 fosfat
PI3K	: Sınıf I fosfotidilinositol 3-kinaz
PKB	: Protein kinaz B
PTEN	: Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten
PUMA	: p53 upregulated modulator of apoptosis
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TRAIL	: (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) –R1
TSC	: Tuberous sclerosis complex

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1:** Apoptotik, Nekrotik ve Otofajik hücrelerde gözlenen yapısal değişiklikler
‘Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. 2009. Cell Death, N Engl J Med. 361:1570-1583’ alınmıştır(31).
- Şekil 2:** Apoptoz Mekanizmaları ‘Gupta *et al.* *Immunity & Ageing* 2006 3:5 doi:10.1186/1742-4933-3-5’ alınmıştır(32).
- Şekil 3:** Otofaji Çeşitleri. ‘Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature. 451:1069-1075’ alınmıştır(46).
- Şekil 4:** Otofagozom oluşumu ve görevli otofaji ilişkili proteinler
‘<http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Autophagy.html>’ alınmıştır.
- Şekil 5:** Apoptoz ve Otofaji arasındaki moleküler bağlantılar. Fimia GM, Piacentini M. 2010. ‘Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. Cell. Mol. Life Sci. 67:1581–1588.’ alınmıştır(53).

GRAFİKLER DİZİNİ

- Grafik 1:** WST-1 testi ile atorvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 saat sitotoksitesi.
- Grafik 2 :** WST-1 testi ile atorvastatinin farklı konsantrasyonlarının 24 saat uygulanması sonrasında MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri. (Yüzde değerleri tedavi uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla elde edilmiştir.)
- Grafik 3 :** WST-1 testi ile atorvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki 48 saat sitotoksitesi.
- Grafik 4:** MCF-7 hücrelerinin atorvastatinin farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmesi sonrasındaki canlılık yüzdeleri.
- Grafik 5:** WST-1 testi ile atorvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki zamana bağlı sitotoksitesi.
- Grafik 6:** WST-1 testi ile MCF-7 hücrelerinde PBS’de çözünerek hazırlanan farklı fluvastatin konsantrasyonlarının 24 saat sitotoksitesi.
- Grafik 7:** WST-1 testi ile MCF-7 hücrelerinde fluvastatinin DMSO’da çözünerek hazırlanan farklı konsantrasyonlarının 24 saat sitotoksitesi.
- Grafik 8:** MCF-7 hücrelerinin fluvastatinin farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonrasındaki canlılık yüzdeleri.
- Grafik 9:** WST-1 testi ile MCF-7 hücrelerinde fluvastatinin DMSO’da çözünerek hazırlanan farklı konsantrasyonlarının 48 saat sitotoksitesi.
- Grafik 10:** MCF-7 hücrelerinin DMSO’da çözünerek hazırlanan farklı fluvastatin konsantrasyonları ile 48 saat muamele sonrasındaki hücre canlılığı.
- Grafik 11:** WST-1 testi ile fluvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki zamana bağlı sitotoksitesi.
- Grafik 12:** WST-1 testi ile simvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 saat sitotoksitesi.
- Grafik 13:** MCF-7 hücrelerinin 24 saat farklı konsantrasyonlarda simvastatin ile muamele sonrasındaki canlılık yüzdeleri.
- Grafik 14:** WST-1 testi ile simvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki 48 saat sitotoksitesi.

- Grafik 15:** MCF-7 hücrelerinin 48 saat farklı konsantrasyonlarda simvastatin ile muamele sonrası canlılık yüzdeleri.
- Grafik 16:** WST-1 testi ile simvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki zamana bağlı sitotoksitesi.
- Grafik 17:** WST-1 testi ile atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 saat sitotoksiteleri.
- Grafik 18:** WST-1 testi ile atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin ortak konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 saat sitotoksiteleri.
- Grafik 19:** WST-1 testi ile atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki 48 saat sitotoksiteleri.
- Grafik 20:** WST-1 testi ile atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin ortak konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki 48 saat sitotoksiteleri.
- Grafik 21:** Atorvastatinin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde zamana bağlı apoptotik etkisi.
- Grafik 22:** Fluvastatinin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde zamana bağlı apoptotik etkisi.
- Grafik 23:** Simvastatin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde zamana bağlı apoptotik etkisi.
- Grafik 24:** Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin 24 saat 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M doz uygulamalarının MCF-7 hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin karşılaştırılması.
- Grafik 25:** Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin 48 saat 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M doz uygulamalarının MCF-7 hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin karşılaştırılması.
- Grafik 26:** Atorvastatinin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde zamana bağlı nekrotik etkisi.
- Grafik 27:** MCF-7 hücrelerinde atorvastatinin farklı doz uygulamalarının LC3 sito ELISA sonuçları.

RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1:** Faz kontrast mikroskopta pasajlandıktan sonra tutunup çoğalmaya başlayan 3.gündeki MCF-7 hücreleri (x40).
- Resim 2:** Faz kontrast mikroskopta 5.günde %70 devamlılık kazanarak farklı hücre siklusundaki değişik büyüklükte izlenen MCF-7 hücreleri (x40).
- Resim 3:** Faz kontrast mikroskopta 7.günde %100 devamlılık kazanarak kültür kabının tabanını tamamen kaplayan, bazısı tutunan bazısı ise yuvarlak biçimli tutunma özelliğini yitirmekte olan MCF-7 hücreleri (x40).
- Resim 4:** Faz kontrast mikroskopta 24 saat ilaca maruz bırakıldıktan sonra mitotik aktivite gösteren (ok), yuvarlak biçimli tutunmayan muhtemelen apoptotik (çift ok) ve sitoplazmasında koyu granüler yapılanma gösteren otofajik olabileceği düşünülen MCF-7 hücreleri (x40).
- Resim 5:** Faz kontrast mikroskopta 48 saat ilaca maruz bırakılan dejeneratif değişiklikler gösteren MCF-7 hücreleri (x40).
- Resim 6:** Faz kontrast mikroskopta 48 saat 80µM konsantrasyonda ilaca maruz bırakılan dejeneratif değişiklikler gösteren ve çoğu kaybedildiği için kültür kabında sayıca azalmış MCF-7 hücreleri (x40).
- Resim 7:** TUNEL yönteminin negatif kontrol grubunda MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).
- Resim 8:** Negatif kontrol grubunda TUNEL pozitif apoptotik hücreler izlenmemektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, x400).
- Resim 9:** 24 saat kontrol grubundaki MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).
- Resim 10:** 24 saat kontrol grubunda az sayıda TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).
- Resim 11:** 10µM atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).
- Resim 12:** 10µM atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).

- Resim 13:** 20 μ M atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha az sayıda MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).
- Resim 14:** 20 μ M atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha çok sayıda TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).
- Resim 15:** 80 μ M atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).
- Resim 16:** 80 μ M atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).
- Resim 17:** 10 μ M simvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).
- Resim 18:** 10 μ M simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).
- Resim 19:** 20 μ M simvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha az sayıda MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).
- Resim 20:** 20 μ M simvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).
- Resim 21:** 80 μ M simvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).
- Resim 22:** 80 μ M simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).
- Resim 23:** 10 μ M fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).

Resim 24: 10µM fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x200, X400).

Resim 25: 20µM fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x100).

Resim 26: 20µM fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x200, X400).

Resim 27: 80µM fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x100).

Resim 28: 80µM fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x200, X400).

Resim 29: 48 saat kontrol grubundaki MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x100).

Resim 30: 48 saat kontrol grubunda az sayıda TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x200, x400).

Resim 31: 10µM atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x100).

Resim 32: 10µM atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x200, X400).

Resim 33: 20µM atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha az sayıda MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x100).

Resim 34: 20µM atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha çok sayıda TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x200, X400).

Resim 35: 80µM atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x100).

- Resim 36:** 80µM atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta az sayıda TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x200, x400).
- Resim 37:** 10µM fluvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x100).
- Resim 38:** 10µM fluvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x200, X400).
- Resim 39:** 20µM fluvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha az sayıda MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x100).
- Resim 40:** 20µM simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha çok sayıda TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x200, X400).
- Resim 41:** 80µM fluvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x100).
- Resim 42:** 80µM fluvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta az sayıda TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x200, X400).
- Resim 43:** 10µM simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı.(TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x100)
- Resim 44:** 10µM simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x100).
- Resim 45:** 20µM simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha az sayıda MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x100).
- Resim 46:** 20µM simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x200, X400).

Resim 47: 80µM simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).

Resim 48: 80µM simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta az sayıda TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, x400).

Resim 49: İmmunofloresan boyama yöntemi için yapılan kontrol boyamada MCF-7 hücrelerinde negatif kaspaz 3 immunreaktivitesi izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

Resim 50: Kontrol grubundan hazırlanan immunofloresan boyamada MCF-7 hücrelerinin kaspaz 3 immunreaktivitesi izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

Resim 51: 10µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta bazı MCF-7 hücrelerinin sitoplazmasında kaspaz 3 immunreaktivitesi izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

Resim 52: 20µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen gruptaki daha az sayıda ve mavi çekirdekleri ile gözlenmekte olan MCF-7 hücrelerinin bazılarında sitoplazmada yaygın kaspaz 3 immunreaktivitesi izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

Resim 53: 80µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen gruptaki MCF-7 hücrelerinin bir kısmının sitoplazmasında kuvvetli kaspaz 3 ekspresyonu (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

Resim 54: 10µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta, DAPI ile çekirdekleri mavi gözlenen MCF-7 hücrelerinin zayıf kaspaz 3 immunreaktivitesi gösterdiği (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

Resim 55: 20µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin daha yaygın kaspaz 3 immunreaktivitesi gösterdiği (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

Resim 56: 20µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptaki MCF-7 hücresinde tüm çekirdek çevresinde kuvvetli kaspaz 3 immunreaktivitesi (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

- Resim 57:** 20 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücreleri izlenmektedir. Bir çok hücrede sitoplazmada yaygın kaspaz 3 immunreaktivitesi (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).
- Resim 58:** 20 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta az sayıda DAPI ile çekirdekleri boyanmış MCF-7 hücreleri izlenmektedir. Sol üst köşedeki MCF-7 hücrelerinde sitoplazmik birkaç bölgenin kuvvetli kaspaz 3 immunreaktivitesi (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).
- Resim 59:** Kontrol grubundan hazırlanan MCF-7 hücrelerinde sitoplazmik beclin1 immunoreaktivitesinin (ok) zayıf ve az sayıda olduğu izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).
- Resim 60:** 10 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta DAPI ile çekirdekleri mavi gözlenen MCF-7 hücrelerinin kontrol grubuna kıyasla daha güçlü, spesifik ve granüler beclin-1 immunreaktivitesi gösterdiği (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).
- Resim 61:** 20 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta daha az sayıda MCF-7 hücreleri görülmektedir. Beclin1 immunofloresan işaretlemesinin sitoplazmada yaygın ve spesifik granüler olduğu (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).
- Resim 62:** 80 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta az sayıda MCF-7 hücresi izlenmektedir. Bazı hücre gruplarında (A) sitoplazmada beclin 1 ekspresyonu granüler ve çok kuvvetli olarak izlenirken (ok) bazı hücre gruplarında (B) ise oldukça zayıf immunreaktivite (çift ok) görülmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).
- Resim 63:** 48 saat kontrol grubunda DAPI ile çekirdekleri mavi gözlenen MCF-7 hücrelerinin bir kısmı beclin 1 ekspresyonunu göstermektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).
- Resim 64:** 10 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptaki MCF-7 hücrelerinin birçoğunun DAPI ile mavi gözlenen çekirdeklerinin etrafında güçlü granüler beclin-1 immunreaktivitesi gösterdiği (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

- Resim 65:** 20µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptaki MCF-7 hücrelerinin birçoğunda sitoplazmada yaygın güçlü, granüler beclin-1 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).
- Resim 66:** 80µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptaki MCF-7 hücrelerinin bir çoğunda sitoplazmada yaygın ancak önceki gruplara göre daha zayıf beclin-1 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).
- Resim 67:** Kontrol grubundan hazırlanan immunfloresan boyamada az sayıda MCF-7 hücresinde zayıf LC3 immunreaktivitesi izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).
- Resim 68:** 10µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin birçoğunda LC3 immunreaktivesi izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).
- Resim 69:** 10µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin birçoğunda sitoplazmada yaygın kuvvetli, otofajiye spesifik granüler LC3 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).
- Resim 70:** 20µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta, önceki gruplara göre daha çok sayıda MCF-7 hücresinde LC3 immunreaktivesi izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).
- Resim 71:** 20µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen hücrelerde belirgin kuvvetli sitoplazmik LC3 immunreaktivitesi izlenmektedir.(B): Mikrografın orta kısmında sitoplazmada yaygın kuvvetli granüler LC3 ekspresyonu görülmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).
- Resim 72:** 80µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta önceki gruplara göre daha az sayıda olan MCF-7 hücrelerinde LC3 immunreaktivitesi yaygın olarak izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).
- Resim 73:** 48 saat kontrol grubunun MCF-7 hücrelerinde LC3 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).
- Resim 74:** 10µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin birçoğunda sitoplazmada yaygın kuvvetli granüler LC3 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).

Resim 75: 20µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinde LC3 immunreaktivesi izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).

Resim 76: 20µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta farklı büyüklükte çekirdekleri ile gözlenen MCF-7 hücrelerinin birçoğunda sitoplazmada yaygın kuvvetli granüler LC3 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).

Resim 77: 80µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptaki MCF-7 hücrelerinde önceki gruplara kıyasla daha az sayıda hücrede LC3 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).

Resim 78: 80µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinde kuvvetli granüler LC3 immunreaktivitesi (ok) izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).

Resim 79: 24 saat kontrol grubundan hazırlanan yarı ince kesitte MCF-7 hücreleri çeşitli büyüklüklerde izlenmektedir. Hücreler belirgin çekirdek ve çekirdekcikleri ile izlenmektedir. Bazı hücrelerin mitoz sürecinde oldukları görülmektedir(ok). Az sayıda hücrede ise dejeneratif değişiklik gözlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).

Resim 80: 10µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grubun ışık mikroskopisinde mitoz gösteren hücrelerin yanı sıra, farklı dejeneratif değişiklikler gösteren; sitoplazması kondens apoptotik hücreler (siyah ok), sitoplazmada vakuoller içeren muhtemelen otofajik değişiklik gösteren hücreler (kırmızı ok) ve ileri dejeneratif görünümleri ile belirgin kromotolizis gösteren çekirdekleri olan nekrotik hücreler (yeşil ok) izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).

Resim 81: 20µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilmiş grubun hücrelerine ait ışık mikroskopisinde önceki gruplara oranla daha fazla sayıda apoptotik hücre ve sitoplazması heterojen görünümlü içeriğe sahip iri otofajik hücreler izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).

Resim 82: 80µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta kromotolizis gösteren, hücre membran bütünlüğü bozulmuş nekrotik hücreler izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).

Resim 83: 10µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grubun ışık mikroskopisinde mitoz gösteren hücrelerin yanı sıra, farklı dejeneratif değişiklikler gösteren; sitoplazması yoğun apoptotik hücreler (siyah ok), sitoplazmada vakuoller içeren muhtemelen otofajik değişiklik gösteren hücreler (kırmızı ok) ve ileri dejeneratif görünümü ile belirgin kromotolizis gösteren çekirdekleri olan nekrotik hücreler (yeşil ok) izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).

Resim 84: 20µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilmiş grubun hücrelerine ait ışık mikroskopisinde daha fazla sayıda apoptotik hücreler ve sitoplazmaları heterojen görünümlü içeriğe sahip iri otofajik hücreler izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).

Resim 85: 80µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptaki hücrelerin çoğunluğunda kromotolizis gösteren hücre membran bütünlüğü bozulmuş çok sayıda nekrotik hücre izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).

Resim 86: Kontrol grubu MCF-7 hücreleri ince sitoplazmik uzantıları ve sitoplazmalarının büyük bir kısmını kaplayan iri çekirdekleri ile izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X6000).

Resim 87: Kontrol grubu MCF-7 hücresi geniş yer kaplayan çift çekirdekci ve iri mitokondriyonları ile izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X15 000).

Resim 88: Kontrol grubu MCF-7 hücresinin daha büyük büyütmesinde düzensiz sınırlı çekirdek, çekirdekci ile sitoplazmasında iri mitokondriyonlar ve lizozomlar izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X12000, X20 000).

Resim 89: Kontrol grubu MCF-7 hücrelerinde organelden fakir sitoplazma içerisinde çekirdeğe yakın yerleşimli iri mitokondriyonlar, serbest ribozomlar ve periferik glikojen tanecikleri izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X15000).

Resim 90: Kontrol grubu MCF-7 hücresi belirgin kristalleri, iri mitokondriyonları ve yakınında lizozomlar ile izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X15000, x20000).

Resim 91:Kontrol grubu MCF-7 hücresinde lizozomların yakınındaki mitokondriyonların çevresini sarar görünümdeki ER'nin izolasyon membranı oluşturmak üzere düzenlendiğini düşündüren yapılanmalar (ok) izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, x20000).

Resim 92: Atorvastatin 10 μ M konsantrasyonuna 24 saat maruz kalan MCF-7 hücreleri. Sol üst köşedeki MCF-7 hücresinin belirgin çekirdekçiği izlenmektedir. Hücre sitoplazmalarının organelden fakir olduğu görülmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat,x6000).

Resim 93: Atorvastatin 10 μ M konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen apoptotik MCF-7 hücresinde sitoplazmik uzantıların tamamen yok olduğu, yuvarlak biçim alan hücrede sitoplazmik yoğunlaşmanın ve irregüler elektron yoğunluğu göstermeyen keseciklerin bulunduğu ancak çekirdek yapılanmasında belirgin değişiklik bulunmadığı görülmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000).

Resim 94: Atorvastatin 10 μ M konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücresi. Sitoplazmik yoğunlaşması belirgin, mitokondriyonlarının bir kısmında kristalizis ve sitoplazmasında az sayıda lipid damlalarına rastlanan hücrede, hücre membranına yakın komşulukta kesecikler izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X12000, 20 000).

Resim 95:Atorvastatin 20 μ M konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde ileri dejeneratif değişiklikler gözlenmektedir. Ortada membran bütünlüğü bozulmuş, sitolizis başlangıcı gösteren nekrotik hücrede çekirdekte belirgin kromotolizis izlenmektedir. Hemen yanındaki apoptotik hücrenin yoğun sitoplazması dikkat çekmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 6000).

Resim 96: Atorvastatin 20 μ M konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücreleri. Çift çekirdekçikli hücreye yakın temasta, çekirdek kromatin yapılanmaları bozulmuş dejenerasyon gösteren hücreler izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 6 000).

Resim 97: Atorvastatin 20 μ M dozu ile 24 saat muamele edilen hücrenin çekirdekçikleri ve ince kromatin ile sınırlı çekirdeği görülmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 12 000).

Resim 98: Atorvastatin 20 μ M dozu ile 24 saat muamele edilen hücrenin sitoplazmasında iri otofajik vakuoller ve hücre membran uzantıları izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 15 000).

Resim 99: Atorvastatin 20 μ M konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan MCF-7 hücresi. Sitoplazmada çok sayıda serbest ribozomlar, yağ damlacıkları ve mitokondriyonlar izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 20 000).

Resim 100: Atorvastatin 80 μ M konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan gruptaki farklı dejeneratif değişiklikler gösteren MCF-7 hücreleri. Daha büyük büyütmede kromotolizis yanı sıra ileri dejenere çekirdekcik içeren hücre ve hemen üzerinde kromatini perifere yığılmış, sitoplazması yoğunlaşma ve balonlaşma gösteren apoptotik hücre izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 2500, x6000).

Resim 101: Atorvastatin 80 μ M konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan ileri dejenerasyon gösteren MCF-7 hücreleri. MCF-7 hücresinin sitoplazmasında fagosit edilmiş bir başka dejeneratif hücre izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 2500,x15000).

Resim 102: Atorvastatin 80 μ M konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan MCF-7 hücresi. MCF-7 hücresinin sitoplazmasında Golgi birleşigi, yağ damlacıkları ve serbest ribozomlar, çeşitli büyüklüklerde otofajik vakuoller ve yakın komşuluğunda düzensiz membran yapıları izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 15000, x20000).

Resim 103: Atorvastatin 80 μ M konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücresi. MCF-7 hücresinin sitoplazmasında çeşitli büyüklüklerde lizozomlar, otofajik vakuoller, yağ damlacıkları ve periferik sitoplazmada glikojen tanecikleri gözlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 12000, x15000).

Resim 104: Atorvastatin 80 μ M konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan MCF-7 hücresi. MCF-7 hücresinin sitoplazmasında çift membran ile sarılı otofajik vakuoller, çekirdek zarının ve deliklerinin hemen yakınında izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X60000).

Resim 105: 48 saatlik kontrol grubundan alınan elektronmikrografta; MCF-7 hücreleri girintili çekirdekleri ve sağ mikrografta çift çekirdekci ve ince kromatin dağılımları ile izlenmektedir. Sitoplazmada iri mitokondriyonlar, GER, Golgi kompleksi ve yaygın glikojen izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X15 000, X15 000).

Resim 106: 10µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücreleri. İnce sitoplazmik çıkıntıları ile belirgin, geniş sitoplazmalı MCF-7 hücresi izlenmektedir. Enine kesitleri ile belirgin kristalleri izlenen iri mitokondriyonlar sitoplazmada yaygın olarak görülmektedir. Çekirdeğe yakın yerleşimli GER sisternaları dikkati çekmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000).

Resim 107: 10µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücreleri. Hücre dejenerasyonunun farklı düzeylerde gözleendiği elektronmikrografta bir önceki resimde gözlenen hücre sağ alt köşede yer almaktadır. Bu hücrenin hemen üstünde mitokondriyonlar, GER, mitokondriyonlara yakın yerleşimli lizozomlar izlenmektedir. Resmin sol üst köşesinde sitoplazmik yoğunlaşma, bleb oluşumu ve kristalizis oluştuğu gözlenen mitokondriyonların bulunduğu apoptotik hücre görünmektedir. Sol alt köşede ise sitoplazma bütünlüğünün bozulduğu sitolizis görünümüne sahip nekrotik bir hücre izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000).

Resim 108: Bir önceki resimde otofajik vakuoller içeren hücrenin daha büyük büyütmesinde hücre iskeletine ait mikrofilamanlar sitoplazmada yaygın olarak izlenmektedir. Mitokondriyonlar, yakın komşuluğundaki lizozomlar ve otofajik kesecikler olarak değerlendirilen heterojen elektron dens görünümlü vakuoller izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X15 000).

Resim 109: 20 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin elektronmikrografında (A) sitoplazmalarında mitokondriyal genişleme ve otofajik vakuollerin belirgin olduğu çift ya da tek çekirdekçikleri olan hücreler izlenmektedir. (B) Birbirleriyle yakın komşulukta bulunan oldukça iri otofajik vakuoller içeren hücreler görülmektedir (C) Çift membran ile sarılı çekirdeğin etrafında mitokondriyon, GER ve otofajik vakuoller daha büyük büyütme ile izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X4000, X4000, X12 000).

Resim 110: 20 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin elektronmikrografında apoptotik ve otofajik değişimlerin gözlendiği hücreler birarada izlenmektedir. Solda çekirdekte kromatin lobulasyonu gösteren, sitoplazması yoğun sitoplazmik uzantılarını kaybetmiş yuvarlak apoptotik hücre izlenmektedir. Sağda sitoplazmada yaygın otofajik vakuoller içeren hücre görünümü izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000).

Resim 111: 20 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin elektronmikrografında sol üst bölgede organel dağılımı bozulmuş, sitoplazmanın periferinde irregüler elektron yoğunluğu göstermeyen membran ile çevrili yapılar ile nekroza gidiş olabileceğini düşündüren ileri hasarlı hücre gözlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X4000, X8000).

Resim 112: 80 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptan alınan ince kesitte yaygın nekrotik hücre grupları izlenmektedir. Membran bütünlüğü bozulmuş sitolizisin büyük oranda gerçekleştiği hücrelerde kromatolizis görünümü de belirgindir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X2500, X4000).

Resim 113: 80µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptan alınan elektronmikrografta apoptotik görünümlü hücre ve hemen yanında apoptotik hücre fagositozunu gerçekleştirmiş izlenimi veren bir başka hücre izlenmektedir. Her iki tarafta ise sitoplazmada belirgin sıvı birikimini gösteren muhtemelen membran bütünlüğü bozulmaya başlamış iki hücre izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000, 15 000).

Resim 114: 80µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta otofaji ve apoptozisin tipik morfolojik özelliklerinin gösteren MCF-7 hücresinde otofajik vakuoller, sitoplazmik kondensasyon, nuklear fragmantasyon ve hücre membranında bleb oluşumu dikkati çekmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000, X15 000).

1.GİRİŞ

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser olmasının yanı sıra, kanserden ölüm nedenleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (1-3). Meme kanserinin insidansı ve mortalite verileri ülkelere göre değişiklik göstermekle birlikte, dünya genelinde meme kanseri insidansında artış, mortalitesinde ise azalma izlenmektedir (3). Günümüzde mikro metastazlarla ilerlediği bilinen meme kanseri tedavisinde, sistemik adjuvan tedavi uygulanımı yaygındır. Kemoterapötik ilaçlar (taksanlar, antrasiklinler), antihormonal tedavi ve hedef molekül tedavileri (trastuzumab) ile birçok hastada başarılı sonuçlar elde edilse de, bu ilaçlarla etkin sonuçlar alınamayan hasta grupları da bulunmaktadır (4). Bu nedenle meme kanserinde moleküler ve genetik mekanizmalar üstünde sık durulan, önemli araştırma konularından biridir. Son yıllarda hücre proliferasyonu veya ölümünde görevli molekülleri hedef alan spesifik tedavilerin geliştirilmesi üzerine bir çok çalışma yürütülmektedir.

Statinler, hidroksi-metil glutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz enzim inhibisyonu ile kolesterol sentezini spesifik olarak bloke eden farmakolojik ajanlardır. Statinlerin hipolipidemik ve vasküler etkilerinin dışında; inme, osteoporoz, diyabet, Alzheimer ve kanser gibi birçok klinik durumun tedavisinde olumlu etkileri gösterilmiştir (5-8). Son çalışmalarda kanser tedavisinde umut vadeden ilaçlar olarak gösterilen statinlerin meme kanseri gelişimi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yürütülen klinik çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Statin kullanımının meme kanseri oluşum riskini azalttığını gösteren çalışmaların(9) yanı sıra, meme kanser riskini arttırdığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (10). Birçok çalışmada statinlerin in vitro ortamda, meme kanseri hücre dizilerinde sitotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ancak statinlerin meme kanser hücrelerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Son yıllarda bu mekanizmaları açıklamaya yönelik birçok çalışma yürütülmektedir. Yapılan çalışmalarda statinlerin meme kanser hücrelerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin mekanizması; mevalonat yolağında yol açtıkları inhibisyon ile Rho ve Ras GTPazları modifiye eden geranil ve farnesil

pirofosfatazların üretimini engellemelerinin yanı sıra (11,12); reaktif oksijen radikallerinde artışa yol açarak, oksidatif stres mekanizmalarını aktive etmeleri ve iNOS-NO aktivitesi üzerine olan etkileri ile açıklanmaya çalışılmıştır (13).

Programlı hücre ölümü apoptoz ve otofaji olmak üzere iki çeşittir. Günümüzde önemli çalışma konularından biri olan otofaji, hücrenin stres altında iken hasarlı organellerini ve makromoleküllerini yıkması olarak tanımlanmaktadır. Otofaji bozukluklarının kanser, enfeksiyon hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalıkla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Otofaji ile karsinogenez arasında karmaşık bir ilişki bulunmaktadır. Otofajinin tümör hücrelerini ölümden koruyan bir mekanizma olduğunu gösteren çalışmalara karşın, hücre ölümüne yol açarak kanser oluşumunu engellediğini savunan birçok çalışma ve görüş de yer almaktadır (14).

Sınıf I fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ protein kinaz B (Akt/PKB) yolağı; hücre proliferasyonunu sağlayan, aynı zamanda hücrelerde otofaji kontrolünde önemli olan ve otofajiyi baskıladığı bilinen bir yolaktır. PTEN, (PI3K)/ Akt/ mTOR sinyal yolağını inhibe eden tümör baskılayıcı gendir. PTEN hücreleri otofajiye götürmektedir. Statinlerin meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin PI3K yolağında inhibisyon üzerinden olabileceği hipoteziyle, MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattı üzerinde simvastatinin Akt fosforilasyonu azalttığı ve PTEN ekspresyonunda artışa yol açtığı gösterilmiştir (15). Aynı zamanda prostat kanseri ve rhabdomyosarkom hücre hatlarında, statinlerin otofajik mekanizmalar üzerinden hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir. Statinlerin (PI3K)/ Akt/ mTOR) yolağı ile ilişkisinin gösterilmesi ve otofaji regülasyonunda (PI3K)/ Akt/ mTOR sinyal yolağının önemini gösteren çalışmalar (16), statinlerin meme kanseri hücrelerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkisinin otofaji indüksiyonu ile olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer hücre hatları üzerinde otofajik etkileri gösterilmiş olan statinlerin, meme kanseri hücrelerinde otofaji etkisine ilişkin literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, in vitro ortamda statinlerin meme kanser hücrelerinde otofaji mekanizmaları üzerine olan etkisinin araştırılmasıdır. Çalışmada ayrıca statinlerin meme kanser hücreleri üzerindeki sitotoksitesi; apoptoz ve otofaji açısından incelenerek, apoptoz ve otofaji arasındaki karmaşık ilişkinin açıklanması amaçlanmıştır. İnsan meme adenokarsinom (MCF-7) hücre dizisinde, statin grubu

ilaçlardan atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin meme kanser hücrelerindeki programlı hücre ölüm mekanizmaları (apoptoz ve otofaji) ve hücre proliferasyonu üzerine olan etkileri immunohistokimya, ELISA ve elektron mikroskopik görüntüleme yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

Meme bezi, pektoralis major kasının yüzeyel ve derin fasiyaları arasında 2. ve 6. interkostal aralıklar üzerinde, sternumun lateral kenarıyla, ön aksiller çizgi arasında uzanan modifiye ter bezidir. Meme derisinden derin fasiyaya doğru uzanan ve memeyi yerine tespit etmeye yarayan ligamentlere Cooper ligamentleri denir. Bu ligamentler kanserin yayılmasında ve ilk belirtilerini ortaya koymada önem taşımaktadır (17).

2.1. MEME EMBRİYOLOJİSİ

Meme dokusu, ilk olarak 4. haftadan itibaren embriyonun alt ve üst ekstremite tomurcukları arasında her iki yanda aksilladan kısığa kadar uzanan meme kristaları olarak adlandırılan ektodermal kalınlaşmanın ortaya çıkmasıyla gelişmeye başlar. Meme kristaları yalnızca memelerin geliştiği pektoral bölgede kalıcı olurken diğer bölümlerde dejenerasyona uğrar. 6. haftada pektoral bölgedeki kalınlaşmış epidermisin alt mezenşime solid kordonlar olarak ilerlemesiyle meme tomurcukları oluşur. Meme tomurcuklarının oluşumunda mezenşim ve ektodermal dokunun karşılıklı indüktif etkisi önemlidir. Primer meme tomurcukları süt kanalları ve dallarını veren birçok sekonder tomurcuğa dallanır. Üçüncü trimester döneminde fetal dolaşıma giren maternal seks hormonları etkisinde memedeki epitel dallanmalarının (tomurcukların) ortasındaki hücrelerde meydana gelen apoptozis sonrası tomurcukların kanalizasyonunu gerçekleştirir. Böylece doğumda sayıları 15-20'yi bulan meme kanalları gelişmiş olur. Memenin fibröz bağ ve yağ dokusu çevre mezenşimden gelişir. 32-40. haftalarda lobüloalveolar yapıdaki meme dokusunda, meme bezinin gelişim merkezindeki epidermisin içe göçmesiyle meme çukuru oluşur. Yenidoğanda tam olarak gelişmemiş olan meme ucu doğumdan sonra areola çevresindeki bağ dokusundaki çoğalma ile meme çukurundan yükselir. Doğumdan kısa bir süre sonra areola hafif derecede artan pigmentasyonla etraf dokudan kolayca ayrılır. Doğumda ana süt kanalları dışındaki yapıları tamamlanmayan meme bezinin gelişimi, pubertede devam eder (18,19).

2.2. MEME HİSTOLOJİSİ

Meme her biri ayrı laktiferöz kanalları olan ve bunlarla meme ucuna açılan 15-25 lobdan oluşmuş birleşik tübüloalveolar bezdir. Her lob yüzeyel fasiyanın sıkı fibröz bağ dokusu ve bol miktarda yağ dokusu ile diğerlerinden ayrılır (20).

Her meme lobu 20-40 lobülünden oluşmuştur. Meme lobülü; bir terminal kanalın küçük bölümü ve onun tomurcuklanması ile gelişen asinüslerden oluşur. Terminal duktüler lobüler unit olarak adlandırılan bu bölüm patolojik lezyonların çoğunun geliştiği bölümdür. Meme bezinin en küçük fonksiyonel ünitesi asinüslerdir. Ancak gebelik ve laktasyon dışında asinüsler fonksiyonel değildir. Asinüsler tek sıralı kübik veya prizmatik epitel ve bazal membran ile döşelidir. Epiteliyal hücreler dışında ikinci bir hücre grubu; bazalde yerleşik olan ve bazal membranı epiteliyal hücreler ile paylaşan mioepiteliyal hücrelerdir. Spiral biçimde düzenlenmiş, alveolleri saran mioepiteliyal hücreler asinus salgılarının boşalmasını sağlayacak kasılma gücüne sahiptir (20).

Asinusların boşaltıcı kanalikülleri birleşerek lobülüslerin toplayıcı kanallarını oluştururlar. Toplayıcı kanallar, birleşip laktiferöz kanalları meydana getirirler. Laktiferöz kanallar, 1-2 mm olup, meme başına yaklaştıklarında 2-5 mm çapındaki laktiferus sinus adındaki genişlemeyi oluştururlar. Sonra ana laktiferöz kanallar meme başının deri yüzeyine açılırlar. Laktiferöz kanallar dışa açıldığı yerde çok katlı yassı epitel ile döşelidir, daha önceki bölümde ise iki katlı kübik epitel ile çevrilidir. Daha küçük süt kanallarında ise tek katlı kübik epitelium çevresinde sıkı bir şekilde paketlenmiş mioepiteliyal hücreler bulunmaktadır.

Areola çok katlı yassı epitel ile döşelidir. Bazal tabakasında melanin pigment artışı belirgindir. Laktiferöz kanallarla ilişkili kısımları sebace bez yapısında olan montgomery bezlerinden zengindir. Meme başı derisi kılsızdır, iyi gelişmiş dermal papillaları ve çok sayıda yağ bezleri vardır. Meme başının yapısında kollajen ve elastik fibrillerden zengin bağ dokusu, sirküler ve longitudinal düz kas demetleri bulunur. Düz kas demetlerinin kasılmasıyla süt sinüsleri boşalır (21).

Doğumda gelişimi tamamlanmamış olan meme bezi, puberte döneminde gelişimine devam eder. Puberte esnasında dişilerde meme büyümesi, yağ dokusu ile bağ dokusunun birikmesi, süt kanallarının gelişmesi ve dallanması sonucunda

gerçekleşir. Meme kanallarının uzamasında, duktal epitelin kalınlaşmasında, terminal kanallardan lobüler tomurcukların oluşmasında ve bağ dokusu artışında östrojen rol oynarken; lobuloasiner yapıların farkanmaları için progesteron gereklidir. Gebelik sırasında, artan östrojen, progesteron seviyeleri ile prolaktin ve plasental laktojen süt kanallarının ve salgı yapan alveollerin gelişimini uyarır. Laktasyon döneminde meme bezi gelişimini tamamlamış durumda ve fonksiyoneldir (22).

Puberte, gebelik ve laktasyon dönemi dışında da kadınlarda her menstrüal siklüsda seks hormonlarının kandaki düzey değişikliğine bağlı olarak memenin histolojik yapısında değişiklikler görülür. Östrojen seviyesindeki artış meme kan akımını ve böylece interlobüler ödem gelişim yolu ile meme hacmini artırır. Menstruasyonda hormon seviyesinin hızla düşmesiyle epitelin salgı aktivitesi ve doku ödemi geriler. Menstruasyonun 5-7. günlerinde minimum meme hacmi gözlenir (17,22).

Menapoz döneminde; meme dokusunda; östrojen düzeyindeki düşme nedeniyle artış gösteren atrofi söz konusudur.

2.3. MEME KANSERİ

Meme kanseri en sık terminal duktuler lobüler ünit olarak adlandırılan lobül ile terminal kanalın birleşme yerindeki epitelden köken alan bir adenokanserdir. Meme kanserlerinin %95'i adenokanser iken %5'lik kısmını skuamoz hücreli kanser, filloides tümörleri, sarkom ve lenfomalar oluşturur. Başlangıçta meme kanalları içinde sınırlı olan kanser hücreleri sonradan kendi bazal membranlarından ilerleyip bağ dokusu içine yayılarak kan damarları ve lenfatikler aracılığıyla metastaz yapma yeteneğine sahip olurlar. Kadınlarda en sık görülen kanser olan meme kanseri, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında %18 oranla ikinci sırada yer almaktadır. Meme kanseri yaş arttıkça daha sık görülür. 25 yaş altında çok nadir görülürken, 90 yaşında bayanlardan 8'de 1'i meme kanserine yakalanmaktadır (23). Meme kanseri görülme sıklığı ve mortalitesi yaşanan coğrafi bölgeye, etnik kökene ve sosyoekonomik duruma göre değişiklik göstermektedir. Meme kanserine ABD'de yüzbinde 80-90 oranında rastlanırken Japonya'da bu sayı yüzbinde 12-18 civarındadır (24). 2010 yılında ABD'de yaklaşık 207.090 yeni tanı alan kadın hasta olacağı ve 39.840 kadının da bu hastalığa bağlı öleceği tahmin edilmektedir (25).

Türkiye’de meme kanseri insidansı ve risk faktörlerinin belirlemeye yönelik çalışmaların sayısı çok azdır. T.C. Sağlık Bakanlığı’nın 1999 yıl verilerine göre, meme kanseri ülkemizde % 24.1 oranı ile kadınlarda görülen kanserler arasında ilk sırada yer alırken, %13.7’lik oranla kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır (1). Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi’nin Türkiye ile ilgili 2002 yılı verilerine göre de, kadınlarda kanserden ölüm sebepleri arasında meme kanseri (%16.7) ilk sırada gelmektedir (2).

2.3.1. Meme Kanseri Etiyopatogeneze

Meme kanseri gelişiminde mevcut etiyolojik faktörler genetik faktörler, hormonal etkiler ve çevresel faktörler olmak üzere 3 grupta incelenmektedir.

Meme kanserine riski arttıran BRCA-1, BRCA-2, p53, Cowden, AR ve AT geni otozomal geçişli ailesel vakalarının bir çoğundan sorumludur. Ailesel meme kanseri vakalarında bu tümör supresor genler ve DNA tamir genlerinin ekspresyonunda azalma gözlenirken c-erb-b2 onkogeninin ekspresyonunda artış tanımlanmıştır (22).

Meme kanseri oluşumundaki hormonal etkiler östrojene uzun süre maruz kalınması ile açıklanmaktadır. Tümör oluşumunun otokrin metabolizmasında önemli olan ve meme kanser hücreleri tarafından salgılanan büyüme faktörleri (EGF, FGF, PDGF)’nin oluşumu östrojene bağlıdır (22).

Meme kanseri sıklığı dünya üzerinde farklılık göstermekle birlikte, Japonya dışında gelişmiş ülkelerde insidansı oldukça yüksek görülmektedir. ABD ve diğer batı ülkelerinde meme kanseri insidansı gelişmekte olan ülkelere oranla 4-7 kat daha fazladır. Japonya’dan Hawai’ye göç eden göçmenlerle yapılan çalışmalarda, göçmenlerdeki meme kanseri insidansının bir veya iki jenerasyon sonra göç ettikleri bölgenin meme kanseri insidansına yaklaştığının gösterilmesi, meme kanserinin çevresel faktörlerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Önemli bir çevresel faktör olan radyasyon ile meme kanseri ilişkisi de 2. Dünya savaşı sonrasındaki çalışmalarda gösterilmiştir. Hiroşimada atom bombası sonrası radyasyona maruz kalan kadınlarda meme kanseri insidansında 2- 4 kat artış olduğu tespit edilmiştir (22,23).

2.3.2. Meme Kanserinde Hücresel Değişim

Meme kanserinin karsinogenez süreci, sırasıyla benin proliferatif meme lezyonları, karsinoma in situ, erken dönem meme kanseri (evre 1- 2), lokal ileri evre meme kanseri (evre 3) ve invaziv kanser evrelerinden oluşmaktadır.

Meme karsinogenezinde hücrelerde meydana gelen ilk morfolojik değişiklik epitel hücre proliferasyonunda artış yani proliferatif lezyonlardır. Bu erken değişiklik hücrelerin büyüme engelleyici sinyallerden ve apoptozdan kaçma mekanizması ile olmaktadır. Bu erken dönemde hücrelerdeki hormon reseptör ekspresyonlarında ve hormon reseptör pozitifliği ile ilişkili hücre proliferasyon kontrollerinde anormallikler gözlenmiştir.

Genetik değişkenlik, proliferatif lezyonlarda çok nadir gözlenmekle birlikte, atipik hiperplazilerde daha sıktır. Karsinoma in situ'da ise yaygın olarak görülür. Nüklear genişleme, düzensizlik, hiperkromazi ile tanımlanan anöploidi sadece ileri evre duktal karsinoma in situ ve bazı invaziv karsinomlarda gözlenir. Duktal karsinoma in situ lezyonlarındaki hücrelerin geniş gruplar oluşturarak duktal sistemi tamamen doldurması hücrelerin sınırsız bölünme potansiyeli nedeniyledir. Karsinomaların morfolojik ve biyolojik özellikleri in situ döneminde kazanılmaktadır. Vakaların çoğunda in situ lezyonlar, takip eden karsinomlarla benzer özellikler taşımaktadır (23).

Normal memenin yapısı ve fonksiyonu için meme epitel hücreleri, miyoepitelial hücreler ve stroma hücreleri arasındaki kompleks ilişkiler önemlidir. Puberte ve gebelikte yeni kanal ve lobül sistemlerin oluşması; bazal membranın kaldırılması, hücre proliferasyonunda artış, büyüme inhibisyonundan kaçış, anjiyogenez ve stroma invazyonu ile gerçekleşmektedir. Karsinogenez sürecinde de anormal epitelial ve stromal hücreler aynı değişiklikleri gerçekleştirmektedir. Epitel hücrelerine paralel olarak miyoepitelial ve stroma hücrelerinde görülen mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler, epitel hücreleri ve stromal hücreler arasındaki normal ilişkilerin ve doku yapısının bozulmasına neden olur. Mutasyonların ortaya çıkması ve normal fonksiyonların kaybı yaş ilerledikçe artmaktadır. Bu da ileri yaştaki bayanlarda meme kanseri riskindeki artışın sebebidir (23).

Karsinogenezin son aşaması, bazal membranlarla kanallarda ve lobüllerde sınırlanmış karsinoma in situ lezyonlarının invazif karsinomaya dönüş basamağıdır.

İnvazyon için gerekli özel gen ekspresyonlarının tanımlanmasının zorluğu nedeniyle bu basamak en az aydınlatılan basamaktır. Son yıllarda malign hücrelerin invazyon yeteneği kazanmasına ek olarak, miyoepitelial ve stroma hücrelerinin fonksiyon kaybının da dokunun bazal membran yapısının bozulmasının ve böylece invaziv karsinomaların oluşmasının temel nedenlerinden biri olabileceğine yönelik görüşler bulunmaktadır (23,26).

2.3.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserinde majör risk faktörleri; kadın cinsiyet, ileri yaş, aile hikayesi, önceki hikayede meme kanseri öyküsü, BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu taşıyıcılığı gibi genetik yatkınlık, göğüs bölgesine radyasyon öyküsü ve atipik hiperplazi sonuçlu biyopsi raporudur. Minör risk faktörleri ise, erken menarş, geç menopoz, obezite, alkol alımı, ilk doğumunu geç yaşta yapma, atipik hiperplazi dışında benin meme hastalıkları öyküsü ve östrojenlere uzun süre maruz kalınmasıdır (26).

2.3.4. Meme Kanseri Sınıflandırılması

Meme kanserlerinin sınıflandırılması klinik veya histopatolojik olarak yapılmaktadır. Kanser hücrelerinin lokalizasyonu ve yaygınlığına göre meme kanser tipleri isimlendirilmektedir. Genel olarak hücreler süt kanallarında lokalize ise duktal, lobüllerde lokalize ise lobüler, medullada ise medüller meme kanseri ismini alır. İn situ kanserlerde, kanser hücreleri kaynaklandıkları yerle sınırlı kalırken, invazif meme kanserlerinde yayılma eğilimi gösterirler. İnvazif duktal karsinom en fazla görülen meme kanseri tipidir (17,23).

2.3.5. Meme Kanserinde Tedavi Yaklaşımları

Günümüzde meme kanserinde tedavi yaklaşımları lokal ve sistemik kontrolü sağlamaya yöneliktir. Lokal kontrolü sağlamada cerrahi ve postoperatif radyoterapi kombinasyonu kullanılırken, sistemik tedavide kemoterapi, hormonal terapi, hedef moleküler tedavi uygulanabilmektedir. Meme kanserinde en etkin tedavi yöntemi cerrahidir. Hastalarda mastektomiye ek olarak prognostik amaçlı olarak aksiler lenf nodu diseksiyonu da uygulanmaktadır. Günümüzde mikro metastazlarla ilerlediği bilinen meme kanseri tedavisinde sistemik adjuvan tedavi uygulanımı

yaygındır. Hastalığın evresi, hastanın premenopozal yada postmenopozal dönemde olması, lenf nodu metastazı ve hormon reseptör durumuna bağlı olarak uygulanacak sistemik tedavi seçenekleri değişmektedir. Kemoterapi, hormonal tedavi ve hedef moleküler tedaviler ayrı ayrı ya da kombine olarak uygulanabilmektedir (4,27).

Meme kanserinde kullanılan kemoteröpatik ajanlar; Antrasiklinler, Taksanlar (Paklitaksel, Dosetaksel), Gemsitabin, Kapesitabin, 5-FU, Siklofosamid ve Etoposide'dir. Bu ilaçların kombinasyonu ile farklı kemoterapi protokolleri oluşturulmuş ve uygulanmaktadır. Meme kanseri tedavisinde temel kemoterapitik ajanlar antrasiklinler ve taksanlardır. Antrasiklinler, DNA baz dizilerinin arasına girip DNA replikasyonunu bozarlar. Ayrıca DNA topoizomera 2 inhibisyonu ile DNA tamirini engelleyerek tümör hücrelerinin ölümüne yol açarlar. Diğer önemli grup taksanlar ise tübülün depolimerizasyonunu azaltarak, mitozu özgü mikrotübül sürecini bozar ve hücreleri G2-M fazında durdururlar. Böylece hücre proliferasyonunu engellerler (4).

Meme kanseri tedavisinde yaygın olarak uygulanan hormonal tedavi seçenekleri; Antiöstrojenler (tamoksifen, fulvestrant), Aromataz inhibitörleri (anastrozole, letrozole), LHRH-A ve progestinlerdir. Son yıllarda büyüme faktörleri reseptörlerine (trastuzumab), stromal proteazlara ve anjiyogenezin inhibisyonuna (bevacizumab) yönelik hedef terapötik uygulamalara da yer verilmektedir (27).

Yeni kemoterapitik ilaçlar, antihormonal tedavi ve hedef molekül tedavileri ile birçok hastada başarılı sonuçlar elde edilse de, meme kanserindeki moleküler ve genetik mekanizmaların daha iyi anlaşılması ile meme kanserinin heterojen gruplu bir hastalık olduğu ve bazı hastalarda günümüzde kullanılan ilaçların olumlu sonuçlar vermediği bilinmektedir (4). Birçok kanserde olduğu gibi meme kanserinde de hücre proliferasyon ve ölümünde görevli sinyal yollarındaki molekülleri hedef alan tedavilerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yürütülmektedir.

2.4.HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI

Yakın zamana kadar hücre ölümünün 2 yolla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunlardan birincisi apoptoz, programlı hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Bunun karşısı olan ve raslantısal olarak ortaya çıkan, programsız hücre ölümü nekroz da tanımlanan ikinci hücre ölüm şeklidir. Uzun yıllar programlı hücre ölümü ile apoptoz eş anlamlı olarak kullanılmış olsa da, 1960 yılından beri alternatif programlı hücre ölüm yollarının olduğu bilinmektedir. Omurgasızlarda tipik apoptoz morfolojisi ile uyuşmayan programlı hücre ölümlerinin gösterilmesi ve organogenez döneminde görülen hücre ölümlerinde de tipik apoptoz morfolojisi gözlenmemesi üzerine 1990'da Clark ve arkadaşları hücre ölümünü morfolojik olarak üçe ayırmışlardır. Hücre ölümünün morfolojik sınıflandırılmasında apoptoz tip 1 hücre ölümü, otofaji tip 2 hücre ölümü, non-lizozomal parçalanma ise tip 3 hücre ölümüdür. En az üzerinde durulan tip 3 hücre ölümü nekroza benzer morfolojik özelliklere sahiptir(14).

2.4.1.APOPTOZ

Kerr ve arkadaşları 1971 yılında sıçanlarda yaptıkları çalışmada, portal venin major dallarından birinin tıkanması sonrasında hepatositlerde gördükleri hücre sitoplazmasının büzüşmesi, çekirdek zarı altında kromatin kondensasyonu, organelleri içeren veziküllerin oluşması gibi morfolojik hücre ölümü değişikliklerini nekrozun bir tipi olarak büzüşme nekrozu olarak tanımlamışlardır. 1972 yılında ise apoptoz terimini literatüre kazandırmışlardır. Apoptoz, Yunanca'da apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinden oluşan yaprakların ağaçtan düşmesi anlamına gelen bir terimdir.

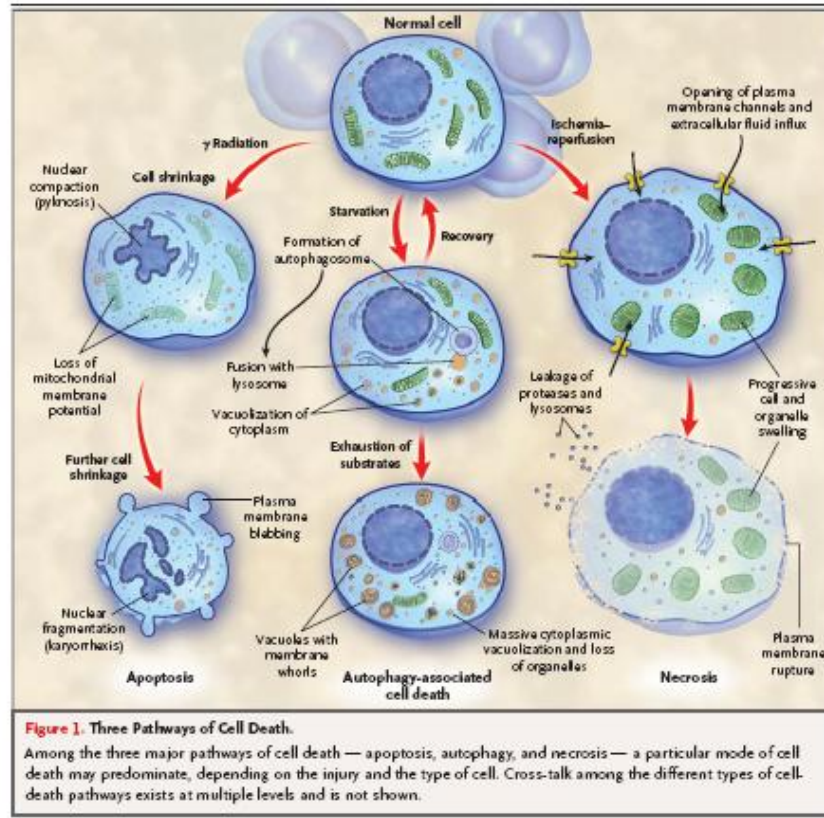
1983 yılında Duke ve arkadaşlarının jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermesi ile hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiş ve apoptoz ile ilgili çalışmalar hızlanmıştır. Özellikle 1990'dan sonra apoptozu pozitif veya negatif yönde düzenleyen proteinlerin belirlenmesindeki hızlı gelişmeler apoptozu önemli konularından biri haline getirmiştir(28).

Apoptoz hasta ve gerekmeyen hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genetik olarak kontrol edilen, RNA, protein sentezi, enerjiye gereksinim duyan ve organizmada dengeyi koruyan bir olaydır. Canlı organizmalarda apoptoz çok sayıda fizyolojik ve patolojik olayda izlenebilmektedir. Bunlardan apoptozun görüldüğü fizyolojik olayları sıralarsak:

1. Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı (implantasyon, organogenezis ve gelişim sürecinde damağın birleşmesi, parmak arası perdesinin ortadan kalkması ve sinir sisteminin gelişim sırasında oluşan çok fazla sayıdaki nöronların hedef sayıya indirilmesi vb.)
2. Yetişkinlerde hormon bağımlı dokularda, hormonun kesilmesinden sonra oluşan atrofi (örn., prostat, endometrium ve meme dokusu hücreleri)
3. Sürekli proliferasyon gösteren hücre gruplarında hücre sayısının azaltılması (bağırsak epiteli, deri)
4. İmmün sistem hücrelerinin seçimi (sitokin deplesyonundan sonra B ve T lenfositlerin ve timusta otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılması) (29,30)

Apoptoz, hücrelerin öldürülmesinde fizyolojik bir süreçtir. Çok hücreli organizmaların gelişimi ve işlevselliğinde çok önemlidir. Organizmada homeostazın korunması için hücrelerin doğru zamanda doğru miktarda apoptoza gitmesi ve bu dengenin bozulmaması gerekir. Organizmada apoptozun azalmasının kanser, viral enfeksiyonlar ve otoimmün hastalıkların etiyopatogenezinde; artmasının ise nörodejeneratif hastalıklar, iskemi/reperfüzyon hasarı ve karaciğer yetmezliğinin etiyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (31).

2.4.1.a. Apoptozda hücrede gözlenen değişiklikler



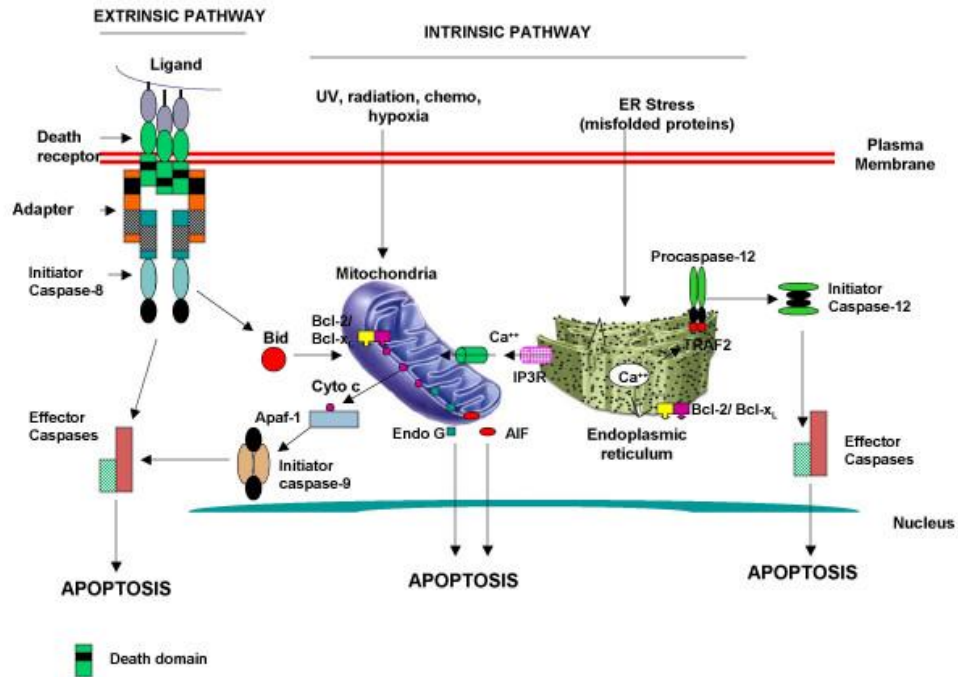
Şekil 1: Apoptotik, Nekrotik ve Otofajik hücrelerde gözlenen yapısal değişiklikler
‘Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. 2009. Cell Death, N Engl J Med. 361:1570-1583’ alınmıştır (31).

Hücre tiplerine göre ölümcül bir uyarıdan sonra apoptozun başlama süresi farklılıklar gösterir. Ancak bütün hücre tiplerinde, apoptoza ait morfolojik değişiklikler benzer olup, 2-4 saat içinde gelişir. Çekirdek, sitoplazma ve hücre yüzeyinde meydana gelen değişiklikler birbiri ile uyumludur.

Apoptoz, çekirdek zarında kromatin yoğunlaşması, sitoplazma yoğunlaşması, apoptotik cisimlerin oluşumu ve bu süreç içerisinde iyi korunmuş organel yapıları ile morfolojik olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1). Apoptoza giden hücrelerde ilk olarak meydana gelen morfolojik değişiklik hücrelerin mikrovillus gibi özel yüzey yapılarını ve diğer hücrelerle temas yüzeylerini kaybetmesidir. Sonrasında hücrelerin su kaybederek büzülmesiyle sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organelerin birbirlerine yaklaştığı görülür. Hücresel membranlar bütünlüklerini korurlar. Endoplazma

Retikulumu (ER) dışında organeller genel olarak sağlamdır. En önemli yapısal değişiklikler çekirdekte görülür. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşır ve parçalar halinde bir araya toplanır (kromatin kondensasyonu). DNA apoptotik hücrelere özgü merdiven şeklinde bantlaşmalar gösterir. Hücre membranında önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bu tomurcuklanmalar sitoplazma parçacıkları, organeller ya da çekirdek parçacıkları içeren apoptotik cisimcikleri oluşturur. Apoptotik cisimlerde hücre membranının iç tabakasında yer alan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yüzüne göç eder. Bu sayede apoptotik cisimler komşu hücreler tarafından tanınır ve fagosite edilir. Sonuç olarak bu çeşit hücre ölümünde hücrenin kendi lizozomlarının belirgin bir rolü yoktur. Hücrenin parçalanması diğer hücrelerin lizozomları aracılığıyla olmaktadır. Hücre membran bütünlüğünün korunmasıyla hücre içeriği ortama dökülmediği için inflamatuvar yanıt oluşmamaktadır (29,30,31).

2.4.1.b.Apoptoz Mekanizmaları



Şekil 2: Apoptoz Mekanizmaları ‘Gupta *et al. Immunity & Ageing* 2006 3:5 doi:10.1186/1742-4933-3-5’ alınmıştır (32).

Apoptoz hücre içi ve hücre dışı çeşitli uyaranlar ile tetiklenebilir. Hücre içi sinyaller DNA hasarı, hücre içi kalsiyum (Ca) seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozukluklarıdır. Hücre dışı sinyaller ise çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, iskemi, toksinler ve radyasyon gibi hücrenin maruz kalabileceği dış etkenlerdir. Hücreye gelen bu sinyaller hücre içi proteaz sistemi olan kaspazları aktive etmektedir. Kaspazlar, temel olarak morfolojik bir olay olan apoptozun gerçekleşmesini sağlayan ana moleküllerdir. Apoptozda kaspazların aktivasyonu temel olarak iki yolak ile sağlanabilir (şekil 2). Bunlar mitokondriyal (intrinstik) ve hücre ölüm reseptör (ekstrinstik) yolağıdır. Son yıllarda üstünde durulan üçüncü bir yolakta Endoplazma Retikulumu Aracılı yoldur. Bu yollar birbirinden çok farklı mekanizmalar olmamakla birlikte sonunda ortak moleküllerin aktivasyonu ile hücreyi apoptoza götürürler (28,32).

Ölüm reseptör yolunda (Fas-L), tümör nekroz faktör (TNF), APO3L, TRAIL gibi ölüm aktivatörleri, hücre yüzeyinde yer alan ölüm reseptörlerine bağlanırlar. Tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ailesi apoptozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli gruptur. Bu gen ailesine ait ölüm reseptörleri CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) -R1, TRAIL-R2, TNF-R1, DR3 ve DR6'dir. Ölüm reseptörleri ekstrasellüler kısımda sisteinden zengin tekrar bölgeleri içerirken, sitoplazmik bölümlerinde ölüm alanı adı verilen bir aminoasit dizisini bulundurlar. Bu alana sitoplazmada bulunan adaptör proteinler bağlanmaktadır. Ölüm aktivatörlerinin, ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmada bulunan adaptör proteinler ölüm alanlarına bağlanarak oligomerize olurlar. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar "Ölümü Başlatan Sinyalleme Kompleksi" denen yapıyı oluştururlar. Ölümü Başlatan Sinyalleme Kompleksinde prokaspaz-8 ve prokaspaz-10'un aktivasyonu gerçekleşir. Prokaspaz-8 aktivasyonundan sonraki basamaklar hücrelerde farklılıklar göstermektedir. Tip 1 hücrelerde kaspaz-8 direk olarak prokaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlar. Tip 2 hücrelerde ise kaspaz-8 orta derecede aktive edilmiştir ve prokaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlayamaz. Bu hücrelerde prokaspaz-8, Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesi olan Bid'i aktif hale getirip mitokondriyal membran

geçirgenliğini arttırarak, mitokondriyal yolağın aktivasyonu ile hücreleri apoptoza getirmektedir (33).

Mitokondriyon hücre içinde sadece enerji üretimi için bulunmamaktadır. Sitokrom c, SMAC/DIABLO ve Omi gibi birçok proapoptotik molekülün salınımı da mitokondriyondan olmaktadır. Bu nedenle mitokondriyal yolaktaki ana değişiklik mitokondriyon membran geçirgenliğinin bozulmasıdır. Membran geçirgenliğinin artmasıyla mitokondriyon iç zarında lokalize olan ve ATP sentezinde görev alan sitokrom c mitokondriyondan sitoplazmaya salınır. Sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozom kompleksi prokaspaz-9'u aktive kaspaza-9'a dönüştürür. Kaspaz-9'da prokaspaz-3'ün aktivasyonu ile kaspaz kaskadını devam ettirir (34).

Son yıllarda üstünde durulan endoplazma retikulumu (ER) aracılı yolda ise hücre içinde kalsiyum artışıyla ER membranında yer alan kaspaz-12 aktive olur. Aktive kaspaz-12'de kaspaz 9 üzerinden kaspaz kaskadının aktivasyonunu sağlar(35).

2.4.1.c. Apoptozda Rol Oynayan Moleküller

İnsan kanserlerinde en fazla mutasyonu görülen tümör supresör geni olan p53, çevresel şartlara ve hücrel duruma göre hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve sentezi, hücre farklılaşması, genomik şekillenme ve programlı hücre ölümünde görev alır. Karsinogen, sitostatik ajan, radyasyon, ultraviyole ışığı, hipoksi veya onkogenler gibi çeşitli uyarılar sonrasında oluşan DNA hasarında, p53 hücreyi G1 fazında durdurarak hasar küçük boyuttaysa tamirini, büyük boyuttaysa ise hücrenin apoptoz ile ölümünü sağlar. Böylece zedelenmiş DNA'nın replike olması engellenerek genomun bütünlüğünü korunmuş olur.

Apoptozun genetik mekanizma üzerine yapılan çalışmalarda ilk olarak *Coenorhabditis elegans* isimli bir nematod kullanılmıştır. *C.elegans*da apoptozda düzenleyici moleküller olarak bulunan ced'lerin, memelilerdeki analogu kaspazlardır. Kaspazlar, normalde sitoplazmada inaktif proenzimler olarak bulunan proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçen sistein proteazlar olarak bilinen bir ailedir. Adlarını da, proteinleri aspartik asit bölgelerinde kesmeleri (cleavage-C) ve yapılarında sistein taşımalarından dolayı almışlardır. Memelilerde şimdiye kadar 14

grubu tanımlanmıştır. Kaspazlar, Sitokin matürasyonuna aracılık edenler (kaspaz-1, 4, 5, 13), apoptotik hücre ölümü sürecinde efektör görevi üstlenenler (kaspaz-2, 3, 7) ve apoptotik hücre ölümünde aktivatörler (kaspaz-6, 8, 9, 10) olmak üzere üç ayrı grupta toplanmıştır. Aktivatör kaspazlar efektör kaspazları etkin hale getirir. Efektör kaspazlardan biri olan kaspaz-3 apoptotik yolların ortak buluşum noktasıdır. Kaspaz-3 etkin hale getirildiğinde apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan diğer proteolitik aktiviteye sahip yolların aktivasyonunu sağlar. Kaspaz 3 ile DNA tamirinde rol oynayan poli ADP riboz polimeraz (PARP) enziminin proteolitik yıkımı, DNA onarımını engeller. Aynı zamanda efektör kaspazlar ile DNA replikasyonu ve tamirini sağlayan DNA topoizomeraşı da yıkıma uğrattır. DNA endonükleazın serbetleşmesini sağlayan kaspazlar DNA kırıkları oluşumuna neden olur. Çekirdekte bir diğer önemli değişiklik de çekirdeğin şeklini sağlayan intranükleer proteinler ve laminlerin yıkıma uğratılmasıdır. Bu moleküler değişiklikler apoptozun çekirdekte gözlenen kromatin kondensasyonu ve parçalanması gibi tipik morfolojik özelliklerinin sebebidir (36).

Mitokondriyon membran geçirgenliği, Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilmektedir. Bu proteinler mitokondriyon ve ER zarında bulunur. Bcl-2 grubu proteinlerin bir kısmı proapoptotik (Bax, Bak, Bad, Bcl-xs, Bim, Bid) etkili iken diğer kısmı ise antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-w, Mcl-1) etkilidir. Bax, Bad gibi proapoptotik grupta olanları mitokondriyon membranına yerleşerek, membranda kanallar ve porlar oluşturup, sitokrom c, IAP, Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2'nin mitokondriyondan sitoplazmaya salınımına yol açarlarken antiapoptotikler ise salınımlarını engellerler (37).

Bir kaspaz inhibitör ailesi olan IAP'ler kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'un aktif bölgelerine bağlanarak selektif olarak inhibisyonlarına neden olur. Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 ise IAP'lara bağlanarak onların kaspazlara bağlanmasını engellerler. Böylece kaspazların ve apoptozun inhibisyonu engellenmiş olur (38).

Kaspaz bağımlı olmayan apoptozda etkin olan ise; mitokondriyon membran bütünlüğünün bozulmasıyla mitokondriyondan salınan bir diğer faktör apoptoz indükleyici faktör (AIF)'dür. AIF, hücre ölüm sinyallerini aldığı anda

mitokondriyondan salınır. Çekirdeğe göç eder ve DNA'ya bağlanarak DNA'nın yıkımına neden olur (34).

2.4.2. NEKROZ

Nekroz, hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı uyaranlar sonucu oluşan patolojik hücre ölümüdür. Nekrozda enerji ve madde metabolizmasında düzensizlik vardır. Metabolik değişikliklere yapısal değişiklikler eşlik eder. Nekroz uzun yıllar apoptozun karşıtı olan ve raslantısal olarak ortaya çıkan, programsız hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Ancak son zamanlarda nekrozun da başlatılması ve kontrolünde programlı kontrol mekanizmalarının olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle 2005'de Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)' de hücre membran bütünlüğünün bozulduğu, hücrede şişme ve organellerde parçalanmanın görüldüğü morfolojik bir terim olarak tanımlanması uygun görülmüştür (39).

Nekrozun karakteristik özelliği ölümün hücre gruplarında ortaya çıkmasıdır. Nekrozda en temel yapısal değişiklik membran bütünlüğünün bozulmasıdır. Membran geçirgenliğinin artması ve bunun sonucunda da sitoplazmanın ve çekirdek içeriğinin hücreler arasındaki boşluğa salınması nedeniyle nekrozun ortaya çıktığı bölgede inflamatuvar olaylar gözlenmektedir.

Hücre ölümü, genetik olarak kontrol ediliyorsa programlıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda üçüncü bir hücre ölüm yolu olarak otofaji üzerine durulmaktadır. Otofaji ile ilgili ulaşılan bilgi birikimi sonrasında apoptoz artık programlı hücre ölümüyle eş anlamlı olarak kullanılmamaktadır. Apoptoz ve otofaji ilişkili hücre ölümü programlı hücre ölümünün temel iki çeşidi olarak kabul edilmektedir.

2.4.3. OTOFAJİ

Kelime anlamı olarak kendi kendini (oto) yeme (faji) anlamına gelen otofaji hücre biyolojisinde hücre içi makromoleküllerin ve organellerin lizozomal enzim aktivitesiyle yıkılma mekanizmasıdır. Genetik olarak kontrol edilen otofaji hücre içerisinde yıkım, sentez ve hücre içi maddelerin geri dönüşümünü dengelemektedir. Otofajinin tanımlanması 1960'lı yıllara uzansa da, 1990'ların ortalarına kadar

genetik temelini kavramaya yönelik çalışmalar yapılmamıştır. 1990'da Oshumi ve arkadaşları mayalarda yaptıkları çalışmada 30 ATG (otofaji ile bağlantılı genler) tanımlamışlardır. Otofajinin genetik yolağındaki temel moleküllerin tanımlanmasıyla temel hücre çalışmalarında otofaji açısından yeni bir dönem başlamıştır (14).

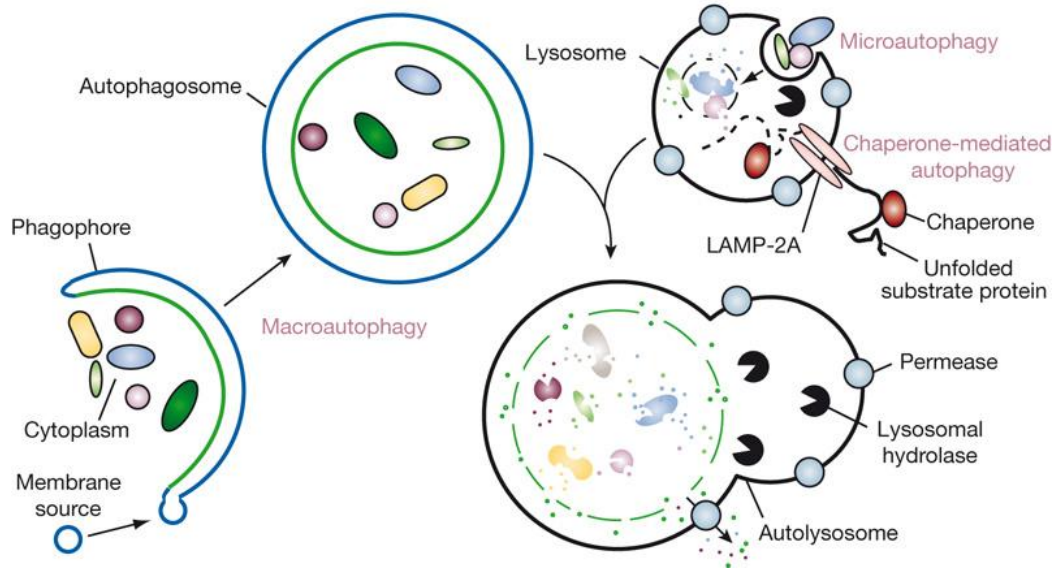
Yapılan ilk çalışmalar ışığında otofajinin hücrelerin gereksiz, aşırı ve hasarlı organellerini ve makromoleküllerini yıktığı bir olay olduğu bilinmektedir. Otofaji tüm ökaryotik canlılarda gerçekleşen evrimsel olarak korunmuş bir membran trafik yolağıdır. Otofaji esnasında hücrenin yıkıma uğratılacağı organel ve proteinler sitoplazmada oluşturulan preotofagozom adlı membran sistemi ile çevrenir. Çift katlı membranlı kesecikler içine hapsedildiğinde de otofagozom ismini alırlar. Otofagozomların lizozomlarla birleşmesi sonucunda maddeler lizozomal enzimlerle yıkıma uğratılırlar. Yıkıma uğrayan proteinler ATP ve yeni proteinlerin sentezi için kullanılırlar. Hücreler otofaji sayesinde kendi organel ve proteinlerini enerji üretimi için hammadde olarak kullanarak metabolik stres durumlarında canlı kalabilmektedirler. Yani otofaji besin yokluğu ve büyüme faktör çekilmesi gibi nedenlerle ortaya çıkan metabolik streslere adaptasyon cevabıdır (14,31,41).

Otofaji hasarlı organel ve proteinlerin yıkılmasında etkin bir mekanizma olmasının yanı sıra normal hücre içeriğinin yeniden işlenmesinde de yer almaktadır. Bu nedenle otofaji eksikliğinde ubikuitinlenmiş proteinlerin ve deforme organellerin birikmesi, hücresel dejenerasyona yol açmaktadır (40).

Otofaji, ilk olarak hücrenin hayatta kalımı ile ilgili bir savunma mekanizması olarak ortaya atılmış olsa da, son yıllardaki çalışmalarda otofaji ile hücre hayatta kalımı ve ölümü arasında karmaşık bağlantılar olduğu ortaya konmuştur. Otofaji hücre içinde uzun dönem devam ettiğinde ve apoptoz mekanizmaları bozuk hücreler ölüme zorlandığında, otofajinin hücrelerde bir hücre ölüm çeşidi olarak kullanıldığı öne sürülmüştür (14,31,42).

Genel olarak bakıldığında son on yılda yapılan çalışmalar otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma gibi fizyolojik hücresel olaylarda ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında rol oynadığını göstermektedir (41,42,43). Ayrıca araştırmalar, hücrelerdeki otofaji bozukluklarının kas hastalıkları, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve Huntington, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların

etiyojisinden sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır (44). Fakat bunlara karşın kontrolsüz otofajinin hücre ölümüne yol açarak hastalıkların patolojik etkilerine katkıda bulunabileceğine dair kanıtlar da bulunmaktadır (45).



Şekil 3: Otofaji Çeşitleri ‘Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature. 451:1069-1075’ alınmıştır (46).

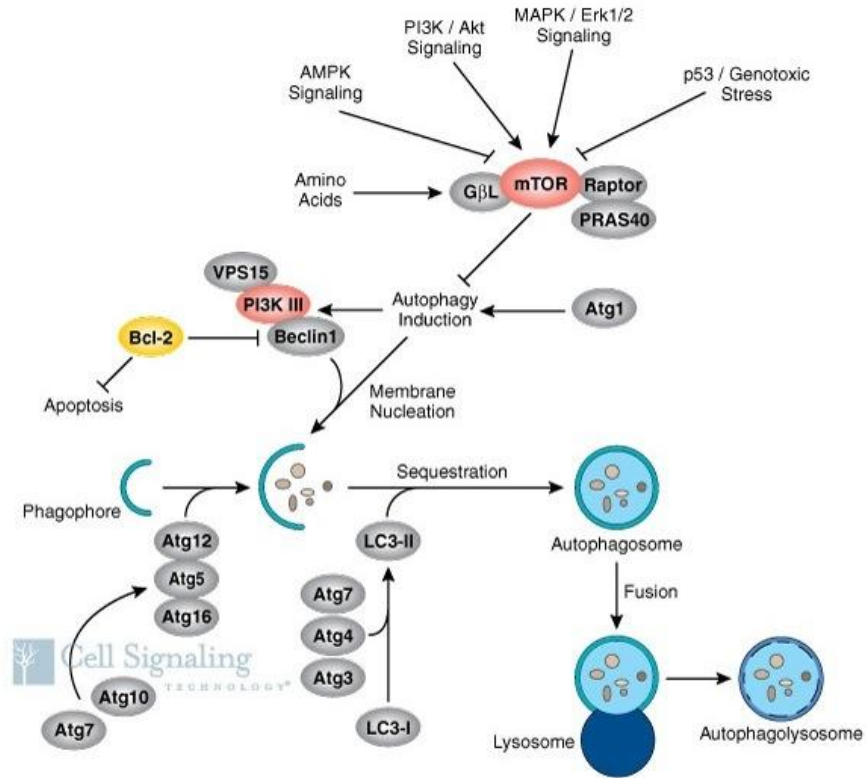
Otofaji kompleks bir süreç olmakla birlikte şimdiye kadar 3 farklı mekanizması tanımlanmıştır. Bunlar makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofajidir (Şekil 3). Her üçünde de hücre içeriği lizozomlar tarafından yıkıma uğratılsa da, üçünün de farklı biyolojik özellikleri bulunmaktadır. En çok üstünde durulan çeşidi makrootofaji, pek çok hücrede oluşur, protein parçalarının ve hasar görmüş organellerin parçalanmasında en önemli rolü üstlenir. Makrootofaji yıkıma uğratılacak hedef molekülleri çevrelerindeki diğer sitoplazmik içerikten ayıran çift katlı membran sistemlerinin (otofagozomların) oluşumuyla karakterizedir. Yıkıma uğratılacak protein, karbonhidrat, lipid, RNA, mitokondriyon ve peroksizom gibi organeller otofagozomların içine hapsedilip lizozomlara taşınarak, lizozomal enzimlerle parçalanırlar. Otofagozomlar ER’deki içerik olarak PI3-P’den zengin izolasyon membranlarının bir araya gelmesi, uzaması ve kapanması ile oluşur.

Otofagozomlar içeriklerini lizozoma taşıyarak lizozom ile birleştiklerinde otolizozom ismini alır. İçerikleri asidik lizozomal hidrolazlar ile yıkılır (46,47).

Mikrotofaji, küçük miktarlardaki sitoplazma içeriğinin direk olarak lizozom tarafından pinositozudur. Sitoplazmik içerik lizozom membranının içe çökmesi ile lizozom içinde hapsedilir (46,47).

Şaperon aracılı otofaji, diğer otofaji çeşitlerine göre daha seçicidir. Sadece KFERQ benzeri motifleri içeren proteinlerin yıkıma uğratıldığı otofaji çeşitidir. HSC70 içeren şaperon kompleksler sitoplazmadaki KFERQ motifli proteinleri tanıyarak, bu proteinlere bağlanırlar ve lizozom membranına taşırlar. Lizozom membranında bulunan LAMP-2 şaperon-KFERQ motifli protein kompleksini tanır ve protein katlantıları açılır. Protein lizozom membranından lizozomal hsc70 yardımıyla geçerek lizozomda yıkıma uğratılır. Şaperon aracılı otofajide membran oluşumu ve içeriğin membran sistemi içinde hapsedilmesi gibi basamaklar yoktur (46,47).

Otofaji mekanizmalarında rol oynayan proteinlerin çoğu ilk olarak mayada yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuş ve "otofaji ile bağlantılı proteinler" ya da kısaca Atg proteinleri olarak adlandırılmışlardır. Ayrıca ökaryotlardaki karşılıkları da bilinmektedir. Bu proteinler otofajik keseciklerin oluşumunda rol oynayan çeşitli protein kompleksleridir. Yani otofaji ile ilgili proteinlerin çoğu, otofajik zarların oluşumunda ve bunların uzayarak kesecik haline gelmesinde görev yapmaktadırlar (45,48).



Şekil4. Otofagozom oluşumu ve görevli otofaji ilişkili proteinler
'<http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Autophagy.html>' alınmıştır.

Hücrede "otofaji oluşum merkezi" (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen ve memelilerde ER ile golgi birleşiminin arasında olduğu düşünülen bölgelerdir. Otofagozomların bu merkezlerde oluşmaya başladıklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Otofaji ile bağlantılı proteinlerden ilk basamakta görev yapan Atg6 (memelilerdeki Beclin-1) proteindir. Atg6 sınıf III phosphoinositol 3 fosfat (PI3F) kinaz Vps34'ün aktivitesini düzenlemektedir. PI3F kesecik oluşumunda rol oynayan proteinleri ve protein gruplarını kendisine bağlayarak otofaji oluşum merkezine yönlendirmektedir. Bu şekilde otofagozom membranının çekirdeği oluşturulmuş olur. Membranların uzaması ve kesecik halini alması ise iki übikitin benzeri sistem tarafından kontrol edilir. Bunlar Atg12–Atg5 ve Atg8-fosfatidiletanolamin konjugasyon sistemidir (Şekil 4). Bu mekanizmalarda konjugasyona yardımcı übikutin sistemindeki E1 ve E2 enzimleri benzeri enzimler bulunur. Atg12-Atg 5 konjugasyon yolağında Atg5, Atg12' ye E1 benzeri enzim Atg7 ve E2 benzeri enzim Atg10 yardımı ile kovalent olarak bağlanır. Ardından Atg12'ye bağlanmış Atg5, Atg16 ile birleşerek büyük bir protein kompleksi oluşturur

ve izolasyon membranının dış yüzeyine bağlanır. İkinci übikitin benzeri sistemde ise Atg8 (memelilerde MAP-LC3 ya da kısaca LC3) proteininin, bir fosfatidiletanolamin (FE) yağ molekülüne kovalent olarak bağlanması söz konusudur. Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi, Atg8/LC3'ün FE'ye bağlanması için gereklidir. LC3'ün FE bağlanması ile çözülebilir formda bulunan sitoplazmik formundaki LC3-1, otofagozom ilişkili membrana bağlı formu LC3-2'e dönüşmektedir. FE molekülü, LC3'ün sondan 6.aminoasiti olan glisine bağlanmaktadır. Glisinde LC3'ün C-ucundaki beş aminoasitin Atg4 proteaz tarafından kesilmesi ile ortaya çıkarılır. Atg8/LC3'ün FE'ye bağlanması, PAS'a zar taşınması ve burada zar uzaması için gerekli bir olaydır. LC3-ethonalmının oluşması sonucunda Atg 4 proteaz, E1 benzeri enzim Atg 7 ve E2 benzeri enzim Atg3 tarafından aktive edilir. Atg4 de kesecik oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3 proteinlerini yağdan kopararak yeniden kullanılmalarını sağlar. Otofagozom daha sonra geç endozom veya lizozomla birleşerek taşıdığı kargo lizozomal enzimler ile yıkıma uğrar. Kargonun yıkımı ile (proteinler, organeller vb.) ortaya çıkan yapıtaşları (örn. aminoasitler, yağ asitleri, vb.) tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılmış olur (48,49,50).

Otofaji mekanizmasında Beklin 1 ve MAP-LC3 “microtubule associated protein 1 light chain 3” gibi sıkıca korunmuş genler rol oynamaktadır. Sentez sonrasında LC3 proteolitik reaksiyonlar sonrasında sitoplazmik lokalizasyonda bulunan LC3-1'e dönüşmektedir. Otofaji boyunca LC3-1 fosfatidiletanolamin ile konjuge edilerek LC3-2 oluşmaktadır. LC3-2 otofagozomun iç ve dış membranlarıyla ilişkiye girerek otofagozom oluşumuna katılmaktadır. LC3 -2 'nin artmış seviyeleri hücrelerde otofagozom oluşumu ile koreledir. Bu nedenle LC3-2 sık olarak geç dönem otofaji işaretleyicisi olarak kullanılırken, izolasyon membranlarının PAS'da toplanması aşamasında kontrol mekanizması olarak görev alan beclin-1 ise erken dönem otofaji işaretleyicisi olarak kullanılmaktadır (51).

2.4.3.a Otofaji Kontrol Mekanizmaları

Otofaji kontrolünde 2 önemli sinyal yolağı, sınıf III ve sınıf I phosphoinositol 3 fosfat (PI3F) rol oynamaktadır. Sınıf III phosphoinositol 3 fosfat (PI3F) kinaz daha önce belirttiğimiz gibi otofajik keseciğin oluşumunu başlatmaktadır. Sınıf I ise otofajiyi negatif yönde kontrol etmektedir.

Sınıf I fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ protein kinaz B (Akt/PKB), mitojenik uyarılarla aktive edilen ve hücre büyümesini uyaran sinyal yollarından birisidir. Sınıf I PI3K, PI (3,4)P₂ fosfat ve PI (3,4,5)P₃ oluşumunu sağlamakta ve bu ürünler Akt/PKB yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır. Sınıf I fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ protein kinaz B /Akt yolağının otofajiyi baskıladığı bilinmektedir. Bunun nedeni aktif haldeki Akt'nin otofajik aktivitenin inhibisyonunda önemli rol oynayan TOR protein kompleksini aktive etmesidir. PTEN, (PI3K)/Akt/mTOR sinyal yolağını inhibe eden tümör baskılayıcı gendir. PTEN, (PI3K)/Akt/mTOR sinyal yolağının inhibisyonu ile hücreleri otofajiye götürmektedir (52).

Hücrelerde protein sentezi ve hücre proliferasyonunu kontrol eden bir kinaz sistemi olan mTOR (mammalian Target of Rapamycin) protein kompleksi, ilk olarak transplant hastalarında bağışıklık sistemini baskılayıcı olarak kullanılmış makrolid grubu bir antibiyotik olan rapamisin'in hedef molekülü olarak ünlenmiş ve buna göre adlandırılmıştır. mTOR hücre döngüsünde G₁'den S fazına geçişte önemli olan mRNA'ların transkripsiyonunu sağlayan serin/tironin kinaz sistemi üyesidir. mTOR; protein sentezi, transkripsiyon ve ribozom oluşumu gibi anabolik olayları aktive etmesinin yanı sıra RNA yıkımı, otofaji gibi katabolik olayları inhibe ederek hücre çoğalmasını sağlamaktadır. Açlık, hipoksi benzeri stres durumlarında mTOR molekülünün baskılanması ile hücrelerde otofaji aktif hale gelmektedir.

Otofajinin mTOR tarafından kontrolü başlangıç basamağından başlamaktadır. mTOR mayalardaki ATG1'in analogu olan ULK1, ULK2 ve bunların ilişkili proteini Atg13'ü fosforile ederek ile inhibisyonlarına neden olmaktadır. ULK'nın aktivasyonu otofajik olayların başlangıcında önemli bir basamaktır. ULK, Atg 13 ve FİF200 (Atg 17) kompleks oluştururlar ve bu komplekste Atg 17 ULK'ler tarafından fosforile edilir. ULK kinazların ile uyarılan Beclin1- kompleksi, otofagozomların oluşumuna katılan Atg5-12-16, LC3 ve Atg9 için platform oluşturacak PI3-P'den zengin membran parçalarını oluşturur. Beclin1- Sınıf 3 PI3K kompleksi evrimsel olarak korunmuş UVRAG, Atg14/Barkor ve şimdiye kadar omurgasızlarda analogları gösterilmemiş Ambra1 ve Rubicon gibi kofaktörler ile kontrol edilir. Atg14 ve Ambra1'in Sınıf III PI3K aracılı otofagozom oluşumunda önemi, UVRAG ve Rubicon'un ise Sınıf III PI3K aracılı endozomal taşınmada aktif rol oynadığı gösterilmiştir (53).

Otofagozom oluşumunda bir diğer önemli faktörde Bif-1'dir. Bif-1 BAR-domain içeren endofilin ailesi üyesi bir proteindir. Bif-1 UVRAG aracılığıyla Beklin1-Sınıf III PI3K kompleksine bağlanarak membranların kıvrılmalarını sağlar. Bu da Beklin1- Sınıf III PI3K kompleksinin lipid fosforilasyonu dışında otofagozom uzamasında gerekli olan faktörleri ortama bağlamak gibi görevlerinin de olduğunu göstermektedir (53).

2.4.3.b. Otofaji ve Hücre Ölümü İlişkisi

Tip II programlı hücre ölümü olarak sınıflandırılan otofajik hücre ölümündeki en belirgin değişiklik, sitoplazmada iki veya daha fazla katmanlı zarla çevrili sitoplazma ve organel parçaları içeren keseciklerin oluşumudur. Apoptozdan farklı olarak kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimler gibi morfolojik özellikler gözlenmez. Otofajide ölü hücrelerin komşu hücreler tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılması apoptozda görüldüğünden çok daha geç bir dönemde olmaktadır. Apoptoz ve otofaji arasındaki bu morfolojik farklılıklar otofajik hücre ölümünün ayrı bir ölüm tipi olarak sınıflandırılması gereğini doğurmuştur (54). Ancak otofajiyi kontrol eden mekanizmaların tam olarak aydınlatılamamış olması nedeniyle, otofajinin apoptotik mekanizmaları sağlam olan hücrelerde aktif olarak ölüme yol açıp açmadığı konusunda farklı görüşler bulunmaktadır.

2.4.3.c. Apoptoz ve Otofaji İlişkisi

Apoptoz ve otofaji birbirinden bağımsız mekanizmalarla gerçekleşen ve farklı morfolojik özellikler gösteren olaylar olsa da, son çalışmalar bu iki hücre ölüm çeşidi arasında karmaşık bir ilişkinin olduğunu ortaya koymaktadır. Apoptoz ve otofaji arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik dört farklı görüş ortaya atılmıştır.

Birinci görüş otofajinin, apoptotik hücre ölümünün baskılandığı koşullarda, hücreleri ölüme getiren mekanizma olduğudur. Yani apoptotik mekanizmalarında sorun olan hücrelerin, otofaji ile doğrudan ya da dolaylı olarak hücresel ölümü gerçekleşmektedir. Bu görüşü savunan çalışmalarda otofajinin 3-MA (3-metil adenin) ile inhibisyonu apoptozu geciktirirken; kaspaz inhibitörleri ile apoptoz inhibe edildiğinde hücrelerde otofajinin devam ettiği gözlenmiştir. Xue ve arkadaşları primer sempatik nöronlarda nöral büyüme faktör eksikliği ya da c-Ara tedavisi

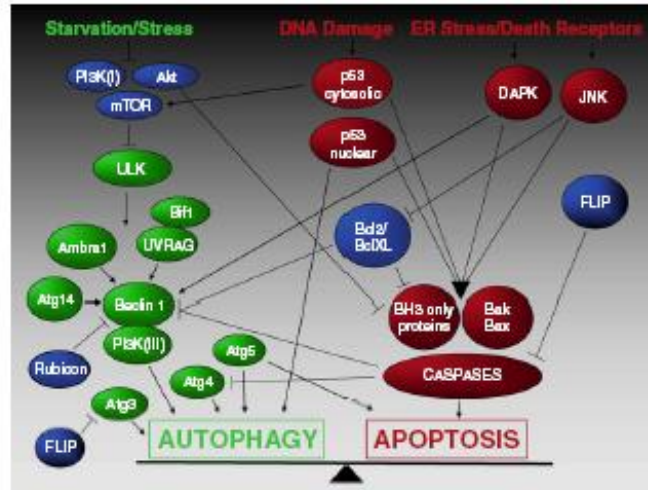
sonrasında, otofajik aktivitede 30 kat artış ve aynı zamanda DNA yıkımı gibi apoptoz morfolojilerini de gözlemişlerdir. Nöronlarda 3-MA ile otofaji inhibisyonundan sonra apoptotik hücre ölümünde azalma saptamışlardır. Kaspaz inhibitörleri ile apoptoz inhibisyonu oluşturulduktan sonra hücrelerin kaspaz bağımsız bir yolak olan otofaji ile öldüğünü göstermişlerdir (55) .

İkinci görüş, otofajinin de apoptoza paralel olarak hücre ölümüne yol açabildiğini savunmaktadır. Apoptoz ile otofajinin bazı hücrelerde koordine bir şekilde çalışarak hücre ölümünde ortak mekanizmalar olarak rol aldığını savunan görüşler yaygınlaşmaktadır. Apoptoz temel olarak çekirdek değişiklikleri ve kromatinin yıkımı üzerine giderken, otofaji sitoplazmik materyallerin yıkımı ile başlamaktadır. Bu nedenle sitoplazmik organellerden zengin ve büyük çekirdeği olan hücrelerde koordine bir şekilde çalışarak hücreyi ölüme getirmeleri anlamlıdır. Bu görüşü destekleyen çalışmalara örnek olarak; Qian ve arkadaşları T-lenfosit lösemisinde arsenik trioksit tedavisi sonrasında beklin-1 upregülasyonu ile hem otofajik, hem de apoptotik hücre ölümünün aktive olduğunu göstererek; tümör regresyonunda bu iki mekanizmanın beraber çalıştığını öne sürmüşlerdir (56). Basciani ve arkadaşları, Kaposi sarkomunda tirozin kinaz inhibitörü imatinib tedavisi sonrasında görülen hücre ölümünün apoptoz-otofaji işbirliğine dayalı olduğunu göstermişlerdir (57).

Üçüncü görüş, otofajinin hücre ölümünden kaçış mekanizması olduğudur. Yani, otofaji apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Otofaji stres, ilaç, radyasyon gibi etkenlere maruz kalan hücrelerde anormal ve hasarlı hücre elemanlarının yıkımını sağlayarak hücrenin ölüme gitmesini engellemektedir. Diğer yandan otofaji inhibe edildiğinde hücrelerde apoptotik hücre ölümü artmaktadır. Bauvy ve arkadaşları bu görüşü destekler nitelikteki çalışmalarında, HT-29 kolon karsinom hücrelerine sulindak sülfid tedavisi uygulamışlardır. Bu hücrelerde sulindak tedavisine ek olarak otofaji inhibitörleri uygulandığında apoptotik hücre ölümünde belirgin artış saptamışlar ve bunun nedeninin mitokondriyonlarından sitokrom c salınımı hızlı olan mutant HT- 29 hücrelerinde; otofajinin mitokondriyonlarını yıkıma uğratarak apoptozu geciktirmesi olabileceğini öne sürmüşlerdir (58).

Dördüncü görüş, otofajinin apoptoz öncesi bulunması gereken ön koşul olduğudur. Bu görüşe göre otofaji kendi başına ölüme yol açmamakta, apoptoza yardım etmektedir. Otofaji, hücre zarı tomurcuklanması, apoptozom kompleksinin oluşumu, fosfatidilserinin hücre dışı zarına transferi gibi apoptotik süreçte ATP gereksinimi duyan olaylara besin yokluğunda ATP sağlamaktadır. Espert ve arkadaşları, CD4 hücrelerinin HIV ile enfeksiyonu üzerine yaptıkları çalışmada otofajinin apoptotik kaspaz aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermişlerdir (59).

2.4.3.d. Apoptoz ve Otofaji Arasındaki Moleküler Bağlantılar



Şekil 5: Apoptoz ve Otofaji arasındaki moleküler bağlantılar. Fimia GM, Piacentini M. 2010. 'Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. Cell. Mol. Life Sci. 67:1581–1588.' alınmıştır (53).

Otofaji ve apoptoz arasındaki ilişkiyi düzenleyen genetik mekanizmalar hücre biyolojisinde üzerinde durulan önemli konulardan biridir. Son çalışmalarda apoptoz ve otofaji arasında birçok moleküler bağlantı ortaya konulmuştur. Bazı otofaji ile ilişkili proteinlerin apoptozda görülen hücresel olaylarda da rol oynadığı gösterilmiştir. Apoptoz ve otofajiyi negatif yönde kontrol eden birçok ortak molekül tanımlanmıştır.

Akt/PKB tarafından kontrol edilmekte olan mTOR yolağının aktivasyonu hücrenin çoğalmasına ve hayatta kalmasına, baskılanması ise otofajiye yol açmaktadır. Otofajinin düzenlenmesinde önemli bir molekül olan mTOR

(memelilerde mTOR), bir “GTP-bağlayıcı küçük protein” olan Rheb'in GTP bağlı şekli tarafından aktive edilmektedir. Tuberoz skleroz proteinleri Tsc1 ve Tsc2 (Tuberous sclerosis complex 1/2, TSC1/TSC2) Rheb'i GTP hidroliziyle inaktif duruma getirmektedir. İnaktif durumda bulunan Rheb'de mTOR aktivasyonunu gerçekleştirememektedir. Akt/PKB aktivasyonu TSC1/TSC2'yi fosforilleyerek inaktif duruma getirir. Rheb'in TSC1/TSC2 tarafından inhibisyonunu engelleyerek, mTOR'un Rheb tarafından aktivasyonuna ve otofajinin inhibisyonuna yol açar. Otofajiyi bu şekilde baskıladığı bilinen Akt/PKB yolağının, apoptozu da bcl-2 proteinlerinden olan Bad'ın Akt tarafından fosforillenmesi sonucunda baskıladığı gösterilmiştir (53, 60).

Bcl-2 ailesinin antiapoptotik proteinleri apoptoz gibi otofajiyi de inhibe edebilmektedir. Otofajik keseciğin oluştuğu aşamada görevli olan Beklin-1 antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından inhibe edilmektedir (Şekil 5). Bu inhibisyon bcl-2'nin beclin-1'de bulunan BH3 domainine bağlanması ile gerçekleşmektedir. Bu nedenle birçok pro ve antiapoptotik proteinde bulunan BH3 dizisi apoptozun düzenlenmesine spesifik bir lokalizasyon olmamakta; otofajinin indüksiyonunda rol oynamaktadır. Bu gözlem ışığında sadece BH3 parçası içeren BAD, BNIP3 ve NIX'in hem apoptoz hem otofajide rol oynadığı gösterilmiştir. BNIP3 ve NIX mitokondriyonun otofaji ile selektif yıkımında (mitofaji) rol oynamaktadır. BNIP3'ün otofaji indüksiyonunu beclin-1'in bcl-2 ailesi bağlantısını etkileyerek gerçekleştirir (61).

Atg5, otofajideki önemli rolünün yanı sıra apoptotik yolda da pozitif ve negatif düzenleyici olarak karşımıza çıkmaktadır. Atg5'in pozitif ya da negatif düzenleyici etkisi apoptotik indükleyiciye göre değişmektedir. Atg5'in FADD adlı reseptör tarafından apoptoz aktivasyonu mekanizmalarında rol oynadığı gösterilmiştir (62). Apoptoz indüksiyonu sırasında Beklin-1, Atg4 ve Atg5 gibi otofaji ile ilişkili proteinlerin yıkıma uğratıldığı bilinmektedir. Bu da otofajinin inhibisyonuna ve hücrelerin apoptozdan otofaji mekanizması ile kaçmasına engel olmaktadır. Bu görüşe zıt olarak Atg5'in kalpain tarafından kesilmesi sonrasında kalan amino kısmının Bcl-XL ile etkileşerek, sitokrom-c salınımına ve kaspaz aktivasyonuna neden olduğunu gösteren çalışma da bulunmaktadır (63).

Bir apoptoz uyararı olan p53 hücre içi lokalizasyonuna göre otofajiyi iki farklı şekilde düzenleyebilmektedir. Çekirdekteki p53'ün transkripsiyonel etkisi aracılığıyla otofajiyi indüklediği, sitoplazmik p53'ün ise otofajiyi baskıladığı bilinmektedir. P53'ün uyardığı sadece BH3 dizisi içeren PUMA proteini apoptoz bağımlı DNA hasarında görevli temel moleküldür ve otofaji indüksiyonunda da rol oynadığı gösterilmiştir.

Apoptoz ve otofaji arasındaki ilişkiyi kontrol eden temel moleküllerden bir diğeri de apoptoz regülasyonunda önemli olan birçok proteinin fosforilasyonunu yapan JNK ve DAP kinazlardır. Jnk Bcl2/BclXL proteinlerinin beclin-1'e bağlanmasını engelleyerek otofaji indüksiyonu sağlamaktadır. Son çalışmalarda DAP kinazın Beklin-1'i fosforile ettiği ve böylece Bcl-2 ailesinin beclin-1'e bağlanarak otofajiyi inhibisyon etkisini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (64).

Apoptoz otofaji arasındaki bağlantı otofajinin son basamaklarında dahi devam eder. Otofajide önemli olan lizozomal protein DRAM'ın ekspresyonu proapoptotik protein p53 tarafından kontrol edilir (53).

2.4.3.e. Otofaji ve Kanser

Otofajinin karsinogenezdeki rolü, son yıllarda önemli bir tartışma konusudur. Daha önce bahsedildiği gibi otofaji, hücreleri besin yokluğu gibi çevresel değişikliklere karşı koruyan bir adaptasyon mekanizmasıdır. Açlık durumunda, hücre içinde otofaji artmakta ve hücrenin protein ve organelleri hücreye aminoasit, yağ asitleri ve nükleotidler gibi makromolekül öncülerini sağlamak amacıyla yıkıma uğratır. Bu görüşü destekleyen Mizushima ve arkadaşları çalışmalarında, memelilerin yaşayabileceği en büyük stresin doğum anında anneden olan kan akımının kesilmesi olduğunu öne sürerek bu durumda bebeği koruyan mekanizmanın otofaji olduğunu göstermişlerdir (65).

Kanser ve otofaji arasındaki ilişkinin araştırıldığı birçok çalışmada, büyüme faktörlerinden yoksun tümör hücrelerinde otofajide artış olduğu, hücrelerin ölümden otofaji ile kaçtığı ve hücrelerdeki otofaji inhibe edildiğinde, hücrelerin apoptoz ile öldüğü gözlenmiştir (66,67). Tümörlerde sınırlı anjiyogenezden dolayı, besin yokluğu ve hipoksik ortam bulunur. Bu çalışmalar ışığında da tümör hücrelerini bu

çevresel koşullardan koruyan mekanizmanın otofaji olabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Solid tümörlerde otofaji artışının tümörün büyümesini sağladığı düşünülürse, hücrelerde otofajinin inhibe edilmesi tümör tedavisinde umut vaat edicidir.

Otofajinin tümör hücrelerini ölümden koruyan bir mekanizma olduğuna dair hipoteze karşı otofajinin kanser oluşumunu önleyici rolünü gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Kanser hücrelerinde normal hücrelere kıyasla daha az otofaji gözlenmektedir. Atg proteinlerinden LC3-2 ve beclin-1 proteinin kanser hücrelerinde ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir. BECN geninde meydana gelen hasar sonrasında tümör oluşumunda artış olduğu ve BECN'nin aşırı ekspresyonunun tümör oluşumunu azalttığı bilinmektedir. BECN geni prostat kanseri olgularının %40, meme kanseri olgularının %50, over kanseri olgularının %75'inde mutasyona uğramıştır. Kolon kanseri, hepatosellüler karsinom, servikal kanser ve santral sinir sistemi kanserlerinde de BECN ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Bu çalışmalar ışığında otofaji mekanizma bozukluğunun kanser patogenezinde önemli bir basamak olduğu görülmektedir. Otofaji bozuklukları ile kanser oluşumu arasındaki ilişkinin en önemli kanıtları farelerde BECN 1 mutasyonu oluşturduktan sonra hücre proliferasyonunda artış ve sporadik akciğer, karaciğer kanseri oluşumlarının gözlenmesidir. Beclin -1 ekspresyonu az gözlenen MCF-7 hücrelerinin BECN ile transfeksiyonu sonrasında da hücre proliferasyonunda azalma gözlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda otofajik genlerin ekspresyonlarının kanser hücrelerinde azaldığı ve otofajinin karsinogenezde tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak önemli rol oynadığını savunan görüşler ortaya atılmıştır (68).

Kanser tedavisinde otofajinin tümör hücreleri üzerine etkisi konusunda karşıt görüşler bulunmaktadır. Tamoksifen, rapamisin, arsenik trioksit, temozolomide ve histon deasetilaz inhibitörleri, etoposid otofajiye yol açtığı bilinen kemoterapetiklerdir. Ancak bu örneklerle rağmen otofajinin tümör hücrelerinin kullandığı önemli bir ölüm mekanizması olup olmadığı net değildir. Tümör hücrelerinde otofaji görülmesi, onları öldüren mekanizmanın otofaji olduğunu göstermemektedir. Hücrelerin ölmek için kullandıkları bir savunma mekanizması olduğunu savunan görüşler de bulunmaktadır. Otofajinin kanser hücrelerini kemoterapetik tedavilere karşı koruduğu ve ilaç kombinasyonlarına otofaji

inhibitörlerinin de eklenmesinin daha etkin tedavi cevaplarına yol açacağını savunan birçok çalışma bulunmaktadır (69). Buna karşın, apoptotik yolağında sorun olan tümör hücrelerinin kemoterapötik tedaviler sonrasında otofaji ile hücre ölümüne gittiğini savunan yayınlar bulunmaktadır .

Sonuç olarak, otofajinin kanser gelişiminin önlenmesi ve kanser tedavisinin etkinliğinin artırılmasında yararlı olacağını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak otofajinin hangi koşullarda uyarılıp, hangi koşullarda inhibe edileceği önemlidir. Otofaji kavramı günümüz itibarıyla tam olarak çözülmemiş, karmaşık bir problemdir.

2.4.3.f. Otofaji ve Meme Kanseri

Son çalışmalarda meme kanseri tedavisinde umut vadeden birçok ilacın meme kanseri hücrelerindeki sitotoksitesini otofajik açıdan da incelenmiştir. İlaçların birçoğunun otofaji indüksiyonu ile hücre proliferasyonunda azalma ve hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir.

Kuo ve arkadaşları, “*Plumbago zeylanica*” bitkisinin kökünden elde edilen ve antikarsinojenik özelliği bilinen plumbagin etken maddesinin sitotoksitesini MCF-7 ve MDA-MD-231 hücre hatları üzerinde araştırmışlardır. Sonuç olarak plumbagin’in meme kanseri hücre hatlarında Akt yolağı inhibisyonu ile G2-M fazında duraklama ve otofajiye yol açtığını göstermişlerdir (70). Zhou ve arkadaşları, MCF-7, MDA-MB-231 ve fareden kurdukları primer meme kanseri hücre hatlarında PPAR gamma aktivasyonunun sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak PPAR gamma agonistleri tioglitazon ve rosiglitazonun HIF1 alfa ve BNIP3 transkripsiyonunda artışa yol açarak hücrelerde otofajik vakuoller oluşumuna neden olduğunu öne sürmüşlerdir (71). Pheophorbide, Çin’de birçok kanserde kullanılan geleneksel bir kemoterapötik ilacın içinde bulunan etken maddedir. Xuan ve arkadaşları, MDA-MB-231 insan meme hücre adenokarsinom dizisinde fotodinamik tedavide fotosensitizer olarak etki gösteren Pheophorbide’nin sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Pheophorbide’nin antitümör etkisinin mitokondria aracılı apoptoz ve ERK yolağı üzerinden otofaji indüksiyonuna bağlı olduğunu göstermişlerdir (72). Brunelli ve arkadaşları, östrojen reseptörü pozitif T47-D meme kanser hücre hattında

flavonoid analogu isocannflavin B'nin diğer analoglarından farklı olarak otofajiye yol açtığını göstermişlerdir (73).

Meme kanseri hücre hatlarında apoptoz otofaji arasındaki karmaşık ilişkiyi anlamaya yönelik kurulan deney düzeylerinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Otofajinin alternatif bir hücre ölüm çeşiti olduğunu gösteren çalışmalar yanı sıra, hücreleri ölüme karşı koruyan bir mekanizma olduğunu savunan görüşler de bulunmaktadır. Abedin ve arkadaşları MCF-7 hücrelerinde kamptotesin tedavisi sonrasında, hücrelerde intristik yolak aktivasyonu saptamalarına rağmen çekirdekte apoptotik morfolojiyi gözlememişlerdir. Kaspaz inhibisyonu ile da hücre ölümü oranlarda herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bunun üzerine Beklin-1 ve Atg7 proteinleri inhibisyonu sonrasında kaspaz bağımlı apoptozda artış gözleyerek otofajinin MCF-7 hücrelerini Kamptotesin tedavisine karşı koruyan bir mekanizma olduğunu ve apoptozu geciktirdiğini bildirmişlerdir (74). Non-invaziv meme kanseri tedavisinde kemoterapetik ilaçlarla otofaji inhibitörlerinin kombine olarak kullanılmasını önermişlerdir. Espina ve arkadaşları, insan duktal karsinoma hücrelerinin NOD/SCID farelere ksenotransplantasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada, duktal karsinoma in situ lezyonlarında malign öncü hücreler bulunduğunu ve bu hücrelerin yaşamak için otofajiye savunma mekanizması olarak kullandıklarını göstermişlerdir (75).

Tamoksifenin meme adenokarsinom hücre hatları üzerinde otofajiye yol açtığı bilinmektedir. Qadir ve arkadaşları da meme kanseri hücre dizisinde siRNA ile otofaji inhibisyonu oluşturdudan sonraki tamoksifen uygulamasında hücrelerin canlılığındaki azalmanın daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Tamoksifen tedavisine dirençli MCF7-HER2 hücre hattında da otofaji inhibisyonundan sonra tamoksifene cevap alınması neticesinde, otofajinin meme kanser hücre hatlarını tamoksifen tedavisine karşı koruyan bir adaptasyon mekanizması olabileceğini öne sürmüşlerdir (76).

Medina ve arkadaşları, 'microsomal antiestrogen-binding site (AEBS) ligands', PBPE'nin MCF-7 hücrelerinde sterollerin birikimi ve reaktif oksijen radikalleri oluşumu ile apoptoz ve otofajiye yol açtığını göstermişlerdir. Hücrelerdeki otofaji inhibisyonunun (AEBS) ligandlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini arttırdığını saptayarak, otofajinin hücre ölüm

yolağından çok hücreleri ölüme karşı koruyan bir mekanizma olduğunu öne sürmüşlerdir (77).

Cheng ve arkadaşları, MCF-7 ve MDA-MB-468 insan meme adenokarsinom hücre hatlarında, metabolik stres ve lapatinib, gefatinib gibi büyüme faktör inhibitörleri ile muamele sonrasında hücrelerde eEF-2 transkripsiyonu üzerinden otofajide artış gözlemlendiğini ve otofajinin hücreleri sitotoksik etkilerden koruduğunu savunarak büyüme faktörlerinin otofaji inhibitörleri kombinasyonunun meme kanser tedavisinde daha başarılı sonuçlar sağlayacağını belirtmişlerdir (78) .

Fazi ve arkadaşları, kaspaz-3 defektli MCF-7 hücrelerinde retinoik asidin sentetik derivativesi fenretinidin Beklin-1 ve LC3-2 'de artışla otofajiye yol açtığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada apoptotik mekanizmalarında sorun olmayan MCF-7 hücre dizisinde ise fenretinid apoptoz ile hücre ölümüne yol açmıştır (79). Bu sonuçlar otofajinin, apoptotik süreci mümkün olmayan hücrelerde alternatif bir hücre ölüm çeşiti olduğunu düşündürmektedir.

Xi ve arkadaşları, ATP üretiminde azalma, ER stresi ve katlanmamış protein cevabında artış yoluyla kanser hücrelerinde ölüme yol açtığı gösterilen glikolitik inhibitörü ve glukoz analogu 2-deoksi-D-glukoz (2-DG) tedavisiyle pankreas kanser hücre hattı 1420, melanoma kanser hücre hattı MDA-MB-435 ve meme kanseri hücre hattı SKBR3 üzerinde ER stresi, ATP üretimi ve otofaji aktivasyonu arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. 2-DG'nin kanser hücrelerinde ATP azalmasından çok ER stresindeki artış ile otofajiye yol açtığını göstererek; otofajinin de ER stresinin azaltarak 2-DG' nin sitotoksik etkisini önleyen bir hücre savunma mekanizması olduğunu göstermişlerdir. Otofaji inhibitörleri ile 2-DG tedavi kombinasyonunu meme kanseri tedavisinde önermişlerdir (80).

Cui ve arkadaşları çalışmalarında oridoninin MCF-7 hücrelerinde hem apoptoz hem otofaji ile hücre ölümüne yol açtığını ve otofaji inhibisyonu sonrasında hücrelerde apoptotik ölümün de azaldığını göstererek; otofajinin apoptoz öncesi bir aşama olduğunu öne sürmüşlerdir (81).

2.5. STATİNLER

Statinler, hidroksi-metil glutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz enzim inhibitörleridir. Bu enzim, HMG-KoA'nın kolesterol gibi izoprenoid grupların sentezinde ön madde olan mevalonik asite dönüşümünü kontrol eder. Serebrovasküler ve kardiyovasküler hastalıkları önlemek için kullanılan statin grubu ilaçlar, kolesterol sentezini spesifik olarak bloke eden farmakolojik ajanlardır. Temelde karaciğerde kolesterol sentezini bloke ederek lipoprotein sentezini azaltırlar. Aynı zamanda hepatositlerde LDL reseptör ekspresyonunu artırır ve kandan kolesterolün daha fazla alınıp safra ile atılımını sağlarlar. Böylece statinlerin en büyük biyokimyasal fonksiyonu lipid seviyelerini, plazma kolesterol, LDL ve trigliseridleri düşürmektedir (82).

İlk defa antifungal ajan olarak üretilen statinler günümüzde birçok klinik durumun tedavisinde kullanılırlar. Doğal ve sentetik olmak üzere iki tip statin üretilmiştir. Doğal statinler; mevastatin, lovastatin, simvastatin, pravastatin, sentetik olanlar; atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve serivastatindir. Aynı zamanda lipofilik (simvastatin, serivastatin, fluvastatin ve atorvastatin) ve hidrofilik (pravastatin ve rosuvastatin) olmak üzere de iki gruba ayrılır. Lipofilik statinler kolaylıkla hücre membranını geçerken hidrofilik statinler hücre membranını geçmek için özel taşıyıcıya ihtiyaç duyarlar. Statinlerin yapısı, yarılanma ömrü ve güçleri farklıdır (83).

Son yıllarda statinler ile yapılan çalışmalar bu grup ilaçların hipolipidemik ve vasküler etkilerinin dışında gözlenen diğer etkileri üzerine de odaklanmaktadır. Statinlerin kolesterol düşücü etkilerinden bağımsız etkileri 'pleiotropik etkiler' olarak adlandırılır. Bunlar arasında inme, osteoporoz, inflamasyon, diabet, Alzheimer ve kanser gibi hastalıklar üzerine olan etkileri yer almaktadır(5-8).

Statinlerin koroner arter hastalarında lipid düzeylerini düşüren etkilerinden bağımsız olarak aterosklerotik plak stabilitesi ve vasküler inflamasyon üzerine de etkilerinin olduğu bilinmektedir (5,6). Ayrıca akut koroner sendromda statin tedavisi ile kısa dönemli tekrarlayan iskemilerin de önlendiğini bildirilmiştir. Yapılan son çalışmalarda statinlerin bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceği ve organ transplantasyonlarından sonra immun modulator olarak kullanılabileceği

öne atılmıştır (84). Bir diğer çalışmada kemik iliğine uyarıcı etkisi gösterilmiştir (85). Düz kas hücrelerine antiproliferatif etkileri bildirilmiştir (86). Ayrıca Alzheimer patogeneğinde önemli olan beta-amiloid peptit birikimini azalttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (7). Kemik oluşumunu arttırdığı gösterilen statinlerin osteoporoz tedavisinde de kullanılabileceklerini savunan görüşler yer almaktadır (8).

2.5.1. Statin ve Kanser

Son çalışmalarda statinler kanser tedavisinde umut vadeden ilaçlar olarak gösterilmektedir. Son yıllarda kemirici modelleri üzerinde yapılan çalışmalarla myeloid lösemi, kolon, prostat, meme, akciğer, melanom ve glioma tümoregeneğinde statinlerin kanser gelişimini engellediği gösterilmiştir (15). Yapılan bir diğer çalışmada ise metilnitrozürea ile sıçanlarda oluşturulan meme karsinogeneğinde statinlerin önleyici etkisinin olmadığı saptanmıştır (87). Statin kullanımı ile kanser gelişiminin ilişkisinin araştırıldığı klinik çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Statin kullanımının kolon, akciğer, pankreas, özefagus kanseri, B ve T hücreli lenfoma oluşumu riskini azalttığını gösteren çalışmaların (88,89,90) yanı sıra kolon, statin kullanımının deri, kolon ve meme kanseri riskinde herhangi bir etkisinin olmadığını savunan yayınlarda bulunmaktadır (91).

Statinlerin birçok kanser üzerinde tedavi edici ve önleyici özellikleri klinik ve prelinik çalışmalarla araştırılmaktadır. Kanser tedavilerinde en önemli unsurlardan biri, kullanılacak olan yöntemin kanser hücrelerini öldürürken, diğer sağlıklı hücrelere olumsuz etkiler oluşturmamasıdır. Kanser hücreleri yüksek izoprenoid ve lipid gereksinimlerini karşılamak için normal hücrelere oranla daha fazla HMG-KoA redüktaz ve LDL reseptörü içermektedir. Bu nedenle normal hücrelere oranla kanser hücreleri statinlere karşı daha duyarlıdır. Bu da statinlerin kanser hücrelerine selektif etki yapabileceğini göstermektedir.

2.5.2. Statinler ve Meme Kanseri

Statinlerin meme kanseri gelişimi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla düzenlenen klinik çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir. Statin kullanan hastalarda meme kanseri riskinin daha yüksek saptandığı çalışmaların (10) yanı sıra, 4 yıldan fazla statin kullanan bayanlarda meme kanseri oluşumunun kullanmayanlara

oranla %74 daha düşük olduğunu gösteren yayınlarda bulunmaktadır(9). Son yıllarda yapılan çok merkezli bir çalışmada hidrofobik (lipofilik) statin kullananlarda meme kanseri görülme riskinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada statinler hidrofobik ve hidrofilik grupları beraber alındığında meme kanseri riski açısından kullananlar ve kullanmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Örneğin hidrofilik bir statin olan pravastatinin meme kanserinde olumlu etkisi gözlenmemiştir (92).

Son yıllarda prelinik çalışmalarda da statinlerin tümör hücrelerindeki antiproliferatif etkileri üzerinde durulmaktadır. Statinlerin antiproliferatif etkisi tümör hücre çeşiti ve kullanılan statine göre farklılıklar göstermektedir. Statinlerin meme kanseri hücrelerindeki etkilerini araştıran in vitro çalışmalar, ilk olarak 2003’de Seeger ve arkadaşlarının MCF-7 hücrelerinde atorvastatin, simvastatin, fluvastatin ve lovastatinin sitotoksik etkilerini göstermesiyle başlamıştır. Aynı çalışmada hidrofilik bir statin olan pravastatinin meme hücre hattında öldürücü etkisi gözlemlenmemiştir (93). Sonuç olarak in vitro hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda hidrofobik statinlerin meme kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisi olurken, hidrofilik olanların etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar epidemiyolojik çalışmalarla, in vitro deney sonuçları arasında tutarlılık olduğunu göstermektedir.

Statinlerin tümör hücrelerindeki antiproliferatif ve proapoptotik etkilerinin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Son yıllarda bu mekanizmaları açıklamaya yönelik birçok çalışma yürütülmüştür. Statinlerin mevalonata yolağında yol açtıkları inhibisyon ile Rho ve Ras GTPazları modifiye eden geranil ve farnesil pirofosfatazların üretimini engellemelerinin, antiproliferatif etkilerini açıklayabilecek bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (11). Rho proteinleri meme kanseri de olmak üzere kanser hücrelerinin proliferatif ve invaziv özelliklerinde önemlidir. Bu nedenle RhoA’nın geranlygeranylasyonun inhibisyonunun meme kanser hücrelerinin çoğalmasındaki azalmanın nedeni olabileceği öne sürülmüştür.

Kolesterol öncül maddesi olan mevalonate hücre proliferasyonu için gereklidir. Bir diğer çalışma da mevalonate yokluğunda, hücrelerde CDK2’nin fonksiyon bozukluğu ve G1-S fazına geçişte gerekli olan pozitif kontrol moleküllerin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Bu nedenle statin tedavisinin kanser

hücrelerinde antiproliferatif etkisinin, hücreleri G1 fazında bekletmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (94).

Sanchez ve arkadaşları MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde fluvastatin, simvastatin ve atorvastatinin, reaktif oksijen radikallerinde artışa yol açarak oksidatif stres mekanizmaları üzerinden hücrelerin apoptoz ve nekroz ile ölümüne yol açtığını göstermiş, statinlerin meme kanseri tedavisinde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir(95). Kotamraju ve arkadaşları MCF-7 hücrelerinde fluvastatin ve simvastatinin antiproliferatif ve proapoptotik etkilerini iNOS-NO aktivitesi ve geranilasyon inhibisyonu üzerinden gerçekleştirdiğini göstermişlerdir (13). Kang ve arkadaşları MCF10A meme kanser hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmada simvastatin ve lovastatinin H-Ras transkripsiyonel faktörünün hücre membranına lokalizasyonu engelleyerek Ras yolağındaki faktörlerin çalışmasını durdurduklarını göstermişlerdir. Aynı zamanda statin tedavisi sonrasında hücrelerde MMPların ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Bu etkiler sonucunda hücrelerin invazyon yeteneği azalmıştır. Meme kanserinde kötü prognoza yol açan metastazlar için statin tedavisinin umut vaat edici olabileceğini öne sürmüşlerdir (96).

Tümör oluşumunda ve kanser hücrelerinin antiapoptotik özelliklerinde Pİ3K-Akt yolağının aşırı aktivasyonun rol oynadığı bilinmektedir. PTEN, (PI3K)/Akt/mTOR sinyal yolağını inhibe eden tümör baskılayıcı gendir. Meme kanseri olgularının büyük çoğunluğunda PTEN geninde görülen mutasyonlar nedeniyle (PI3K)/Akt/mTOR yolağının aşırı aktivasyonu mevcuttur. Choudhury ve arkadaşları statinlerin meme kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve proapoptotik etkilerinin Pİ3K yolağında inhibisyon etkileri üzerinden olabileceği hipoteziyle, MDA-MB-231 insan meme kanseri üzerinde yaptıkları çalışmada simvastatinin insan meme kanseri hücrelerinde Akt fosforilasyonunu azalttığını ve PTEN ekspresyonunda artışa yol açtığını göstermişlerdir (15).

2.5.3. Statin ve Otofaji

Son yıllarda statinlerin hücrelerde otofajik mekanizmalar üzerinden etki ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Araki ve arkadaşları A204 insan rhabdomyosarkom kanser hücre dizisinde statinlerin otofajik etkisini araştırmışlardır. Hidrofobik statinlerden simvastatin (10µM) ve serivastatinin (0.1µM) düşük dozlarda

rhabdomyosarkom hücrelerinde otofajiyi indüklediğini saptamışlardır. Hidrofilik bir statin olan pravastatinin ise 10 μ M dozda dahi otofajiyi indüklemediğini göstermişlerdir. Serivastatinin otofajik etkisini HEK293 ve HepG2 hücre hattında saptamamışlardır. Sonuç olarak hidrofobik statinlerin kas sistemi üzerindeki yan etkilerinin otofajiye bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir (97). Parikh ve arkadaşları, atorvastatinin prostat hücrelerinde geranilasyon inhibiyonu ile otofajiye yol açtığını göstermişlerdir. Prostat kanser oluşumunda statin kullanımının koruyucu bir faktör olabileceğini öne sürmüşlerdir (98).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmadaki amacımız; hücre kültürü yöntemlerini kullanılarak *in vitro* koşullarda insan meme kanseri hücre hattı üzerinde (MCF-7), statin grubu ilaçlardan atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin sitotoksitesi ile hücre ölüm mekanizmaları apoptoz ve otofaji üzerine etkilerini araştırmaktır.

3.1. GEREÇ

3.1.1 Hücre Hattı ve Hücre Kültürü

İnsan meme adenokarsinom hücre hattı MCF-7 bölümümüzde gerçekleştirilmiş olan bir başka çalışmadan (Devlet Planlama Teşkilatı Araştırma Projesi: 2004K 120 330 MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında vinorelbine (Navelbine) ve gemcitabine (Gemzar) kullanımının CD44 ve CD24 dağılımlarına immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemlerle değerlendirilmesi) temin edildi. Önceki çalışma esnasında dondurularak sıvı nitrojen (-180 °C)de saklanmış olan MCF-7 hücre örnekleri çözülerek çalışmamızda kullanıldı.

3.1.1.a. Hücrelerin çözülmesi

Azot tankından içinde dondurulmuş hücreler bulunan dondurma tüpü çıkarılarak, önceden 37°C ayarlanmış su banyosu içinde 1 dakika bekletildi. Başka bir tüp içine 9 ml besiyeri konuldu ve dondurma tüpü içindeki hücre karışımı sıvı bu tüpe aktarıldı. 1200 devirde 7 dakika santrifuj sonrası tüpün üstündeki supernatan atıldı. Tüpün dibinde kalan pelet üzerine besiyeri eklendi. Eklenen besiyeri ile pipetaj sonrası, tüpte oluşan hücre+besiyeri karışımı 2 flaska ekildi. Faz kontrast mikroskopta hücrelerin incelenmesi sonrasında hücrelerin şeffaf sitoplazmalı, sağlıklı ve yeterli sayıda olduğu tespit edildi.

3.1.1.b. Hücrelerin çoğaltılması ve idamesi

Hücre hatları için %2 L-glutamine, 100 units/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal kalf serum eklenen RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. Üç günde bir bu besiyeri değiştirilerek 37°Cde %5 CO₂ li

inkübatörde büyümeleri sağlandı. Ayrıca flasklar inverted mikroskop kullanılarak günlük olarak canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından değerlendirildi. Hücreler ekildikleri flaskları kapladıklarında (%90 konfluensiye ulaştıktan sonra) %0.25 Trypsin-EDTA ile pasajlandı. Pasaj sonrası hücrelerin yeni flasklara 1×10^6 hücre/80 cm² olacak şekilde ekilip üremeleri sağlandı. Çalışma için yeterli sayıda hücre elde edildiğinde hücreler 96 kuyulu plaklara ve lamlara ekildi.

3.1.2. İlaçların Eldesi ve Hazırlanması:

Bu çalışmada test edilen maddeler Atorvastatin Godecke/Parke-Davis (Freiburg, Germany), Fluvastatin Novartis (Barcelona, España), Simvastatin MSD (Cramlington, UK) temin edildi. Statinler literatürdeki bilgiler ışığında PBS (150 mM NaCl, 30 mM KCl, 15 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂ PO₄ pH 7.4) ve DMSO'da çözülerek 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 ve 80 µM konsantrasyonları oluşturuldu.

3.1.2.a. Kullanılan dilusyonların hazırlanması:

Toz halinde bulunan etken maddelerinden; atorvastatininin 1204mg (1mol)'ına 1ml PBS ve simvastatinin 418 mg'ına (1mol) PBS ilave edilerek 100 mM'lık stok solüsyonları hazırlandı. Fluvastatinin ise çözünürlüğünden emin olunamadığı için 421 mg (1mol) hem PBS hem DMSO'da çözülerek 100 µM'lık iki stok solüsyonu oluşturuldu. Stok solüsyondan 1.25–80 µM'lık çalışma konsantrasyonları %10 serumlu besi ortamı (RPMI 1640) ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre canlılığı ve sitotoksosite testi:

MCF-7 hücreleri 1×10^4 hücre/kuyu olmak üzere 96 kuyulu plaklara ekilip, tutunmaları için beklendi. Hücreler atorvastatin (5, 10, 20, 40, 80 µM), fluvastatin ve simvastatinin (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 ve 80 µM) farklı konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. Inkubasyon sonrası hücre canlılığı ve sitotoksitesi kolorimetrik WST-1 kit (Roche, Cat no 11644807001) ile belirlendi. Kararlı (dayanıklı) tetrazolium tuzu olan WST-1 hücrelerde gerçekleşen kompleks hücresel mekanizma

ile çözülebilir formazana dönüşmektedir. Bu dönüşüm canlı hücrelerde NAD(P)H'nin glikolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle oluşan formazan miktarı direkt olarak kültürde metabolik olarak aktif hücreleri (canlı hücreleri) göstermektedir. Bizde çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda farklı statinlerin MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisini göstermek amacıyla WST-1'i kullandık. Bunun için inkübasyon sonrası hücrelerin bulunduğu kuyulara 10µl WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) eklendi. 4 saat 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Dört saat sonra 420nm-600 nm dalgaboyunda mikro ELISA okuyucuda (Versamax microplate reader, Molecular Devices) okundu. Elde edilen verilerden Softmax Pro5 ile sitotoksosite grafikleri elde edildi.

3.2.2. Apoptoz için terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) metodu

MCF-7 hücreleri üzerinde simvastatin, atorvastatin ve fluvastatinin 10, 20 ve 80µM konsantrasyonlarının apoptotik etkisi belirlendi. Apoptosis, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling (TUNEL) metodu kullanılarak DNA kırıklarının enzimatik işaretlemesi ile belirlendi. TUNEL işaretlemesi için in situ Cell Death Detection kit, POD (Roche; Mannheim, Germany, Cat no 11 684 817 910) kullanıldı. İşaretleme firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Kısaca, MCF-7 hücreleri 1X10⁴ hücre/kuyu olmak üzere özel 8 kuyulu lamlara ekilip, tutunmaları için beklendi. Hücreler atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin 10, 20 ve 80 µM konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası hücreler %4 paraformaldehitte 5 dakika oda sıcaklığında tespit edildi. PBS ile yıkandıktan sonra 10 dakika %0.3 H₂O₂ ile endojen peroksidaz blokajı yapıldı. PBS ile yıkandı ve 4°C'de permeabilizasyon solüsyonunda (%0.1 sodyum sitrat içinde %0.1 Triton X-100'de) 2 dakika inkübe edildi. Lamlar PBS ile yıkandıktan sonra Digoksinin-dUTP ile işaretli TdT solüsyonu ile 1 saat süreyle 37°C'de nemli ortamda (üzeri cam kapakla kapatılmış, ıslatılmış gazlı bez içeren nemli küvet) inkübe edildi. Negatif kontroller enzim içermeyen reaktif ile inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra converter horseradish peroxidase ile 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkamanın ardından işaretlenmiş DNA kırıklarını içeren hücrelerin belirlenmesi için lamlar di-amino benzidin (DAB) (Dako, K3468) ile 8

dakika inkübe edildi. Yıkamadan sonra Hematoksilen ile 1 dakika çekirdek boyası yapıldı. Alkollerden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilolde 20 dakika tutulduktan sonra Entellan ile kapatıldı. Her lam incelendi ve kondanse çekirdek özelliği gösteren kahverengi boyalı apoptotik hücreler belirlendi. Her lamda 40'lık büyütmede 100 hücre sayılarak apoptotik indeks yüzdesi saptandı. Apoptotik indeks (%)= 100 X (apoptotik hücre/toplam hücre). Lamlar DFC490 digital camera (Leica, Wetzlar-Germany) bağlı Leica DM6000B (Wetzlar-Germany) ışık mikroskobu ile incelendi ve fotoğraflandı.

3.2.3. ELISA

MCF-7 hücreleri 1×10^4 hücre/kuyu olmak üzere 96 kuyulu plaklara ekilip, tutunmaları için beklendi. Atorvastatinin 10, 20 ve $80 \mu\text{M}$ konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süreleri tamamlanınca PBS ile 3 kez yıkandı ve anti-rabbit LC3B (1:1000) poliklonal antikoru 1 saat 37°C inkübatörde inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkadıktan sonra %0.05 gluteraldehit ile oda sıcaklığında 10 dakika tespit edildi. PBS ile 3 kez yıkandı ve lamlar 1:1000 dilusyonda goat-anti rabbit IgG (H+L) sekonder antikoru ile yarım saat inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkadıktan sonra DAB (Dako K3468) ile 20 dakika shaker üzerinde bekletildi ve sülfürik asit ile reaksiyon durdurulup 450 nm dalgaboyunda ELISA okuyucuda (Versamax microplate reader) okundu. Elde edilen verilerden Softmax Pro5 ile ELISA grafikleri elde edildi.

3.2.4. Immunohistokimyasal inceleme:

MCF-7 hücreleri 1×10^4 hücre/kuyu olmak üzere özel 8 kuyulu lamlara ekilip, tutunmaları için beklendi. Atorvastatinin 10,20 ve $80 \mu\text{M}$ konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süreleri tamamlanınca $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiş olan aseton ile -20°C ' de 5 dakika TESPİT edildi. PBS ile 1 kez yıkama sonrasında 10 dakika vantilatör karşısında lamlar kurutuldu. PBS' de hazırlanmış %2' lik BSA ve %10 insan serumu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücreler 1:100 dilusyonda anti-rabbit kaspaz 3 (Abcam), anti-rabbit LC-3 (Abcam) ve anti-rabbit beclin1 (Abcam) ile nemli kutuda oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Apoptoz açısından kaspaz 3, otofaji açısından beclin-1 ve LC3 monoklonal antikoru

kullanıldı. PBS ile 3 kez yıkadıktan sonra lamalar 1:100 dilusyonda FITCH ile işaretli goat-anti rabbit IgG sekonder antikoları ile yarım saat karanlık ortamda inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkadıktan sonra DAPI ile çekirdek boyası yapıp floresan kapatma medyumunu ile kapatıldıktan sonra floresan mikroskobu (DC490 digital kamera bağlı Leica DM6000B (Wetzlar, Germany) altında incelenip fotoğraflandı.

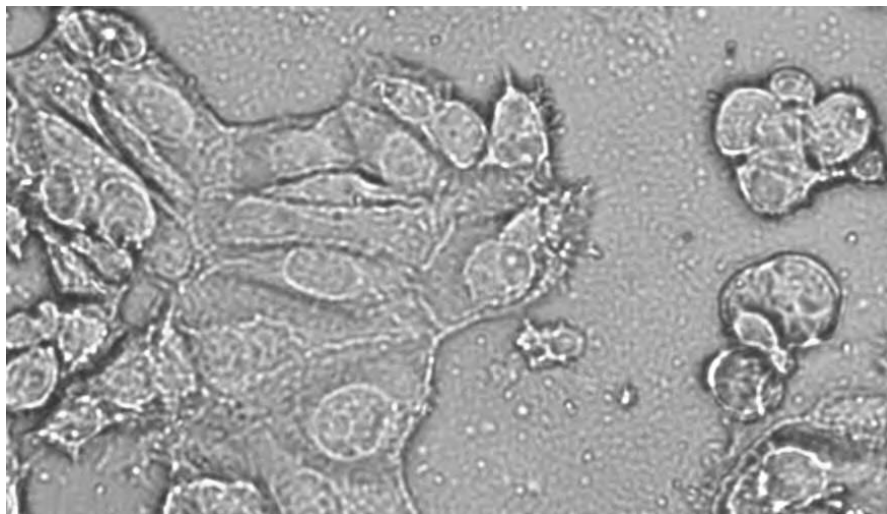
3.2.5.Elektron mikroskop incelemesi :

25 cm²'lik flasklara ekilerek konfluent hale gelmeleri beklenen hücreler, atorvastatin 10, 20 ve 80 μ M konstrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra %0.25 Tripsin-EDTA ile kaldırılıp 5 dakika 800 rpm'da santrifuj edilerek tüplerde pellet oluşturuldu. Oluşturulan hücre peleti %2 gluteraldehit ile 1 saat oda sıcaklığında tespit edildi. Tamponla yıkandıktan hücrelerin takip esnasında dağılmasını engellemek amacıyla agara gömülen hücre peletinin osmiyum tetroksit ile oda sıcaklığında 1 saat ikinci tespiti yapıldı. Tampon ile yıkandıktan sonra yükselen derecelerde alkollerden geçirilip, propilen oksitten sonra Epon 812'ye gömüldü. 60°C etüvde 48 saat ısı ile polimerizasyon sonrası ultramikrotomda yarı ince kesitleri alındı. 48 saatlik gruptan elde edilen bloklarda, görüntülenmek istenen kısım trimlendikten sonra ince kesitler gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanan gridler elektron mikroskobunda (Jeol 1400) incelendi. Hücreler, elektron mikroskobik olarak otofaji ve apoptoz ince yapı değişiklikleri yönünden incelenerek görüntülendi. Histolojik değerlendirmeleri yapıldı.

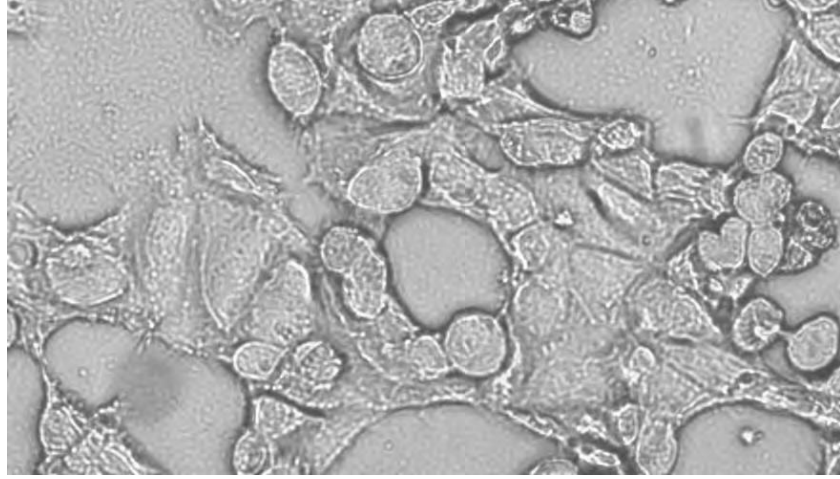
4.BULGULAR

4.1. MCF-7 HÜCRELERİNİN FAZ KONTRAST MİKROSKOBU İNCELEME BULGULARI

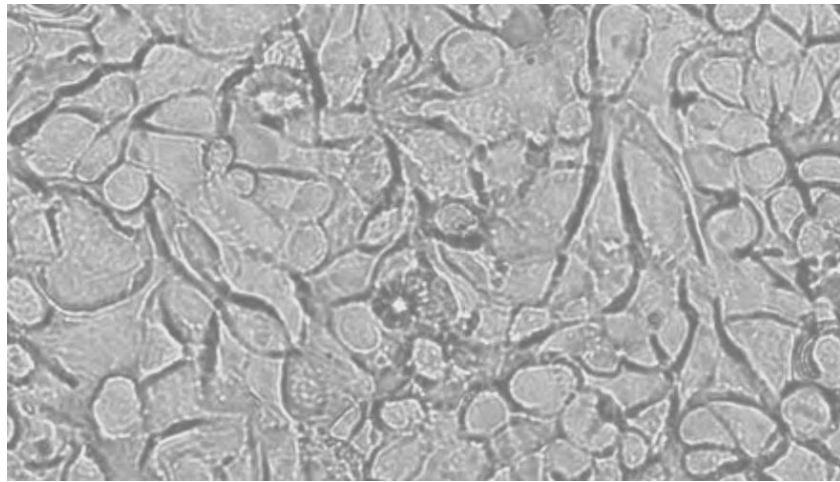
İn vitro ortamda azot saklama tankından dondurulmuş olarak çıkarılan MCF-7 hücreleri besiortamlarında çözöldükten sonra kültür kaplarına ekildi. Hücrelerin 48 saat sonra faz kontrast mikroskop değeriendirilmelerinde tutunmuş oldukları saptandı. Tutunan MCF-7 hücreleri proliferatif faza geçtiklerinde yaklaşık 3. günde %50, 5. günde %70, 7. günde ise %100 devamlılık ile tüm kültür kabını kaplamış olarak gözlendi (Resim 1,2,3). Tripsin EDTA ile muamele sonrası kaldırılan hücrelerin pasajlama sonrasında 24. saatte çok kuyucuklu plaklarda devamlılıkları saptandıktan sonra her gün faz kontrast mikroskopta görünömleri değeriendirilerek farklı hücre sikluslarını gösteren yeni mitozla bölünmüş oldukça küçük sitoplazmalı ve S fazının sonlarında olduğunu düşöndüren mitozla girmekte olan oldukça iri sitoplazmalı hücre çeşitliliğı gözlendi. 24 saat ilaçla muamele sonrasında, mitotik aktivite gösteren hücrelerin yanı sıra yuvarlak biçimli tutunmayan muhtemelen apoptotik hücreler ve sitoplazmasında koyu granöler yapılanma gösteren otofajik hücreler saptandı (Resim 4). 48 saat ilaca maruz bırakılan gruplarda ise konsantrasyon artışına bağılı olarak, hücrelerde dejeneratif değerişikliklerin yanı sıra tutunan hücre sayısının da gittikçe azalmış olduğı gözlendi (Resim 5,6).



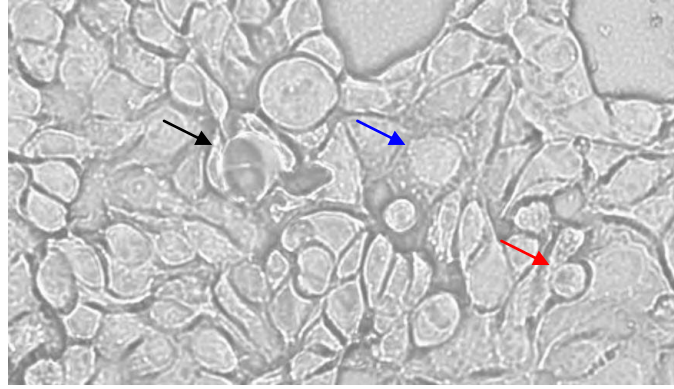
Resim 1: Faz kontrast mikroskopta pasajlandıktan sonra tutunup çoğalmaya başlayan 3.gündeki MCF-7 hücreleri (x40).



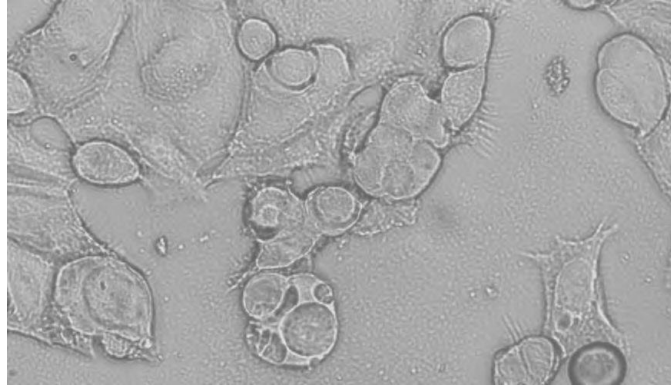
Resim 2: Faz kontrast mikroskopta 5.günde %70 devamlılık kazanan farklı hücre siklusundaki değişik büyüklükte izlenen MCF-7 hücreleri (x40).



Resim 3: Faz kontrast mikroskopta 7. günde %100 devamlılık kazanarak kültür kabının tabanını tamamen kaplayan, bazıları tutunan bazıları ise yuvarlak biçimli tutunma özelliğini yitirmekte olan MCF-7 hücreleri (x40).



Resim 4. Faz kontrast mikroskopta 24 saat ilaca maruz bırakılan mitotik aktivite gösteren (siyah ok), yuvarlak biçimli tutunmayan muhtemelen apoptotik (kırmızı ok), ve sitoplazmasında koyu granüler yapılanma gösteren otofajik (mavi ok) olabileceği düşünülen MCF-7 hücreleri (x40).



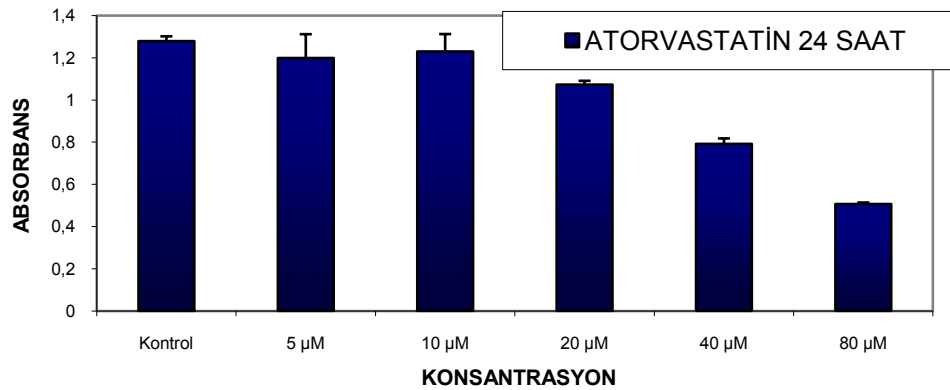
Resim 5: Faz kontrast mikroskopta 48 saat ilaca maruz bırakılan dejeneratif değişiklikler gösteren MCF-7 hücreleri (x40).



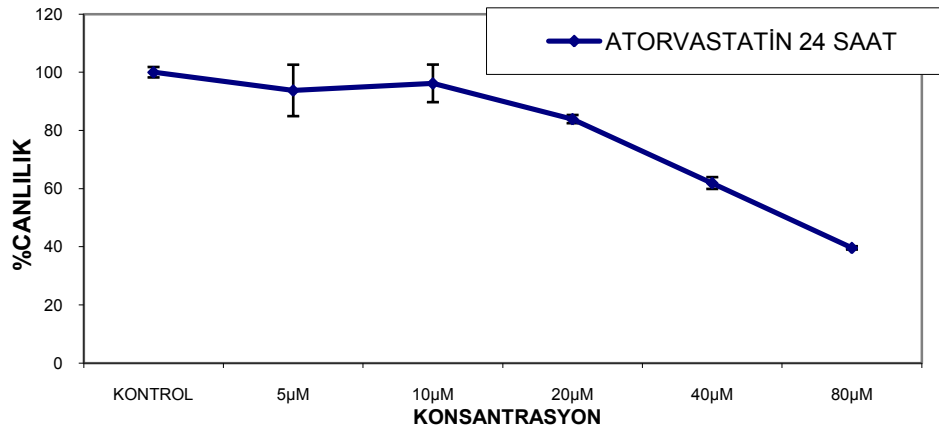
Resim 6: Faz kontrast mikroskopta 48 saat 80μM konsantrasyonda ilaca maruz bırakılan dejeneratif değişiklikler gösteren ve çoğu kaybedildiği için kültür kabında sayıca azalmış MCF-7 hücreleri (x40).

4.2.STATİNLERİN MCF-7 HÜCRELERİNDE DOZ VE ZAMANA BAĞLI SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN WST TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLME BULGULARI

MCF-7 hücrelerinin Atorvastatin, Simvastatin, Fluvastatin'nin farklı dozları ile (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μ M) 24 ve 48 saat inkübasyonu sonrasında hücre canlılığının WST testi ile değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar grafikler halinde sunulmaktadır. Atorvastatin ve fluvastatin uygulanan gruplardaki konsantrasyon ve zaman farklılığı (24 ve 48 saat) sitotoksitesinin, ve üç ilacın ortak konsantrasyonlarının sitotoksitesinin istatistiksel değerlendirilmesinde %95 güvenilirlik ile parametrik t-testi uygulandı. Simvastatin uygulanan grupların farklı konsantrasyonların karşılaştırılması Holm-Sidak methodu ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Simvastatinin 24 ve 48 saat doz uygulamasının sitotoksiste açısından farklılığının değerlendirilmesinde t-testi kullanıldı.

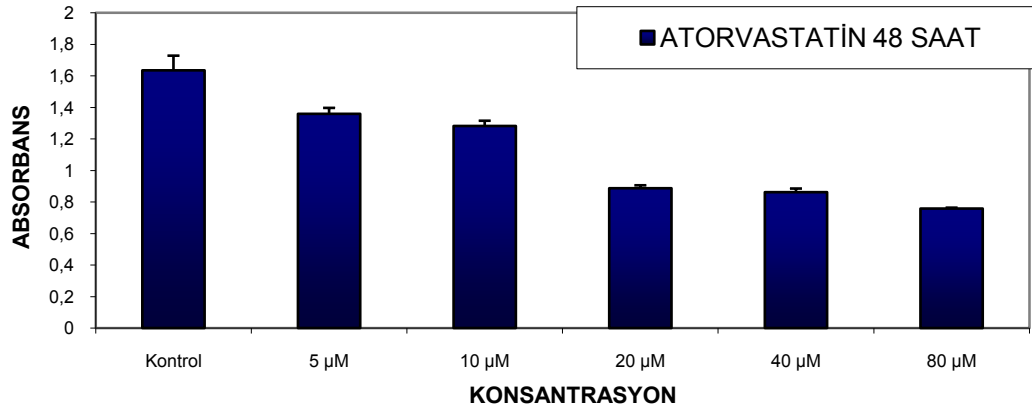


Grafik 1: WST-1 testi ile atorvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 saat sitotoksitesi

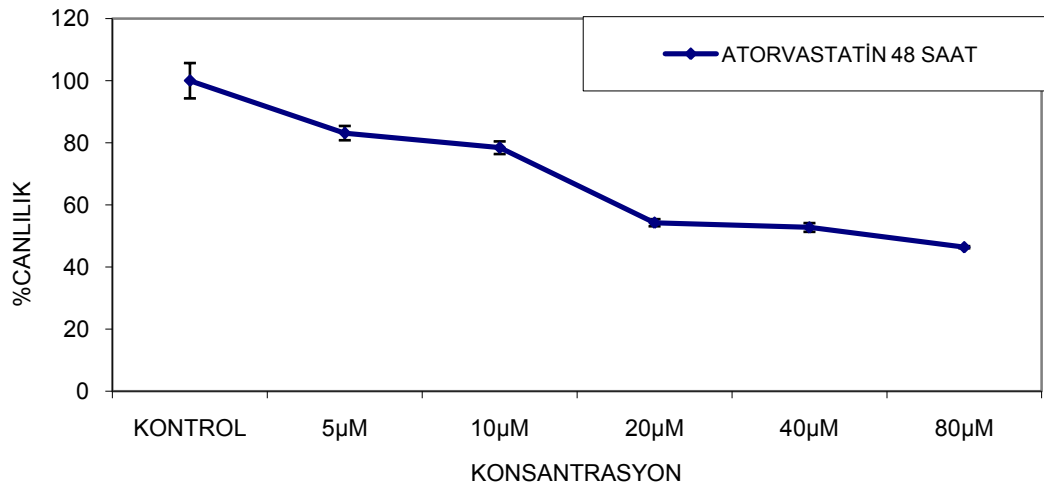


Grafik 2 : WST-1 testi ile atorvastatinin farklı konsantrasyonlarının 24 saat uygulanması sonrasında MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri (Yüzde değerleri tedavi uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla elde edilmiştir.)

Atorvastatinin farklı dozlarıyla 24 saat muamele sonrası elde edilen hücre canlılığının değerlendirildiği grafiklerde (Grafik 1,2) kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığındaki ilk istatistiksel anlamlı azalma atorvastatin 20µM dozunda saptandı ($P < 0,001$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında atorvastatin 20, 40 ve 80µM tedavisi sonrasında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma izlendi ($P < 0,001$, $P < 0,001$, $P < 0,001$). Kontrol grubu ile atorvastatin 5µM, 10µM uygulanan hücre grupları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P = 0,525$, $P = 0,646$). Atorvastatinin 80µM konsantrasyonunun MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksitesi diğer dozlarına oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksekti ($P < 0,001$). Atorvastatin 10 ve 20µM dozları arasında hücre proliferasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($P = 0,075$). Atorvastatin 5µM ile 10µM ve 20µM konsantrasyonu uygulanan hücre grupları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P = 0,827$, $P = 0,191$).



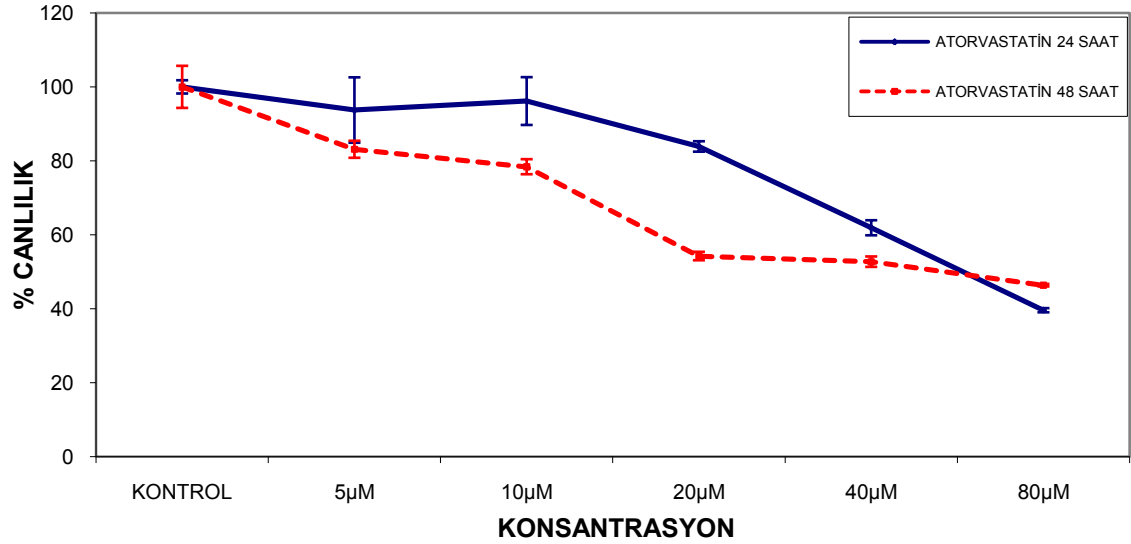
Grafik 3 : WST-1 testi ile atorvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki 48 saat sitotoksitesi



Grafik 4: MCF-7 hücrelerinin atorvastatinin farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmesi sonrasındaki canlılık yüzdeleri.

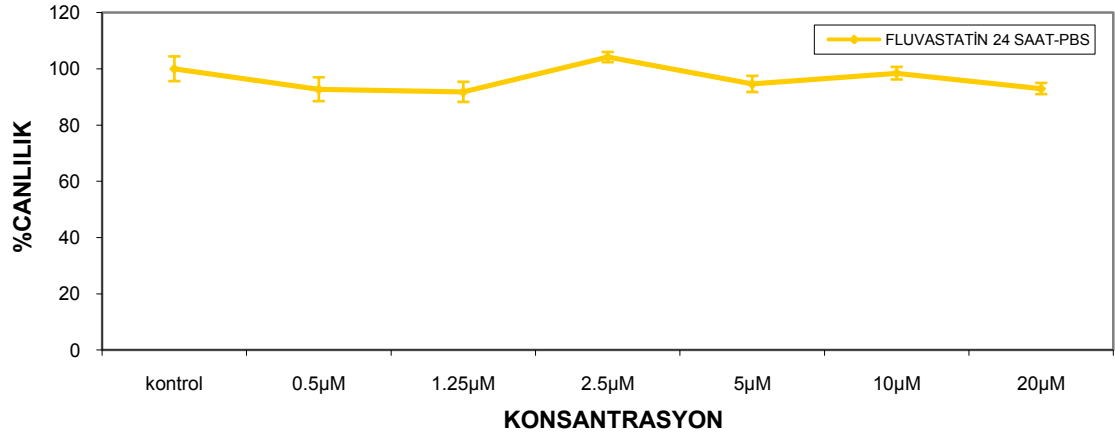
Atorvastatinin 5, 10, 20, 40, 80µM dozlarıyla 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen hücre canlılığı değerleri ile çizilen grafikde(Grafik 4) kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığındaki ilk düşüş atorvastatin 5µM dozundadır ($P = 0,025$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında atorvastatinin tüm dozlarında (5, 10, 20, 40, 80µM) ilaç doz artışına paralel hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($P = 0,025$, $P = 0,015$, $P < 0,001$, $P < 0,001$, $P < 0,001$). Atorvastatin 5

ve 10 μ M (P = 0,184) ile 20 ve 40 μ M (P = 0,410) dozları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Diğer tüm dozlar arasında doz artışıyla hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı saptandı (P <0,001).



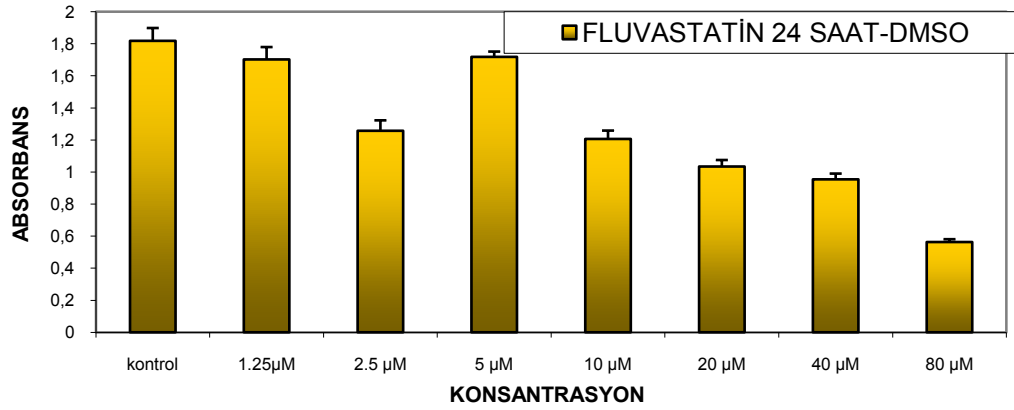
Grafik 5: WST-1 testi ile atorvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki zamana bağlı sitotoksitesi

MCF-7 hücre dizilerinin atorvastatin 24 ve 48 saat grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında her iki grupta da hücre canlılığında ilacın artan dozuna paralel olarak azalma olduğu belirlendi (Grafik 5). Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen hücre gruplarında 24 saatlik gruplara kıyasla daha belirgin sitotoksite gözlemlendi. Atorvastatinin 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M konsantrasyonunun 48 saat uygulamaları ve 24 saat uygulamaları arasında hücre canlılığını düşürme açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. (P = 0,039, P <0,001, P = 0,006). Atorvastatinin 5 μ M konsantrasyonunda zamana bağlı sitotoksite açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (P:0.393).

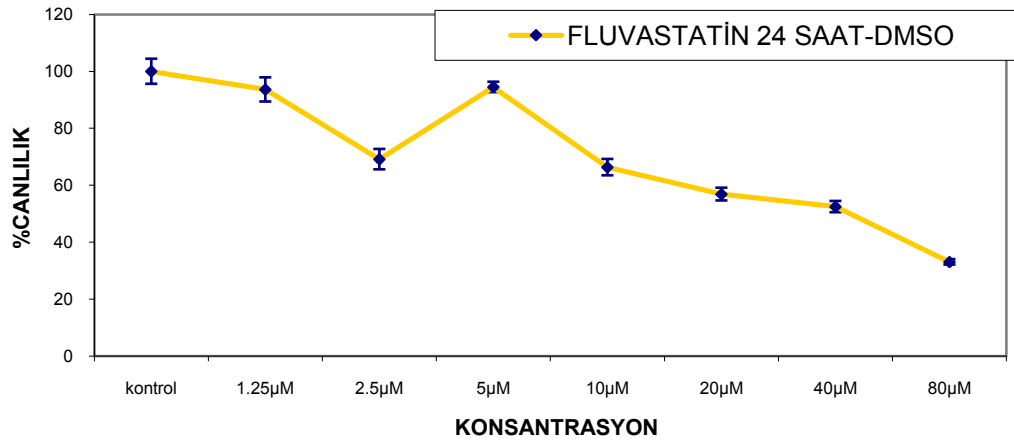


Grafik 6: WST testi ile MCF-7 hücrelerinde PBS’de çözünerek hazırlanan farklı fluvastatin konsantrasyonlarının 24 saat sitotoksitesi.

MCF-7 hücre dizisinde fluvastatinin PBS’de çözünerek hazırlanan farklı konsantrasyonları ile 24 saat tedavi sonrasında gruplar arasında sitotoksite açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Grafik 6). Fluvastatin uygulanan gruplarda kontrol grubuna yakın değerlerde hücre canlılığı saptanması, fluvastatinin MCF-7 hücrelerine etkin doz ve şekilde verilmediğini düşündürdü. Fluvastatinin PBS’de çözünürlüğünden şüphe duyularak, deneyler fluvastatin konsantrasyonlarının DMSO’da çözünerek hazırlanması sonrasında tekrarlandı. Fluvastatinin daha yüksek konsantrasyonlarının da MCF-7 hücrelerinin sitotoksitesi üzerine etkisinin araştırılması uygun görüldü.



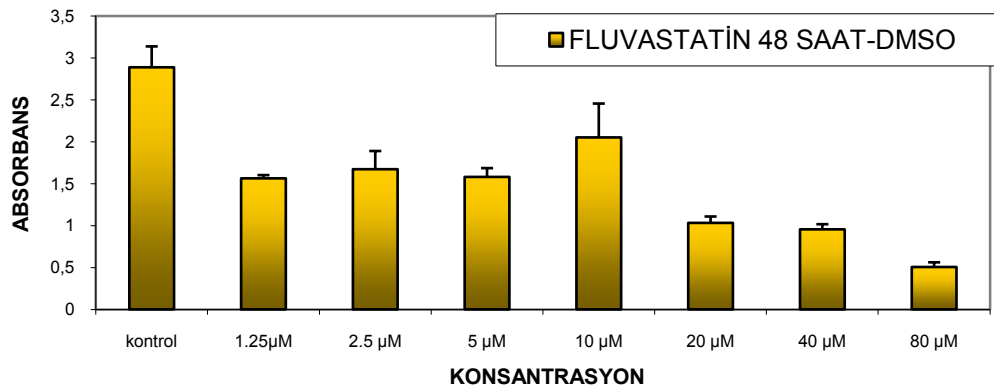
Grafik 7: WST-1 testi ile MCF-7 hücrelerinde fluvastatinin DMSO’da çözünerek hazırlanan farklı konsantrasyonlarının 24 saat sitotoksitesi.



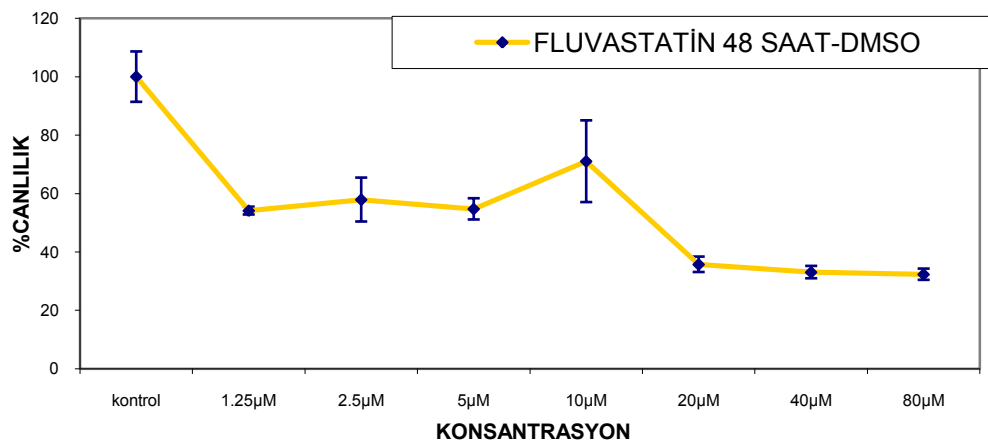
Grafik 8: MCF-7 hücrelerinin fluvastatinin farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonrasındaki canlılık yüzdeleri.

MCF-7 hücrelerine 24 saat DMSO’da çözünerek hazırlanan, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80µM fluvastatin konsantrasyonları uygulandıktan sonra WST ile elde edilen hücre proliferasyon değerlerinden çizilen grafiğe göre; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1.25µM ($P = 0,396$) ve 5µM ($P = 0,387$) dozları dışındaki fluvastatinin diğer tüm dozlarında ilaç doz artışına paralel hücre canlılığında

istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma saptandı ($P < 0,001$). Fluvastatinin 1.25 μM ve 5 μM ($P = 0,838$), 2.5 ve 10 μM ($P = 0,559$), 20 ve 40 μM ($P = 0,180$) dozları arasında fluvastatin sitotoksitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Diğer tüm dozlar arasında doz artışıyla hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($P < 0,001$). Fluvastatinin 80 μM konsantrasyonunun MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksitesi diğer dozlarına oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksekti ($P < 0,001$) (Grafik 7,8).

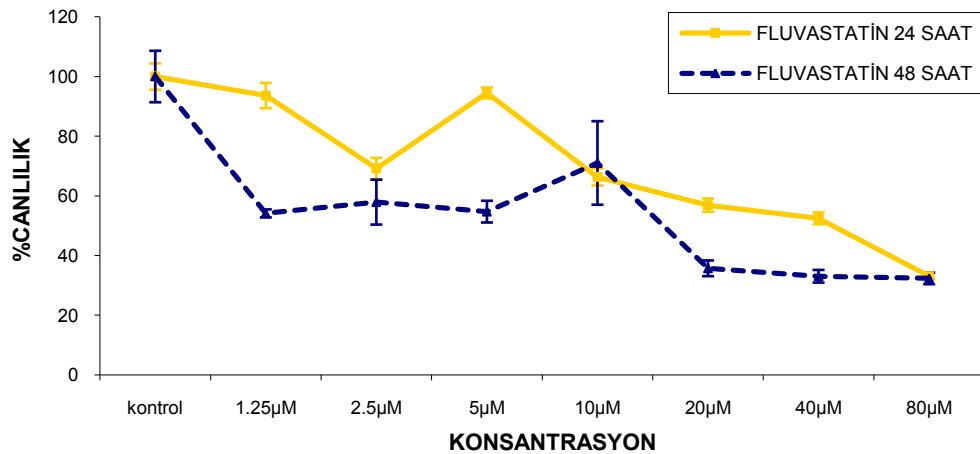


Grafik 9: WST-1 testi ile MCF-7 hücrelerinde fluvastatinin DMSO’da çözünerek hazırlanan farklı konsantrasyonlarının 48 saat sitotoksitesi.



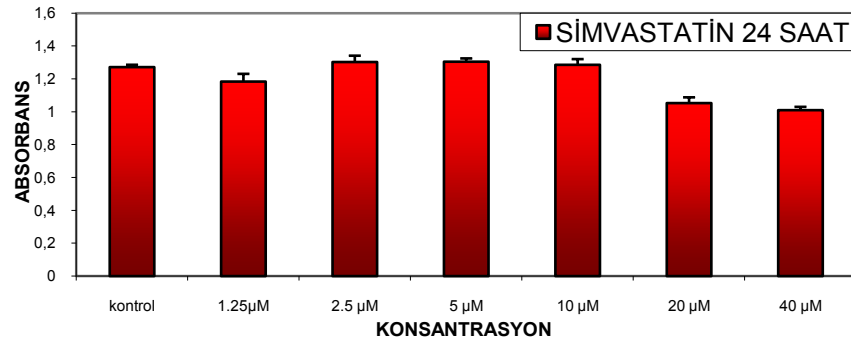
Grafik 10: MCF-7 hücrelerinin DMSO’da çözünerek hazırlanan farklı fluvastatin konsantrasyonları ile 48 saat muamele sonrasındaki canlılık yüzdeleri.

MCF-7 hücrelerine 48 saat DMSO' da çözünerek hazırlanan, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μ M fluvastatin konsantrasyonları uygulandıktan sonra WST ile elde edilen hücre canlılığı değerlerinden çizilen grafiğe göre; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10 μ M ($P=0,128$) dozu dışındaki tüm dozlarında, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma saptandı ($P=0,003$, $P = 0,008$, $P = 0,003$, $P = <0,001$, $P = 0,002$, $P<0,001$). Fluvastatin 80 μ M dozunun MCF-7 hücreleri üzerine olan sitotoksitesi, diğer tüm dozlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksekti ($P<0.001$). Fluvastatinin 1.25 μ M ve 2.5 μ M ($P = 0,632$) ; 2.5 ve 5 μ M ($P = 0,713$); 5 ve 10 μ M ($P=0.200$); 20 ve 40 μ M ($P=0.514$); dozları arasında sitotoksite açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Grafik 9,10).

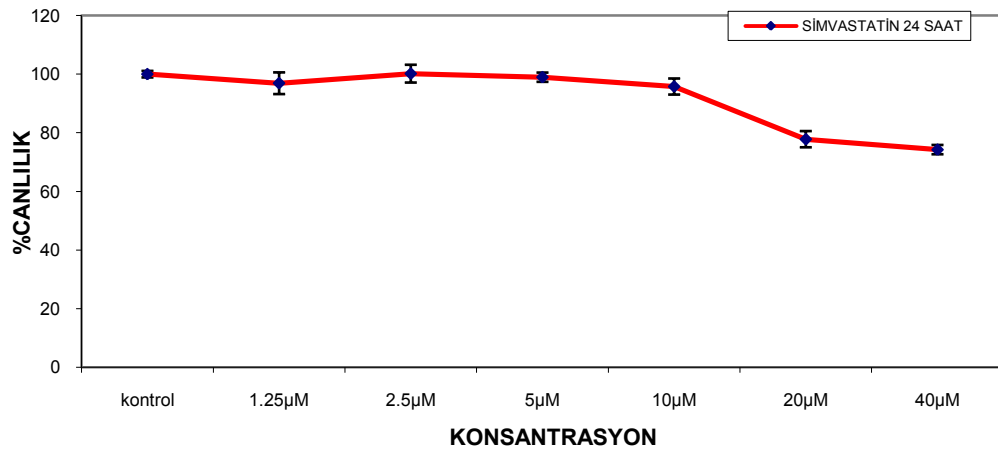


Grafik 11: WST-1 testi ile Fluvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki zamana bağlı sitotoksitesi

MCF-7 hücre hattında, fluvastatinin zamana bağlı sitotoksitesi incelendiğinde fluvastatinin 1.25, 5, 20, 40 μ M konsantrasyonlarının 48 saat uygulanan gruplardaki sitotoksitesi, 24 saat uygulanan gruplardan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksekti ($P<0,001$, $P <0,001$, $P = 0,008$, $P<0,001$). Fluvastatinin 2.5 ve 10 μ M konsantrasyonlarının sitotoksitesinde zamana bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P=0.257$, $P=0.682$) (Grafik 11).



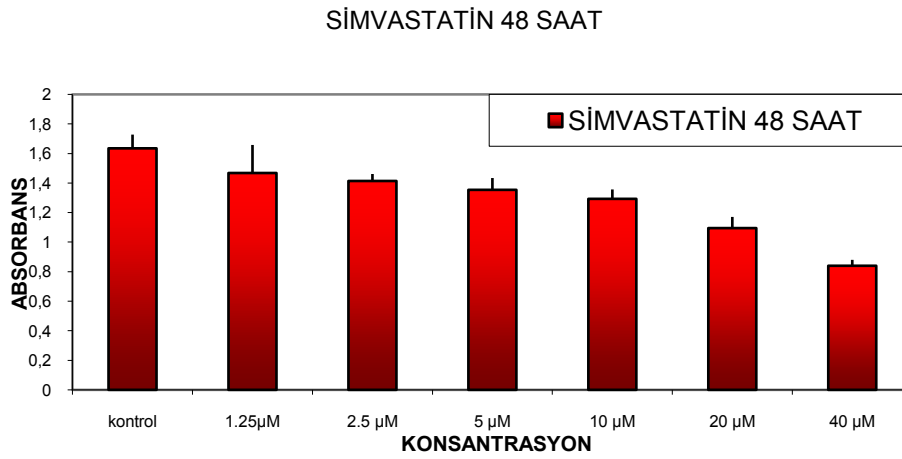
Grafik 12: WST-1 testi ile simvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 saat sitotoksitesi.



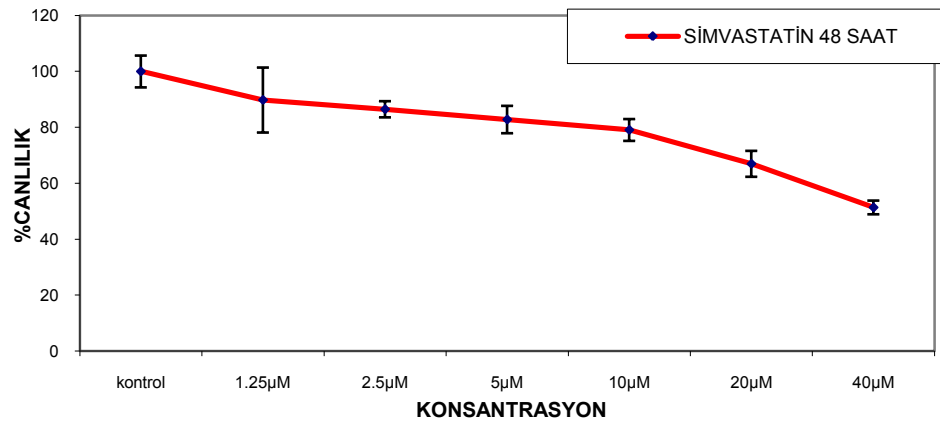
Grafik 13: MCF-7 hücrelerinin 24 saat farklı konsantrasyonlarda simvastatin ile muamele sonrasında canlılık yüzdeleri.

Simvastatinin farklı dozlarıyla 24 saat muamele sonrası elde edilen hücre canlılığı değerleri ile çizilen grafiklerde kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığındaki ilk istatistiksel olarak anlamlı azalma simvastatin 5µM dozunda saptandı ($P=0,017$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında simvastatin 10µM ($P=0,00452$), 20µM ve 40µM tedavisi sonrasında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı

azalma izlendi ($P < 0,001$). Simvastatin 40 μM 'in MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksitesi diğer dozlarına oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksekti ($P < 0,001$). Simvastatinin 2.5 μM ve 5 μM ($P = 0,955$) ; 5 μM ve 10 μM ($P = 0,671$) ; 20 μM ve 40 μM ($P=0.306$); dozları arasında sitotoksite açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Simvastatinin farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamele sonrasında MCF-7 hücrelerinde %50 sitotoksite saptanmadı (Grafik 12,13).

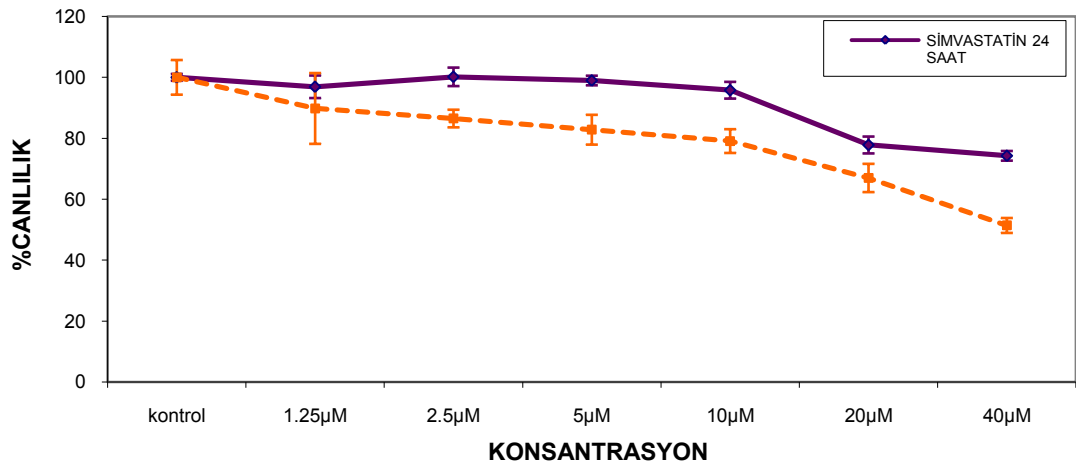


Grafik 14: WST-1 testi ile simvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki 48 saat sitotoksitesi.



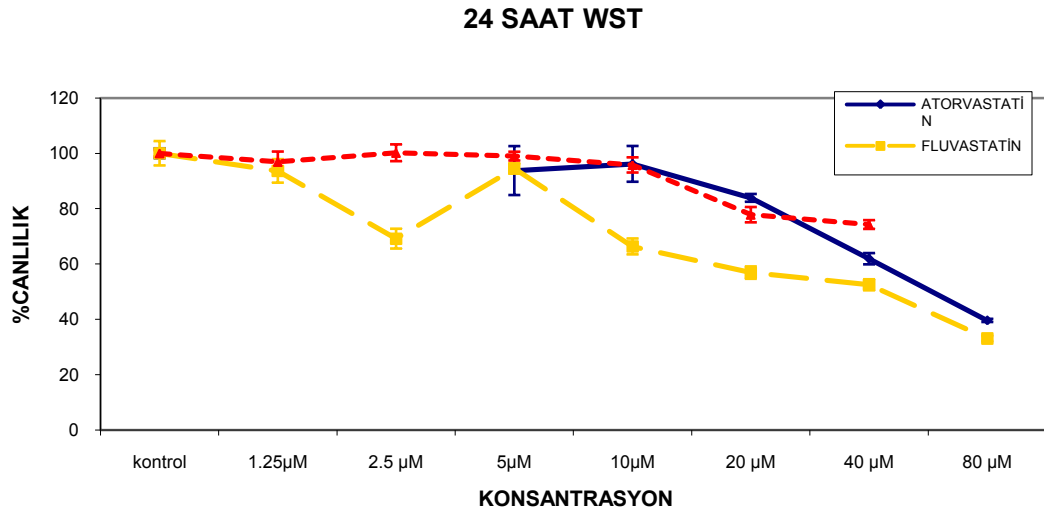
Grafik 15: MCF-7 hücrelerinin 48 saat farklı konsantrasyonlarda simvastatin ile muamele sonrası canlılık yüzdeleri.

Simvastatinin farklı dozlarıyla 48 saat muamele sonrası elde edilen absorban değerleri ile çizilen grafikte kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığındaki ilk istatistiksel anlamlı düşme atorvastatin 5 μ M dozunda saptandı ($P=0,017$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında simvastatin 5, 10, 20, 40 μ M tedavisi sonrasında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma izlendi ($P=0,017$ $P=0,00452$, $P<0,001$, $P<0,001$). Simvastatinin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesi 40 μ M konsantrasyonunda en belirgindi. Simvastatin 40 μ M'in MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksitesi diğer dozlardan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksekti ($p<0,001$). Simvastatin 10 ve 20 μ M dozları arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($P = 0,853$) (Grafik 14,15).

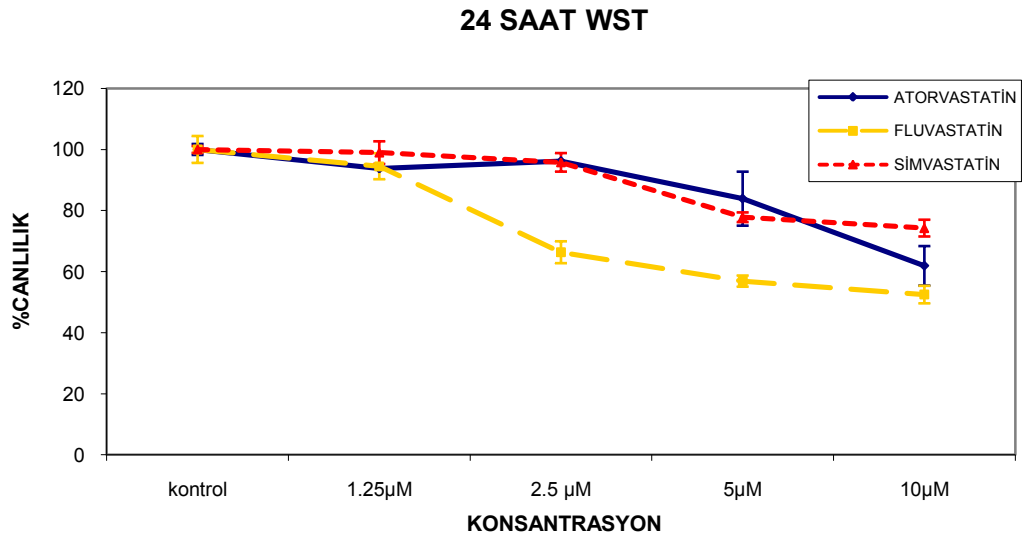


Grafik 16: WST-1 testi ile simvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki zamana bağlı sitotoksitesi.

MCF-7 hücre dizilerinin simvastatin 24 ve 48 saat grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında simvastatinin 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M uygulama konsantrasyonlarında sitotoksitesite açısından zamana bağlı istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ($P = 0,005$, $P=0,016$, $P=0,003$, $P=0,019$, $P=<0,001$). Simvastatinin 1.25 μ M konsantrasyonunun sitotoksitesinde zamana bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P=0.767$) (Grafik 16).



Grafik 17: WST testi ile Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 saat sitotoksiteleri.

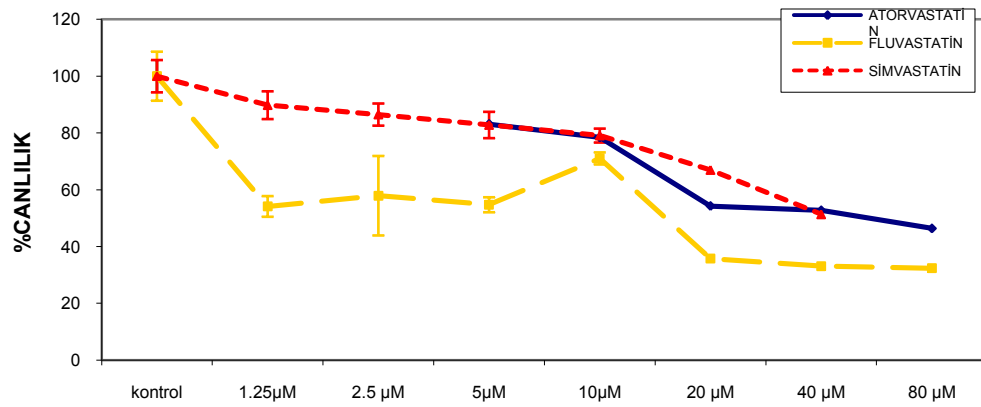


Grafik 18: WST testi ile Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin ortak konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 saat sitotoksiteleri

Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 saat sitotoksiteleri karşılaştırıldığında 10µM, 20µM ve 40µM konsantrasyonlarında fluvastatinin sitotoksitesi, simvastatin ve atorvastatinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek saptandı. (Atorvastatin-Fluvastatin $P = 0,003$, $P < 0,001$, $P = 0,010$;

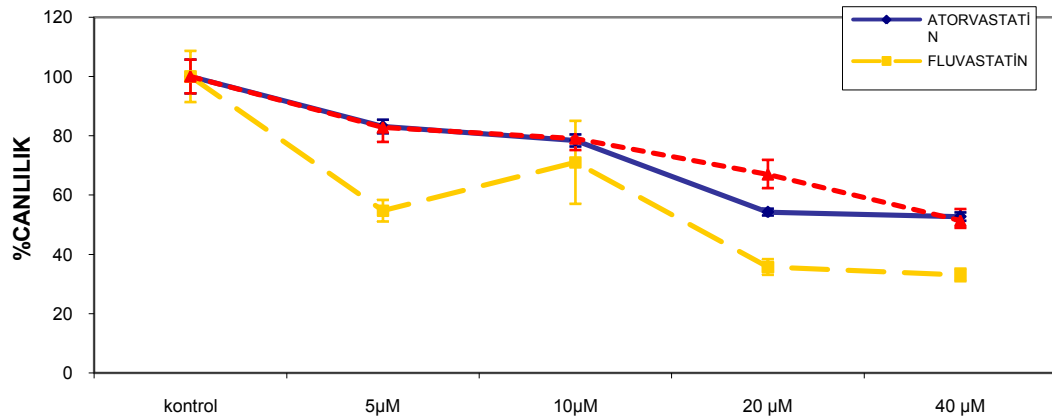
Simvastatin-Fluvastatin ($P < 0,001$, $P < 0,001$, $P < 0,001$). $40\mu\text{M}$ konsantrasyonu uygulanan hücre gruplarında atorvastatinin sitotoksitesi, simvastatin sitotoksitesinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek saptandı ($P < 0,001$). Atorvastatin ve simvastatinin $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ ve $20\mu\text{M}$ konsantrasyonu uygulanan MCF-F hücre gruplarında sitotoksite açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P = 0,571$, $P = 0,510$, $P = 0,744$) (Grafik 17,18).

48 SAAT WST SONUÇLARI



Grafik 19: WST testi ile Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki 48 saat sitotoksiteleri.

48 SAAT WST SONUÇLARI



Grafik 20: WST testi ile Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin ortak konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki 48 saat sitotoksiteleri.

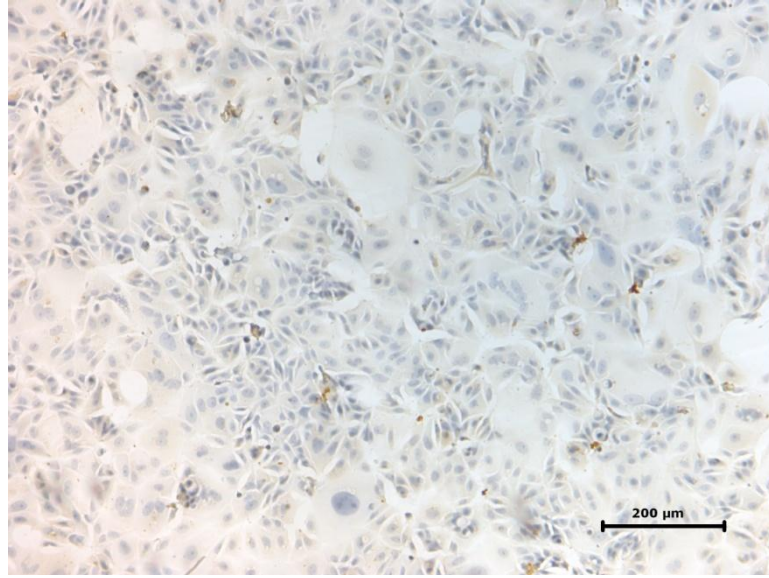
Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin MCF-7 hücreleri üzerindeki 48 saat sitotoksiteleri karşılaştırıldığında 5 μ M, 20 μ M ve 40 μ M konsantrasyonlarında fluvastatinin sitotoksitesi, simvastatin ve atorvastatinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek saptandı. (Atorvastatin-Fluvastatin; $P < 0,001$, $P < 0,001$, $P < 0,001$; Simvastatin-Fluvastatin $P = 0,002$, $P = 0,008$, $P = 0,002$). 20 μ M konsantrasyonu uygulanan hücre gruplarında atorvastatinin sitotoksitesi, simvastatin sitotoksitesinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek saptandı ($P = 0.029$) . Atorvastatin ve simvastatinin 5,10 ve 40 μ M konsantrasyonu uygulanan MCF-F hücre gruplarında sitotoksite açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P=0,963$, $P = 0,898$, $P = 0,655$) (Grafik 19,20).

Elde edilen sitotoksite grafiklerinin değerlendirilmesi sonucunda apoptoz ve otofaji testlerinde simvastatin, atorvastatin ve fluvastatinin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonlarının uygulanmasına karar verildi.

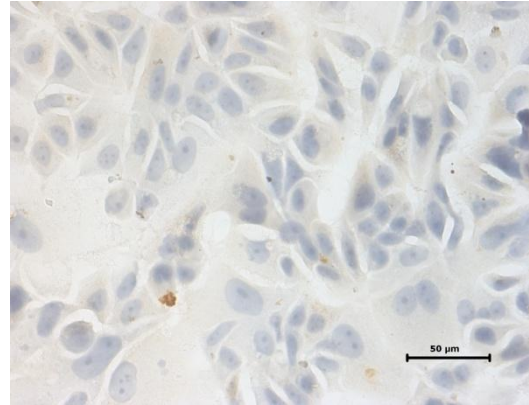
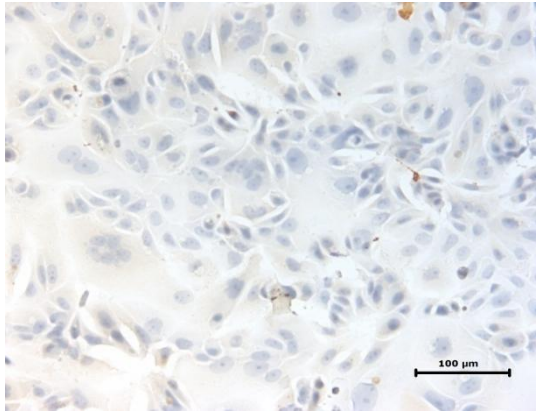
4.3. STATİN GRUBU İLAÇLARIN MCF-7 HÜCRELERİ ÜZERİNE APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMİŞ BULGULARI

4.3.1.TUNEL Yöntemi ile Elde Edilen Bulgular:

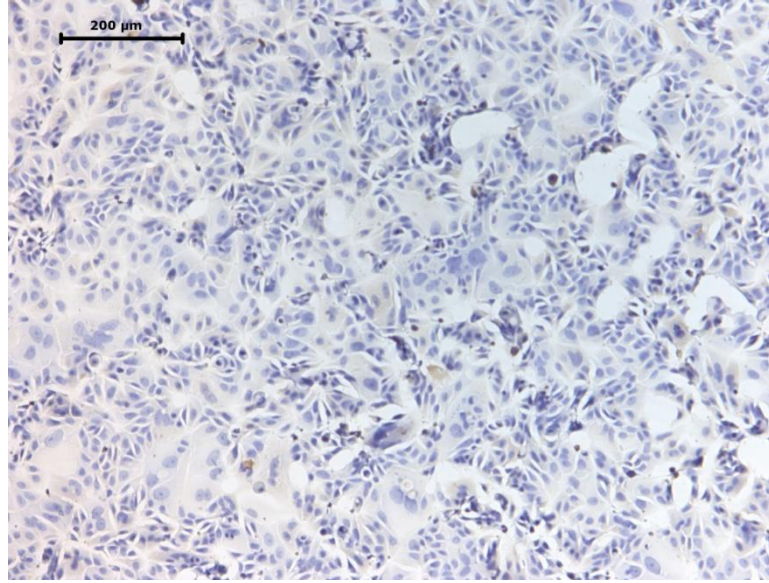
Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin 10 μ M, 20 μ M, 80 μ M dozlarıyla 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinde, apoptotik hücre ölümüne karakteristik olan DNA fragmentasyonunu gösteren TUNEL methodu uygulandıktan sonra koyu kahverengi kromatin yoğunlaşması görülen hücreler TUNEL pozitif apoptotik hücreler olarak yorumlandı. Gruplardan elde edilen TUNEL fotoğrafları sunulmaktadır.



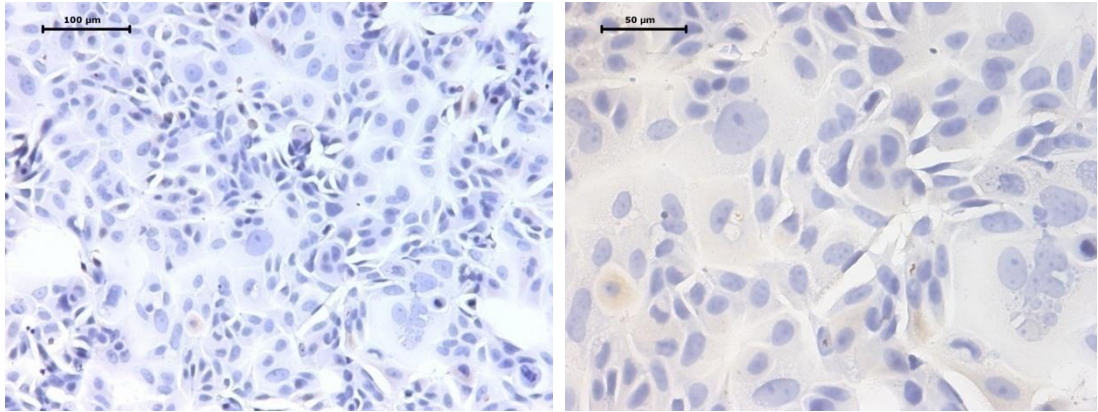
Resim 7: TUNEL yönteminin negatif kontrol grubunda MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x100).



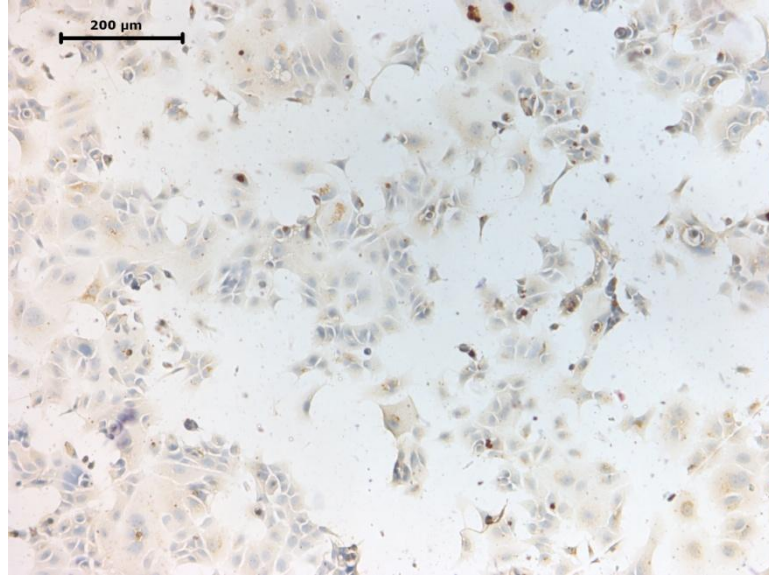
Resim 8: Negatif kontrol grubunda TUNEL pozitif apoptotik hücreler izlenmemektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x200, x400).



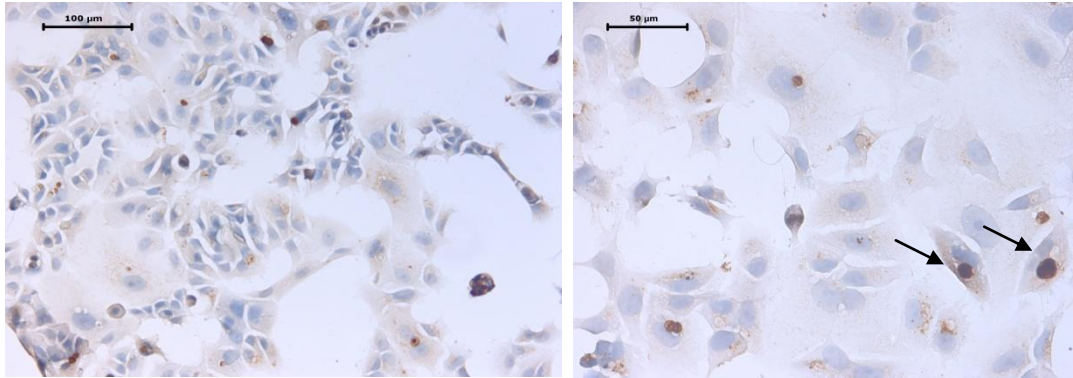
Resim 9: 24 saat kontrol grubundaki MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x100).



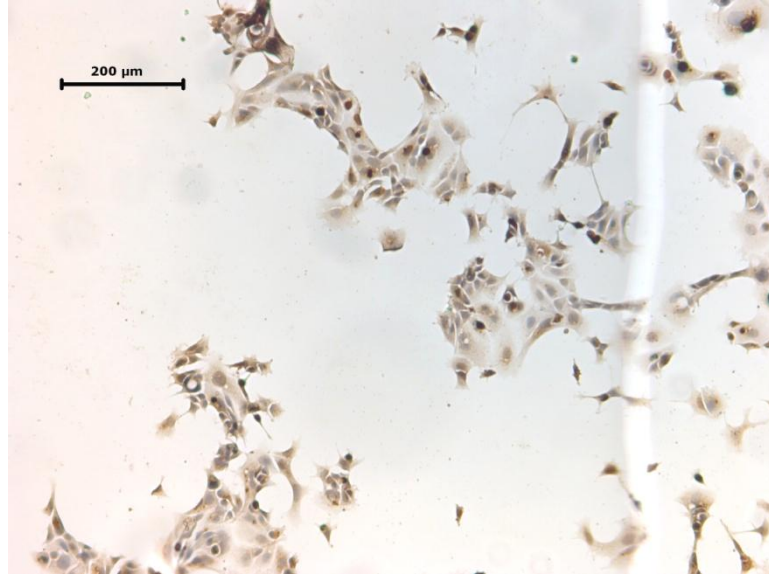
Resim 10: 24 saat kontrol grubunda az sayıda TUNEL pozitif apoptotik hücre izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x200, X400).



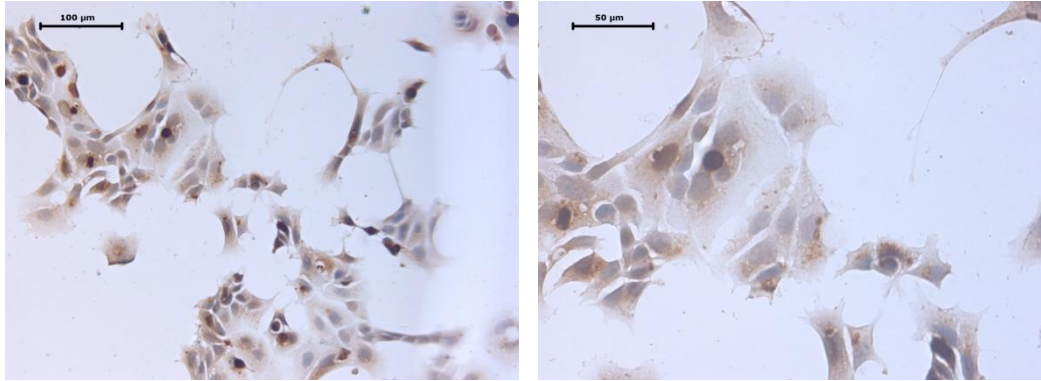
Resim 11: 10µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x100).



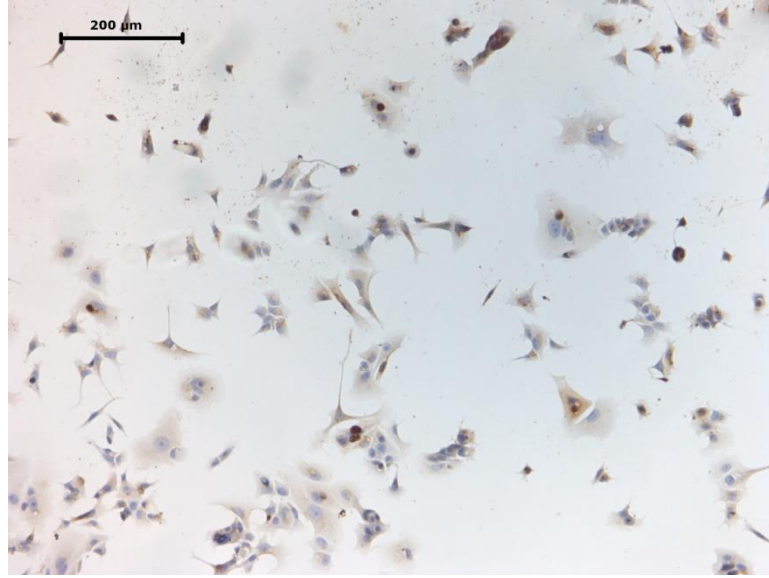
Resim 12: 10µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x200, X400).



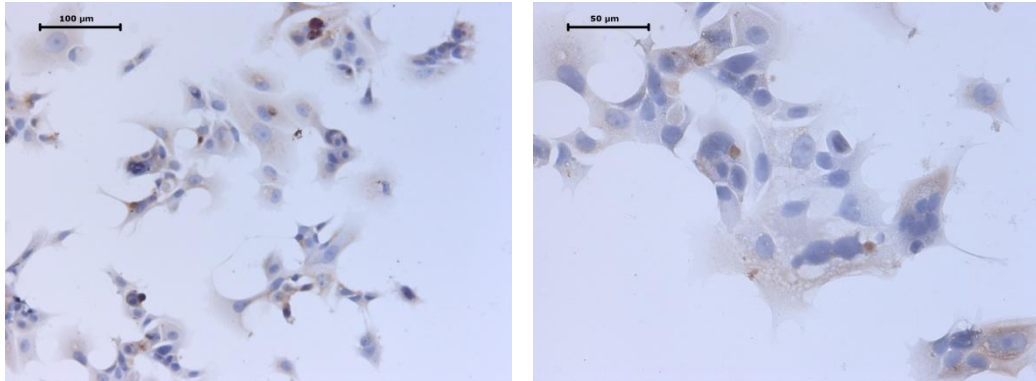
Resim 13: 20µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha az sayıda MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).



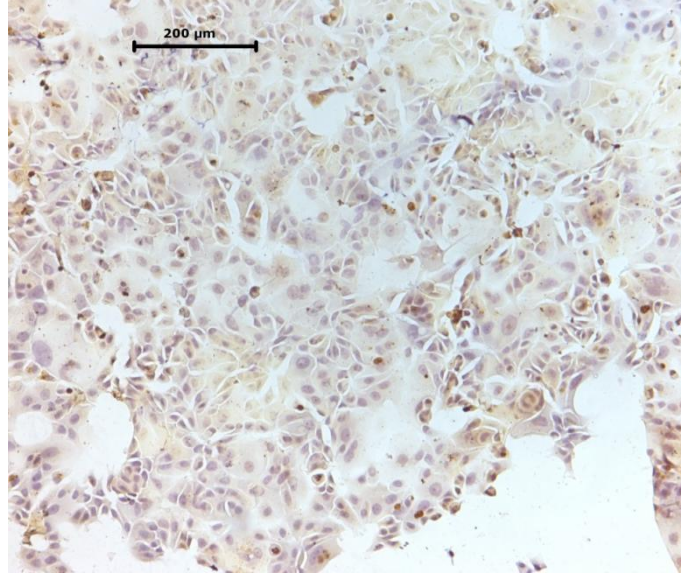
Resim 14: 20µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha çok sayıda TUNEL pozitif MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).



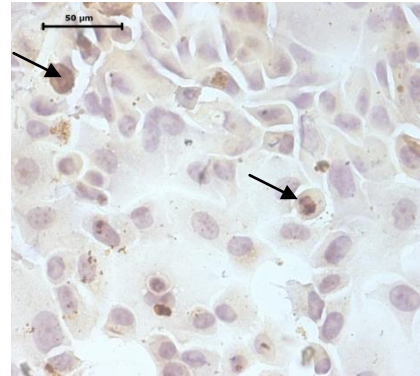
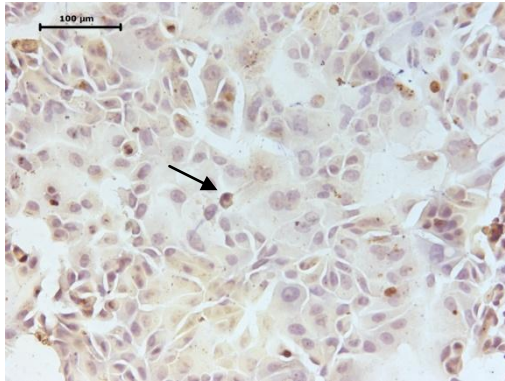
Resim 15: 80μM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır(TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x100).



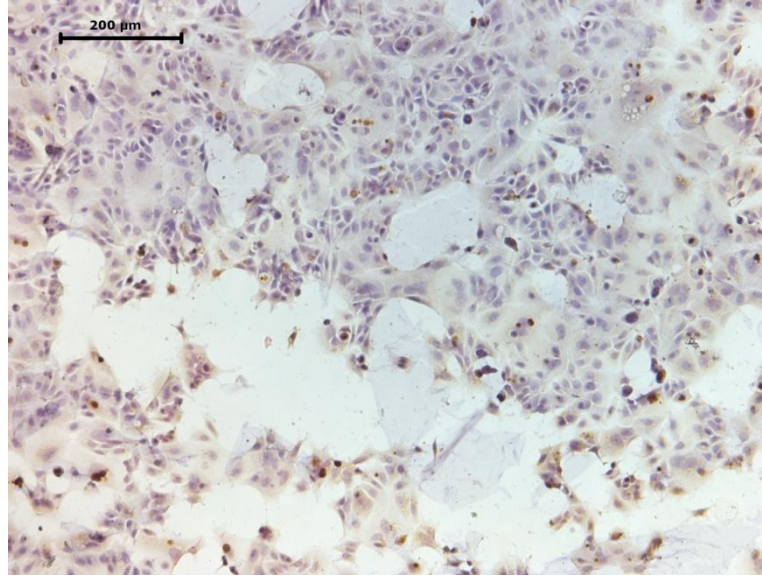
Resim 16: 80μM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x200, X400).



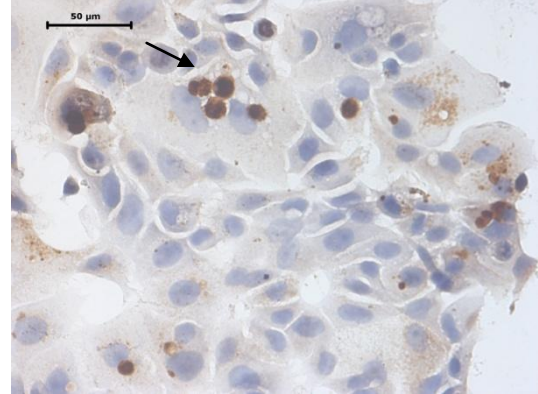
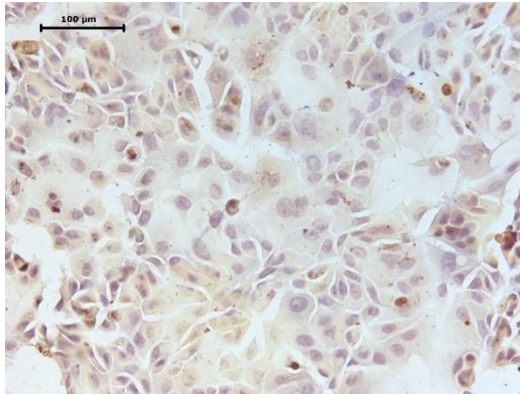
Resim 17: 10μM Simvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x100).



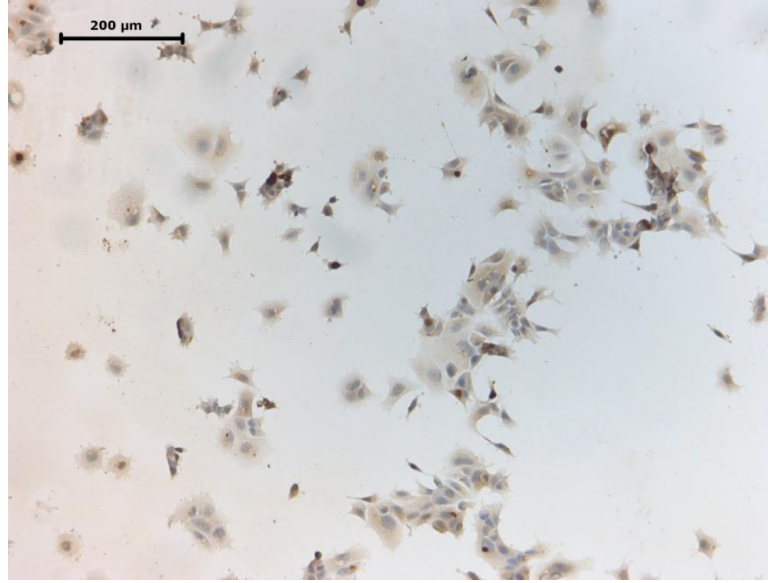
Resim 18: 10μM Simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x200, X400).



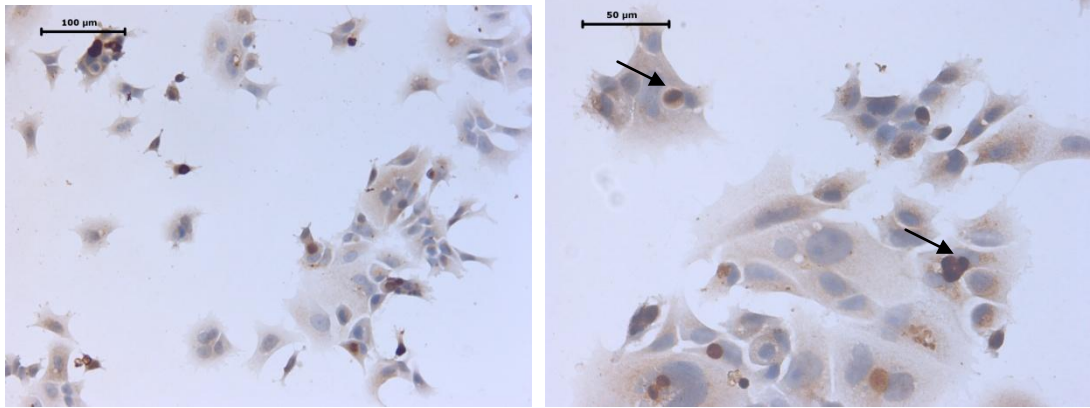
Resim 19: 20μM Simvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha az sayıda MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoxilen, x100).



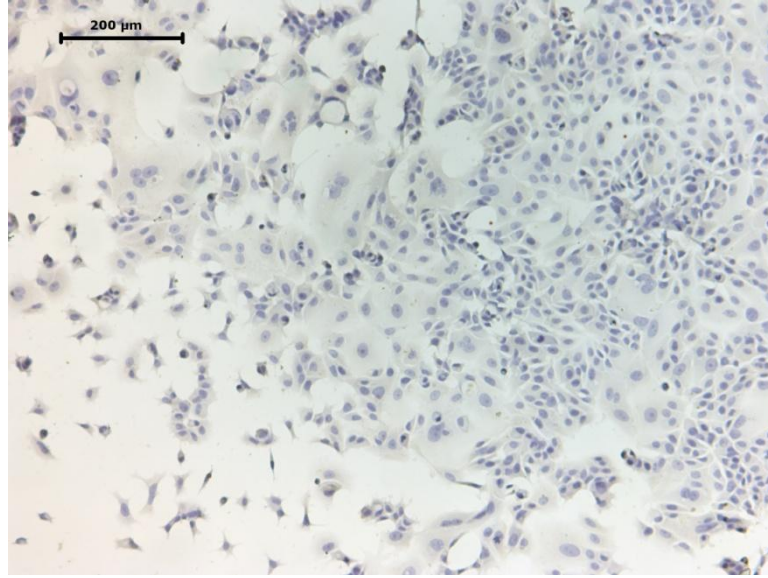
Resim 20: 20μM Simvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoxilen, x200, X400).



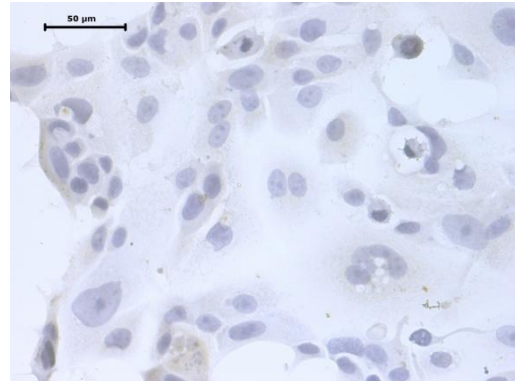
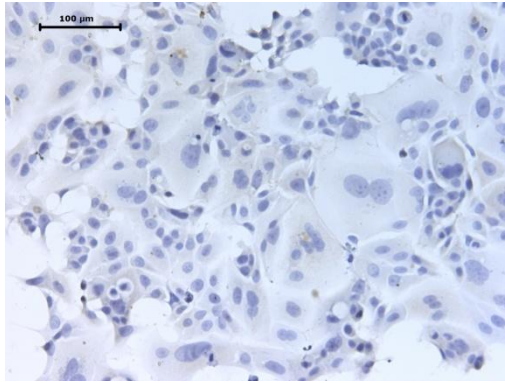
Resim 21: 80µM Simvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen , x100).



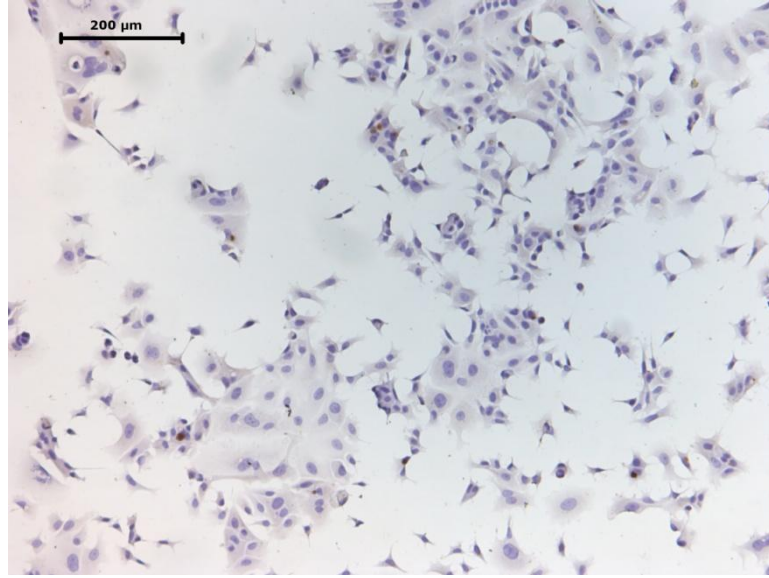
Resim 22: 80µM Simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).



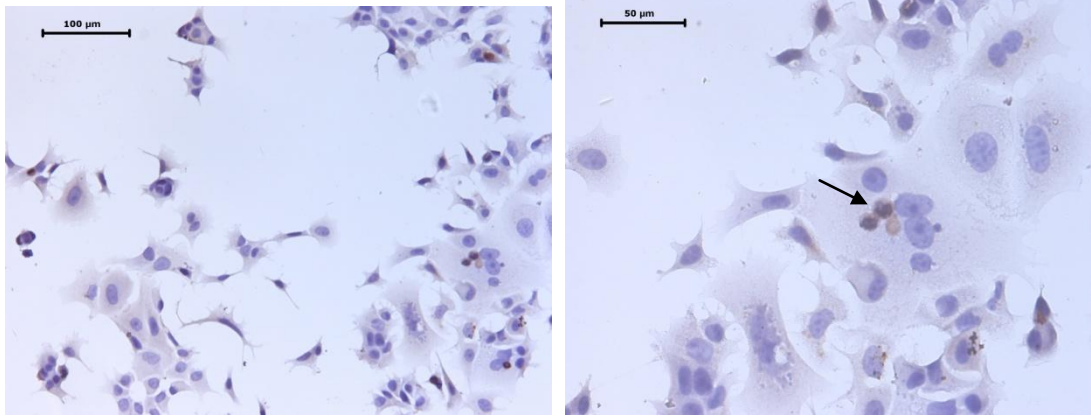
Resim 23: 10μM Fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x100).



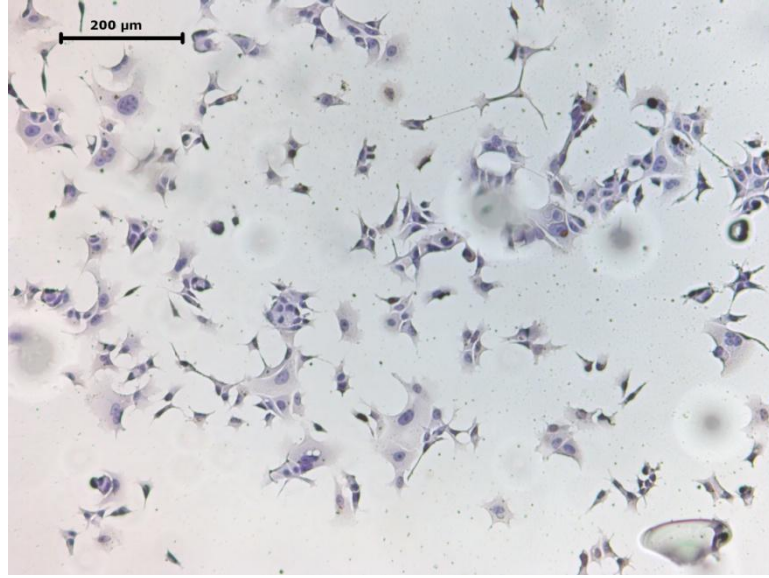
Resim 24: 10μM Fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x200, X400).



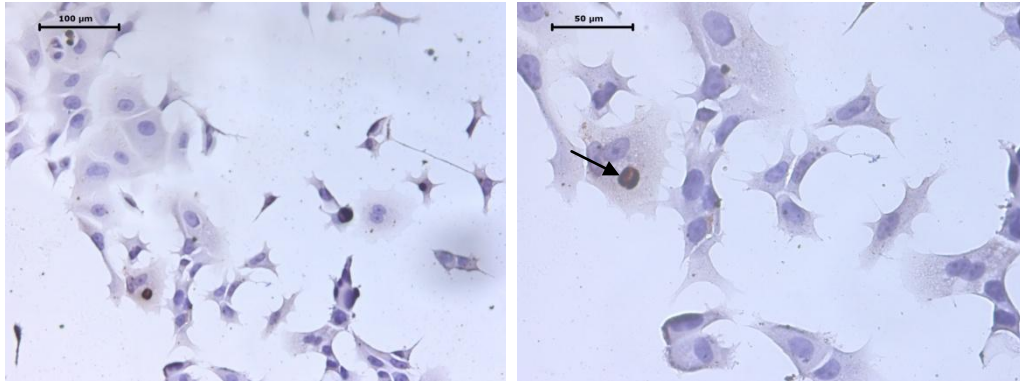
Resim 25: 20μM Fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x100).



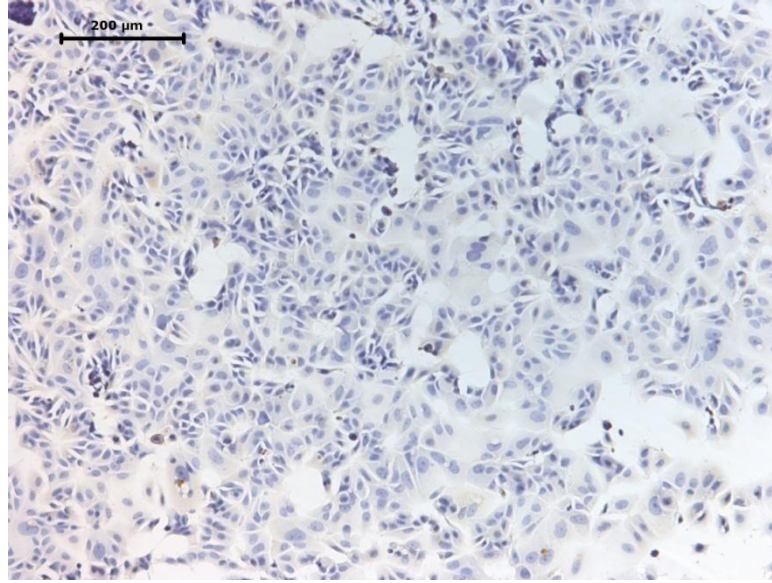
Resim 26: 20μM Fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, X200, X400).



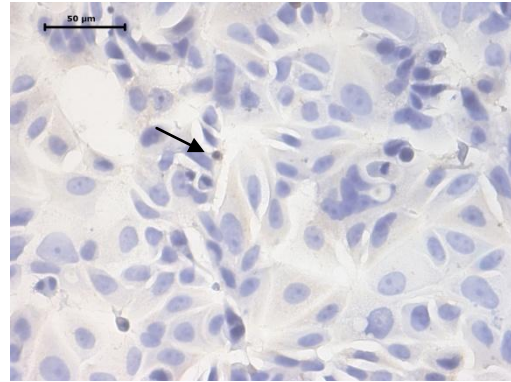
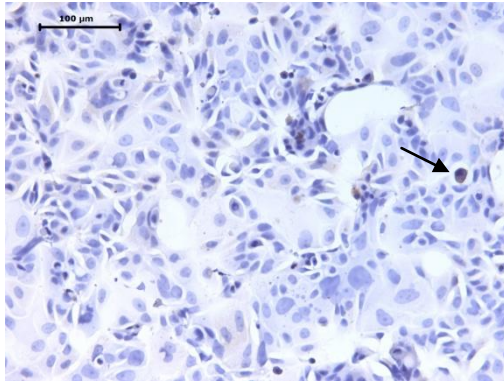
Resim 27: 80μM Fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır(TUNEL, çekirdek boyası hematoksislen, x100).



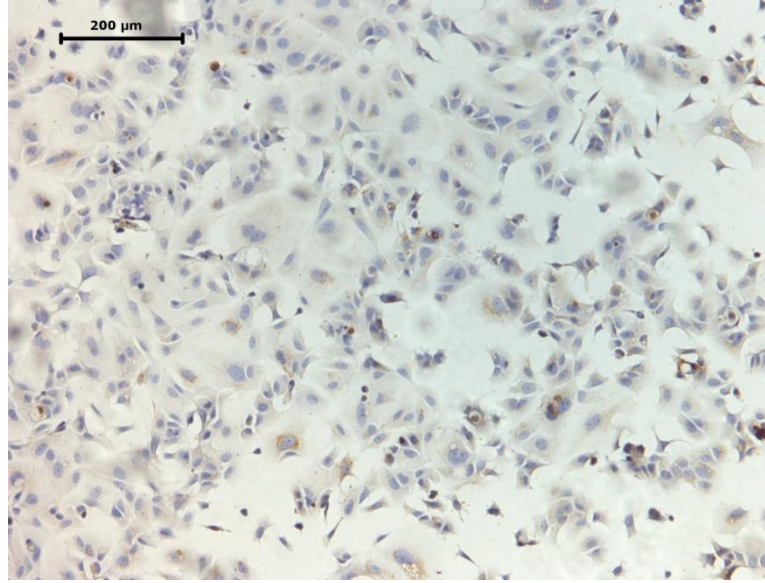
Resim 28: 80μM Fluvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksislen, x200, X400).



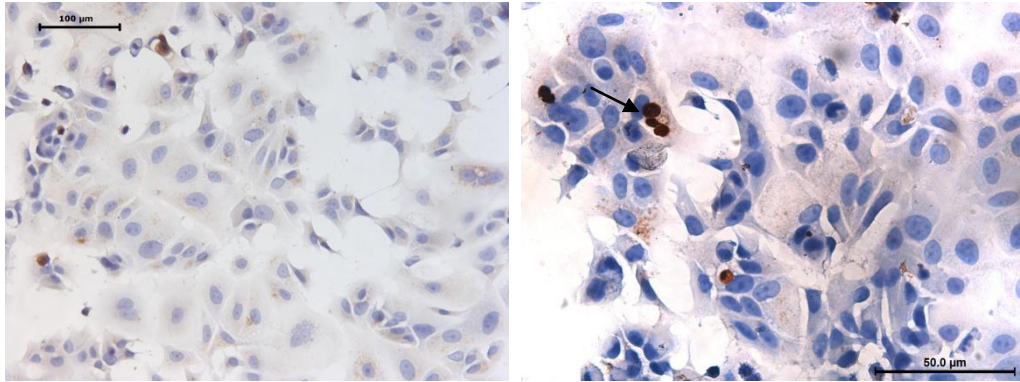
Resim 29: 48 saat kontrol grubundaki MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).



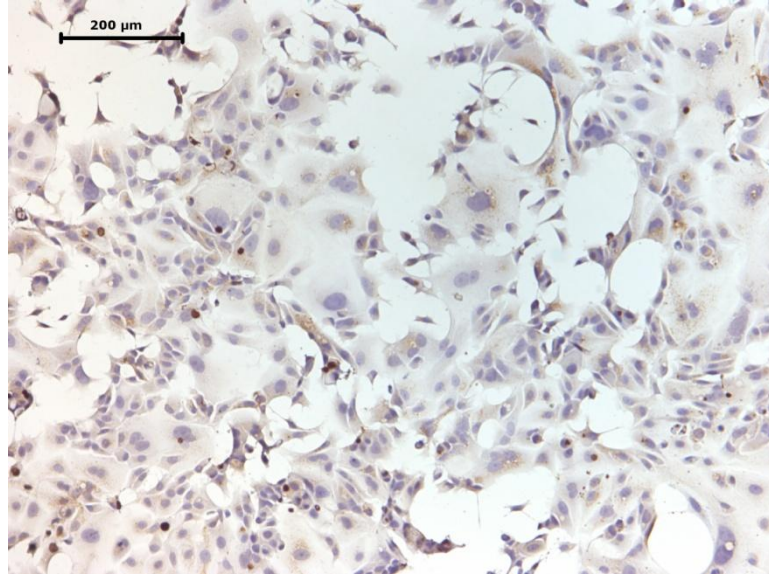
Resim 30: 48 saat kontrol grubunda az sayıda TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, x400).



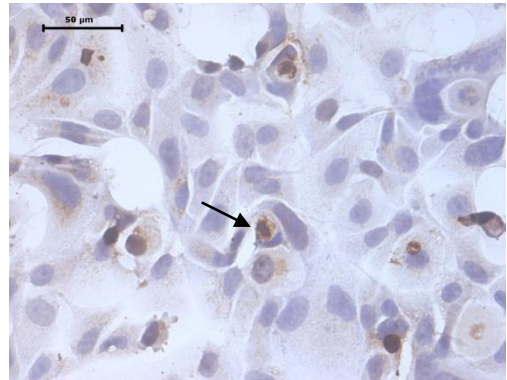
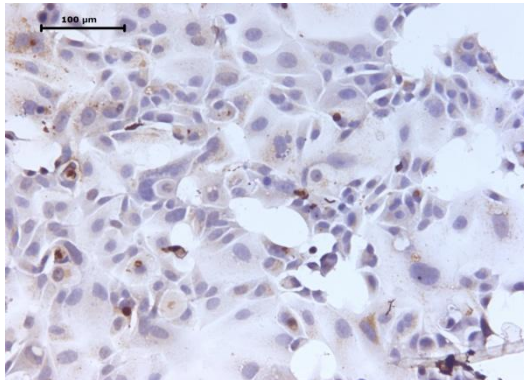
Resim 31: 10μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x100).



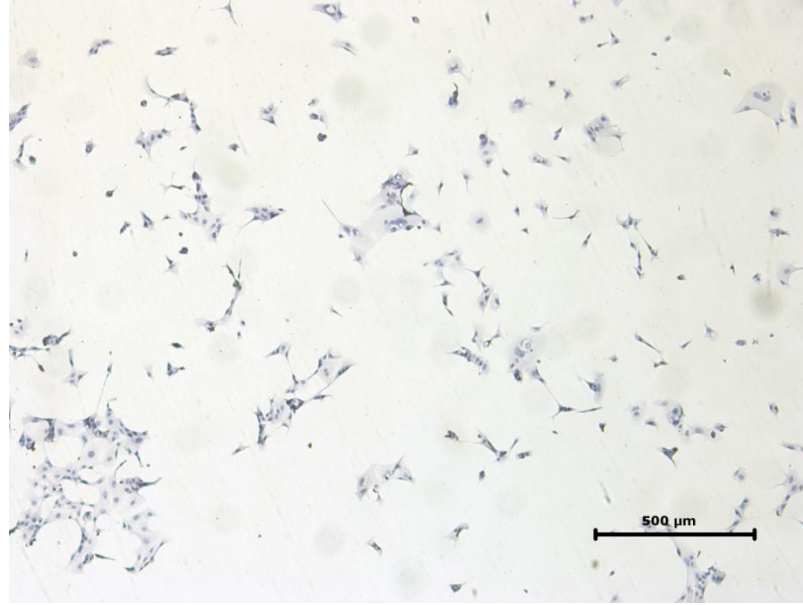
Resim 32: 10μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksisilen, x200, X400).



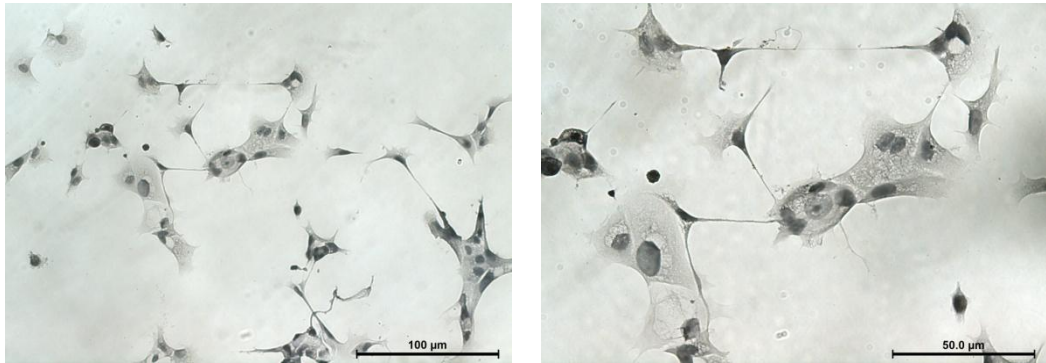
Resim 33: 20μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha az sayıda MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).



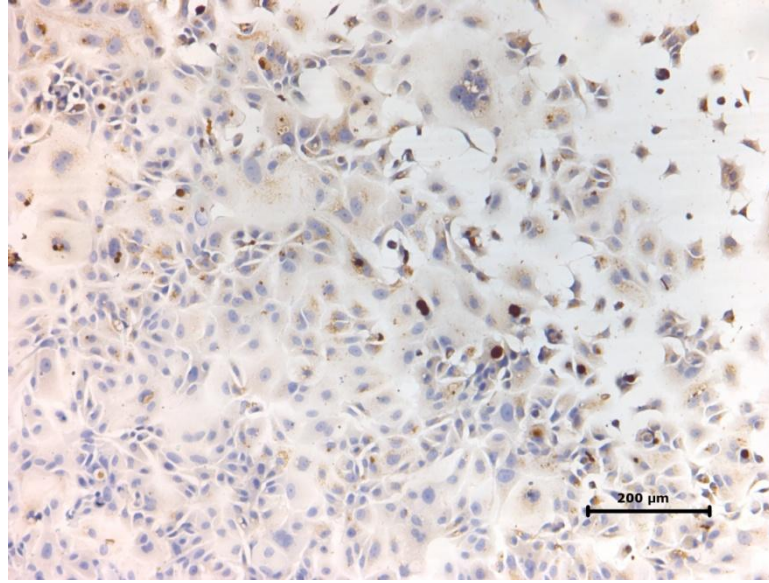
Resim 34: 20 μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha çok sayıda TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).



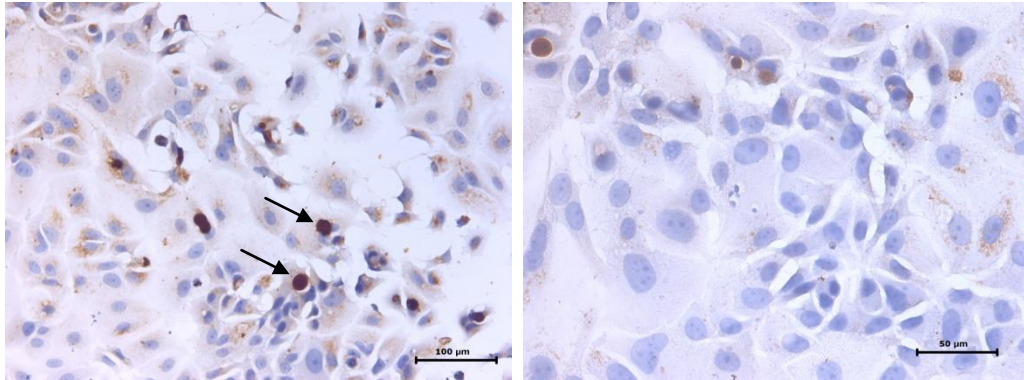
Resim 35: 80µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100)



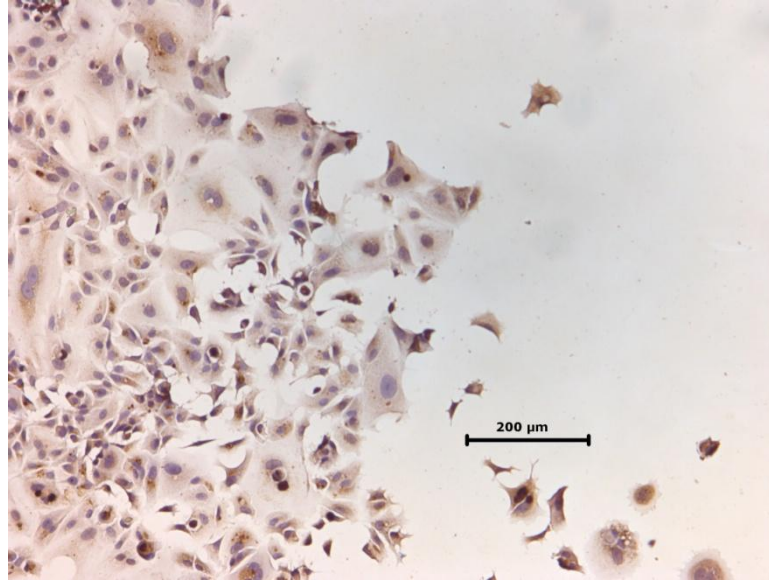
Resim 36: 80µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta az sayıda TUNEL pozitif MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).



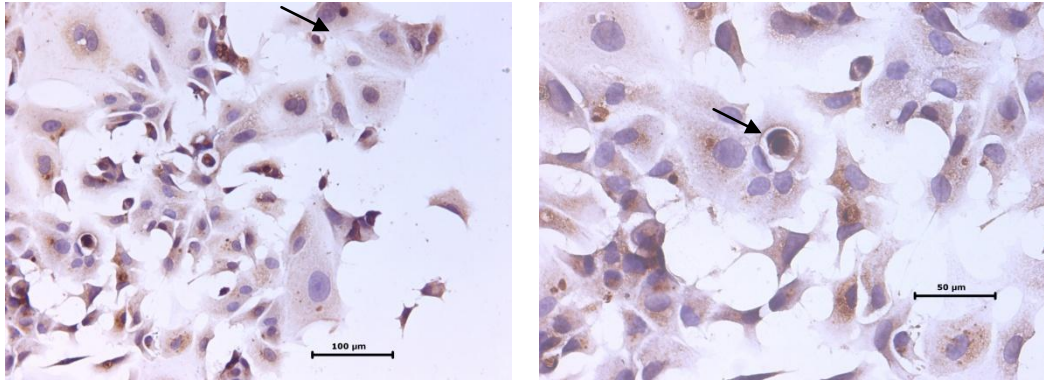
Resim 37: 10µM Fluvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı.(TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x100)



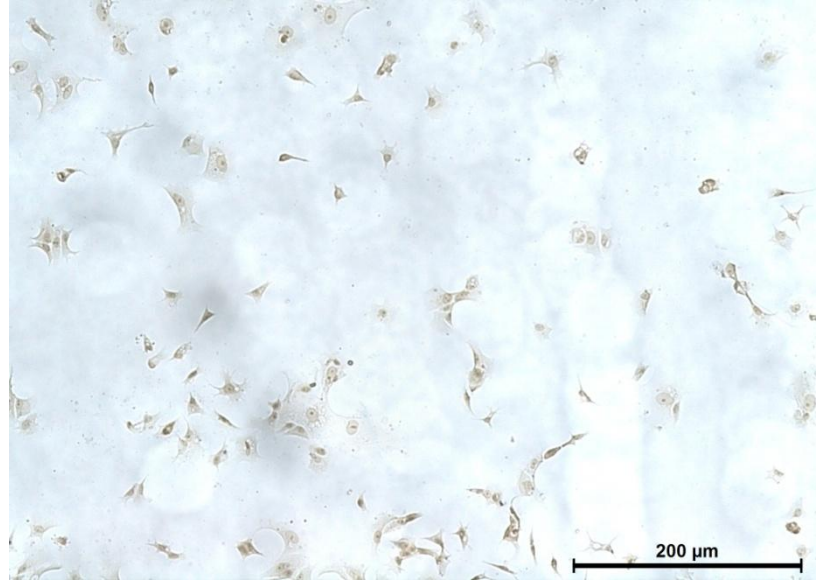
Resim 38: 10µM Fluvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilin, x200, X400).



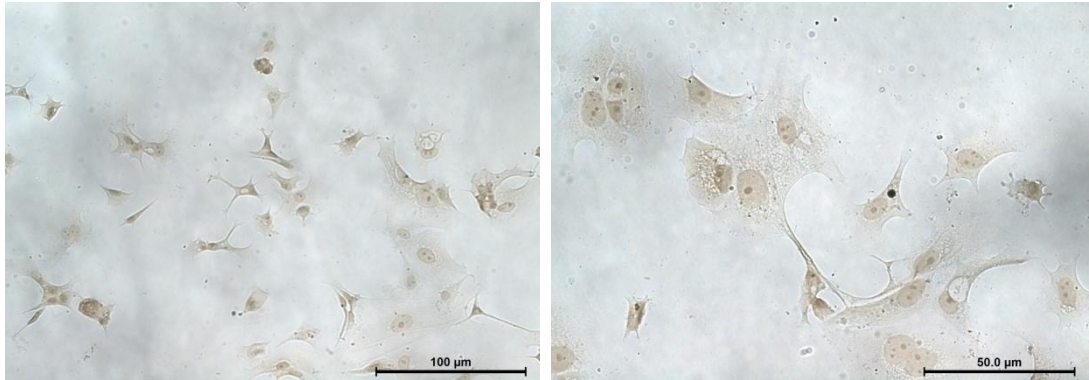
Resim 39: 20µM Fluvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha az sayıda MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoxilen, x100).



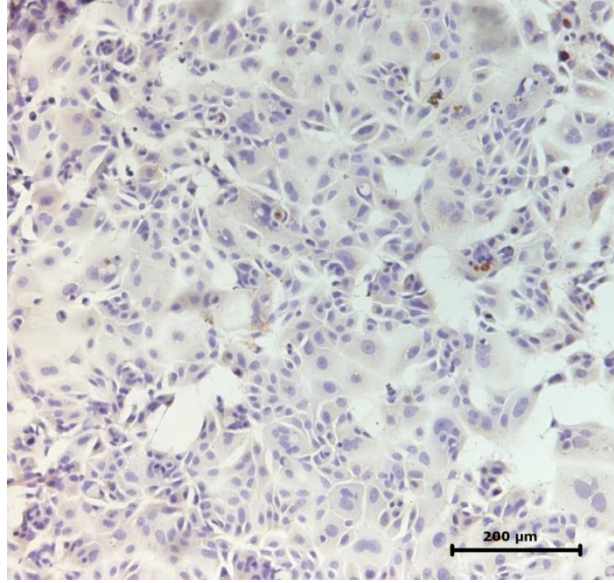
Resim 40: 20µM Simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha çok sayıda TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoxilen, x200, X400).



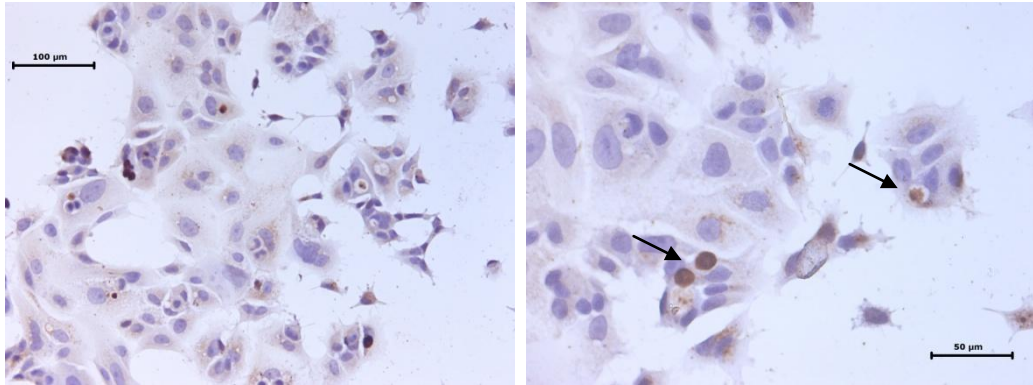
Resim 41: 80µM Fluvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır(TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).



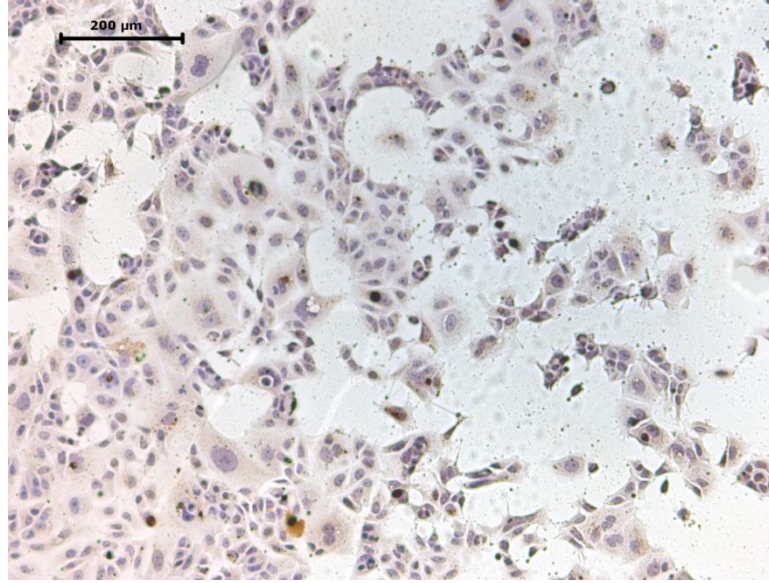
Resim 42: 80µM Fluvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta az sayıda TUNEL pozitif MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200, X400).



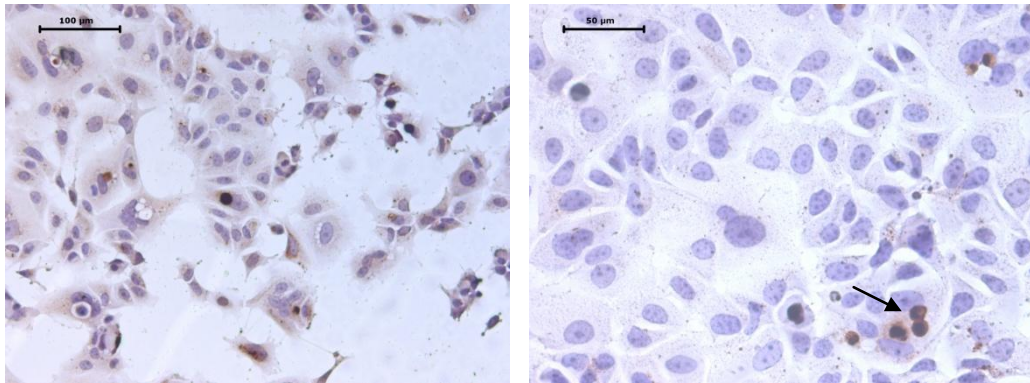
Resim 43: 10µM Simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin dağılımı (TUNEL, çekirdek boyası hematoksin, x100).



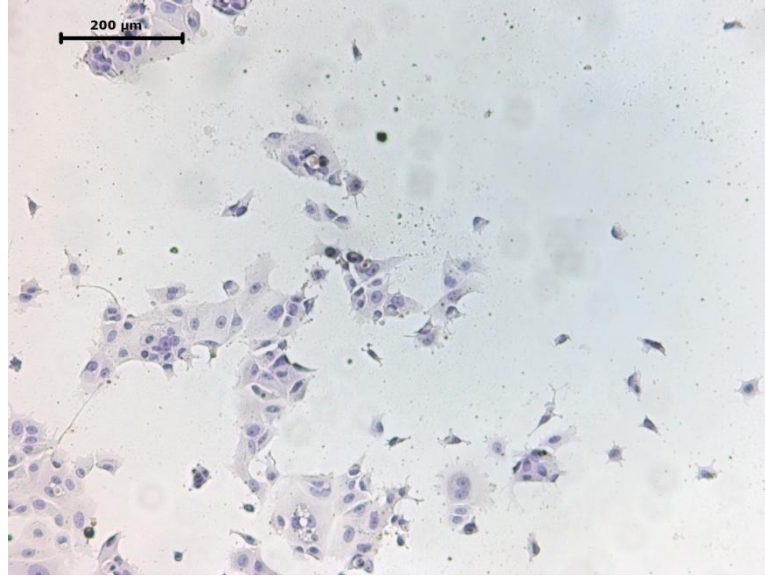
Resim 44: 10µM Simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif apoptotik hücreler (ok) izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksin, x200, x400).



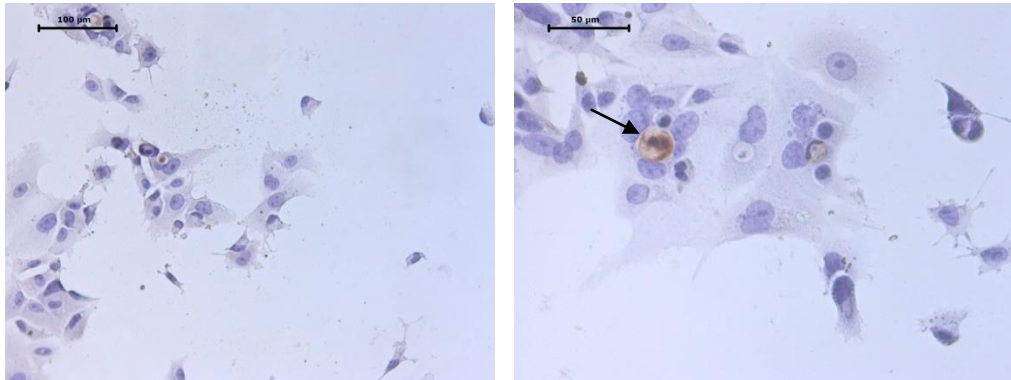
Resim 45: 20µM Simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta önceki gruba göre daha az sayıda MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematomksilen, x100).



Resim 46: 20µM Simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematomksilen, x200, X400).



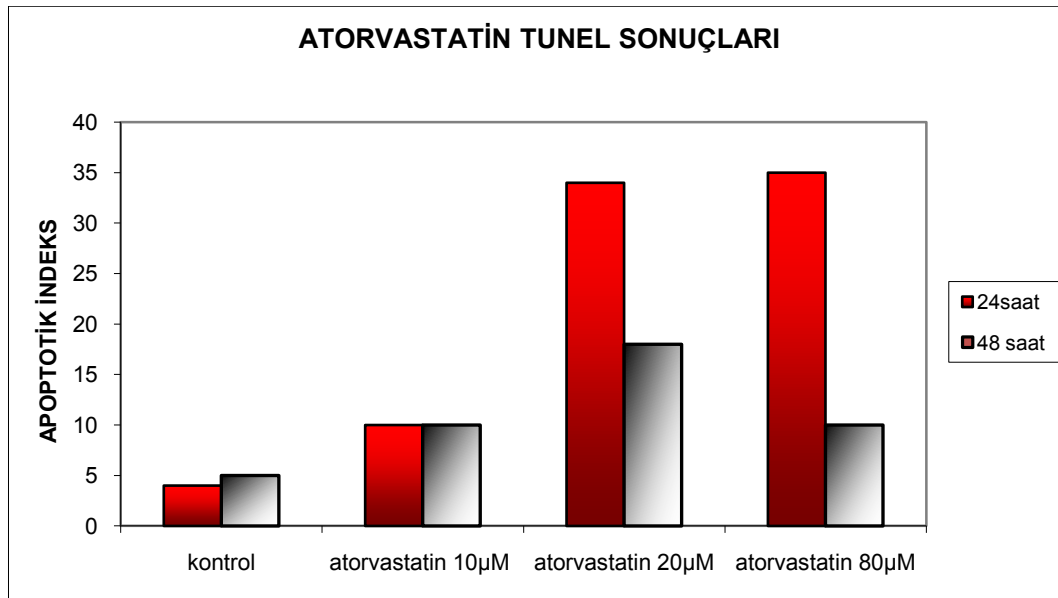
Resim 47: 80μM Simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta çok az sayıda tutunan MCF-7 hücreleri saptanmıştır(TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x100).



Resim 48: 80μM Simvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta az sayıda TUNEL pozitif (ok) MCF-7 hücreleri izlenmektedir (TUNEL, çekirdek boyası hematoksilen, x200,x400).

4.3.1.a. APOPTOTİK HÜCRE İNDEKSİ BULGULARI

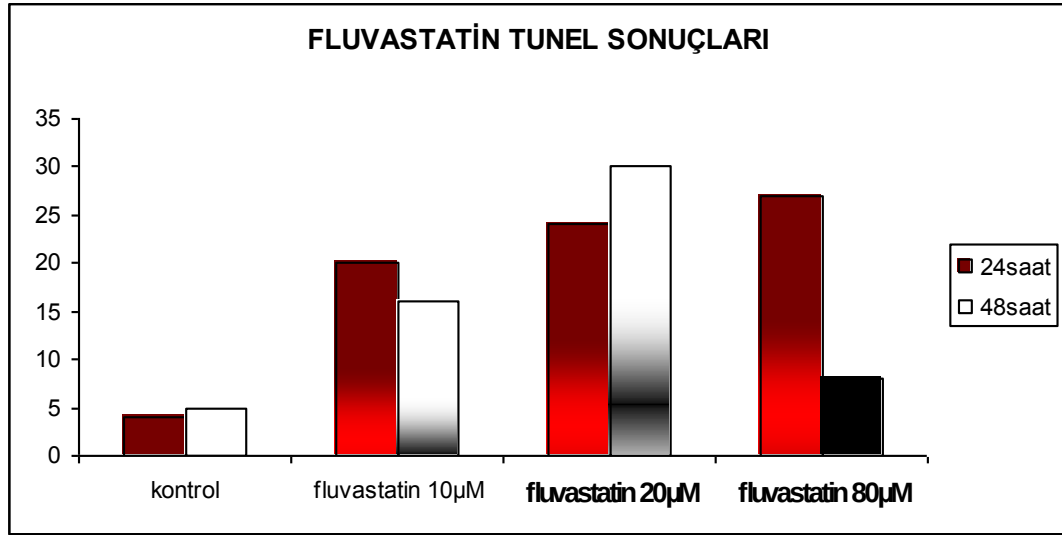
Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin 10 μ M, 20 μ M, 80 μ M dozlarıyla 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinde, apoptotik hücre ölümüne karakteristik olan DNA fragmentasyonunu gösteren TUNEL methodu uygulandıktan sonra koyu kahverengi kromatin yoğunlaşması görülen TUNEL pozitif apoptotik hücreler, birbirinden farklı 3 bölgede mikroskop altında değerlendirilerek elde edilen apoptotik hücre indekslerinin konsantrasyon ve zamana bağlı grafikleri sunulmaktadır.



Grafik 21: Atorvastatinin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde zamana bağlı apoptotik etkisi.

Atorvastatinin 24 saatlik uygulaması sonucunda, TUNEL pozitif hücrelerin sayısında ilaç doz artışına bağlı olarak artış olduğu saptandı. Kontrol hücrelerinde apoptotik hücre indeksi %4, atorvastatin 10 μ M dozunda %10, atorvastatin 20 μ M dozunda %34, 80 μ M dozunda %35 olarak saptandı. 48 saatlik atorvastatin 10, 20 ve 80 μ M dozları uygulaması sonrasında her üç dozda da kontrol grubuna göre apoptotik hücre yüzdesinde artış gözlemlendi. Kontrol grubunda %5, atorvastatin 10 μ M dozunda

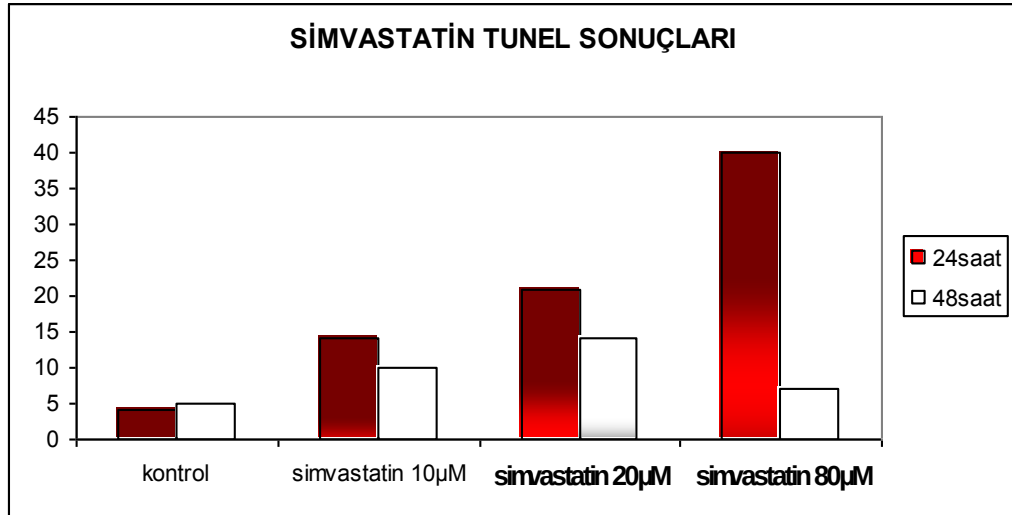
%10, atorvastatin 20 μ M dozunda %18, 80 μ M dozunda %10 apoptotik hücre ölümü gözlemlendi. Atorvastatin 80 μ M dozunda grupta kalan hücre sayısı azdı. Hücrelerin çoğunun nekrotik hücre ölümü ile kaybedildiği düşünüldü. Atorvastatin MCF-7 hücreleri üzerine etkisi, apoptotik hücre indeksi açısından zamana bağlı olarak karşılaştırıldığında simvastatinin 24 saat uygulamasında 48 saate oranla daha yüksek apoptotik hücre oranları saptandı. Bunun nedeni 48 saatte hücrelerin nekroz ile kaybına bağlandı. MCF-7 hücrelerine atorvastatinin 10 μ M dozunun 24 ve 48 saat uygulanması karşılaştırıldığında apoptotik hücre indeksi her iki grupta da %10 olarak bulundu (Grafik 21).



Grafik 22: Fluvastatinin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde zamana bağlı apoptotik etkisi.

Fluvastatinin 24 saatlik uygulaması sonucunda, gruplarda gözlenen apoptotik hücreler ilaç doz artışına paralel olarak arttı. Kontrol hücrelerinde %4, fluvastatin 10 μ M dozunda %20, fluvastatin 20 μ M dozunda %24, 80 μ M dozunda %27 apoptotik hücre ölümü gözlemlendi. 48 saatlik fluvastatin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M dozları uygulaması sonrasında her üç dozda da kontrol grubuna göre apoptotik hücre yüzdesinde artış saptandı. Kontrol grubunda %5, fluvastatin 10 μ M dozunda %16, fluvastatin 20 μ M dozunda %30, 80 μ M dozunda %8 apoptotik hücre ölümü gözlemlendi. 48 saatte fluvastatin 80 μ M doz grubunda kalan hücre sayısı azdı.

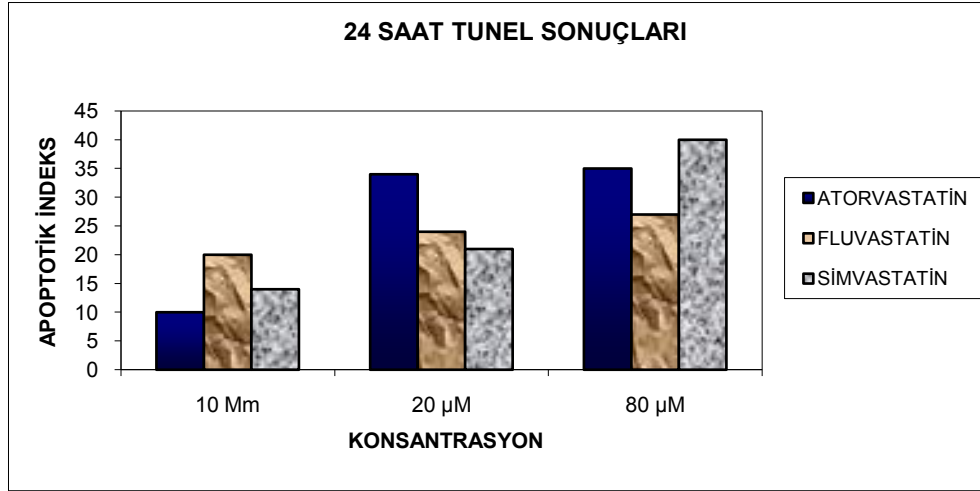
Hücrelerin çoğunun nekrotik hücre ölümü ile kaybedildiği düşünüldü. Fluvastatinin MCF-7 hücreleri üzerine etkisi apoptotik hücre ölüm yüzdesi açısından zamana bağlı olarak karşılaştırıldığında, fluvastatin 20 μ M grubu dışındaki dozlarda 24 saat uygulamasında 48 saate oranla daha yüksek apoptotik hücre indeksi saptandı (Grafik 22).



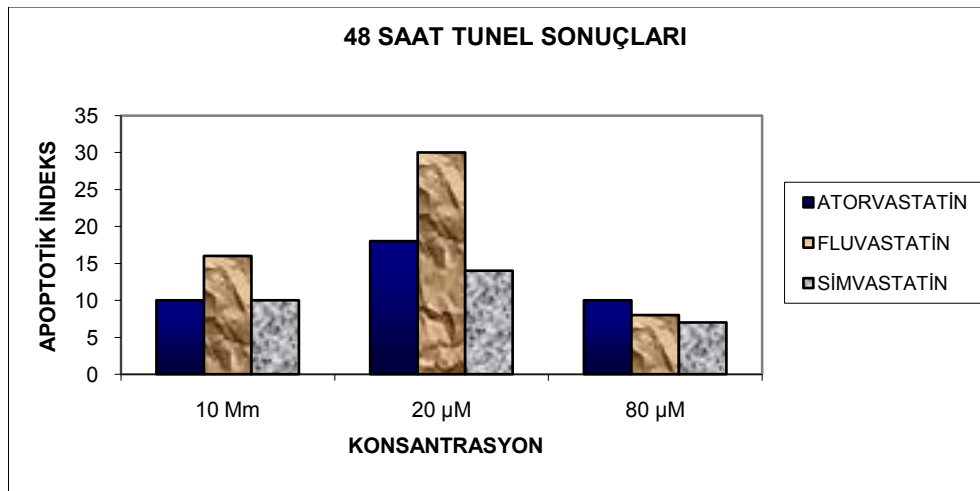
Grafik 23: Simvastatin 10, 20 ve 80 μ M konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde zamana bağlı apoptotik etkisi.

Simvastatin ile 24 saat muamele edilen hücrelerde, apoptotik hücre yüzdesi simvastatin 10 μ M dozunda %14, simvastatin 20 μ M dozunda %21, 80 μ M dozunda %40 olarak saptandı. MCF-7 hücrelerine 48 saat simvastatin 10, 20 ve 80 μ M tedavisi uygulanması sonrasında her üç dozda da kontrol grubuna göre apoptotik hücre yüzdesinde artış gözlemlendi. 48 saat deney gruplarından kontrol grubunda %5, simvastatin 10 μ M dozunda %10, simvastatin 20 μ M dozunda %14, 80 μ M dozunda ise %7 apoptotik hücre ölümü gözlemlendi. Simvastatinin 80 μ M dozuyla muamele gören grupta 48 saatin sonunda kalan hücre sayısı oldukça azdı. Hücrelerin çoğunun nekrotik hücre ölümü ile kaybedildiği düşünüldü. Simvastatinin MCF- 7 hücreleri üzerine etkisi apoptotik hücre ölüm yüzdesi açısından zamana bağlı olarak karşılaştırıldığında simvastatinin 24 saat uygulamasında 48 saate oranla daha yüksek apoptotik hücre indeksi saptandı. Simvastatinin her üç dozunda da (10, 20 ve 80 μ M)

24 saat muamele sonrası daha fazla apoptoz gözlemlendi. Bunun nedeninin 48 saatlik grupta hücrelerin nekroz ile kaybı olduğu düşünüldü. (Grafik 23)



Grafik 24: Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin 24 saat 10µM, 20µM ve 80µM doz uygulamalarının MCF-7 hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin karşılaştırılması.



Grafik 25: Atorvastatin, Simvastatin ve Fluvastatinin 24 saat 10µM, 20µM ve 80µM doz uygulamalarının MCF-7 hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin karşılaştırılması.

Atorvastatin, Fluvastatin ve Simvastatinin MCF-7 hücrelerinde apoptotik etkileri karşılaştırıldığında; Fluvastatin 24 saat 10 µM, 48 saat 10µM ve 48 saat 20µM konsantrasyonlarında; Atorvastatinin 24 saat 20µM konsantrasyonunda;

Simvastatinin 24 saat 80µM konsantrasyonunda diğer ilaçlara oranla daha fazla apoptotik etki gösterdiği izlendi (Grafik 24,25).

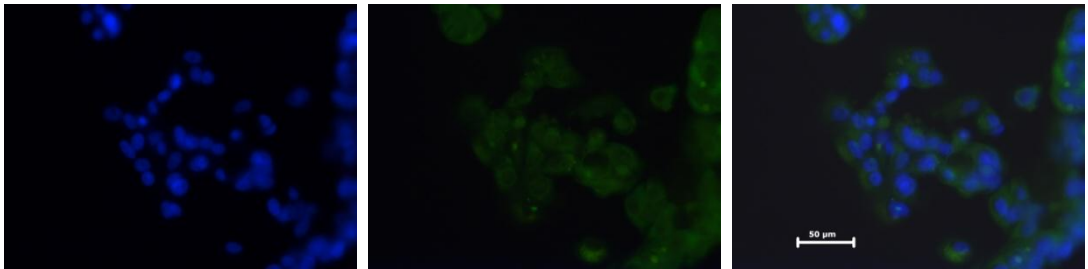
Atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin sitotoksosite ve TUNEL sonuçları değerlendirildiğinde fluvastatin deneylerinde düşük dozlarda dahi hücre canlılığında belirgin azalmanın saptanması sonucunda aşırı toksik olduğunun düşünülmesi ve atorvastatin ile muamele edilen gruplardaki konsantrasyon farklılıklarına bağlı değişimlerin incelemeye uygun gözükmesi klinikte en yaygın kullanıma sahip olan atorvastatin ile deneylere devam edilmesi sonucunu oluşturdu.

4.3.2. ATORVASTATİNİN MCF-7 HÜCRELERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİSİNİN KASPAZ 3 İMMUNREAKTİVİTE BULGULARI

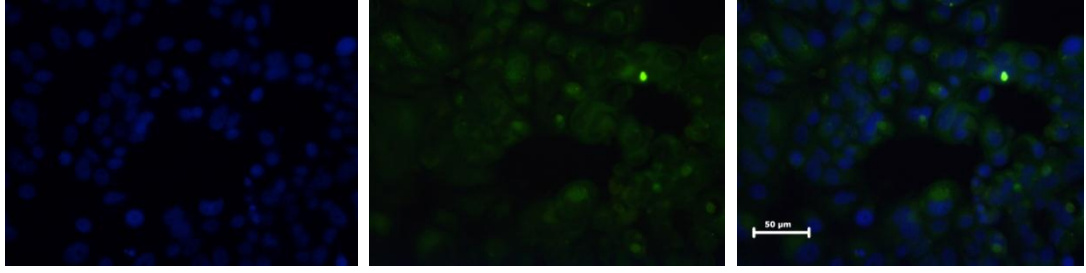
Atorvastatinin 10 μ M , 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edilen tüm MCF-7 hücre gruplarında kaspaz 3 immunreaktivitesi floresan işaretleyiciler ile saptandı. Floresan mikroskobu ile elde edilen kaspaz 3 immunreaktivite görüntüleri sunulmaktadır.



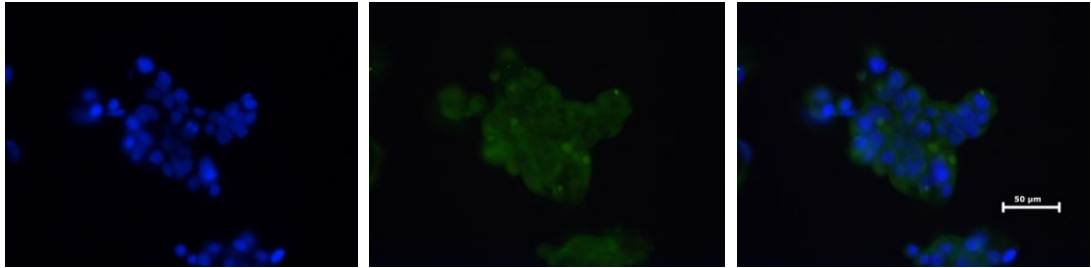
Resim 49: İmmunofloresan boyama yöntemi için yapılan kontrol boyamada MCF-7 hücrelerinde negatif kaspaz 3 immunreaktivitesi izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



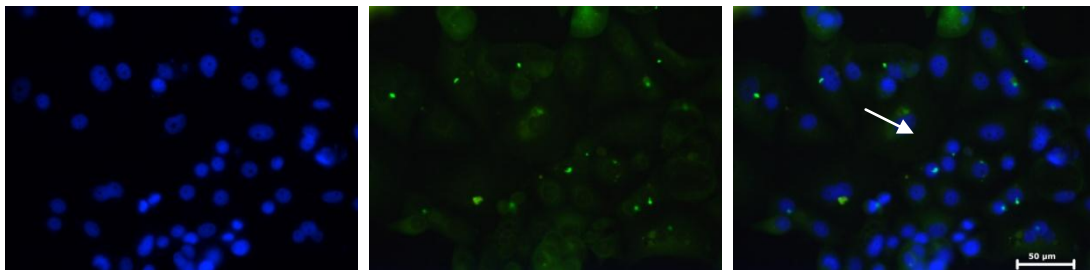
Resim 50: Kontrol grubundan hazırlanan immunofloresan boyamada MCF-7 hücrelerinin kaspaz 3 immunreaktivitesi izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



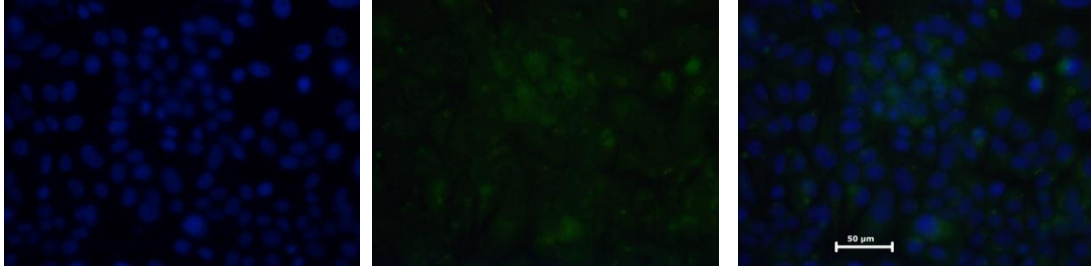
Resim 51: 10 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta bazı MCF-7 hücrelerinin sitoplazmasında kaspaz 3 immunreaktivitesi izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



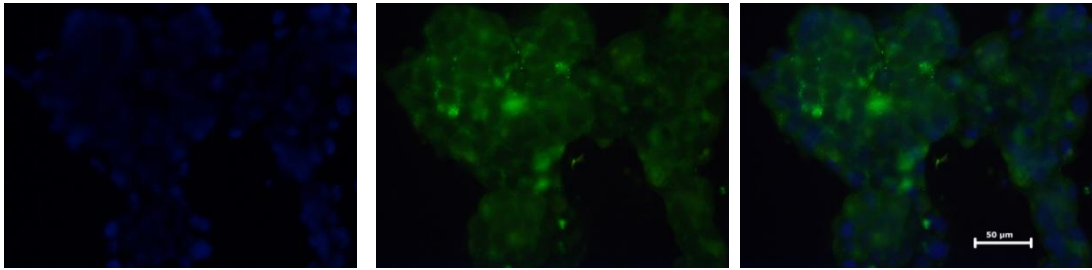
Resim 52: 20 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta daha az sayıda mavi çekirdekleri ile gözlenen MCF-7 hücrelerinin bazılarında sitoplazmada yaygın kaspaz 3 immunreaktivitesi izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



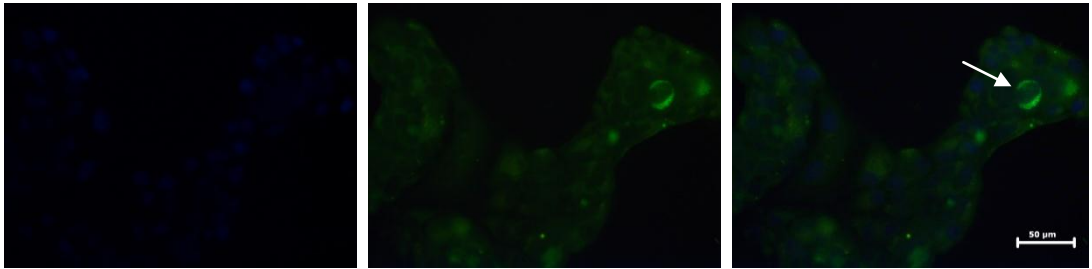
Resim 53: 80 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin bir kısmında sitoplazmada kuvvetli kaspaz 3 ekspresyonu (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



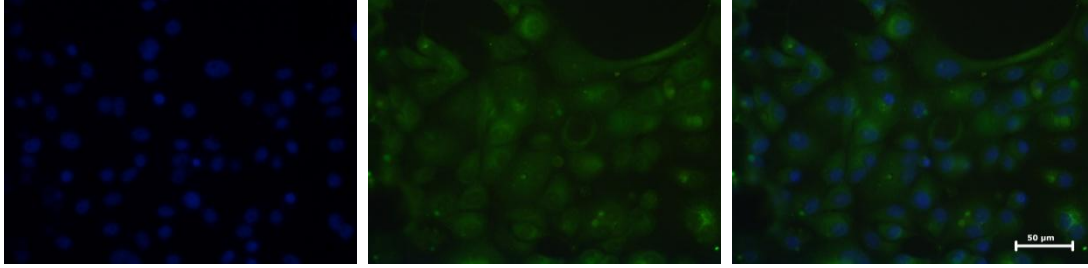
Resim 54: 10 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta DAPI ile çekirdekleri mavi gözlenen MCF-7 hücrelerinin zayıf kaspaz 3 immunreaktivitesi gösterdiği izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



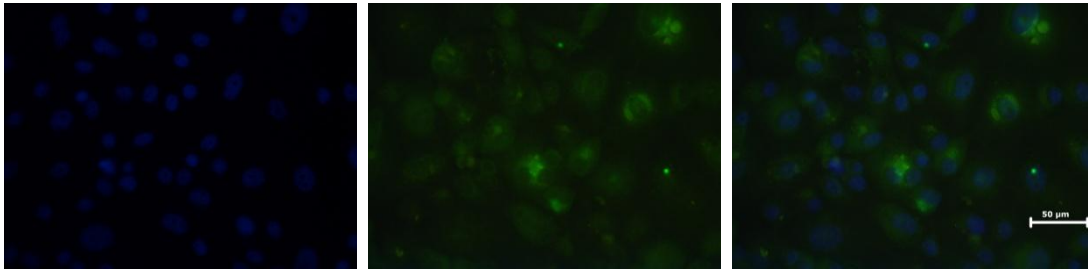
Resim 55: 20 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin yaygın kaspaz 3 immunreaktivitesi gösterdiği izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



Resim 56: 20 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücresinde tüm çekirdek çevresinde kuvvetli kaspaz 3 immunreaktivitesi (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



Resim 57: 20µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücreleri izlenmektedir. Bir çok hücrede sitoplazmada yaygın kaspaz 3 immunreaktivitesi izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

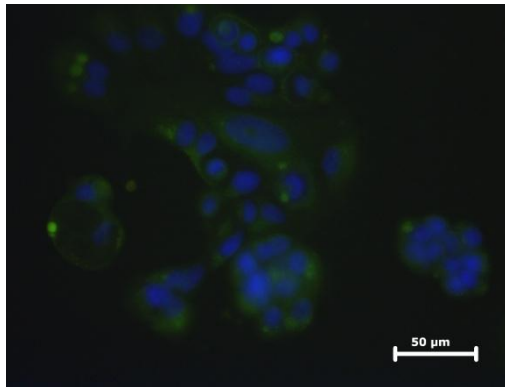


Resim 58: 20µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta az sayıda DAPI ile çekirdekleri boyanmış MCF-7 hücreleri izlenmektedir. Sağ üst köşedeki MCF-7 hücrelerinde sitoplazmik birkaç bölgenin kuvvetli kaspaz 3 immunreaktivitesi (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

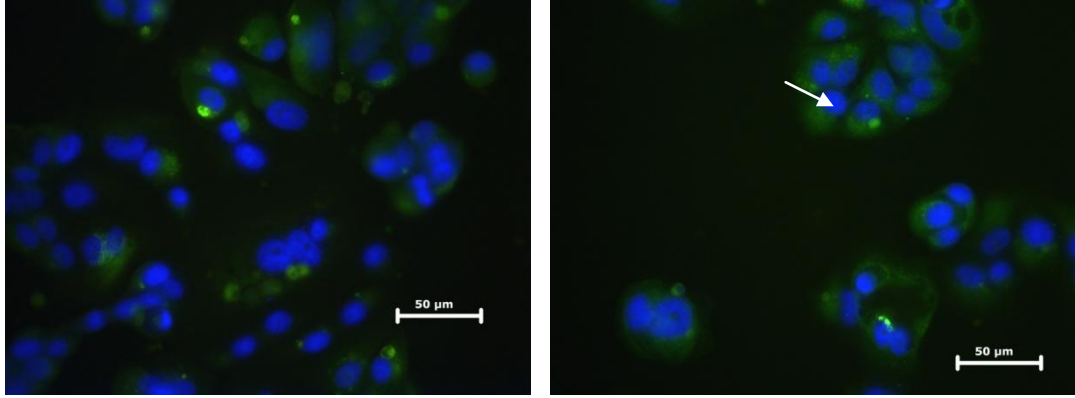
4.4. STATİN GRUBU İLAÇLARIN MCF-7 HÜCRELERİ ÜZERİNE OTOFAJİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLME BULGULARI

4.4.1. Atorvastatinin MCF-7 Hücrelerindeki Otofajik Etkisinin Beklin-1 İmmunreaktivite Bulguları

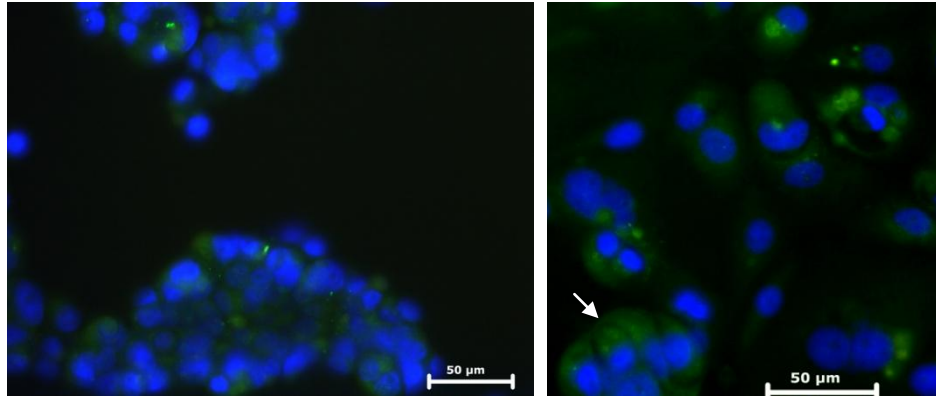
Kontrol grubu hücrelerinde beclin-1 ekspresyonu, zayıf ve az sayıda izlenmekle birlikte otofajik vakuollere spesifik noktasal ekspresyon ve granüler görünüm saptanmadı. Atorvastatinin 10, 20 ve 80µM konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edilen tüm MCF-7 hücre gruplarında hücre sitoplazmasında beclin-1 ekspresyonuna karakteristik granüler görünüm veren noktasal immünreaktivite floresan işaretleyiciler ile saptandı. Floresan mikroskobu ile elde edilen beclin-1 immünreaktivite görüntüleri sunulmaktadır:



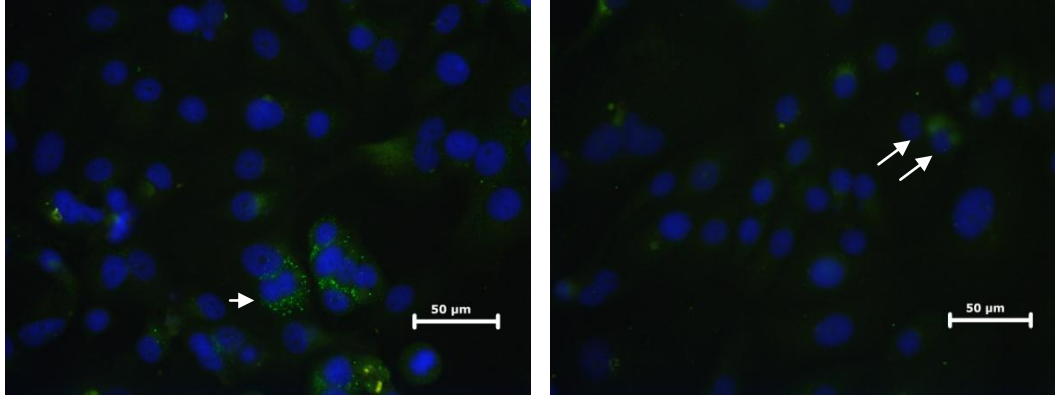
Resim 59: Kontrol grubundan hazırlanan MCF-7 hücrelerinde sitoplazmik beclin1 immünreaktivitesinin (ok) zayıf ve az sayıda olduğu izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



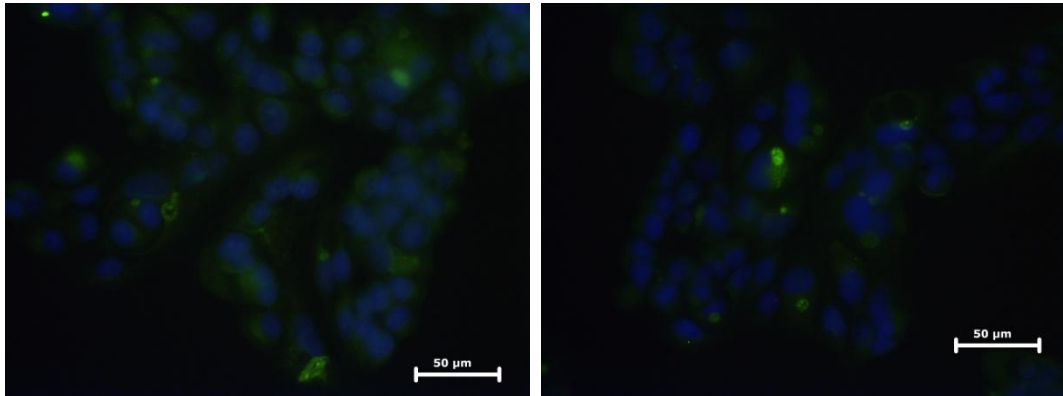
Resim 60: 10µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta DAPI ile çekirdekleri mavi gözlenen MCF-7 hücrelerinin kontrol grubuna kıyasla daha güçlü, spesifik granüler beklin-1 immunreaktivitesi gösterdiği (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



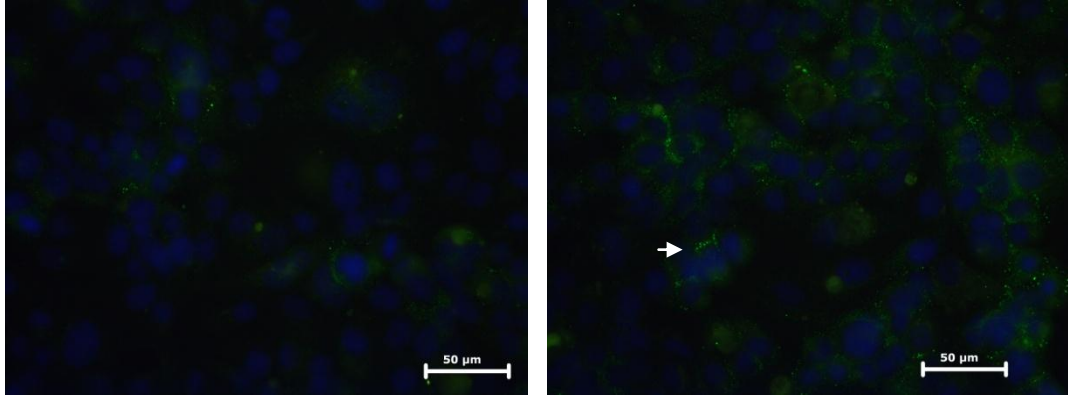
Resim 61: 20µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta daha az sayıda MCF-7 hücreleri görülmektedir. Beklin-1 immunofloresan işaretlemesinin sitoplazmada yaygın ve spesifik granüler olduğu (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



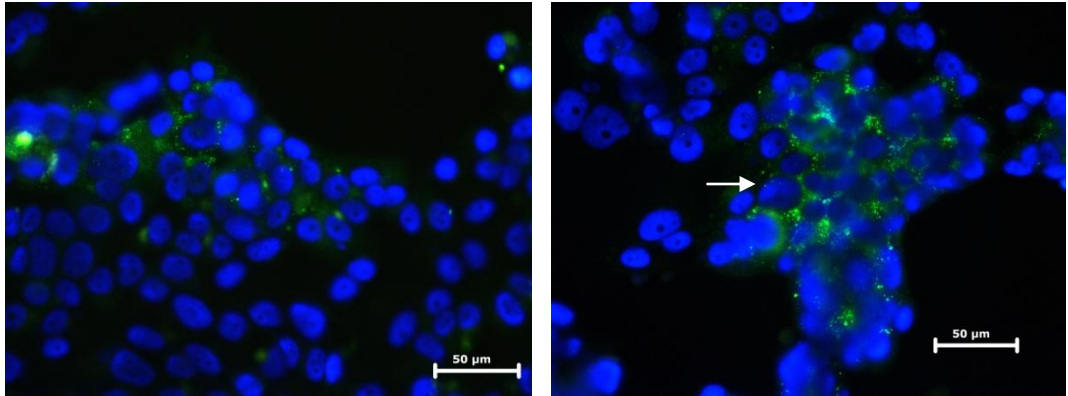
Resim 62: 80µM Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta az sayıda MCF-7 hücresi izlenmektedir. Bazı hücre gruplarında sitoplazmada beclin 1 ekspresyonu granüler ve çok kuvvetli olarak izlenirken (ok), bazı hücre gruplarında ise oldukça zayıf immunreaktivite (çift ok) görülmektedir. (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400)



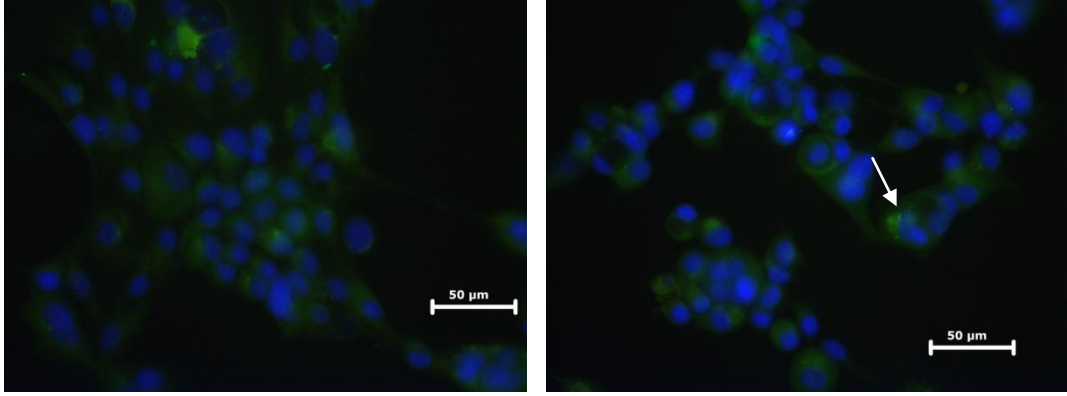
Resim 63: 48 saat kontrol grubunda DAPI ile çekirdekleri mavi gözlenen MCF-7 hücrelerinin bir kısmı beclin 1 ekspresyonunu göstermektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



Resim 64: 10µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin birçoğunda DAPI ile mavi gözlenen çekirdeklerinin etrafında güçlü granüler beklin-1 immunreaktivitesi gösterdiği (ok) izlenmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



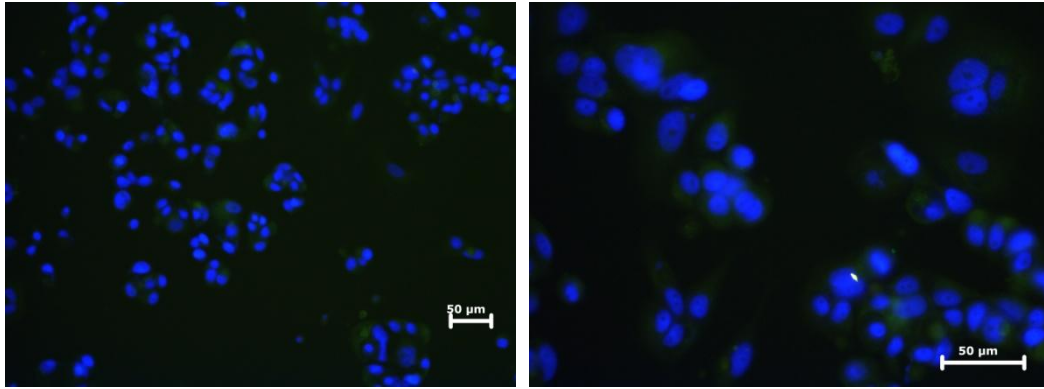
Resim 65: 20µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin bir kısmında sitoplazmada yaygın güçlü, granüler beklin-1 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).



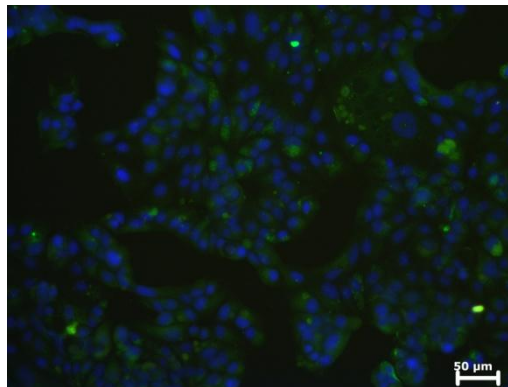
Resim 66: 80µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin birçoğunda sitoplazmada yaygın ancak önceki gruplara göre daha zayıf beklin-1 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (a:DAPI, b:FITC, c: DAPI+FITC, x400).

4.4.2. Atorvastatinin MCF-7 Hücrelerindeki Otofajik Etkisinin LC3 İmmunreaktivite Bulguları

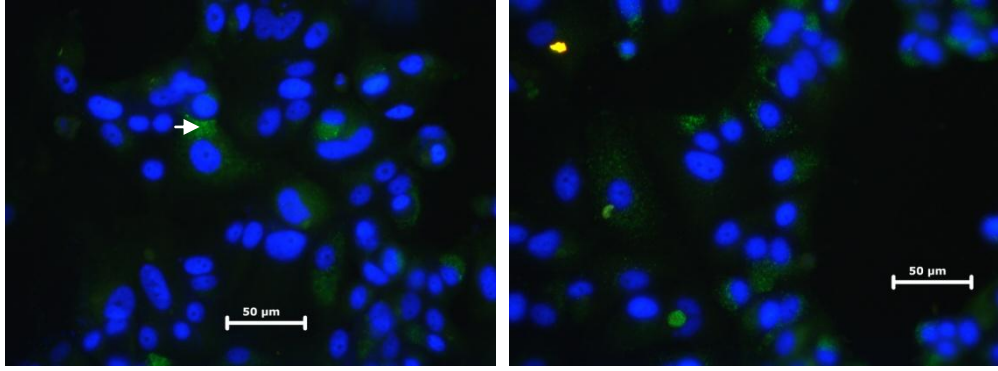
Atorvastatinin 10, 20 ve 80 μ M konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edilen tüm MCF-7 hücre gruplarında hücre sitoplazmasında otofajik vakuollere karakteristik granüler görünüm veren noktasal LC3 immünreaktivitesi floresan işaretleyiciler ile izlendi. Atorvastatin uygulanan hücre gruplarında kontrol grubuna kıyasla daha yaygın, kuvvetli ve belirgin granüler LC3 ekspresyonu saptandı. Floresan mikroskopu ile elde edilen LC3 immünreaktivite görüntüleri sunulmaktadır.



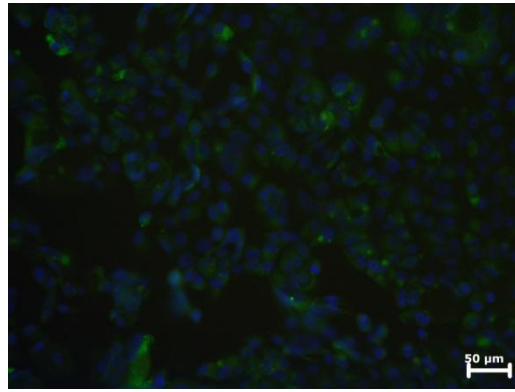
Resim 67: Kontrol grubundan hazırlanan immünfloresan boyamada az sayıda MCF-7 hücresinde zayıf LC3 immünreaktivitesi izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).



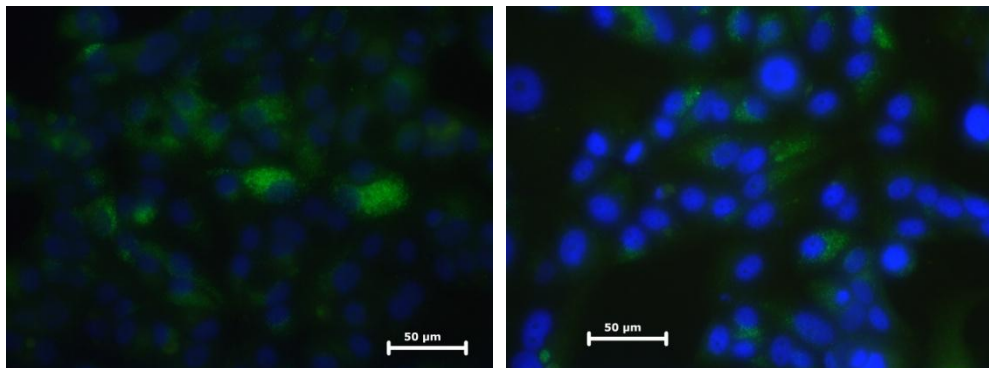
Resim 68: 10 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin birçoğunda LC3 immünreaktivesi izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).



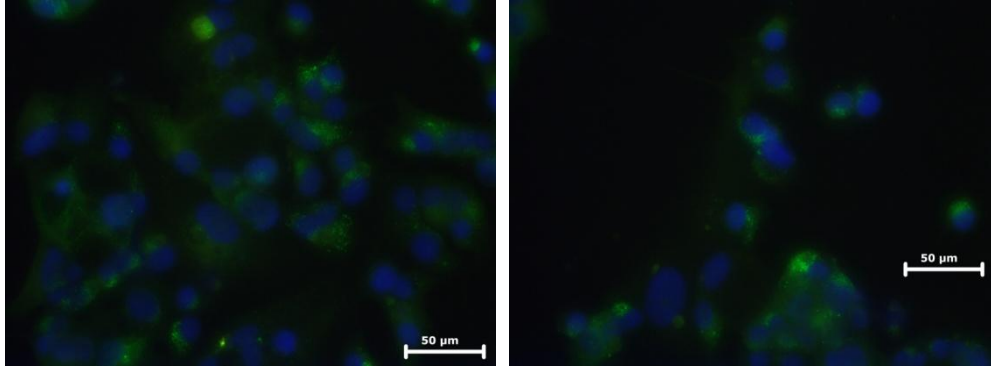
Resim 69: 10 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin birçoğunda sitoplazmada yaygın kuvvetli, otofajiye spesifik granüler LC3 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).



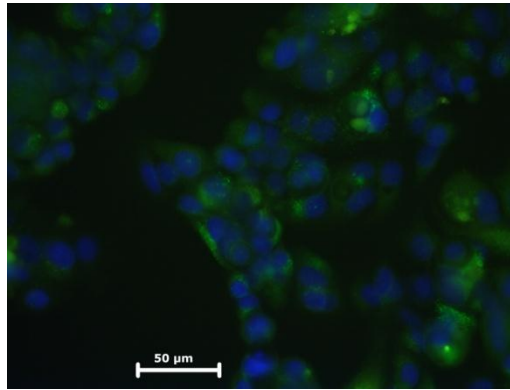
Resim 70: 20 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta önceki gruplara göre daha çok sayıda MCF-7 hücresinde LC3 immunreaktivesi izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).



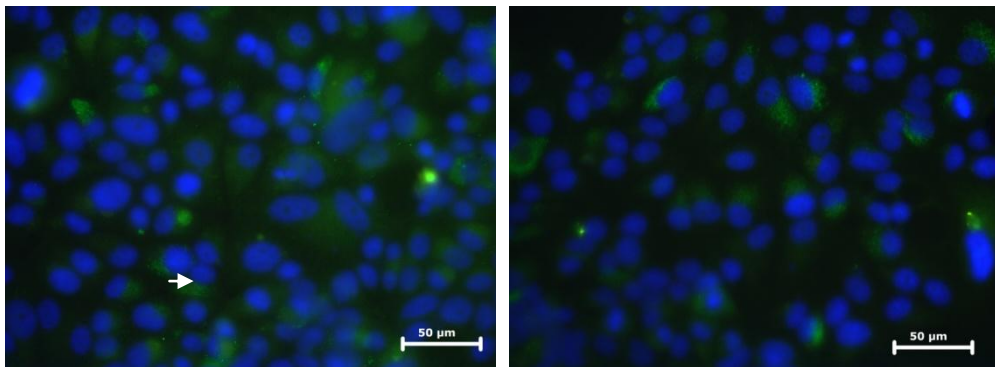
Resim 71:20 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen hücrelerde belirgin kuvvetli sitoplazmik LC3 immunreaktivitesi izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).



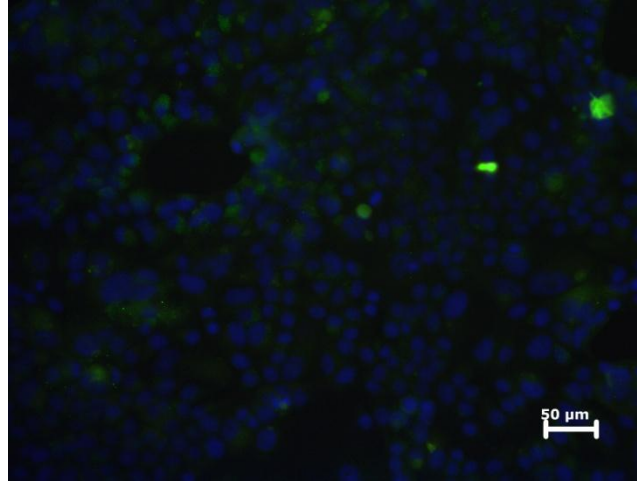
Resim 72: 80 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta önceki gruplara göre daha az sayıda olan MCF-7 hücrelerinde LC3 immunreaktivitesi yaygın olarak izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).



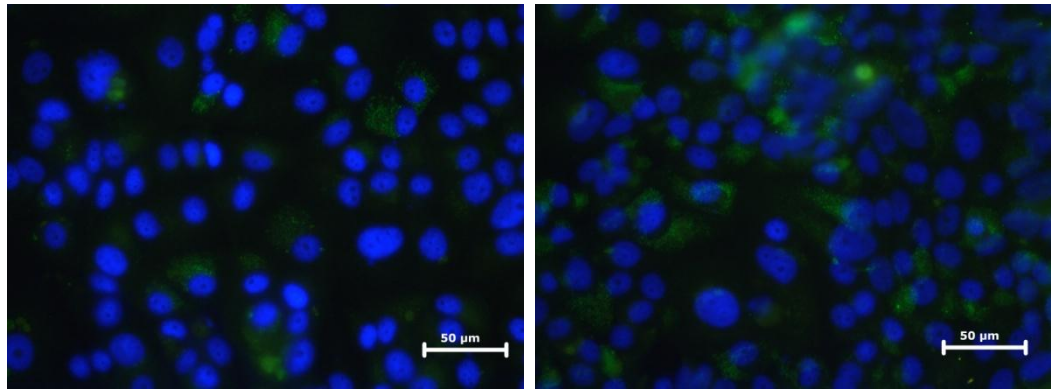
Resim 73: 48 saat kontrol grubunun MCF-7 hücrelerinde LC3 immunreaktivitesi görülmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).



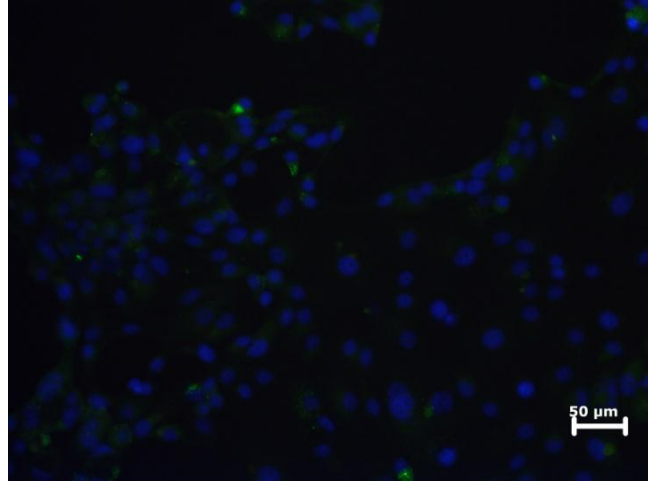
Resim 74: 10 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta MCF-7 hücrelerinin bir çoğunda sitoplazmada yaygın kuvvetli granüler LC3 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).



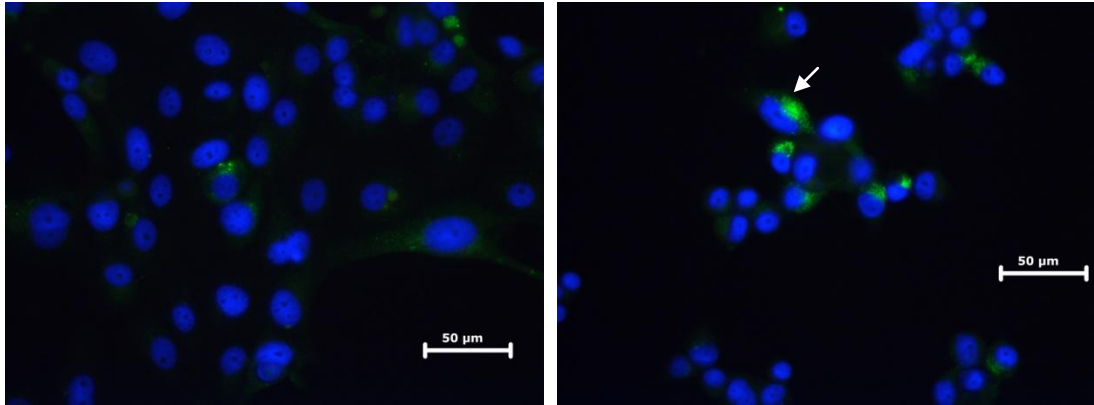
Resim 75: 20μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinde LC3 immunreaktivesi izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).



Resim 76: 20μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta farklı büyüklükte çekirdekleri ile gözlenen MCF-7 hücrelerinin birçoğunda sitoplazmada yaygın kuvvetli granüler LC3 immunreaktivitesi görülmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).



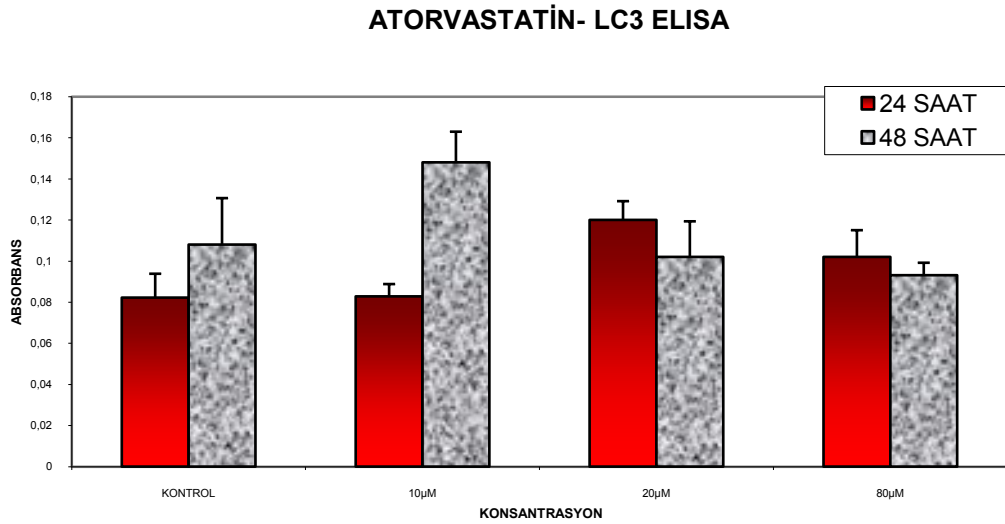
Resim 77: 80μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptaki MCF-7 hücrelerinde önceki gruplara kıyasla daha az sayıda hücrede LC3 immunreaktivitesi (ok) görülmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).



Resim 78: 80μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinde kuvvetli granüler LC3 immunreaktivitesi (ok) izlenmektedir (FITC, çekirdek DAPI, x400).

4.4.3. Atorvastatinin MCF7 Hücreleri Üzerindeki Otofajik Etkisinin Sito Elisa Yöntemi İle LC3 Bulguları

MCF-7 hücrelerinde atorvastatinin 10, 20 ve 80 μ M dozları ile 24 ve 48 saat muamele sonrasında meydana gelen otofajinin tayini için hücelere LC3 sito ELISA yöntemi uygulandı. LC3 ELISA sonucunda elde edilen absorbans değerleri ile çizilen grafik sunulmaktadır.



Grafik 27: MCF-7 hücrelerinde Atorvastatinin farklı doz uygulamalarının LC3 sito ELISA sonuçları

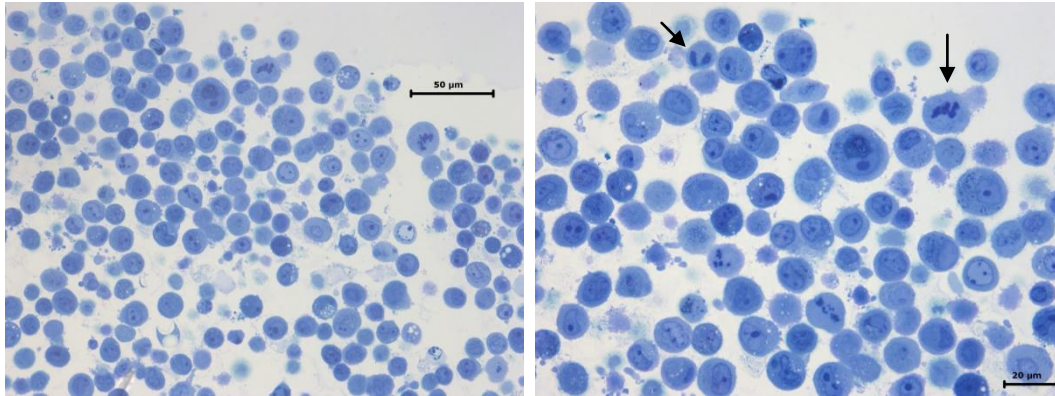
LC3 ELISA sonucunda elde edilen absorbans değerleri ile çizilen grafiğe göre 24 saatlik grupta Atorvastatin 20 μ M dozu uygulanan hücrelerde diğer gruplara oranla daha fazla otofaji gözlemlendi. 24 saat kontrol ve atorvastatin 10 μ M grubu arasında otofaji açısından belirgin farklılık yokken, atorvastatin 80 μ M uygulanan grupta bu iki gruba oranla daha fazla otofaji görüldü (Grafik 27). 48 saatlik atorvastatin grubunda en yüksek otofaji atorvastatin 10 μ M grubunda izlendi. 48 saatte ilaç doz artışına paralel otofajide azalma saptandı. Ancak hem 24 hem 48 saat uygulamalarda, atorvastatin ilaç dozları ve kontrol grubu arasında otofajik açıdan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($P > 0.001$).

İstatiksel olarak anlamlılık gözlemlenmediğini belirterek elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde Atorvastatin 10 μ M grupta otofaji 48 saatte daha belirginken, atorvastatin 20 μ M grupta 24 saat daha belirgin olması yüksek dozda otofajinin daha erken dönemde meydana geldiğini düşündürttü. Atorvastatin 80 μ M dozunda ise otofajinin diğer gruplara göre düşük seyretmesi hücrelerin direk olarak nekrotik ölümüne bağlandı.

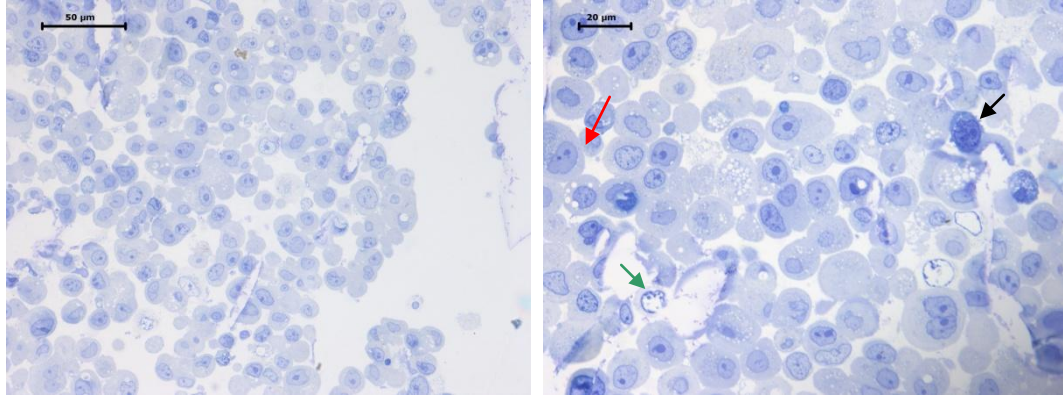
4.5.ATORVASTATİNİN MCF 7 HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEME BULGULARI

4.5.1. Atorvastatinin MCF 7 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisinin Işık Mikroskobu İnceleme Bulguları

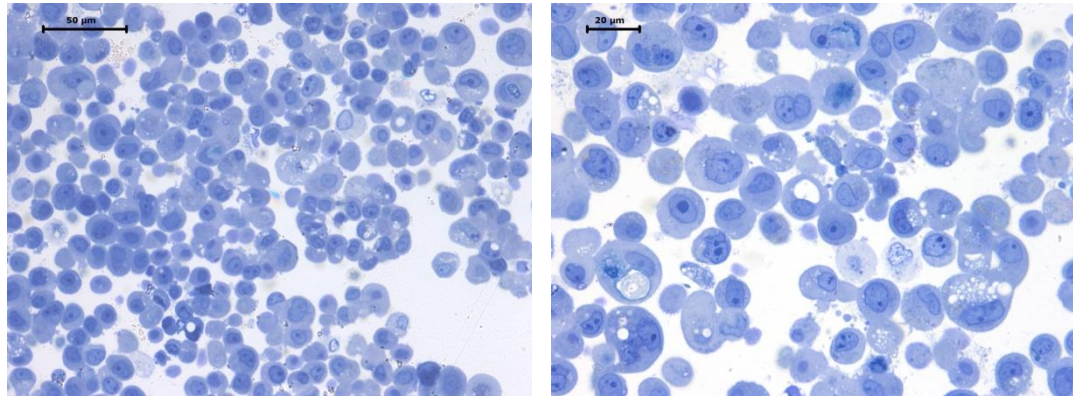
Atorvastatinin 10, 20 ve 80 μM konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edilen tüm MCF-7 hücre gruplarından elde edilen yarı ince kesitler ışık mikroskobunda incelendiğinde, kontrol grubunda farklı büyüklüklerde mitotik özellikler gösteren hücreler yaygın olarak izlenirken, atorvastatin uygulanan hücre gruplarında dejeneratif değişiklikler gösteren hücreler daha belirgin olarak saptandı. Atorvastatin 10 μM ve 20 μM konsantrasyonundan elde edilen hücre gruplarında apoptotik ve heterofajik vakuol içeren otofajik hücreler dikkati çekti. Atorvastatin 80 μM uygulanan MCF-7 hücrelerinde ise kromotolizis ve hücre membran bütünlüğü bozulmuş nekrotik hücrelere rastlandı.



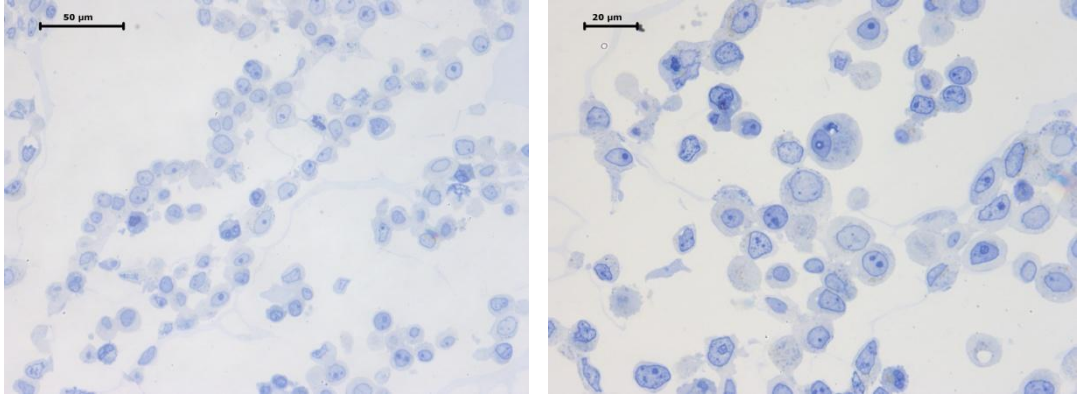
Resim 79: 24 saat kontrol grubundan hazırlanan yarı ince kesitte MCF-7 hücreleri çeşitli büyüklüklerde izlenmektedir. Hücreler belirgin çekirdek ve çekirdekcikleri ile izlenmektedir. Bazı hücrelerin mitoz sürecinde oldukları görülmektedir(ok). Az sayıda hücrede ise dejeneratif değişiklik gözlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).



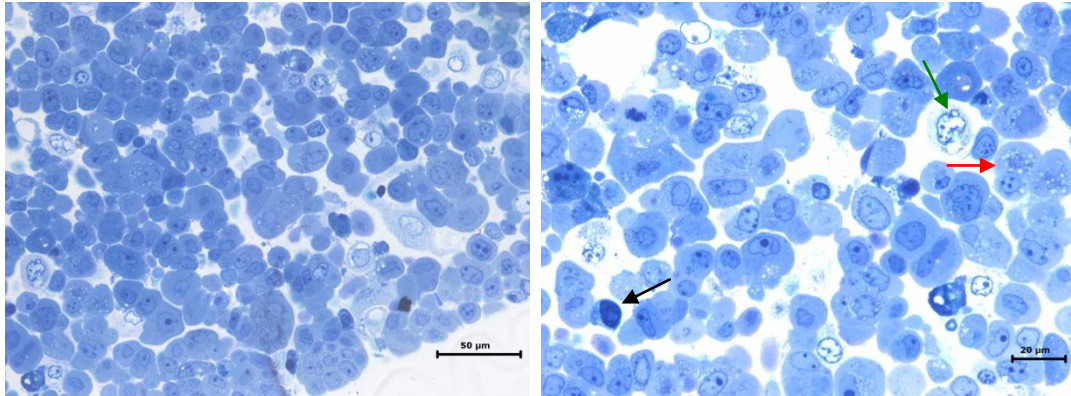
Resim 80: 10 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grubun ışık mikroskopunda mitoz gösteren hücrelerin yanı sıra, farklı dejeneratif değişiklikler gösteren; sitoplazması kondens apoptotik hücreler (siyah ok), sitoplazmada vakuoller içeren muhtemelen otofajik değişiklik gösteren hücreler (kırmızı ok) ve ileri dejeneratif görünümleri ile belirgin kromotolizis gösteren çekirdekleri olan nekrotik hücreler (yeşil ok) izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).



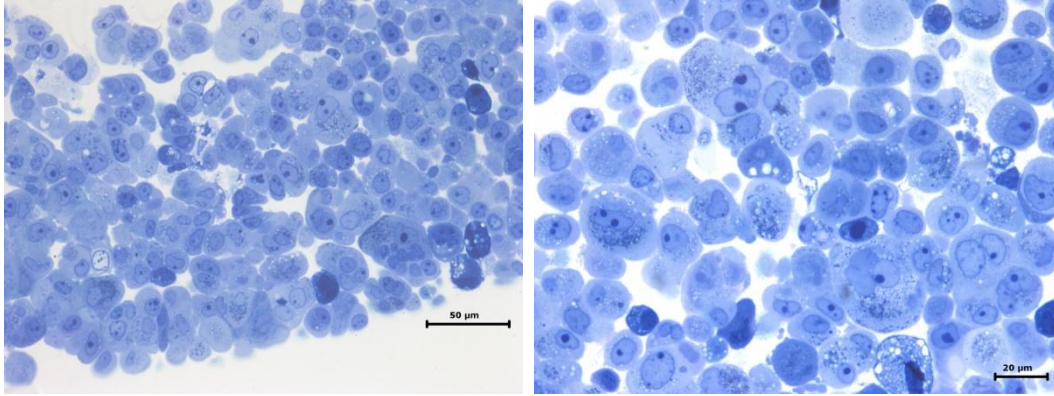
Resim 81: 20 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilmiş grubun hücrelerine ait ışık mikroskopunda önceki gruplara oranla daha fazla sayıda apoptotik hücre ve sitoplazması heterojen görünümlü içeriğe sahip iri otofajik hücreler izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).



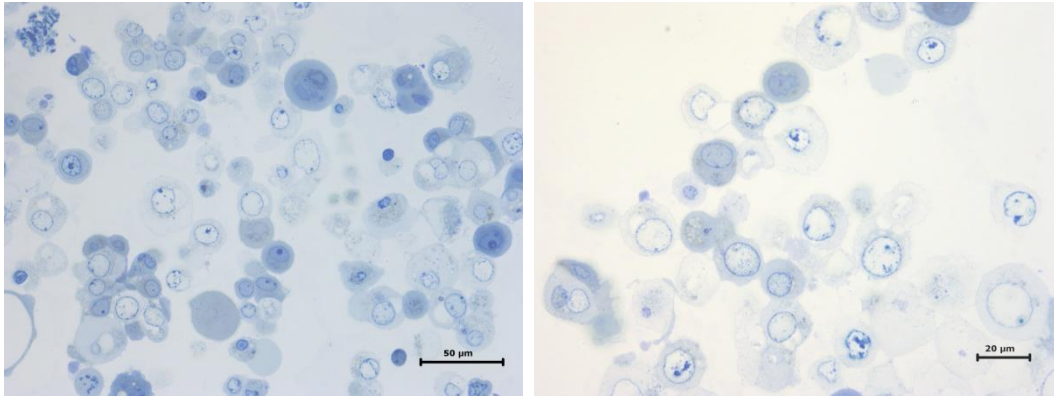
Resim 82: 80 μ M Atorvastatin ile 24 saat muamele edilen grupta kromotolizis gösteren, hücre membran bütünlüğü bozulmuş nekrotik hücreler izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).



Resim 83: 10 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grubun ışık mikrografında mitoz gösteren hücrelerin yanı sıra, farklı dejeneratif değişiklikler gösteren; sitoplazması yoğun apoptotik hücreler (siyah ok), sitoplazmada vakuoller içeren muhtemelen otofajik değişiklik gösteren hücreler (kırmızı ok) ve ileri dejeneratif görünümü ile belirgin kromotolizis gösteren çekirdekleri olan nekrotik hücreler (yeşil ok) izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).



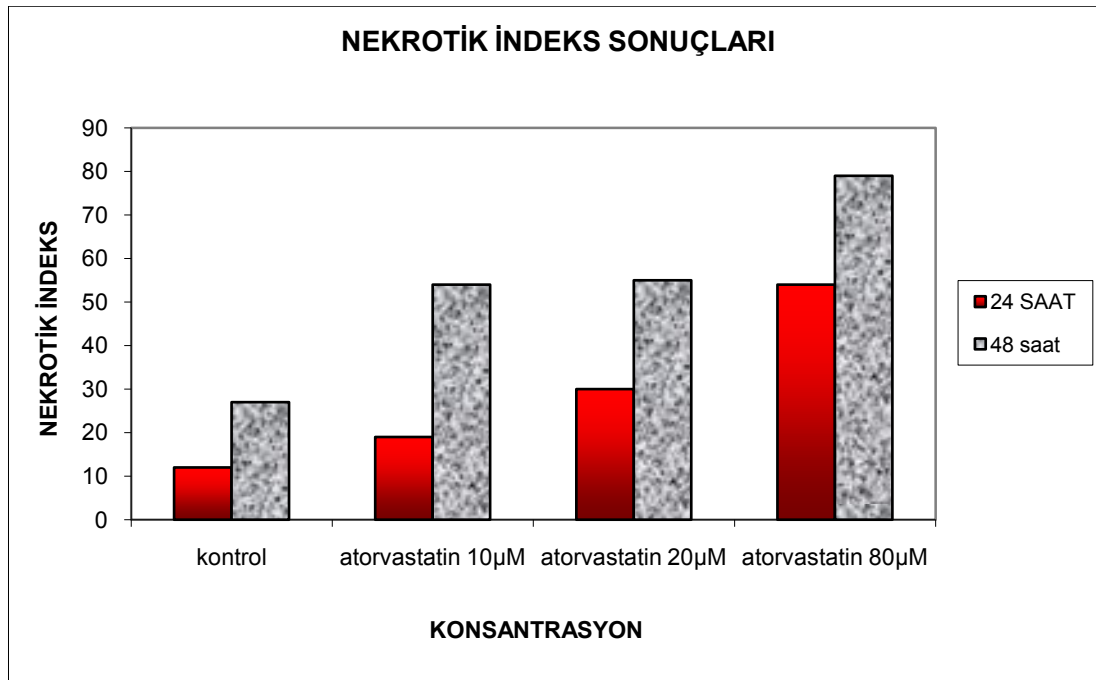
Resim 84: 20 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilmiş grubun hücrelerine ait ışık mikroskopisinde daha fazla sayıda apoptotik hücreler ve sitoplazmaları heterojen görünümlü içeriğe sahip iri otofajik hücreler izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).



Resim 85: 80 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptaki hücrelerin çoğunluğunda kromotolizis gösteren hücre membran bütünlüğü bozulmuş çok sayıda nekrotik hücre izlenmektedir (Metilen mavisi, x200, x400).

4.5.1.a. Nekrotik Hücre İndeksi Bulguları

Atorvastatinin 10µM, 20µM, 80µM dozlarıyla 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin elektron mikroskopik incelemesi için alınan yarı ince kesitlerde, her lamda 40'lık büyütmede birbirinden farklı üç bölge mikroskop altında değerlendirilerek hücre membran bütünlüğü bozulmuş, çekirdeğinde kromotolizis görülen nekrotik hücreler sayıldı. Nekrotik indeks (%)= 100 X (nekrotik hücre/toplam hücre) formülü ile nekrotik hücre indeks yüzdesi hesaplandı. Elde edilen nekrotik hücre indekslerinin konsantrasyon ve zamana bağlı grafiği sunulmaktadır.

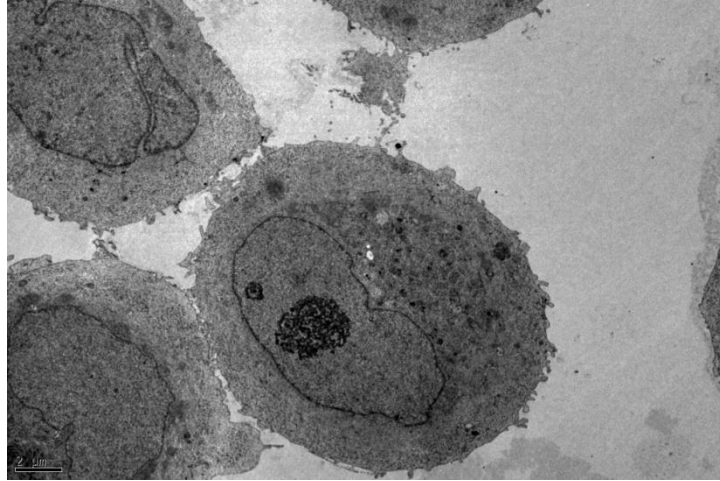


Grafik 26: Atorvastatinin 10µM, 20µM ve 80µM konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde zamana bağlı nekrotik etkisi.

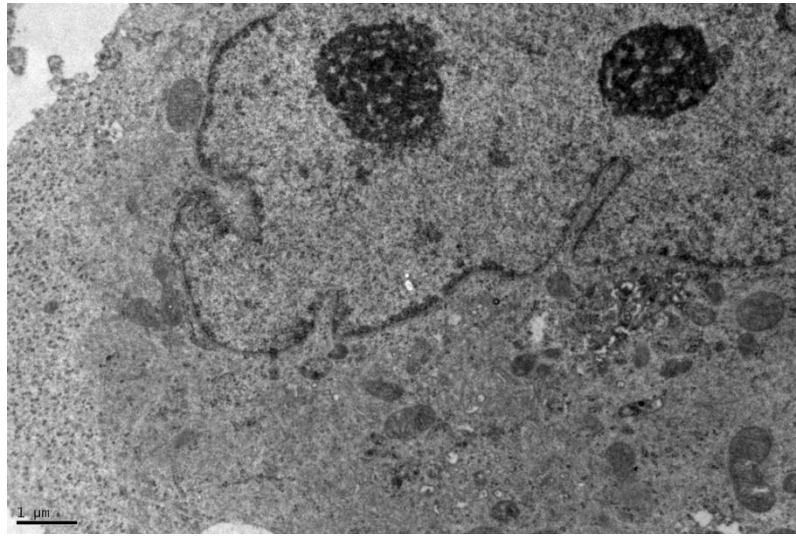
48 saat atorvastatin uygulanan deneme ve kontrol gruplarında 24 saatlik gruba göre daha çok sayıda nekrotik hücre saptanmıştır. 24 ve 48 saatlik grupta atorvastatinin artan dozuna paralel olarak nekrotik hücre yüzdesinde artış izlenmiştir (Grafik 26).

4.5.2. Atorvastatinin MCF 7 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisinin Elektron Mikroskobu İnceleme Bulguları

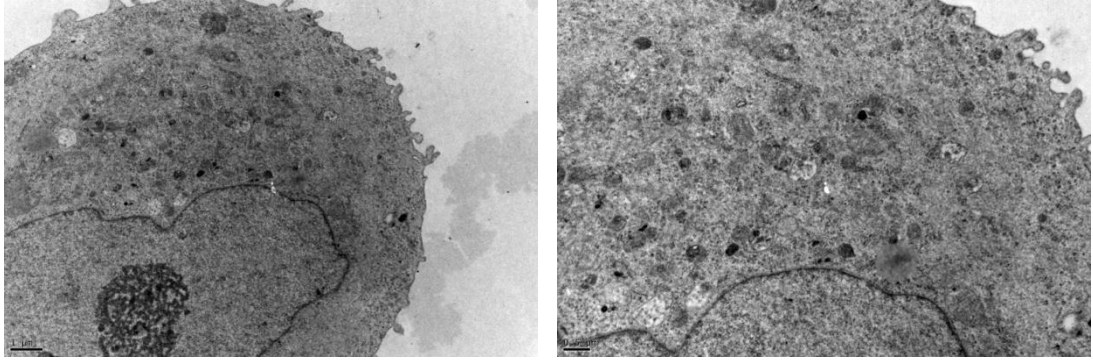
Kontrol grubu MCF-7 hücreleri elektron mikroskop incelemelerinde, büyüklükleri birbirinden farklı, tek veya bazen çift belirgin çekirdekçikleri olan çekirdek sınırları düzensiz hücreler olarak saptandı. Hücre sitoplazmaları genelde organelden fakir olmakla birlikte, hücrelerin bazılarında iri mitokondriyonlar, serbest ribozomlar ve glikojen içeriği belirgindi. Bazı hücrelerin sitoplazmaları ise yer yer GER sisternaları ve Golgi birleşiminin yanı sıra lizozomdan zengin çok sayıda otofajik vakuoller içeriyordu. Atorvastatin uygulanan deney gruplarının tüm ilaç dozlarında hücre sitoplazmalarında çift zar ile sarılı çok sayıda değişik büyüklükteki otofajik vakuolleri dikkati çekti. 10 ve 20 μ M ilaç uygulaması yapılan deney gruplarında çekirdek kromatinin periferiye yığıldığı, sitoplazmik balonlaşma (blebbing) ve sitoplazmik yoğunlaşmalar gösteren apoptotik hücrelerin çok sayıda olduğu gözlemlendi. Bu hücrelerin yanı sıra yine sıkça gözlenen otofajik hücre sitoplazmalarında iri mitokondriyonların azaldığı görüldü. Otofajik hücrelerde mitokondriyonların çevresinde ER sisternaları olarak değerlendirilen yapıların izolasyon membran oluşturmaya başladığı izlenimi alındı. Doz artışına bağlı olarak 10 ve 20 μ M uygulanan gruplarda, iri mitokondriyonlarda azalmanın yanı sıra lipid damlacıklarındaki artış dikkati çekti. Özellikle 24 saatlik gruplarda rastlanan lipid damlacıklarının 80mM grubunda hem sayıca hem de büyüklük olarak daha fazla olduğu gözlemlendi. 48 saatlik deney grubunun elektron mikroskobik incelemelerinde, 24 saatlik gruba kıyasla dejeneratif değişiklikler gösteren hücrelerin sayıca daha fazla olduğu görüldü. Hücrelerin bir kısmının apoptotik hücre morfolojisi sergiledikleri bazı hücrelerin ise sitoplazmalarında fagositik hücre artıklarıyla birlikte bulundukları saptandı. 48 saatlik dejenerasyon gösteren hücrelerde organel içeriğinin azalmış olmasının yanı sıra sitolizis görüntüsü de belirgindi. Özellikle 48 saat 80 μ M uygulanan hücrelerin çekirdek yapıları ve kromatin dağılımı bozuk olarak izlendi.



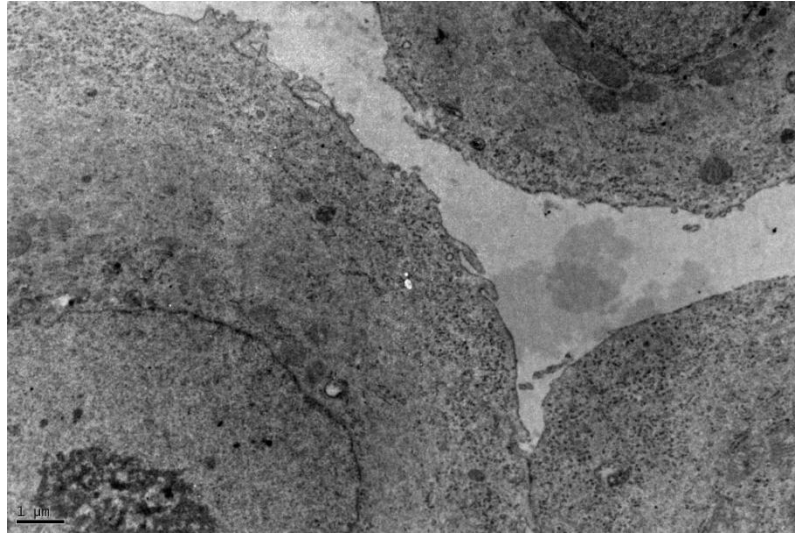
Resim 86: Kontrol grubu MCF-7 hücreleri ince sitoplazmik uzantıları ve sitoplazmalarının büyük bir kısmını kaplayan iri çekirdekleri ile izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X6000).



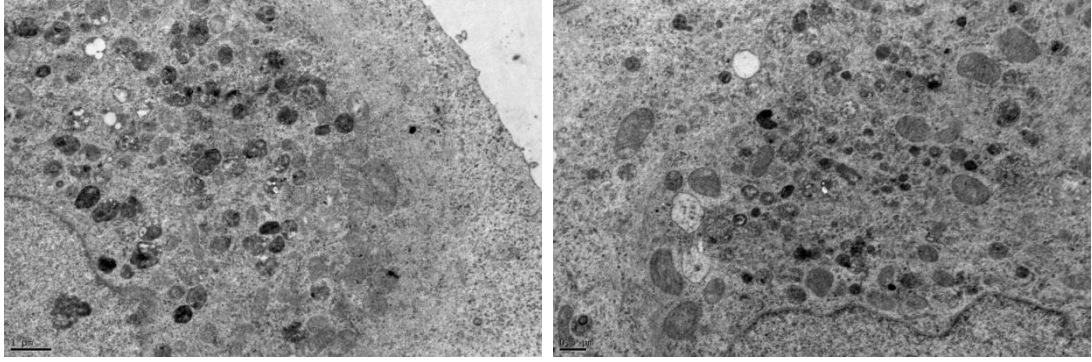
Resim 87: Kontrol grubu MCF-7 hücresi geniş yer kaplayan çift çekirdekcik ve iri mitokondrionları ile izlenmektedir(Uranil asetat-kurşun sitrat, X15 000).



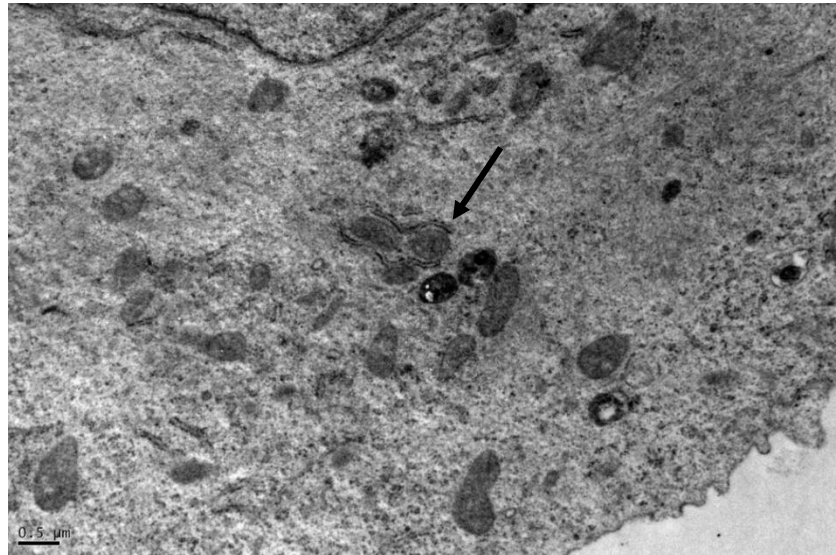
Resim 88: Kontrol grubu MCF-7 hücresinin daha büyük büyütmesinde düzensiz sınırlı çekirdek, çekirdekcik ile sitoplazmasında iri mitokondriyonlar ve lizozomlar izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X12000, X20 000).



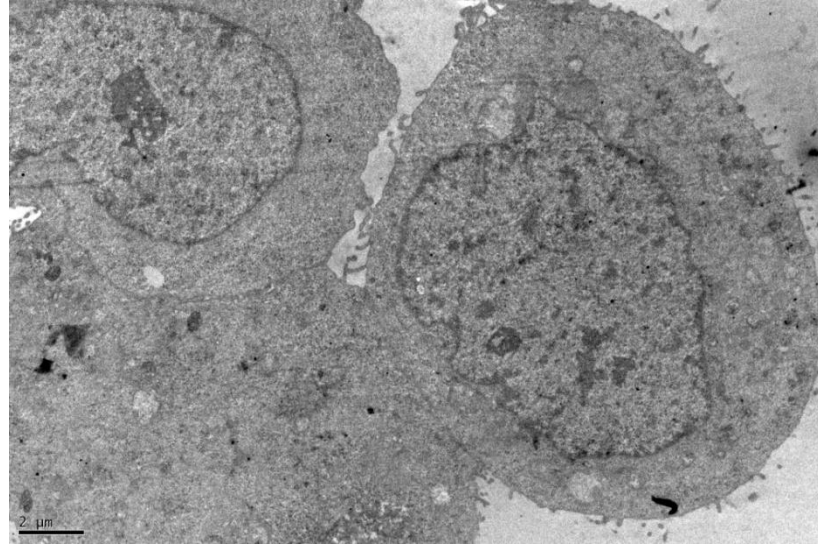
Resim 89: Kontrol grubu MCF-7 hücrelerinde organelden fakir sitoplazma içerisinde çekirdeğe yakın yerleşimli iri mitokondriyonlar, serbest ribozomlar ve periferik glikojen tanecikleri izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X15000).



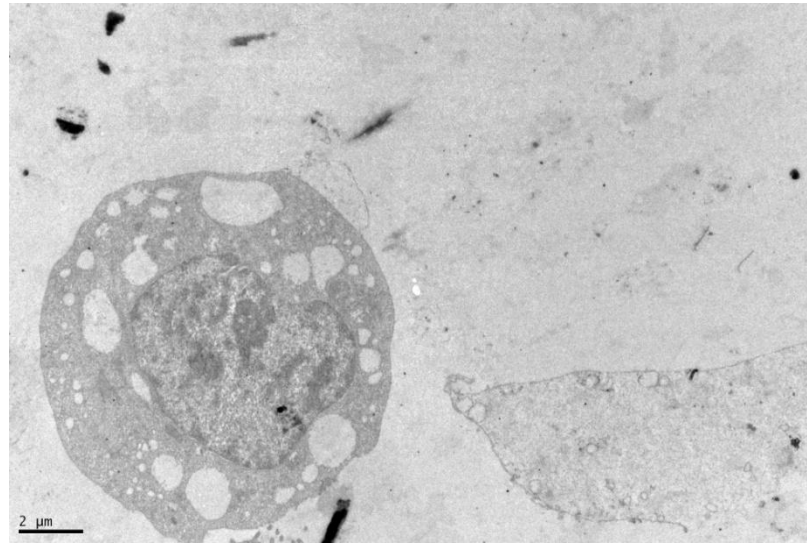
Resim 90: Kontrol grubu MCF-7 hücresi belirgin kristalları, iri mitokondriyonları ve yakınında lizozomlar ile izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X15000, x20000).



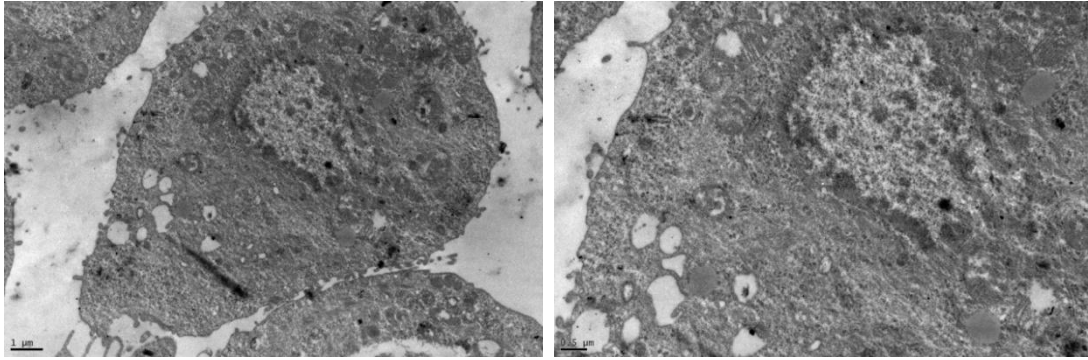
Resim 91: Kontrol grubu MCF-7 hücresinde lizozomların yakınındaki mitokondriyonların çevresini sarar görünümdeki ER'nin izolasyon membranı oluşturmak üzere düzenlendiğini düşündüren yapılanmalar (ok) izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, x20000).



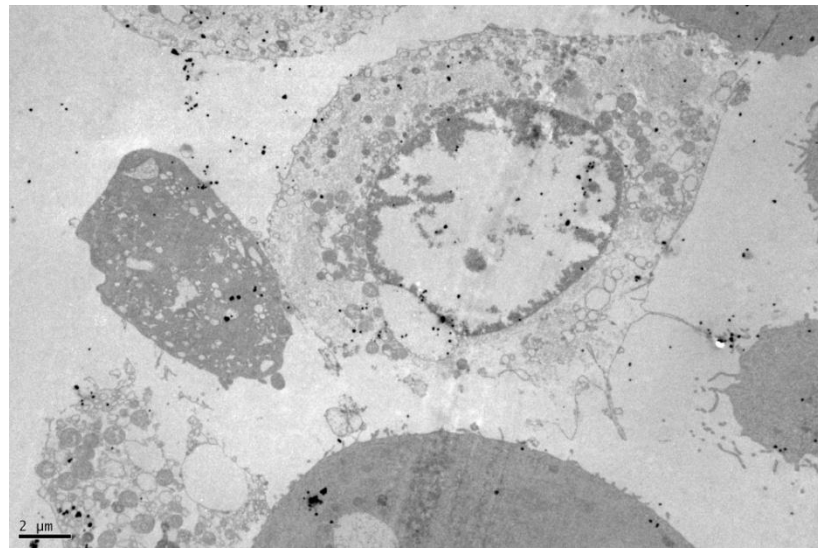
Resim 92: Atorvastatin 10μM konsantrasyonuna 24 saat maruz kalan MCF-7 hücreleri. Sol üst köşedeki MCF-7 hücresinin belirgin çekirdekçiği izlenmektedir. Hücre sitoplazmalarının organeldan fakir olduğu görülmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat,x6000).



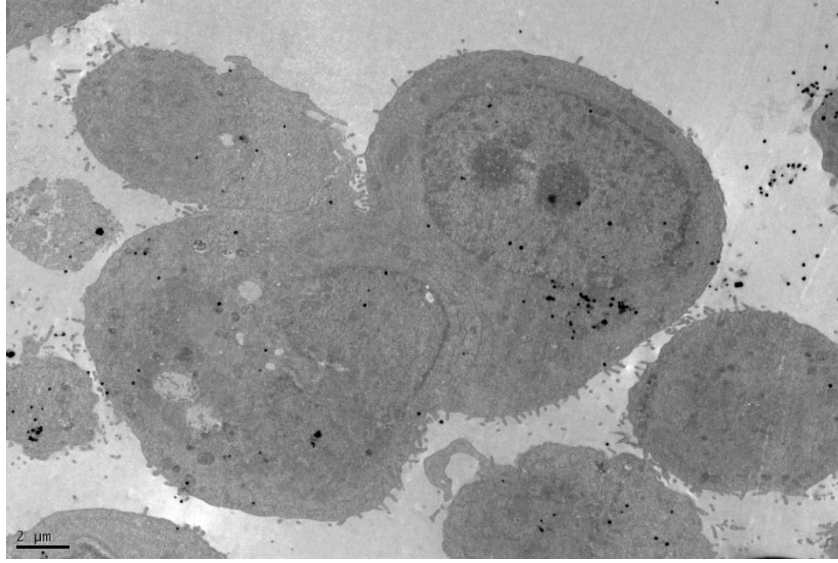
Resim 93: Atorvastatin 10μM konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen apoptotik MCF-7 hücresinde sitoplazmik uzantıların tamamen yok olduğu, yuvarlak biçim alan hücrede sitoplazmik yoğunlaşmanın ve irregüler elektron yoğunluğu göstermeyen keseciklerin bulunduğu ancak çekirdek yapılanmasında belirgin değişiklik bulunmadığı görülmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000).



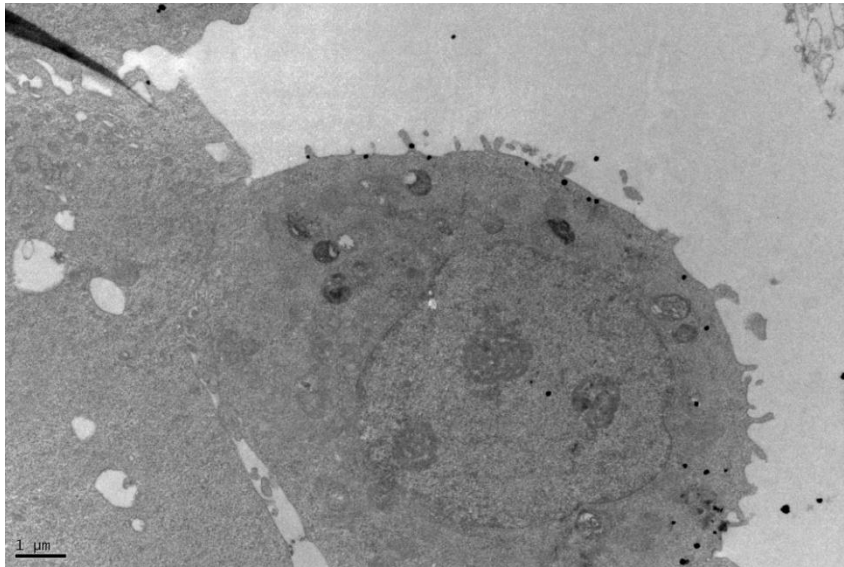
Resim 94: Atorvastatin 10 μ M konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücresi. Sitoplazmik yoğunlaşması belirgin, mitokondriyonlarının bir kısmında kristalizis ve sitoplazmasında az sayıda lipid damlalarına rastlanan hücrede, hücre membranına yakın komşulukta kesecikler izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X12000, 20 000).



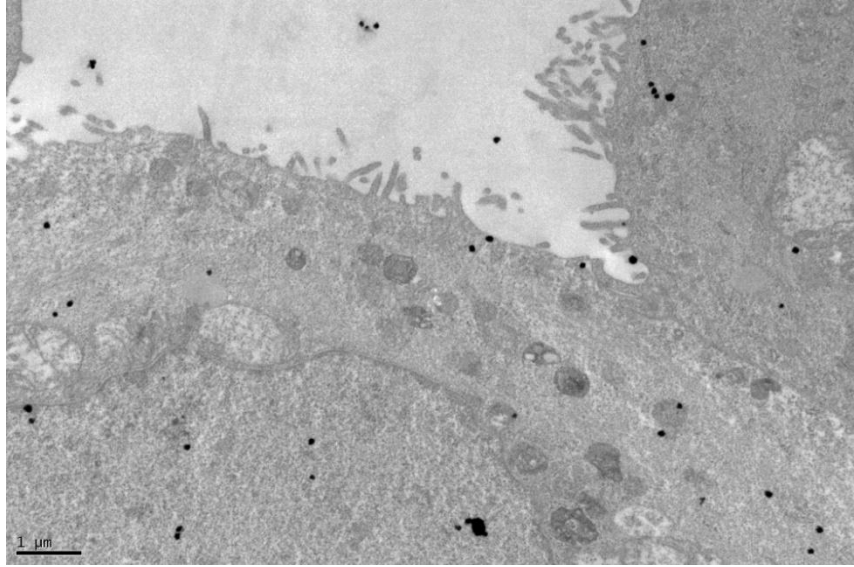
Resim 95: Atorvastatin 20 μ M konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde ileri dejeneratif değişiklikler gözlenmektedir. Ortada membran bütünlüğü bozulmuş, sitolizis başlangıcı gösteren nekrotik hücrede çekirdekte belirgin kromotolizis izlenmektedir. Hemen yanındaki apoptotik hücrenin yoğun sitoplazması dikkat çekmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 6000).



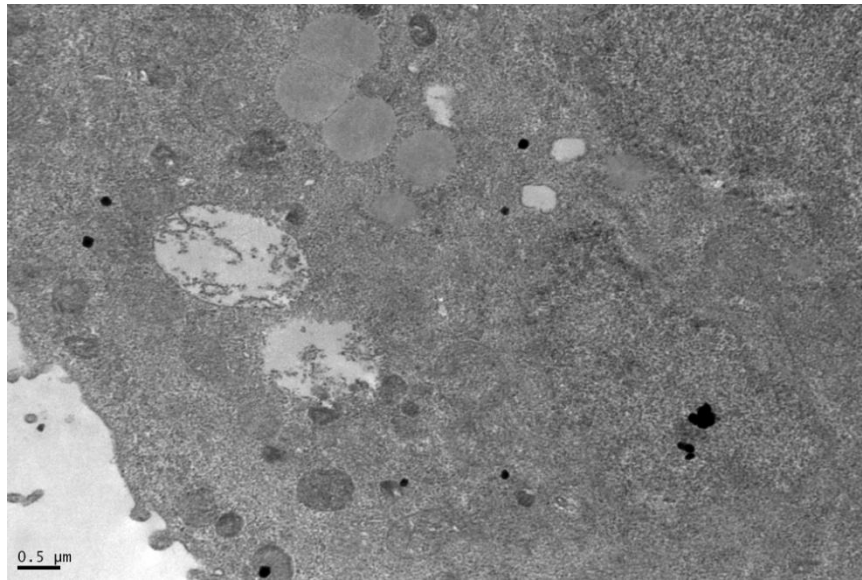
Resim 96: Atorvastatin 20 μ M konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücreleri. Çift çekirdekli hücreye yakın temasta, çekirdek kromatin yapılanmaları bozulmuş dejenerasyon gösteren hücreler izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 6 000).



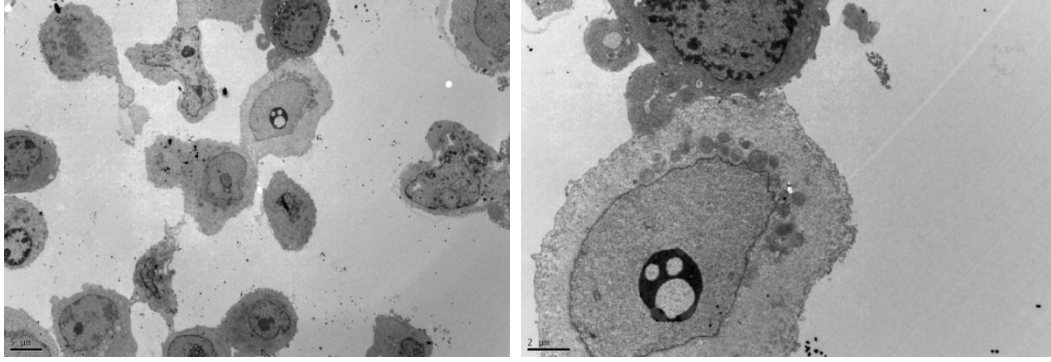
Resim 97: Atorvastatin 20 μ M dozu ile 24 saat muamele edilen hücrenin çekirdekcikleri ve ince kromatin ile sınırlı çekirdeği görülmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 12 000)



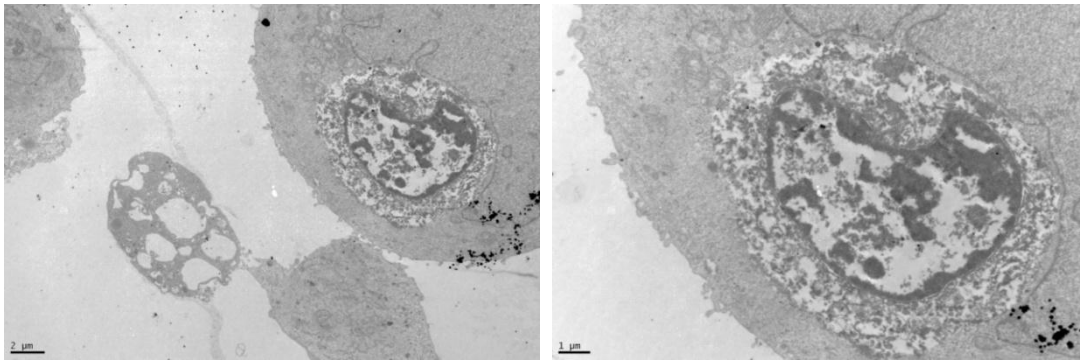
Resim 98: Atorvastatin 20μM dozu ile 24 saat muamele edilen hücrenin sitoplazmasında iri otofajik vakuoller ve hücre membran uzantıları izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 15 000).



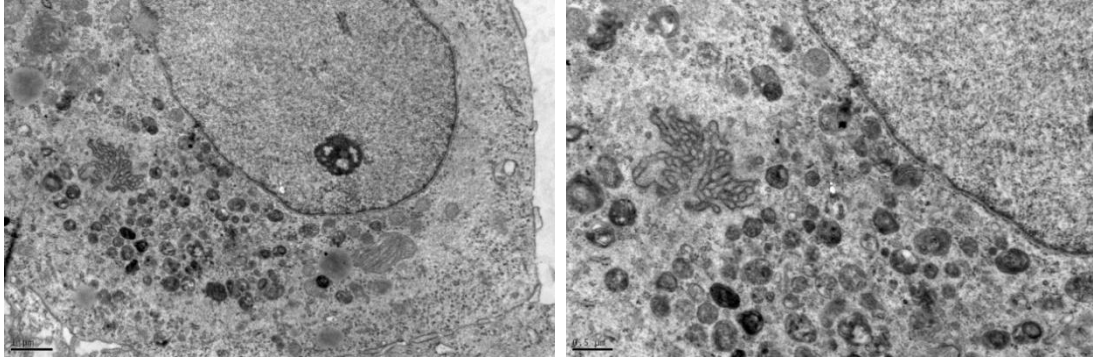
Resim 99: Atorvastatin 20μM konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan MCF-7 hücresi. Sitoplazmada çok sayıda serbest ribozomlar, yağ damlacıkları ve mitokondriyonlar izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 20 000).



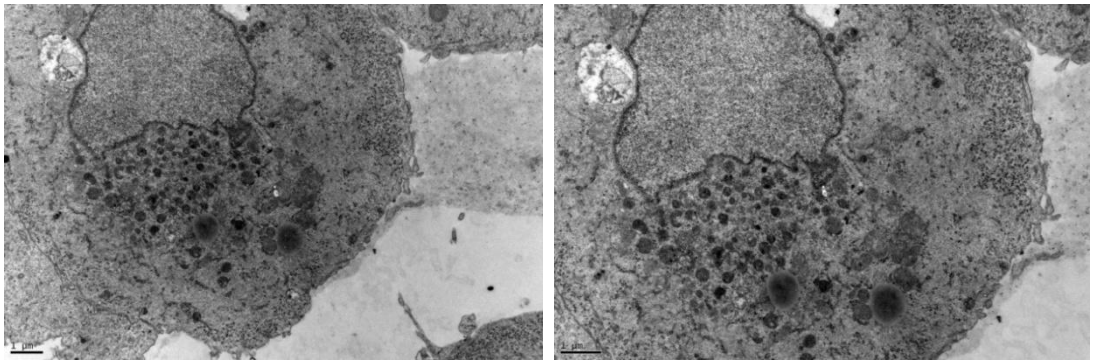
Resim 100: Atorvastatin 80 μ M konsantrasyonuna 24 saat bırakılan ve farklı dejeneratif değişiklikler gösteren MCF-7 hücreleri. Daha büyük büyütmede kromotolizis yanı sıra ileri dejenere çekirdekcik içeren hücre ve hemen üzerinde kromatini perifere yığılmış, sitoplazması yoğunlaşma ve balonlaşma gösteren apoptotik hücre izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 2500, x8000).



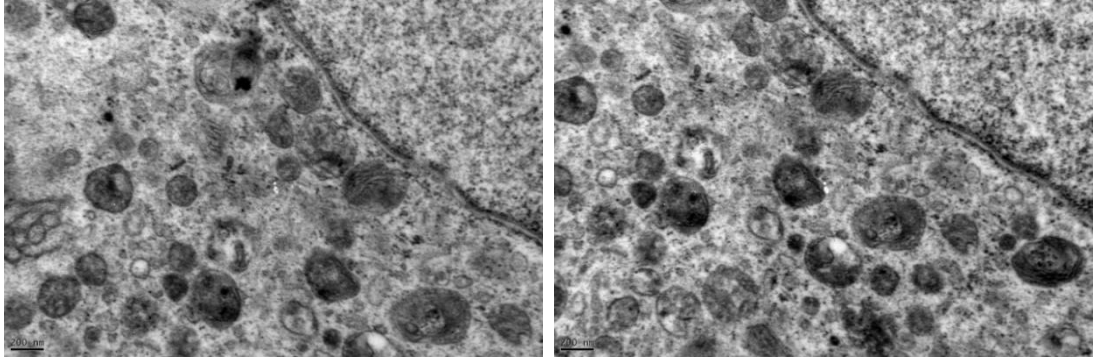
Resim 101:Atorvastatin 80 μ M konsantrasyonuna 24 saat bırakılan ileri dejenerasyon gösteren MCF-7 hücreleri. MCF-7 hücresinin sitoplazmasında fagosit edilmiş bir başka dejeneratif hücre izlenmektedir. (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 6000, x12 000)



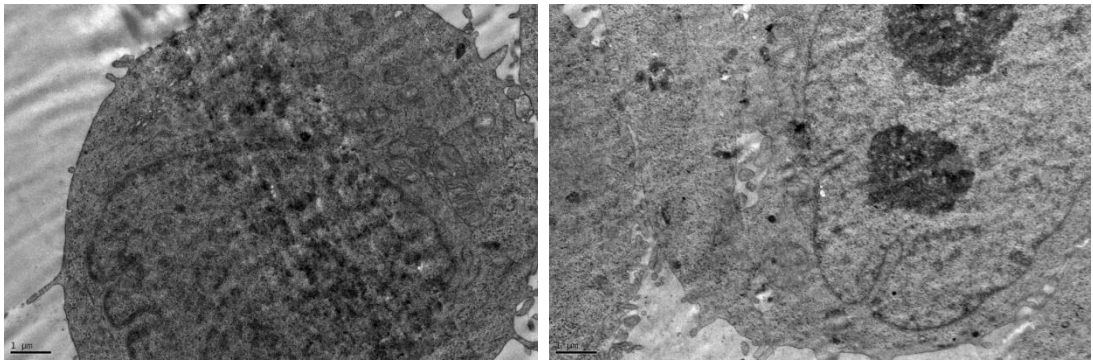
Resim 102: Atorvastatin 80 μ M konsantrasyonuna 24 saat bırakılan MCF-7 hücresi. MCF-7 hücresinin sitoplazmasında Golgi birleşigi, yağ damlacıkları ve serbest ribozomlar, çeşitli büyüklüklerde otofajik vakuoller ve yakın komşuluğunda düzensiz membran yapıları izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 15000, x30 000).



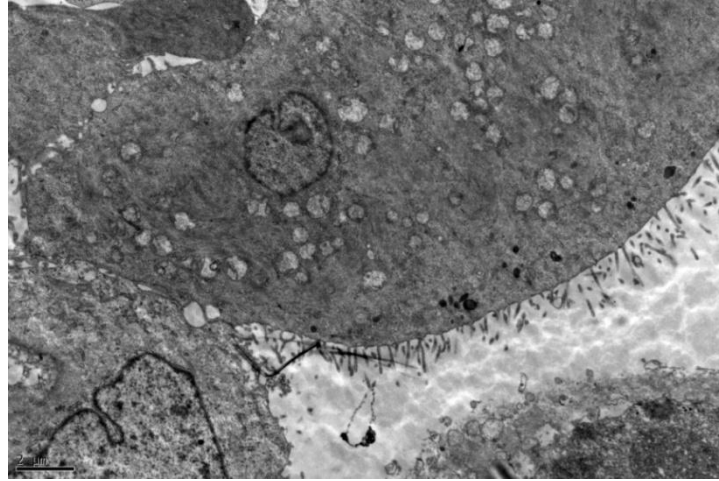
Resim 103: Atorvastatin 80 μ M konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MCF-7 hücresi. MCF-7 hücresinin sitoplazmasında çeşitli büyüklüklerde lizozomlar, otofajik vakuoller, yağ damlacıkları ve periferik sitoplazmada glikojen tanecikleri gözlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X 12000, x15000).



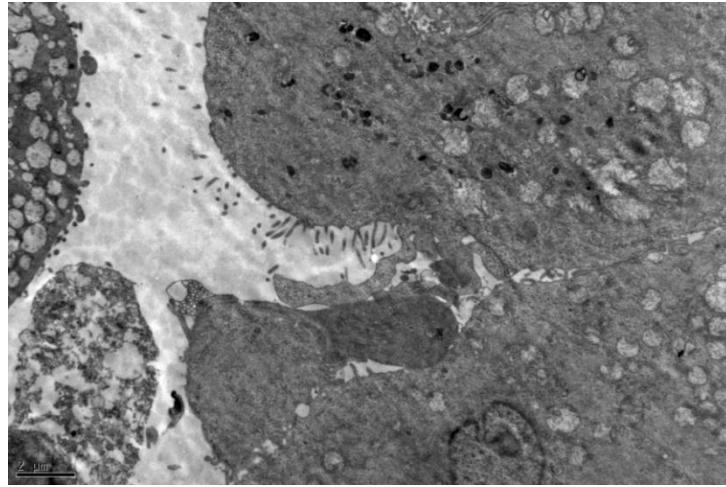
Resim 104: Atorvastatin 80 μ M konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılan MCF-7 hücresi. MCF-7 hücresinin sitoplazmasında çift membran ile sarılı otofajik vakuoller, çekirdek zarının ve deliklerinin hemen yakınında izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X60000).



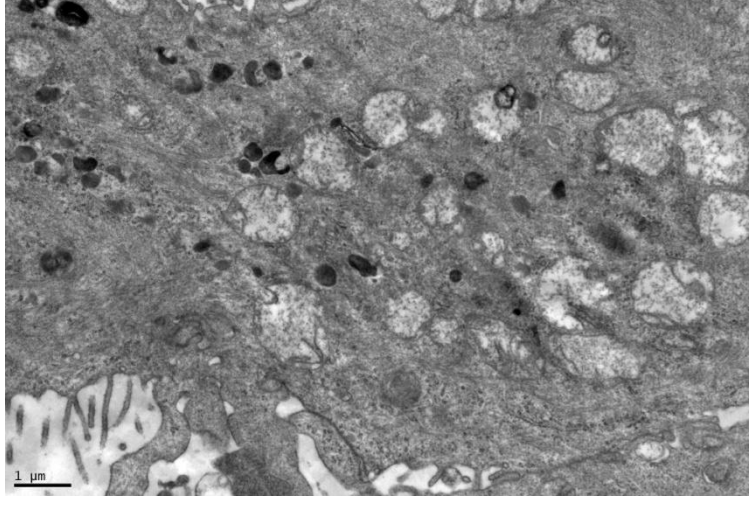
Resim 105: 48 saatlik kontrol grubundan alınan elektronmikrografta; MCF-7 hücreleri girintili çekirdekleri ve sağ mikrografta çift çekirdekcik ve ince kromatin dağılımları ile izlenmektedir. Sitoplazmada iri mitokondriyonlar, GER, Golgi kompleksi ve yaygın glikojen izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X15 000, X15 000).



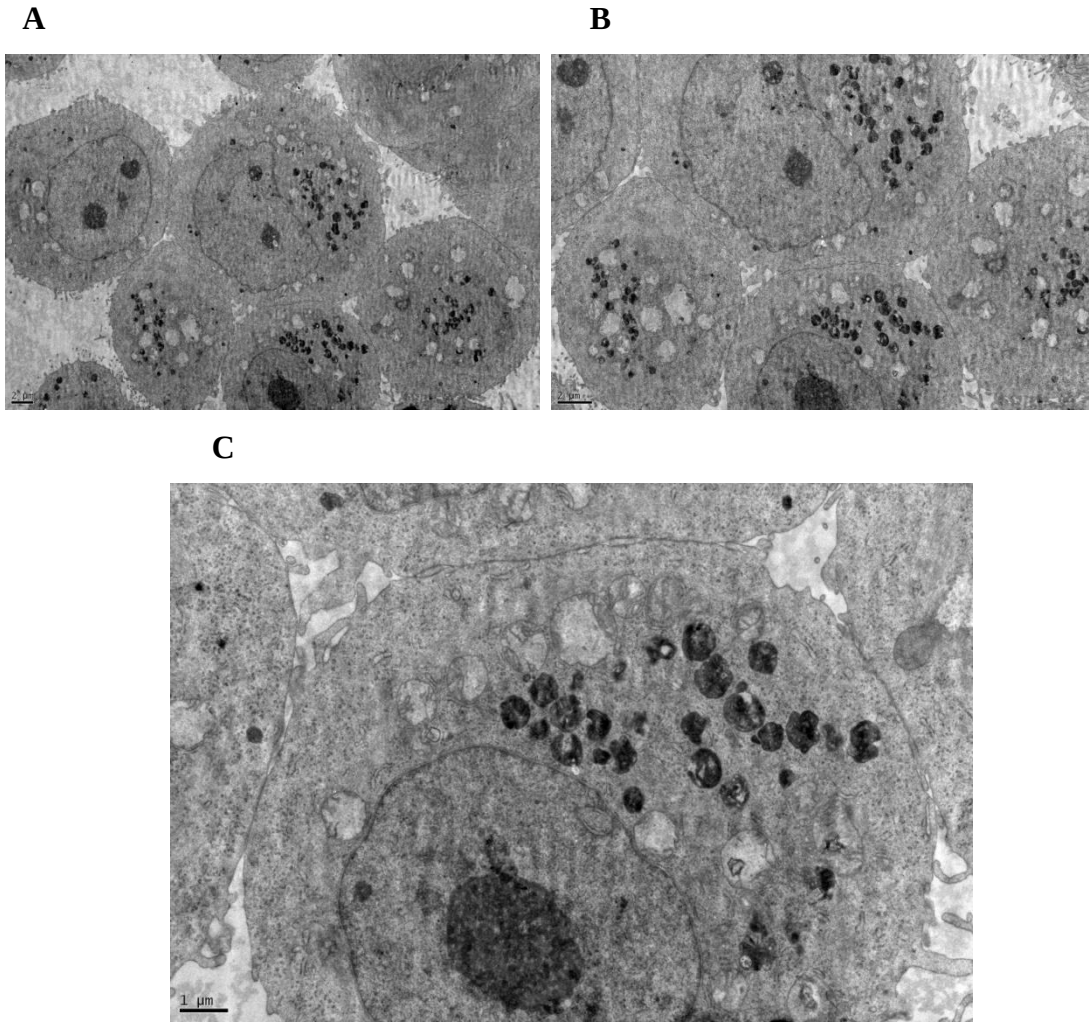
Resim 106: 10μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücreleri. İnce sitoplazmik çıkıntıları ile belirgin, geniş sitoplazmalı MCF-7 hücresi izlenmektedir. Enine kesitleri ile belirgin kristalleri izlenen iri mitokondriyonlar sitoplazmada yaygın olarak görülmektedir. Çekirdeğe yakın yerleşimli GER sisternaları dikkati çekmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000).



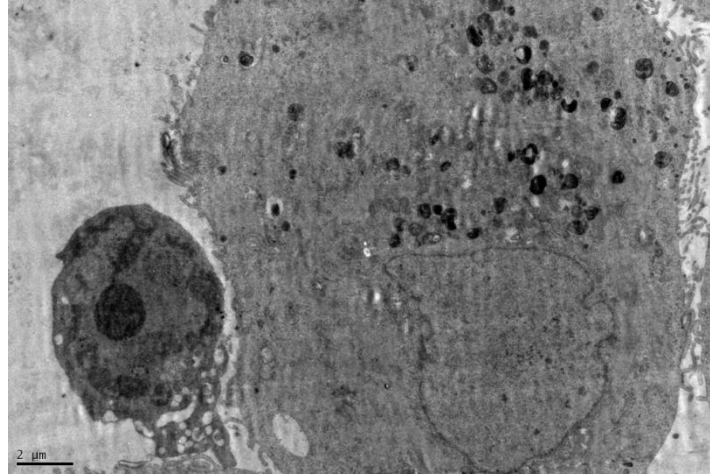
Resim 107: 10μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücreleri. Hücre dejenerasyonunun farklı düzeylerde gözleendiği elektronmikrografta bir önceki resimde gözlenen hücre sağ alt köşede yer almaktadır. Bu hücrenin hemen üstünde mitokondriyonlar, GER, mitokondriyonlara yakın yerleşimli lizozomlar izlenmektedir. Resmin sol üst köşesinde sitoplazmik yoğunlaşma, bleb oluşumu ve kristalizis olduğu gözlenen mitokondriyonların bulunduğu apoptotik hücre görünmektedir. Sol alt köşede ise sitoplazma bütünlüğünün bozulduğu sitolizis görünümüne sahip nekrotik bir hücre izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000).



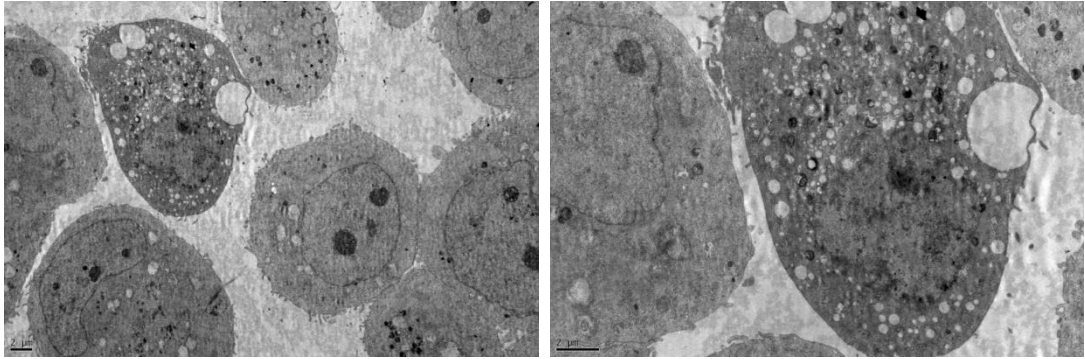
Resim 108: Bir önceki resimde otofajik vakuoller içeren hücrenin daha büyük büyütmesinde hücre iskeletine ait mikrofilamanlar sitoplazmada yaygın olarak izlenmektedir. Mitokondriyonlar, yakın komşuluğundaki lizozomlar ve otofajik kesecikler olarak değerlendirilen heterojen elektron dens görünümlü vakuoller izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X15 000).



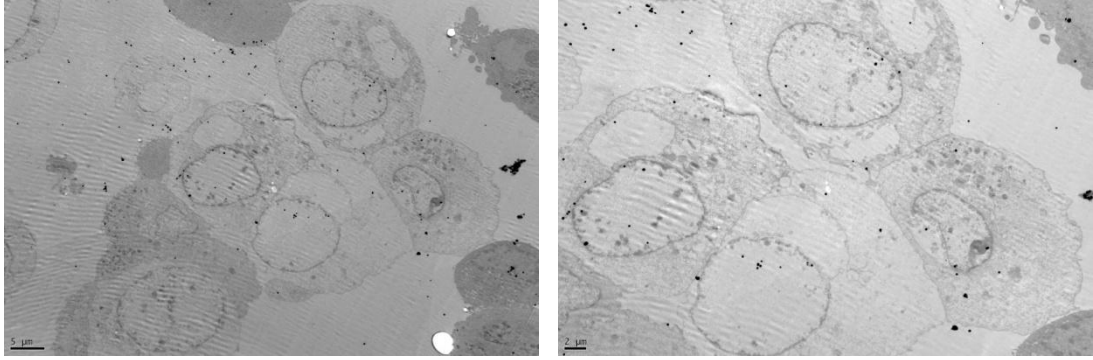
Resim 109: 20μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin elektronmikrografında (A) sitoplazmalarında mitokondriyal genişleme ve otofajik vakuollerin belirgin olduğu çift ya da tek çekirdekcikleri olan hücreler izlenmektedir. (B) Birbirleriyle yakın komşulukta bulunan oldukça iri otofajik vakuoller içeren hücreler görülmektedir (C) Çift membran ile sarılı çekirdeğin etrafında mitokondriyon, GER ve otofajik vakuoller daha büyük büyütme ile izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X4000, X4000, X12 000).



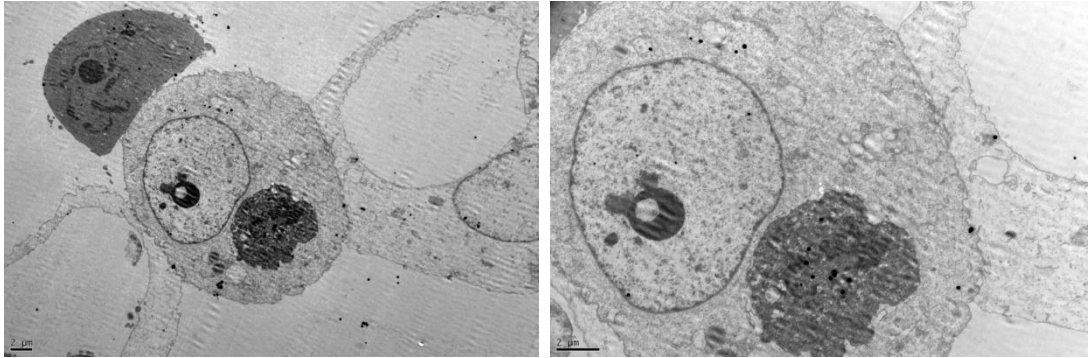
Resim 110: 20μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin elektronmikrografında apoptotik ve otofajik değişimlerin gözlemlendiği hücreler birarada izlenmektedir. Solda çekirdekte kromatin lobulasyonu gösteren sitoplazması yoğun sitoplazmik uzantılarını kaybetmiş yuvarlak apoptotik hücre izlenmektedir. Sağda sitoplazmada yaygın otofajik vakuoller içeren hücre görünümü izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000).



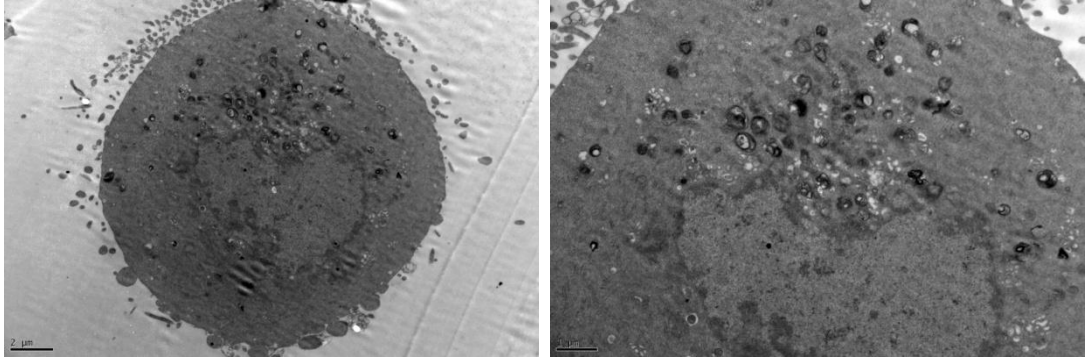
Resim 111: 20μM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin elektronmikrografında sol üst bölgede organel dağılımı bozulmuş, sitoplazmanın periferinde irregüler elektron yoğunluğu göstermeryen membran ile çevrili yapılar ile nekroza gidiş olabileceğini düşündürülen ileri hasarlı hücre gözlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X4000, X8000).



Resim 112: 80µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptan alınan ince kesitte yaygın nekrotik hücre grupları izlenmektedir. Membran bütünlüğü bozulmuş sitolizisin büyük oranda gerçekleştiği hücrelerde kromatolizis görünümü de belirgindir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X2500, X4000).



Resim 113: 80µM Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen gruptan alınan elektronmikrografta apoptotik görünümlü hücre ve farklı hemen yanında apoptotik hücre fagositozunu gerçekleştirmiş izlenimi veren bir başka hücre izlenmektedir. Her iki tarafta ise sitoplazmada belirgin sıvı birikimini gösteren muhtemelen membran bütünlüğü bozulmaya başlamış iki hücre izlenmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000, 15 000).



Resim 114: 80 μ M Atorvastatin ile 48 saat muamele edilen grupta otofaji ve apoptozis in tipik morfolojik özelliklerinin gösteren bir başka hücre. otofajik vakuoller, sitoplazmik kondensasyon, nuklear fragmentasyon ve hücre membranında bleb oluşumu dikkati çekmektedir (Uranil asetat-kurşun sitrat, X8000, X15 000).

5.TARTIŞMA

Dünya genelinde yüksek insidans ve mortalite oranları ile ciddi bir sağlık sorunu olan kanser, uzun ve zahmetli tedavi süreci ile ekonomik olarak da büyük kayıplara yol açmaktadır. Meme kanseri, kadınlarda en sık gözlenen kanser olmakla birlikte, kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Son yıllarda meme kanseri insidansında artış; mortalitesinde ise azalma izlenmektedir (3). Bunun nedeninin tarama yöntemlerinin gelişmesine bağlı erken teşhis edilen olgu sayısındaki artış ya da tedavi yöntemlerindeki ilerlemeler olduğu düşünülmektedir. Günümüzde mikro metastazlarla ilerlediği bilinen meme kanseri tedavisinde sistemik adjuvan tedavi uygulanımı yaygındır. Kemoterapatik ilaçlar (taksanlar, antrasiklinler), antihormonal tedavi ve hedef molekül tedavileri (transtuzumab) ile birçok hastadan başarılı sonuçlar elde edilse de, bazı hastalarda günümüzde kullanılan ilaçlar ile olumlu sonuçlar alınamamaktadır (4). Bu nedenle birçok kanserde olduğu gibi meme kanserinde de yeni tedavilerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yürütülmektedir.

Günümüzde en çok serebrovasküler ve kardiyovasküler hastalıkları önlemek için kullanılan, kolesterol sentezini hidroksi-metil glutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz enzimi inhibisyonu ile spesifik olarak bloke eden statinler literatürde yer alan son çalışmalarda kanser tedavisinde umut vadeden ilaçlar olarak gösterilmektedir. Statinlerin meme kanseri gelişimi üzerindeki etkisini incelemeye yönelik yapılan klinik çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Statin kullanımının meme kanseri oluşumunu azalttığına yönelik çalışmaların yanı sıra (9) riski arttırdığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (10). Statinlerin meme kanseri tedavisinde etkisini araştırmak üzere planlanmış deneysel çalışmalarda statinlerin in vitro ortamda, meme kanseri hücre hatlarında sitotoksik etkileri gösterilmiştir (93,95). Literatürde MCF-7 meme adenokanser hücrelerinde de farklı statinlerin hücre çoğalması üzerindeki etkisini araştıran yayınlar bulunmaktadır. Statinlerin meme kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksitesinin araştırıldığı çalışmalarda; hidrofobik statinlerin meme kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisi olurken, hidrofilik olanların etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (93,101). Bu çalışmalarda atorvastatin, simvastatin, fluvastatin ve lovastatin gibi lipofilik statinlerin hücre

proliferasyonunda azalma etkisi gözlenmiş, ancak hidrofilik gruptan pravastatinin ise meme kanser hücrelerinde sitotoksik etkisi izlenmemiştir (93). Gruplar arasındaki bu etki farkı lipofilik statinlerin kolaylıkla hücre membranından geçerken; hidrofilik statinlerin hücre membranını geçmek için özel taşıyıcıya ihtiyaç duymasına bağlanmaktadır. Bu çalışmada da literatürdeki bu yayınlardan yola çıkarak statinlerin lipofilik grubundan olan atorvastatin, simvastatin ve fluvastatin tercih edilmiştir.

Atorvastatin, fluvastatin ve simvastatinin meme adenokarsinom hücre hattı MCF-7 üzerinde sitotoksik etkilerini incelediğimiz çalışmamızda, ilaçların artan dozlarına paralel MCF-7 meme adenokarsinom hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. MCF-7 hücrelerinin 48 saat atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonrasında atorvastatinin 40µM, fluvastatinin 5 µM ve simvastatinin 40 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığında %50 azalma saptanmıştır. Kullandığımız ilaçlardan fluvastatin, hücre canlılığında en belirgin azalmayı göstermiştir. Fluvastatinin MCF-7 hücrelerinde atorvastatin ve simvastatinden daha sitotoksik olmasının nedeni; fluvastatinin daha lipofilik olması nedeniyle hücre membranından daha kolay geçmesine bağlanmıştır. MCF-7 hücrelerinde statinlerin sitotoksitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada; atorvastatinin 40µM, simvastatinin 2.5µM, fluvastatinin ise 1.25µM konsantrasyonu ile 48 saat muamele sonrasında MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda %50 azalma saptanmıştır(95). Bu çalışmada fluvastatinin atorvastatin ve simvastatinden daha sitotoksik olması ve atorvastatinin 48 saat tedavisinde %50 inhibisyon dozunun 40µM olarak bulunması, bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Statinlerin MCF- 7 hücrelerinde sitotoksik etkisini gösteren bir diğer çalışmada, atorvastatinin 43µM, simvastatinin 21µM, fluvastatinin ise 30µM konsantrasyonu ile 4 gün muamele edilen MCF-7 hücrelerinin proliferasyonda %50 azalma saptanmıştır (93). Aynı çalışmada MCF- 7 hücreleri üzerinde en etkin statin grubu ilaç simvastatin olarak gösterilmiştir. Literatürdeki statin sitotoksitesinin araştırıldığı araştırmalarda, benzer statin çeşitleri kullanılarak farklı sitotoksik etkilerin saptanmasının nedeni kültür koşullarındaki farklılıklara ve ortam pH'sındaki değişikliklerin statinlerin lipofilik ve hidrofiik özelliklerini değiştirmesine bağlanmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer olarak bazı farklılıkların gözlenmesi yine kültür koşullarının farklılığı ve değişik sitotoksik testlerinin kullanılmasına bağlanabilir. Önceki çalışmalarda hücre

proliferasyonu ve ilaç sitotoksitesi; kristal viyole ve ATP kemosensitivite testi ile değerlendirilmiş ve yorumlanmıştır. Bizim çalışmamızda statinlerin sitotoksitesi kültür çalışmalarında kullanıma yeni başlanmış olan mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzim bozukluğuna dayanan WST-1 yöntemi ile saptanmıştır. Çalışmamızda hücrelerin dejeneratif değişikliklerinin yaygın olarak mitokondonriyon hasarı ile ilişkili olduğu göz önüne alındığında, sitotoksisite testi olarak WST' nin seçilmesinin doğru bir karar olduğu düşünülmektedir.

Statinlerin meme kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkilerinin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Son yıllarda bu mekanizmaları açıklamaya yönelik birçok çalışma yürütülmektedir. Statinlerin mevalonat yolağında yol açtıkları inhibisyon ile Rho ve Ras GTPazları modifiye eden geranil ve farnesil pirofosfatazların üretimini engellemelerinin meme kanser hücrelerinin çoğalmasındaki azalmanın nedeni olabileceği öne sürülmüştür (11,12). Bir diğer çalışmada mevalonat yokluğunda, hücrelerde CDK2'nin fonksiyon bozukluğu ve G1-S fazına geçişte gerekli olan pozitif kontrol moleküllerin ekspresyonunda azalma gözlenerek statin tedavisinin kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisinin, hücreleri G1 fazında bekletmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (94). Bizim çalışmamızda da statinlerin meme kanseri hücrelerindeki antiproliferatif etkisi apoptoz ve otofaji mekanizmaları açısından incelenmiştir.

MCF-7 hücrelerinin çalışmamızda atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin 10µM, 20µM ve 80µM konsantrasyonları ile 24 saat muamelesi sonrasında, hücre gruplarında doz artışına paralel apoptotik hücre artışı gözlenirken, 48 saatte 80 µM konsantrasyon uygulanan grupta, 10µM ve 20µM gruplara oranla daha düşük sayıda apoptotik hücre saptanmıştır. Bunun nedeninin doz artışıyla hücrelerin nekroz yoluyla kaybedilmesi ve lamda tutunan hücre sayısının azalması olabileceği düşünülmüştür. Atorvastatinin 10µM, 20µM ve 80µM konsantrasyonları ile muamele sonrası saptanan nekrotik hücrelerin 48 saatte 24 saat gruplarına göre yüksek olması ve 48 saat 80µM uygulanan grupta %70'e varan oranda nekrotik hücre gözlenmesi; atorvastatinin yüksek dozlarda apoptotik mekanizmaların yanı sıra nekrotik mekanizmalar ile de hücre ölümünü gerçekleştirdiğini düşündürmüştür. Elektron mikroskop incelemelerimizde de, bunu destekler nitelikte bulgular elde edilmiştir. Elektron mikroskopik incelemede, kontrol grubunda mitotik özellikler gösteren

hücreler bulunurken, atorvastatin 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonları uygulanan gruplarda çoğunlukla apoptotik ve otofajik dejeneratif özellikler gösteren hücreler incelenmiştir. 80 μ M atorvastatin uygulanan gruplarda ise belirgin çekirdek ve sitoplazma dejenerasyonları ile nekrotik hücreler saptanmıştır. Elektron mikroskopik inceleme bulgularımız, TUNEL ve yarı ince kesitlerden elde edilen kantitatif apoptotik ve nekrotik hücre sonuçlarını desteklemektedir.

Mitokondriyon oksijen molekülü kullanması nedeniyle, hücrede oksijen radikallerinin en önemli kaynaklarından. Oksijen radikallerinin artması; membran lipidlerinin peroksidasyonuna, mitokondriyal DNA'nın yıkılmasına, ATP üretiminin bozulmasına ve mitokondriyonun geri dönüşümsüz hasarına yol açmaktadır. Hücrelerdeki oksidatif stres göstergelerinden bir diğeri hücre sitoplazmalarında lipid birikimlerinin görülmesidir. Elektron mikroskopik incelemelerimizde, kontrol hücrelerinde iri ve düzgün yapıda gözlenen mitokondriyonların, atorvastatin uygulanan hücre gruplarında yapısal bozukluğa uğradığı ve sayıca azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca 24 saat atorvastatinin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonları ile muamele edilen deney gruplarındaki hücrelerin sitoplazmalarında kontrol grubu hücrelerinden farklı olarak yağ damlacıkları izlenmiştir. Atorvastatin uygulanan MCF-7 hücrelerinde mitokondriyonların yapısının bozulması ve yağ damlacıklarının izlenmesi hücrelerde membran döngüsünün bozulduğunu göstermesinin yanısıra oksidatif stres mekanizmasının da aktive olduğunu düşündürmektedir. Statinlerin meme kanser hücrelerindeki apoptotik etkilerinin mekanizmasını araştıran çalışmalardan birinde atorvastatinin meme kanser hücre dizilerinde reaktif oksijen radikallerinde artışa yol açarak oksidatif stres mekanizmaları üzerinden, hücrelerin apoptoz ve nekroz ile ölüme yol açtığı gösterilmiştir (95). Çalışmamızdaki elektron mikroskopik bulgularımız bu çalışmayı destekler niteliktedir.

Sınıf I fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ protein kinaz B (Akt/PKB) yolağı hücre proliferasyonunda önemli kontrol yollarındandır. Aynı zamanda otofaji kontrolünde önemli olan bu yolağın aktivasyonu, hücrelerde otofajiyi baskılamaktadır. PTEN, (PI3K)/Akt/mTOR sinyal yolağını inhibe eden tümör baskılayıcı gendir. PTEN, (PI3K)/Akt/mTOR yolağında inhibisyon ile hücrelerde otofajiyi arttırmaktadır. Choudhury ve arkadaşları statinlerin meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin PI3K yolağında inhibisyon üzerinden olabileceği

hipoteziyle MDA-MB-231 insan meme kanseri üzerinde yaptıkları çalışmada, simvastatinin Akt fosforilasyonunu azalttığı ve PTEN ekspresyonunda artışa yol açtığı gösterilmiştir(15). Choudhury ve arkadaşlarının çalışması ve otofaji regülasyonunda (PI3K)/Akt/mTOR sinyal yolağının önemini gösteren çalışmalar (16), statinlerin meme kanseri hücrelerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkisinin otofaji indüksiyonu ile olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulguları destekler nitelikte çalışmamızda literatürde ilk olarak MCF-7 meme adenokanser hücrelerinde atorvastatinin otofajik etkisi incelenmiştir. MCF-7 hücrelerinde atorvastatinin 10, 20 ve 80µM dozları ile 24 ve 48 saat muamele sonrasında beclin-1 ve LC3 otofaji belirteçlerinin belirgin immunreaktiviteleri saptanmıştır. Beclin-1 ve LC3, sitoplazmada granüler görünüm göstermektedir. Otofaji tespiti yapılan bir çok çalışmada LC3'ün bu noktasal ekspresyonları özel programlarla değerlendirilerek kantitatif sonuçlar alınmaktadır. Çalışmamızda hücrelerde otofajinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla Atorvastatin 10µM, 20µM ve 80µM konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücrelere LC3 ile sito ELISA yöntemi uygulanmıştır. 24 saat ELISA sonuçlarında atorvastatin 20µM dozunda; 48 saat ELISA sonuçlarında atorvastatin 10µM dozunda otofaji en belirgin olarak saptanmıştır. Son yıllarda statinlerin farklı hücre hatları üzerinde otofajik etkileri incelenmiştir. Prostat kanser hücre hatlarında atorvastatinin 1, 2,5, 10 ve 20µM konsantrasyonları uygulanması sonrasında doz artışına paralel otofaji artışı gösterilmiştir (98). Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak doz artışına paralel otofajide artış gözlenmemiştir. Atorvastatin 10µM grupta otofaji 48 saatte daha belirginken, atorvastatin 20µM grupta 24 saatte daha belirgin olması yüksek dozda otofajinin daha erken dönemde meydana geldiğini düşündürmektedir. Atorvastatin 80µM dozunda otofajinin diğer gruplara göre düşük seyretmesi hücrelerin direk olarak nekrotik ölümüne bağlanmaktadır. Çalışmamızdaki elektron mikroskopik inceleme sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde Atorvastatinin 80µM dozu otofaji indüksiyonundan çok hücreleri nekroza getiren toksik bir doz olarak gözlenmektedir.

Çalışmamızda atorvastatinin 10 μ M, 20 μ M konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücre gruplarının elektron mikroskopik incelemelerinde hücrelerin büyük çoğunluğunda apoptotik ve otofajik değişiklikler saptanmıştır. Atorvastatin 10 ve 20 μ M uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, 20 μ M uygulanan grupta apoptoz ve otofaji; 10 μ M uygulanan gruba oranla daha fazladır. Apoptoz ve otofaji mekanizmaları arasında karışık bir ilişki bulunmaktadır. Otofajinin hücreleri apoptozdan koruyan bir mekanizma olduğunu savunan grupların yanı sıra hücrelerin kullandığı bir hücre ölüm mekanizması olabileceğini savunan yayınlar da bulunmaktadır. Meme kanseri hücre dizilerinde apoptoz otofaji arasındaki karmaşık ilişkiyi anlamaya yönelik kurulan birçok deney düzeneklerinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Benzer olarak meme kanserinde umut vadeden ilaçların birçoğunun otofaji indüksiyonu ile hücre proliferasyonunda azalma ve hücre ölümüne yol açtığını gösteren çalışmalar yanı sıra hücreleri ölümden koruyan bir savunma mekanizması olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin; Kuo ve arkadaşları, Plumbago zeylanica bitkisinin kökünden elde edilen ve antikarsinojenik özelliği bilinen plumbagin etken maddesinin etkisini MCF-7 ve MDA-MD-231 hücre hatları üzerinde araştırmışlar ve plumbaginın meme kanseri hücre hatlarında Akt yolağı inhibiyonu ile G2-M fazında duraklama ile otofajiye yol açtığını göstermişlerdir (70). Buna karşılık Espina ve arkadaşlarının insan duktal karsinoma hücrelerinin NOD/SCID farelere ksenotransplantasyonu üzerinde oluşturdukları duktal karsinoma insitu lezyonlarında, malign öncü hücreler bulunduğunu ve bu hücrelerin yaşamak için otofajiyi savunma mekanizması olarak kullandıklarını gösterdikleri karşıt görüşlü çalışmalar da bulunmaktadır (75). Çalışmamızda 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonlarda, doz artışına paralel apoptoz ve otofajideki artışın nedeni yüksek doza maruz kalan hücrelerin kendilerini korumak için otofajiyi savunma mekanizması olarak kullanmalarına bağlı olabileceği gibi otofaji ile hücre ölümüne gitmeleri nedeniyle de olabilir. Apoptoz ve otofajinin arasındaki yakın ilişkiyi gösteren kanıtların artması nedeniyle hücre ölüm mekanizmalarının tam olarak anlaşılması için ilaçların sitotoksik etkilerine hem apoptoz hem otofaji açısından bakılması yararlıdır. Apoptoz ve otofaji arasındaki ilişki otofaji inhibisyonunu sonrasında apoptoz düzeylerinin belirlenmesi ile daha detaylı anlaşılabilir.

Çalışmamızda atorvastatin uygulanan hücre gruplarının elektron mikroskopik incelemelerinde bazı hücrelerin apoptotik ve otofajik dejeneratif özellikleri birlikte içerdiği izlenmiştir. Bu hücrelerde otofaji ve apoptoz birlikte hücre ölümünü sağlamakta olabileceği gibi, otofaji ile canlılığını korumaya çalışan hücrelerde otofaji yeterli olmamış ve apoptotik mekanizma aktif hale gelmiş olabilir. Literatürde apoptoz ile otofajinin bazı hücrelerde koordine bir şekilde çalışarak hücre ölümünde ortak mekanizmalar olarak rol aldığını savunan görüşler bulunmaktadır. Apoptoz temel olarak çekirdek değişiklikleri ve kromatin materyalinin yıkımı üzerine giderken, otofaji sitoplazmik materyallerin yıkımı ile başlamaktadır. Bu nedenle organellerden zengin ve büyük çekirdeği olan hücrelerde koordine bir şekilde çalışarak hücreyi ölüme getirmeleri anlamlıdır. Ancak MCF-7 hücreleri kanser hücre morfolojisi olarak organelden fakir sitoplazmalara sahiptir. Bizim çalışmamızda da elektron mikroskopik incelemelerde MCF-7 hücreleri organelden fakir sitoplazmaları ile izlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda bazı hücrelerde apoptotik ve otofajik özelliklerin beraber görülmesini, apoptoz ve otofajinin koordine bir şekilde çalışarak hücreleri ölüme getirmeleri ile açıklamak zordur. Otofajinin bu hücrelerde savunma mekanizması olarak görev almış olması, ancak yeterli olmaması sonrasında hücrelerin apoptoza gitmesi bizim çalışmamızdaki hücreler için daha uygundur.

Elektron mikroskop incelemelerimizde atorvastatin uygulanan gruplarda, kontrol gruplarına oranla daha az sayıda mitokondriyon izlenmesi, mitokondriyon çevresinde izolasyon zarları ve mitokondriyonlara yakın komşulukta lizozomların saptanması, atorvastatin uygulanan MCF-7 hücrelerinde mitofajinin (mitokondriyonların otofaji ile yok edilmesi) gerçekleştiğini düşündürmektedir. Atorvastatinin sıçan iskelet kas hücrelerinde mitokondriyon membran potansiyelini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (100). Atorvastatinin ayrıca MCF-7 hücrelerinde oksidatif stres mekanizmaları üzerinden mitokondriyon membran potansiyelini bozduğu bilinmektedir (95). Apoptoz otofaji ilişkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada HT- 29 hücrelerinde sulindak tedavisine ek olarak otofaji inhibitörleri uygulandığında apoptotik hücre ölümünde belirgin artış gösterilmiş ve bunun nedeninin mitokondriyonlarından sitokrom c salınımı hızlı olan mutant HT- 29 hücrelerinde; otofajinin mitokondriyonları yıkıma uğratarak apoptozu geciktirmesi

olabileceği bildirilmiştir (58). Elektron mikroskop incelemelerimizde elde ettiğimiz bulgular, atorvastatinin oksidatif stres ile mitokondriyon hasarına yol açması sonrasında, otofaji ile hasarlı mitokondriyonların ortadan kaldırılmasına bağlı olabilir. Bu da otofajinin hücreleri ölümden koruyan bir savunma mekanizması olarak görev aldığını göstermektedir.

Erken, geç otofaji belirteçleri ve nekroz arasındaki ilişkiye yönelik çalışmamızda 80µM'lik yüksek doz konsantrasyonu ile 24 ve 48 saat muamele edilen gruplarda hücrelerin çoğunun nekroz ile kaybedildiği saptanmıştır. Ancak 80µM doz gruplarından elde edilen hücrelerde 48 saatte daha az olmak üzere beklin-1 ve LC3 otofaji işaretleyicilerinin ekspresyonu izlenmektedir. Atorvastatin 10µM ve atorvastatin 20µM doz gruplarında daha fazla sayıda hücrede yaygın ve kuvvetli ekspresyonlar; atorvastatin 80µM dozunda ise çok az sayıda hücrede kuvvetli granüler beklin-1 ve LC3 immunreaktiviteleri saptanmıştır. Atorvastatin 80µM grubunda ise diğer gruplara oranla apoptotik ve nekrotik hücreler daha fazla bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonda otofaji azalırken, apoptoz ve nekrozun artması; hücrelerin otofajiyi savunma mekanizması olarak kullanmalarına rağmen başarılı olamadıklarını düşündürmektedir. Aynı zamanda yüksek konsantrasyon ile muamele sonrası az sayıda kalan canlı hücrelerin otofaji sürecini geçirmiş ve yaşamda kalmayı başarmış olan hücre grubu olduklarının izlenimini vermektedir. Literatürde bu görüşümüzü destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Burch ve arkadaşları tamoksifenin 10µM dozu ile 24 saat muamelesi sonrasında MCF-7 hücrelerinin büyük çoğunluğunda nekroz ile hücre ölümünün gerçekleştiğini göstermişlerdir. Tamoksifenin 10µM dozu ile 1 saat muamele edilen hücrelerde ise otofajik özellikler saptamışlardır. Aynı hücrelerde 23 saat sonra hücre ölümünün gerçekleşmemesi üzerine otofajinin bu hücrelerde yaşamayı sağlayan bir savunma mekanizması olduğunu öne sürmüşlerdir (101). Apoptoz ve otofaji arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma olmasına rağmen, otofaji ve nekroz arasındaki ilişki üzerine çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Otofaji ve nekroz ilişkisinin araştırıldığı bu az sayıda çalışmada otofajinin hücrelerdeki ölüme karşı koruyan mekanizma olmasından çok nekroz için gereken bir ön koşul olduğu savunulmuştur. Bu çalışmalara örnek olarak Samara ve arkadaşları nematodlarda yaptıkları çalışmada, nöronların nekroz ile ölümü için otofajinin gereken bir ön koşul olduğunu savunarak

akut nörodejeneratif olaylarda otofaji inhibitörlerinin yararlı olacağını öne sürmüşlerdir (102). Bizim çalışmamızda da atorvastatin 80µM gibi toksik bir dozda hücrelerde nekrotik özelliklere ek olarak otofaji işaretleyicilerinin immunreaktivitesini bulmamızın nedeni, otofajinin savunma mekanizması olabileceği gibi bu çalışmaların gösterdikleri gibi otofajinin nekroz öncesinde yer alan ve nekroza yardımcı bir mekanizma olması da olabilir.

Metabolik stres tümörlerde sık gözlenen ve tümör hücrelerinin apoptoz ile ölmesini sağlayan bir süreçtir. Apoptotik mekanizmaları hasarlı olan hücrelerde ise metabolik stres otofajiyi uyarmakta, otofajide hasarlı organelleri yıkıma uğratarak hücreleri ölümden korumaktadır. PI3-kinase/AKT yolağı mTOR aktivasyonu ile hücrelerin çoğalmasını sağlayıp, otofajiyi inhibe etmektedir. Bu yolağın metabolik stres durumundaki tümör hücrelerinde aşırı aktivasyonu, hücreler için gereken enerji ihtiyacını arttırıp üretilen enerjinin yetersizliğine yol açarak tümör hücrelerini strese sokmaktadır. Aynı zamanda mTOR'un aktivasyonu ile otofaji baskılandığı için hücreler organellerini yıkıma uğratarak enerji gereksinimlerini karşılayamamaktadır (52). Tümör hücrelerinde apoptotik mekanizmaların hasarı ve Akt yolağının aktivasyonu ile otofajinin baskılanması sonrasında hücrelerde nekrotik hücre ölümü gerçekleşmektedir. Ancak nekroz sonrası inflamasyon kaçınılmazdır. İnflamatuar hücrelerden salınan anjiogenetik faktörler, kemokin ve sitokinler tümör hücrelerinin çoğalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle tümör tedavilerinde nekrotik hücre ölümü istenilen bir hücre ölüm çeşidi değildir. MCF-7 hücrelerinde atorvastatinin 10µM, 20µM ve 80µM dozlarının sitotoksik etkisini incelediği bu çalışmada, her üç dozda da apoptoz, otofaji ve nekroz saptanmıştır. 80µM doz grubunda ise hücrelerin çoğunun nekroz ile ölüme gittiği gözlenmiştir. Literatürdeki nekroz ve kanser tedavisi üzerine çalışmalar ışığında, atorvastatin 80µM dozu meme kanseri tedavisinde kullanılmasını önerebileceğimiz bir doz değildir.

Çalışmamızda kullandığımız MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı, östrojen reseptörü pozitif invaziv olmayan bir hücre soyudur. Lipofilik statinlerin östrojen reseptörü negatif invaziv meme kanser hücre hattında (MDA-231) MCF-7 hücre hattına kıyasla daha sitotoksik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (103). İleri dönem çalışmalarda statinlerle meme kanseri tedavisinde otofajinin rolünün daha net anlaşılmasında MDA-MB 231 gibi östrojen negatif, invazif meme adenokarsinom

hücre hattının ve T47D gibi östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, invaziv olmayan hücre hattının; yani daha fazla sayıda ve farklı özellikte meme kanser hücre hatlarının kullanılması yararlı olacaktır.

Statinler, dünya genelinde yüksek insidans ve mortalite oranları ile ciddi bir sağlık sorunu oluşturan meme kanserinin önlenmesinde ve tedavisinde umut vaat ededen bir ilaç grubudur. Literatürdeki çalışmalarda statinlerin meme kanser dizilerindeki sitotoksik etkileri apoptoz mekanizmaları ile açıklanmıştır. Meme kanser hücrelerinde statinler ile muamele sonrası gözlenen programlı hücre ölümleri otofaji açısından ele alınmamıştır. Çalışmamızda literatürde ilk olarak klinikte en yaygın kullanıma sahip olan atorvastatinin, MCF-7 meme adenokanser hücrelerindeki antiproliferatif etki mekanizması otofajik açıdan araştırılmıştır. Deneysel çalışmalarla, ilaç etki mekanizmalarının aydınlatılması ileri dönemde yapılacak klinik çalışmalara ışık tutmaktadır. Bu nedenle çalışmamız meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek statinlerin sitotoksik etki mekanizmalarına farklı bir bakış getirmesi açısından önemlidir.

Hücrelerde otofajik morfolojik özelliklerin saptanması ve MDC, LC3 gibi otofajik işaretleyicilerle otofajik keseciklerin izlenmesi otofajinin hücreleri ölüme getiren bir mekanizma olduğunu tam olarak göstermez. Otofaji hücrelerin stres durumlarında kullandıkları bir savunma mekanizması olabileceği gibi hücreyi ölüme getiren bir süreçte olabilir. Otofajinin hücreler üzerindeki etkisi ve otofaji apoptoz arasındaki karmaşık ilişkinin daha net anlaşılması 3-MA (3-metil adenin) gibi otofaji inhibitörleri veya siRNA yöntemi ile otofajinin baskılanması ve sonrasında hücrelerin canlılık oranları ve apoptoz oranlarının belirlenmesi ile sağlanabilmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ışığında otofaji inhibitörleri ile gerçekleştirilecek ileri çalışmalar otofaji ve apoptozis arasındaki ilişkiyi daha net ortaya koyacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1) Statin grubu ilaçlardan atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin MCF-7 hücrelerinde antiproliferatif etkileri bulunmaktadır. Antiproliferatif etkisi en belirgin olan ilaç grubu fluvastatindir.
- 2) Statin grubu ilaçlardan atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonlarla 24 ve 48 saat uygulaması sonrasında MCF-7 hücrelerinde apoptotik etkileri bulunmaktadır.
- 3) Atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen hücre gruplarında doz artışına paralel apoptotik hücre sayısında artış bulunmaktadır.
- 4) Atorvastatin, simvastatin ve fluvastatinin 80 μ M konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen gruplarda, hücrelerin yüksek konsantrasyon ilaca uzun süre maruz kalması nedeniyle nekrotik hücrelerin sayısı yüksek olarak saptanmıştır. Hücrelerin birçoğunun nekroz ile kaybedilmesine bağlı olarak, üç ilacında 80 μ M dozunda apoptotik hücre sayısı diğer gruplara oranla düşüktür.
- 5) MCF-7 hücrelerinde atorvastatin 10 μ M, 20 μ M ve 80 μ M konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat uygulama sonrasında otofaji tespit edilmiştir.
- 6) Atorvastatin 10 μ M ve 20 μ M uygulanan gruplarda daha fazla sayıda hücrede, granüler ve kuvvetli beclin-1 ve LC3 otofaji belirteçlerinin immunreaktivitesi belirgindir.
- 7) Elektron mikroskopik görüntülemelerde MCF-7 hücrelerinde Atorvastatin 10 μ M, 20 μ M uygulanan gruplarda apoptotik ve otofajik ince yapı değişiklikleri; Atorvastatin 80 μ M uygulanan gruptaki hücrelerde ise en çok nekrotik ince yapı değişiklikleri bulunmaktadır.

ÖNERİLER

Otofaji, bazı hücreleri ölüme getiren bir yıkım süreci olmasının yanı sıra, bazı hücreleri ölümden koruyan bir savunma mekanizması olarak da görev almaktadır. Otofajinin, apoptoz öncesi bir basamak olduğunu gösteren çalışmalara karşın, hücrelerin apoptozla ölümünü engellediğini savunan yayınlarda bulunmaktadır. Çalışmamızda otofaji inhibisyonu yapılmadığı için apoptoz ve otofaji arasındaki ilişki net olarak ortaya konulamamıştır. Apoptoz ve otofaji arasındaki karışık ilişkinin ve otofajinin MCF-7 hücrelerindeki rolünün daha net anlaşılması için 3 metiladenin gibi otofaji inhibitörleri ile otofaji inhibisyonu sonrasında hücre ölümü ve çoğalmasının araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı, östrojen reseptörü pozitif invaziv olmayan bir hücre soyudur. Statinlerle meme kanseri tedavisinde otofajinin rolünün anlaşılması için MDA-MB 231 gibi östrojen negatif, invazif meme adenokarsinom hücre hattını ve T47D gibi östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, invaziv olmayan hücre hattını; yani daha fazla sayıda ve farklı özellikte meme kanser hücre hatlarını içeren kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kanserle Savaş Politikası ve Kanser Verileri(1995-1999), T.C. Sağlık Bakanlığı KanserSavaş Dairesi Başkanlığı Bakanlık YayınNo:618, 145,
2. Hamzaoglu O, Özcan U. Türkiye Sağlık İstatistikleri. Ankara: TürkTabipler Birliği Yayınları, 2006.
3. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. 2010. Cancer Statistics. CA Cancer J Clin. 60:277-300.
4. Saurel CA, Patel TA, Perez EA. 2010. Changes to adjuvant systemic therapy in breast cancer: a decade in review. Clin Breast Cancer. 10:196-208.
5. Farmer JA. 2002. Pleiotropic effects of statins. Curr Atherosclero Rep. 2:208–217.
6. Gotto AM Jr, Farmer JA. 2001. Pleiotropic effects of statins: do they matter? Curr Opin Lipidol. 12:391–394.
7. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Guietterez G. 1999. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. Science. 286:1946-1949.
8. Simons M, Keller P. 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. Proc Natl. Acad Sci USA. 95:6460-6464.
9. Beck P, Wysowski DK, Downey W, Butler-Jones D. 2003. Statin use and the risk of breast cancer. J Clin Epidemiol. 56:280-285.
10. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. 1996. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. N Engl J Med. 335:1001-1009.
11. Denoyelle C, Vasse M, Korner M, Mishal Z, Ganne F, Vannier JP, Soria J, Soria C. 2001. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. Carcinogenesis. 22:1139-1148.

12. Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Nakamura H. 2001. Inhibition of Epidermal Growth Factor-induced RhoA Translocation and Invasion of Human Pancreatic Cancer Cells by 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase Inhibitors. *Cancer Res.* 61:4885.
13. Kotamraju S, Williams CL, Kalyanaraman B. 2007. Statin-Induced Breast Cancer Cell Death: Role of Inducible Nitric Oxide and Arginase-Dependent Pathways. *Cancer Res.* 67:7386-7394.
14. . Gozuacik D, Kimchi A. 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 23:2891-2906.
15. Ghosh-Choudhury N, Mandal CC, Ghosh-Choudhury N, Ghosh Choudhury G. 2010. Simvastatin induces derepression of PTEN expression via NF κ B to inhibit breast cancer cell growth. *Cellular Signalling.* 22:749–758.
16. Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, Ogier-Denis E. 2001. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem.* 276:35243-6.
17. Sayek İ, Temel Cerrahi, İkinci Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi, 835-892, 1996.
18. Moore,K., Persaud N., T.V.N.2008. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology,(8.bs). Philadelphia:Saunders Elsevier
19. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. Basaklar AC (Çev. Ed.). 7. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 1996.
20. Ross, M.H., Kaye, G.I, Pawlina,W.(2003)Histology A Text an Atlas(4.bs),Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins
21. Ovale W.,NahirneyP.,Netter Temel Histoloji,
22. . Kuzey GM. Temel Patoloji. I.Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi, 2007.
23. .Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic Pathology. Çevikbaş U (Çev ed) . 2008.Temel Patoloji. Sekizinci Baskı. İstanbul, Nobel
24. . Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55:74-108.
25. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. 2010. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 60:277-300.

26. Vincent T. DeVita, Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg, 2005., *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (7 the edition) Lippincott Williams & Wilkins (LWW)
27. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. 2003. Updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol.* 121:3357-3365.
28. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.* 31:214-223.
29. Öktem S., Özhan M., Özol D. 2001. Apoptozisin Önemi,, *Toraks Dergisi*, 2(1):91-95
30. Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35: 495–516.
31. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. 2009. Cell Death, *N Engl J Med.* 361:1570-1583.
32. Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. 2006. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing.* 3:5.
33. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15:269-290.
34. Pradelli LA, Bénéteau M, Ricci JE. 2010. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci.* 67:1589-1597.
35. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7:880-885.
36. Nicholson DW. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6:1028-1042
37. Youle R, Strasser A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:47–59.
38. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102:33-42.

39. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.*
40. Martinez-Vicente M, Cuervo AM. 2007. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes onstrike. *Lancet Neurol.* 6:352-361.
41. Shintani T, Klionsky DJ. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 306:990-995.
42. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 451:1069-1075.
43. Rajawat YS, Bossis I. 2008. Autophagy in aging and in neurodegenerative disorders. *Hormones (Athens).* 7:46-61.
44. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. 2007. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov.* 6:304-312.
45. Yorimitsu T, Klionsky DJ. 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 12:1542–1552.
46. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 451:1069-1075.
47. Bursch W, Karwan A, Mayer M, Dornetshuber J, Fröhwein U, Schulte-Hermann R, Fazi B, Di Sano F, Piredda L, Piacentini M, Petrovski G, Fésüs L, Gerner C. 2008. Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology.* 254:147-157.
48. Glick D, Barth S, Macleó KF. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 221:3–12.
49. Ferraro E, Cecconi F. 2007. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 462:210–219.
50. Xie Z, Klionsky DJ. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptation. *Nat Cell Biol.* 9:1102-1109.

51. Martinet W, De Meyer GR, Andries L, Herman AG, Kockx MM. 2006. Detection of Autophagy in Tissue by Standard Immunohistochemistry Possibilities and Limitations. *Autophagy* 2:55-57.
52. Song G, Ouyang G, Bao S. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 9:59–71.
53. Fimia GM, Piacentini M. 2010. Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:1581–1588.
54. Tsujimoto Y, Shimizu S. 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* 12:1528–1534
55. Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. 1999. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci.* 14:180-198.
56. Qian W, Liu J, Jin J, Ni W, Xu W. 2007. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1. *Leuk Res.* 31:329–339.
57. Basciani S, Vona R, Matarrese P, Ascione B, Mariani S, Cauda R Malorni W, Straface E, Lucia MB. 2007. Imatinib interferes with survival of multi drug resistant Kaposi's sarcoma cells. *FEBS Lett.* 581:5897–5903
58. Bauvy C, Gane P, Arico S, Codogno P, Ogier-Denis E. 2001. Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. *Exp Cell Res.* 268:139-149.
59. . Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M. 2006. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest.* 116: 2161-2172.
60. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* 16:966-975.
61. Levine B, Sinha S, Kroemer G. 2008. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 4:600-606.

62. Bell BD, Leverrier S, Weist BM, Newton RH, Arechiga AF, Luhrs KA, Morrisette NS, Walsh CM. 2008. FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signalling in proliferating T cells. *PNAS*. 105:16677-16682.
63. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L. 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*. 8:1124-1132.
64. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachi L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, Kimchi A. 2009. DAPk-mediated phosphorylation on the BH3 domain of Beclin-1 promotes dissociation of Beclin-1 from Bcl-XL to induce autophagy. *EMBO Rep*. 10:285–292.
65. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 432:1032–1036.
66. Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*. 25:1025–1040.
67. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. 2005. Growth factor, regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 120:237–248.
68. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. 2006. Autophagy in Cancer: Good, Bad, or Both? *Cancer Res*. 66:9349-9351.
69. Ravikumar B, Berger Z, Vacher C, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. 2006. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Hum Mol Genet*. 15:1209–1216.
70. Kuo PL, Hsu YL, Cho CY. 2006. Plumbagin induces G2-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 5:3209-32021.
71. Zhou J, Zhang W, Liang B, Casimiro MC, Whitaker-Menezes D, Wang M, Lisanti MP, Lanza-Jacoby S, Pestell RG, Wang C. 2009. PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 41:2334-2342.

72. Bui-Xuan NH, Tang PM, Wong CK, Fung KP. 2010. Photo-activated pheophorbide-a, an active component of *Scutellaria barbata*, enhances apoptosis via the suppression of ERK-mediated autophagy in the estrogen receptor-negative human breast adenocarcinoma cells MDA-MB-231. *J Ethnopharmacol.* 131:95-103.
73. Brunelli E, Pinton G, Bellini P, Minassi A, Appendino G, Moro L. 2009. Flavonoid-induced autophagy in hormone sensitive breast cancer cells. *Fitoterapia.* 80:327–332
74. Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, Lehmann U, Kelekar A. 2007. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ.* 14:500–510.
75. Espina V, Mariani BD, Gallagher RI, Tran K, Banks S, Wiedemann J, Huryk H, Mueller C, Adamo L, Deng J, Petricoin EF, Pastore L, Zaman S, Menezes G, Mize J, Johal J, Edmiston K, Liotta LA. 2010. Malignant Precursor Cells Pre-Exist in Human Breast DCIS and Require Autophagy for Survival. *PLoS One.* 5:e10240.
76. . Qadir MA, Kwok B, Dragowska WH, To KH, Le D, Bally MB, Gorski SM. 2008. Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Res Treat.* 112:389–403.
77. De Medina P, Payré B, Boubekeur N, Bertrand-Michel J, Tercé F, Silvente-Poirot S, Poirot M. 2009. Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Cell Death and Differentiation.* 16:1372–1384.
78. Cheng Y, Li H, Ren X, Niu T, Hait WN, Yang J. 2010. Cytoprotective Effect of the Elongation Factor-2 Kinase-Mediated Autophagy in Breast Cancer Cells Subjected to Growth Factor Inhibition. *PloS One.* 5:e9715.
79. Fazi B, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M. 2008. Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy.* 4:435-441.

80. Xi H, Kurtoglu M, Liu H, Wangpaichitr M, You M, Liu X, Savaraj N, Lampidis TJ. 2010. 2-Deoxy-D: -glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother Pharmacol.* [Epub ahead of print].
81. Cui Q, Tashiro S, Onodera S, Minami M, Ikejima T. 2007. Autophagy preceded apoptosis in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells. *Biol Pharm Bull.* 30:859-864.
82. Hunninghake DB. 1992. HMG-CoA reductase inhibitors. *Curr Opin Lipidol.* 3:22-28.
83. Stancu C, Sima A. 2001. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med.* 5:378-387.
84. Mach F. 2002. Toward a role for statins in immunomodulation. *Mol Interv.* 2:478-480.
85. Bellocchia S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. 2000. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med.* 32:164-176.
86. Hess DC, Fagan SC. 2001. Pharmacology and clinical experience with simvastatin. *Expert Opin Pharmacother.* 2:153-163.
87. . Lubet RA, Boring D, Steele VE, Ruppert JM, Juliana MM, Grubbs CJ. 2009. Lack of Efficacy of the Statins Atorvastatin and Lovastatin in Rodent Mammary Carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila).* 2:161-167.
88. Dellavalle RP, Nicholas MK, Schilling LM. 2003. Melanoma chemoprevention: a role for statins or fibrates? *Am. J. Ther.* 10:203-210.
89. Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. 2005. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer.* 5:930-942.
90. Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, Low M, Greenson JK, Rennert G, Engl N. 2005. Statins and the risk of colorectal cancer. *J Med.* 352:2184-2192.
91. Kaye JA, Jick H. 2004. Statin use and cancer risk in the General Practice Research Database. *Br J Cancer.* 90:635-637.

92. Cauley JA, McTiernan A, Rodabough RJ, LaCroix A, Bauer DC, Margolis KL, Paskett ED, Vitolins MZ, Furberg CD, Chlebowski RT. 2006. Women's Health Initiative Research Group. Statin use and breast cancer: prospective results from the Women's Health Initiative. *J Natl Cancer Inst.* 98:700-707.
93. Seeger H, Wallwiener D, Mueck AO. 2003. Statins can inhibit proliferation of human breast cancer cells in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 111:47–48.
94. Wu J, Wong WW, Khosravi F, Minden MD, Penn LZ. 2004. Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis. *Cancer Res.* 64: 6461-6468.
95. Sánchez CA, Rodríguez E, Varela E, Zapata E, Páez A, Massó FA, Montaña LF, Lóopez-Marure R. 2008. Statin-induced inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation is related to cell cycle arrest and apoptotic and necrotic cell death mediated by an enhanced oxidative stress. *Cancer Invest.* 26:698-707.
96. Kang S, Kim ES, Moon A. 2009. Simvastatin and lovastatin inhibit breast cell invasion induced by H-Ras. *Oncol Rep.* 21:1317-1322.
97. Araki M, Motojima K. 2008. Hydrophobic statins induce autophagy in cultured human rhabdomyosarcoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 367:462–467.
98. Parikh A, Childress C, Deitrick K, Lin Q, Rukstalis D, Yang W. 2010. Statin-induced autophagy by inhibition of geranylgeranyl biosynthesis in prostate cancer PC3 cells. *Prostate.* 70:971-981.
99. Mück AO, Seeger H, Wallwiener D. 2004. Inhibitory effect of statins on the proliferation of human breast cancer cells. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 42:695-700.
100. Kaufmann P, Török M, Zahno A, Waldhauser KM, Brecht K, Krähenbühl S. 2006. Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci.* 63:2415-2425.

101. Wilfried Bursch³, Adolf Ellinger¹, Harald Kienzl, Ladislaus Török, Siyaram Pandey², Marianna Sikorska², Roy Walker² and Rolf Schulte Hermann, Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy, *Carcinogenesis* (1996) 17 (8):1595-1607.doi: 10.1093/carcin/17.8.1595
102. Samara C, Syntichaki P, Tavernarakis N. 2008. Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ.* 15:105-112.
103. Campbell MJ, Esserman LJ, Zhou Y et al (2006) Breast cancer growth prevention by statins. *Cancer Res* 66:8707–8714.