

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

5-FLOROURASİL VE C₆₀ NANOPARTİKÜLÜNÜN MCF-7 HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ SİNERJİK ETKİSİNİN APOPTOTİK VE OTOFAJİK HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

HAVVA AYBEK

KİMYA BÖLÜMÜ VE BİYOKİMYA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MEHMET ÇİFTÇİ
EŞ DANIŞMANI
DR. ÖĞRT. Ü. CAN ALİ AĞCA

BİNGÖL 2021

ÖNSÖZ

Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki doktora tez çalışmam sırasında bilimsel yol gösterici tutumu ile bilgi, deneyim, eşsiz destek ve yardımlarını gördüğüm saygıdeğer danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde her türlü bilgi birikimlerini paylaşan destek ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer eş danışmanım Dr.Öğrt.Üyesi Sayın Can Ali AĞCA'ya.

Ayrıca eğitimim boyunca her türlü bilgi birikimlerini ve deneyimlerini paylaşan tüm değerli hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

Tüm bu süreçleri aşmamda sonsuz desteğini ve sevgisini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim İsmail ve yaşam kaynağım çocuklarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: BAP-FEF.2017.00.017.

Havva AYBEK

Bingöl 2021

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.2. Meme Kanseri	3
1.2.1. Meme Kanserinin Sebepleri.....	4
1.2.2. MCF-7 (Michigan Cancer Foundation – 7)	6
1.2.3. Meme Kanserinin Moleküler Biyolojisi	6
1.2.3.1. BRCA1 ve BRCA2 Genleri.....	6
1.2.3.2. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)	7
1.2.3.3. CerbB-2 (HER2/Neu).....	7
1.2.3.4. Ras Proteinleri	8
1.2.3.5. c-Myc.....	8
1.2.3.6. p53 Proteini	9
1.2.3.7. Ataksi telenjiektazi mutasyona uğramış protein(ATM).....	9
1.2.4. Meme Kanserinde Tedavi Stratejiler	10
1.2.4.1. Cerrahi Tedavi	10
1.2.4.2. Radyasyon Tedavisi.....	10
1.2.4.3. Hormonal Tedavi	11
1.2.4.4. Kemoterapi Tedavisi.....	11

1.3. 5-Fluorourasil (5-FU).....	12
1.3.1. 5-FU Etki Mekanizması.....	13
1.4. Fullerene C ₆₀	15
1.4.1. Fullerene C ₆₀ ve Kanser.....	16
1.5. Serbest Radikaller	17
1.5.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	18
1.5.1.1. Süperoksit radikali (O ₂ ⁻).....	19
1.5.1.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	20
1.5.1.3. Hidroksil radikali (OH).....	20
1.6. Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	21
1.6.1. Apoptozis	21
1.6.1.1. Apoptozisin Morfolojisi.....	22
1.6.1.2. Apoptozis Mekanizmaları.....	23
1.6.2. Apoptoz ve Kanser Tedavisi.....	26
1.6.3. Otofaji	27
1.6.3.1. Otofajinin Moleküler Mekanizması	28
1.6.3.2. Otofajinin Moleküler Regülasyonu	30
2. MATERYAL VE YÖNTEM	32
2.1. Hücre Kültürü.....	32
2.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültür Kaplarına Hücrelerin Ekilmesi	32
2.3. Hücre Sayımı.....	33
2.4. Hücre Canlılık Testi.....	33
2.5. ROS (Reaktif Oksijen Türleri)	36
2.6. Western Blot	36
2.6.1. Protein İzolasyonu	37
2.6.2. SDS- PAGE Elektroforezi.....	37
2.6.3. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi.....	39
2.6.4. Bovine Serum Albumin (BSA) ile Blokaj	40
2.6.5. Membranın Primer Antikor ile inkübasyonu	40
2.6.6. Membranın Sekonder Antikor ile inkübasyonu	40
2.6.7. Görüntüleme	41

2.6.8. İstatistiksel Analiz.....	41
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	42
3.1. 5-Fluorourasil'in MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	42
3.2. C ₆₀ Fullerenin MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	43
3.3. 5-FU + C ₆₀ Fullerenin MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi..	44
3.4. 5-FU' nun MCF-7 Hücre Hattında ROS Düzeyinin Ölçülmesi	45
3.5. C ₆₀ Fullerenin MCF-7 Hücre Hattında ROS Düzeyinin Ölçülmesi	46
3.6. 5-FU + C ₆₀ Fullerenin MCF-7 Hücre Hattında ROS Düzeyinin Ölçülmesi	47
3.7. 5-FU, C ₆₀ ve 5-FU+C60 kombinasyonunun MCF-7 Hücre Hattında p53 Üzerine Etkisi	47
3.8. 5-FU, C ₆₀ ve 5-FU+C60 kombinasyonunun MCF-7 Hücre Hattında TIGAR Üzerine Etkisi.....	48
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Kanser hücresinin karakteristik özellikleri.....	2
Şekil 1.2.	Memenin yapısı	4
Şekil 1.3.	MCF-7 Hücre Hattı	6
Şekil 1.4.	5-FU metabolizması	14
Şekil 1.5.	C60 fullerene nanopartikülünün şematik gösterimi	16
Şekil 1.6.	Yaygın reaktif oksijen türlerinin elektron yapıları.....	19
Şekil 1.7.	Apoptosis'in Morfolojik degisiklikleri	23
Şekil 1.8.	Apoptoz Mekanizmaları	25
Şekil 1.9.	Otofaji aşamalarının şematik gösterimi	28
Şekil 1.10.	Otofajinin moleküler mekanizmaları	30
Şekil 2.1.	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar.....	35
Şekil 2.2.	SDS-PAGE deneyi sırasında kullanılan sistemin fotoğrafı, (Çalışan jel sistemi).....	39
Şekil 2.3.	Tipik bir Western Blot Deneyi sırasında proteinlerin jelden membrana transferi.....	40
Şekil 2.4.	Western Blotlama yönteminin şematik gösterimi.....	41
Şekil 3.1.	MCF-7 hücre hattında 5-Fluorourasil'in hücre canlılığı üzerine etkisi..	42
Şekil 3.2.	MCF-7 hücre hattında C60 Fullerenin hücre canlılığı üzerine etkisi.....	43
Şekil 3.3.	MCF-7 hücre hattında 5-FU+C60 fulleren kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi.....	44
Şekil 3.4.	MCF-7 hücre hattında 5-Fluorourasil (5-FU)'nun hücre içi ROS düzeyine olan etkisi.....	45

Şekil 3.5.	MCF-7 hücre hattında C60 Fullerenin hücre içi ROS düzeyine olan etkisi.....	46
Şekil 3.6.	MCF-7 hücre hattında 5-FU +C60 kombinasyonunun hücre içi ROS düzeyine olan etkisi.....	47
Şekil 3.7.	24saatlik ilaç uygulaması sonrası Western Blot yöntemiyle p53, B-Aktin tayini 1-Kontrol, 2-C60, 3- 5-FU, 4- 5-FU + C60 B-Aktin; 42 kDa, p53; 53 kDa.....	48
Şekil 3.8.	24saatlik ilaç uygulaması sonrası Western Blot yöntemiyle, TIGAR, B-Aktin tayini 1-Kontrol, 2-C60, 3-5-FU, 4- 5-FU + C60 B-Aktin; 42kDa, TIGAR; 30kDa.....	49

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Ayırma jel bileşimi (%12 Ayırma Jel İçeriği)	38
Tablo 2.2. Yığma jel bileşimi (Yığma Jeli İçeriği)	38
Tablo 2.3. Transfer Tampon İçeriği (1X Fresh Transfer Buffer İçeriği)	39

5-FU VE C₆₀ NANOPARTİKÜLÜNÜN MCF-7 HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ SİNERJİK ETKİSİNİN APOPTOTİK VE OTOFAJİK HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Meme kanseri dünyanın hemen her bölgesinde kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. 5-FU; meme, baş, mide, kolon ve pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. C₆₀ fullerene, antioksidan ve antitümör potansiyeli olan bir nanopartiküldür ve 5-FU'ya hücre tepkilerini modüle etmedeki rolü henüz doğrudan ele alınmamıştır. C₆₀ fullerenin kanserdeki etkisi MCF-7 hücre hattı üzerinde araştırılmıştır. Bu çalışmada 5-FU, C₆₀ ve 5-FU+C₆₀ kombinasyonunun MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri WST-1 analizi ile gerçekleştirildi. Ek olarak, **DCFDA** kullanılarak reaktif oksijen türleri (ROS) düzeylerinin tespiti araştırılmıştır. Çalışmamızda zamana ve konsantrasyona bağlı olarak 5-FU'nun MCF-7 hücre canlılığını inhibe ettiği, C₆₀ nanopartikülünün MCF-7 hücreleri üzerine tek başına uygulanması sonucunda anlamlı bir etkinin olmadığı belirlenmiştir. 5-FU+C₆₀'ın birlikte kullanımının ise hücre canlılığı üzerinde kısmi bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan hücreler üzerine 5-FU, C₆₀ ve 5-FU+C₆₀ uygulamalarının ROS seviyeleri **DCFDA** testi ile ölçüldü. 5-FU'nun hücre içi ROS'u indükleyerek MCF-7 hücre hattında ROS'u arttırdığı belirlendi. **DCFDA** analizinin sonuçlarına göre, C₆₀ fullerenin ve 5-FU+C₆₀ gruplarının MCF-7 hücre hattında; ROS seviyeleri üzerinde anlamlı bir etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. İlâveten p53 ve TIGAR proteinlerinin ekspresyonlardaki değişiklikler Western Blot yöntemi ile incelenerek analiz edildi. 5-FU ve 5-FU+C₆₀ gruplarında p53 ve TIGAR proteinleri ekspresyon seviyelerinde artış olduğu görüldü. Genel olarak, bulgularımız 5-FU, 5-FU+C₆₀ gruplarının MCF-7 hücrelerinde apoptozisi ve otofajiyi indüklediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: 5-FU, C₆₀, meme kanseri, apoptozis, otofaji.

INVESTIGATION OF THE SYNERGISTIC EFFECT OF 5FU AND C₆₀ NANOPARTICULES ON THE MCF-7 CELL LINE ON APOPTOTIC AND AUTOPHAGIC CELL DEATH PATHWAYS

ABSTRACT

Breast cancer, which is an important health problem in almost every part of the world, is the most common type of cancer among women and ranks second among cancer related deaths after lung cancer. 5-FU; It is a chemotherapy drug used in various types of cancer, including breast, head, stomach, colon and pancreatic cancer. C₆₀ fullerene, with antioxidant potential is a nanoparticle and may be in modulating cell responses to 5-FU. The effect of C₆₀ fullerene in cancer was investigated on the MCF-7 cell line. In this study, cytotoxic effects of the 5-FU, C₆₀ and 5-FU + C₆₀ combination on MCF-7 human breast cancer cells were investigated by WST-1 analysis. In addition, the detection of reactive oxygen species (ROS) levels using DCFDA was investigated. In our study, it was observed that 5-FU inhibited MCF-7 cell viability depending on time and concentration, and no significant effect was observed as a result of the application of C₆₀ nanoparticle alone on MCF-7 cells. The use of 5-FU + C₆₀ together was shown to have a partial decrease in cell viability. On the other hand, ROS levels of 5-FU, C₆₀ and 5-FU + C₆₀ applications on cells were measured by the DCFDA test. It was determined that 5-FU increased ROS in the MCF-7 cell line by inducing intracellular ROS. According to the results of the DCFDA analysis, C₆₀ fullerene and 5-FU + C₆₀ groups in MCF-7 cell line; It was determined that there was no significant effect on ROS levels. In addition, changes in the expression of p53 and TIGAR proteins were analyzed by Western Blot method. In the 5-FU and 5-FU C₆₀ groups, there was an increase in the expression levels of p53 and TIGAR proteins. Overall, our findings show that the 5-FU, 5-FU, C₆₀ groups induce apoptosis and autophagy in MCF-7 cells.

Keywords: 5-FU, C₆₀, breast cancer, apoptosis, autophagy.

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması, komşu bölgelerin istilası ve anormal hücrelerin uzak dokulara metastazı ile karakterize olabilen bir grup hastalık olarak tanımlanmaktadır. Amerikan Kanser Derneği, yalnızca ABD’de farklı kanser türleriyle ilişkili multiorgan yetmezliği nedeniyle ortaya çıkacak yaklaşık 1,5 milyon yeni kanser vakası ve yarım milyon ölüm olacağını öngörmüştü (Amerikan Kanser Derneği, 2010). Dünya Sağlık Örgütü kanserin, dünyadaki ikinci önde gelen ölüm nedeni olduğunu ve 2018’deki tahmini 9,6 milyon ölümden sorumlu olduğunu ve küresel olarak, 6 ölümden yaklaşık 1 tanesinin kanserden kaynaklandığını açıkladı (World Health Organization, 2018). Türkiye Sağlık Bakanlığı, 2018 yılında kanserin hem dünyada hemde ülkemizde ölümler sıralamasında kalp hastalıklarına bağlı ölümlerin ardından ikinci ölüm sebebi olduğunu açıkladı. 2002 yılında ülkemizde kansere bağlı ölümlerin, tüm ölümlerin %12’sini oluşturmaktayken bu oran 2009 yılında %21’e çıkmıştır. Kanserdeki bu artış oranı devam ettiği takdirde 2030 yılında 22 milyon yeni vakanın ortaya çıkacağı tahmin edilmektedir. (Türkiye Sağlık Bakanlığı, 2018).

Kanser, normal hücreyi kötü huylu hücrelere dönüştüren çok aşamalı bir süreçte ortaya çıkar (Boland et al. 2005). Kötü huylu hücrelerin üretilmesi, aşırı çoğalmaya neden olan onkogenlerin aktivasyonu veya amplifikasyonu ve hücre büyümesinin sınırlandırılmasından normal olarak sorumlu olan tümör baskılayıcı genlerin aktifleştirilmesi dahil olmak üzere büyük genetik değişiklikler gerektirir. Tümör hücrelerinin gelişmesine neden olan genetik değişiklikler hem iç hem de dış faktörlerden kaynaklanabilir. İç faktörler, protein fonksiyonunda kısmi veya tam kaybına, kromozomal kırılmalar veya yeniden düzenlemelere, bazı DNA bazlarının içsel kimyasal kararsızlığına, epigenetik değişikliklere, hormon seviyelerine, metabolik işlemlerle üretilen serbest radikallere ve immün sistem değişikliklerine yol açabilen nokta ve çerçeve değiştirme mutasyonlarını içerir (Bertram 2000). Öte yandan, viral veya bakteriyel enfeksiyonlar, iyonlaştırıcı veya UV radyasyonu, kimyasal kanserojenlere maruz kalma ve sigara içme dış faktörler olarak sıralanabilir (Rieger 2004).

Kanser heterojen bir hastalık grubunu içermesine rağmen, karakteristik ve birleştirici bir özelliği doğal sınırlarının ötesinde büyüyen anormal hücrelerin oluşmasıdır. Hanahan ve Weingberg kanser hücresini normal hücreden ayıran altı temel özellik belirlemiştir. İ) Büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik ii) büyüme engelleyici (antigrowth) sinyallerine duyarsızlık iii) programlı hücre ölümü apoptozdan kaçış iv) sınırsız çoğaltma potansiyeli v) sürekli anjiyogenez ve vi) doku istilası ve metastazı şeklinde sıralanabilir. (Hanahan et al. 2000).



Şekil 1.1. Kanser hücresinin karakteristik özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2000)

Hücrelerin çoğalması ve büyümesi, büyüme teşvik sinyalleri olarak adlandırılan sinyallerin üretimi ve salgılanması ile kontrol edilir. Hücre homeostazı ve bölünmesi, sağlıklı hücrelerde bu sinyallere bağlıdır (Hanahan et al. 2011). Çoklu yollarda görülebilen büyüme sinyallerindeki değişim, kontrolsüz hücre bölünmesinin temel sebebidir. Kanser hücreleri sadece otokrin sinyaller yoluyla gerekli büyüme sinyallerini elde etmekle kalmaz, aynı zamanda çevreleyen dokudan çeşitli büyüme faktörleri sağlamak için çevresini değiştirme yeteneğine de sahiptir (Hembruff et al. 2010). Örneğin, tirozinkinazın aşırı ekspresyonu, kanser hücresi yüzeyindeki büyüme faktörü reseptörlerini artırır, bu da bir keredede daha fazla büyüme faktörü tanıma yeteneği verir. Bu nedenle kanser hücreleri, sağlıklı hücrelere kıyasla küçük miktarlarda büyüme faktörlerine karşı daha duyarlı hale gelir. Ayrıca, büyüme faktörü reseptörlerinin aşağı akış düzenleyicileri, proliferatif fonksiyonlar sağlamak için mutasyona uğratılır. Ek olarak, çeşitli anti-büyüme veya anti-proliferatif sinyaller, birkaç hücre aracılığıyla kanser hücresi tarafından başarıyla bloke edilebilir.

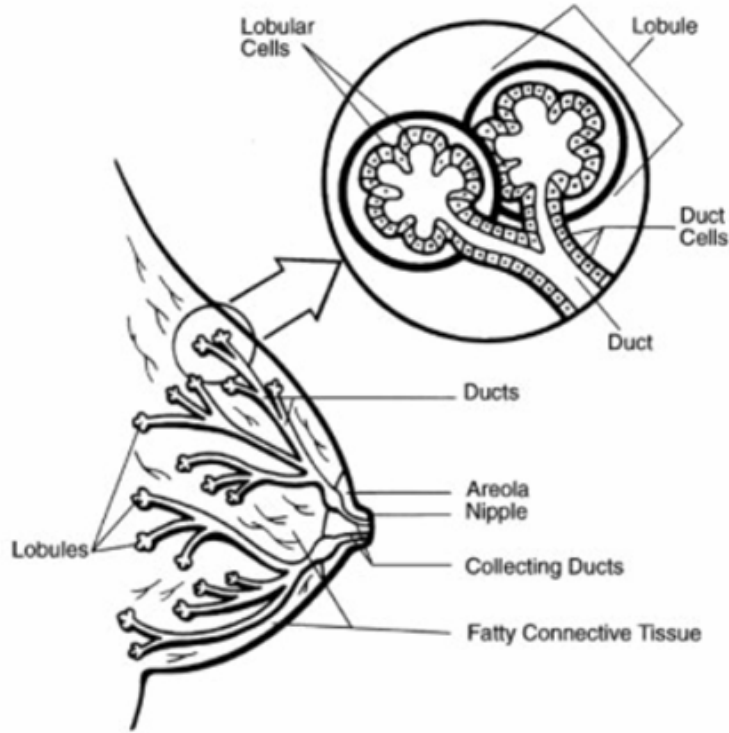
Büyüme uyarıcılarının yanı sıra, hücre döngüsünün koruyucuları olan tümör baskılayıcı genler kanserde düzensizdir. Son araştırmalar altı kanser işaretine ek olarak kötü huylu hücrelerin, hücresel enerjinin serbest bırakılma ve immün yıkımdan kaçınma yeteneğindedir sahip olduğunu göstermiştir (Hanahan et al. 2011). Ek işaretlerin ortaya çıkması, kanser hücrelerinin yeni özellikler kazanmaya devam ettiğini ve daha da tehlikeli hale geldiğini doğrulamıştır (Luo et al. 2009).

1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve akciğer ve kolon kanseri ile birlikte dünya çapında en yaygın üç kanserden biridir (Harbeck et al. 2016). Her yıl dünya çapında yaklaşık olarak 1,3 milyon kadına meme kanseri teşhisi konmakta ve hastalıktan 465.000 ölüm meydana gelmektedir. Bu hastalık erkeklerde (İngiltere’de 300 / yıl) kadınlara göre çok nadir görülür. İnsidans, yaşla birlikte artar, 50 yaş üstü kadınlarda %80 oranında görülür. Genç kadınlarda daha az görülür, ancak daha agresif hastalık gösterme eğilimindedir (5 yıllık sağkalım oranları: %81 <45 yaş, %86 > 65 yaş). Diğer risk faktörleri arasında erken menarş, geç menopoz, doğum sayısı, emzirme ve eksojen hormonların uzun süreli kullanımı, obezite, egzersiz eksikliği ve alkol tüketimi yer alır. Meme kanserlerinin %5’inden azı genetikdir. Kanıtlanmış gen mutasyonları (BRCA1 / BRCA2) olan hastalar, %40-85 oranında meme kanseri gelişimi için tahmini yaşam boyu risk taşıyıcıdır (Davies 2015).

Genellikle kanser, ortaya çıktığı vücut kısmından sonra adlandırılır; bu nedenle meme kanseri, meme dokusundan kaynaklanan hücrelerin düzensiz büyümesi ve çoğalması anlamına gelir (Sharma et al. 2010). Meme dokusundaki tümörler, meme hücreleri anormal şekilde bölünmeye başladığında ortaya çıkar. Bu anormal hücreler, röntgende gözlenebilen bir tümör oluşturur. Anormal hücreler vücudun diğer bölgelerine invazif veya metastatik kapasiteye sahipse, tümör kanserli (hapis) olarak adlandırılır. Neredeyse her kadın ve belirli sayıda erkek meme kanseri riski altındadır (Americancancersocietycancer.org). Meme iki ana doku türünden oluşur, yani glandüler dokular ve stromal (destekleyici) dokular. Glandüler dokular süt üreten bezleri (lobüller) ve kanalları (süt geçişleri) barındırırken, stromal dokular memenin yağlı ve lifli bağ dokularını içerir. Memenin farklı bölgelerinde gelişebilen birkaç tip tümör vardır. Çoğu tümör, memedeki iyi huylu (kansersiz olmayan) değişikliklerin sonucudur. Örneğin, fibrokistik değişiklik, kadınlarda kistler (birikmiş sıvı paketleri), fibroz (yara benzeri bağ dokusu oluşumu), yumru ve kalınlaşma, hassasiyet veya meme ağrısı alanları geliştiren kansersiz olmayan bir durumdur. Çoğu meme kanseri, kanalları hizalayan hücrelerde (duktal kanserler) başlar. Bazıları lobülleri (lobüller kanserler) hizalayan hücrelerde başlarken, diğer dokularda küçük bir sayı başlar.

Lobüler karsinom in situ (LCIS, lobüler neoplazi): “in situ” terimi başlangıçta geliştiği bölgeye yayılmamış kanseri ifade eder. LCIS, memenin süt bezlerindeki (lobüller) hücre sayısında keskin bir artıştır. Duktal karsinom in situ (DCIS): En yaygın noninvaziv meme kanseri türü olan DCIS, meme kanallarıyla sınırlıdır (Sharma et al. 2010).



Şekil 1.2. Memenin yapısı (Sharma et al. 2010)

1.2.1. Meme Kanserinin Sebepleri

- i) *Geçmişte meme kanseri öyküsü*
Meme kanseri olan bir kadının diğer memede meme kanserine yakalanma riski artar.
- i) *Önemli aile geçmişi*
Hastanın ailesinin birkaç üyesinde belirli kanser türleri varsa, hastanın meme kanserine yakalanma riski artabilir.
- ii) *Genetik nedenler*
Aile geçmişinin meme kanseri için bir risk faktörü olduğu uzun zamandır

bilinmektedir. Hem anne hem de baba akrabaları önemlidir.

Etkilenen akraba genç yaşta meme kanseri geliştirmişse, her iki göğsünde kanser varsa veya yakın bir akraba ise risk en yüksektir. Birinci derece akrabalar (anne, kız kardeş, kız) risk tahmininde en önemlileridir. Meme kanseri olan birkaç ikinci derece akraba (büyükanne, teyze) da riski artırabilir.

Bir erkekte meme kanseri, tüm yakın kadın akrabaları için riski artırır. BRCA1 ve BRCA2, kalıtsal olduklarında meme kanseri riskini önemli ölçüde artırarak ömür boyu %40 ila 85 arasında tahmin edilen bir riske yükselten anormal genlerdir. BRCA1 genine sahip kadınlar, erken yaşta meme kanseri geliştirme eğilimindedir.

iii) *Hormonal nedenler*

Hormon seviyesindeki değişiklik meme kanserini hızlandırabilir. Periyotların başlatılması ve durdurulması (Adet Döngüsü), Erken yaşta gebelik, Hormonal replasman tedavisi, Oral hap kullanımı vb.

iv) *Yaşam tarzı ve beslenme nedeni*

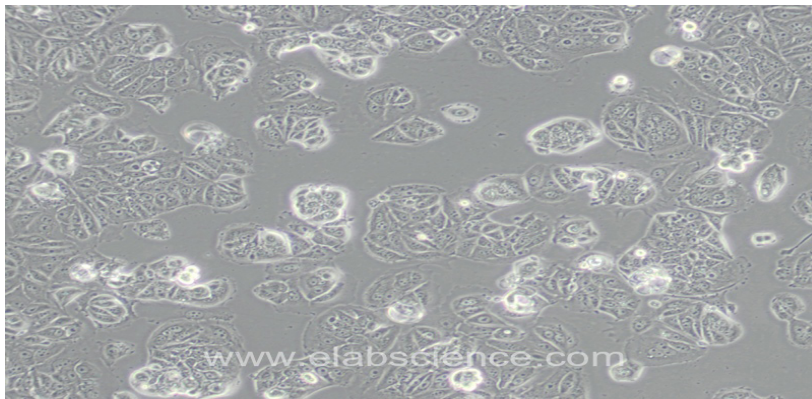
Hareketsiz yaşam tarzı, özellikle postmenopozal kadınlarda diyetle yüksek miktarda yağ alımı meme kanserine neden olabilir. Alkol kullanımı da meme kanserinin bir başka nedenidir. Tüketilen alkol miktarı ile risk artar. Günde iki ile beş alkollü içecek tüketen kadınlar, meme kanseri gelişimi için içmeyenlere göre yaklaşık bir buçuk kat daha fazla risk altındadır.

vi) *Çevresel neden*

Uzun bir süre boyunca düşük doz radyasyonla çalışan kadınlarda, örneğin X-ışını teknisyenlerinde hafif bir risk artışı olduğu bilinmektedir (Sharma et al. 2010).

1.2.2. MCF-7 (Michigan Cancer Foundation – 7)

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation – 7), 69 yaşında Kafkas plevral efüzyonlu bir kadından alınan invaziv bir duktalkarsinomdur. Sitoplazmik östrojen reseptörleri yoluyla östradiolü işleme yeteneği gibi farklılaştırılmış meme epitelinin birçok özelliğini gösterir. MCF-7, daha farklı görünen ve sıkı hücre birleşimleri oluşturan lümen hücrelerinden oluşur (Soule et al. 1973).



Şekil 1.3. MCF-7 Hücre Hattı (Web, 2020)

1.2.3. Meme Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Meme kanseri, her biri farklı morfoloji, davranış ve klinik uygulamalar ile karakterize edilen, çoklu tümör varlıklarını kapsayan karmaşık bir hastalıktır. Meme kanserinin gelişmesinden ve ilerlemesinden sorumlu olan genlerin biyolojisi ile ilgili araştırmalar daha hassas tedaviler geliştirilmesi açısından hastalık yönetiminin tüm yönleri üzerinde büyük bir etkiye sahip olmaya devam edecekleri söylenebilir (Dai et al. 2016).

1.2.3.1. BRCA1 ve BRCA2 Genleri

Kalıtsal meme kanserinin, tüm meme kanserinin küçük bir kısmını oluşturduğu bildirilmektedir. Çok sayıda gen meme kanseri gelişiminde rol oynar, ancak BRCA1 (meme kanseri 1) ve BRCA2 (meme kanseri 2) genlerinin ailesel meme kanseri eğiliminden sorumlu olduğu bulunmuştur.

BRCA1 geni, 17q21'de ve BRCA2 geni, 13q12 lokasyonunda bulunur. Her ikisi de hücresel proliferasyon ve transkripsiyonun düzenlenmesinde, DNA hasar cevabında ve hücre döngüsü regülasyonunda anahtar rol oynar. BRCA1 veya BRCA2 genlerinin fonksiyonlarını inhibe eden mutasyonlar, tümörjenik gelişimi tetikler (Yoshida et al. 2004). Bu genlerin 1'inde mutasyon olan kadınların yaşamları boyunca yaklaşık %60-80 oranında meme kanseri gelişme riski olduğu bildirilmektedir. BRCA1 / BRCA2 mutasyonlarının taranması ve saptanması, özellikle kalıtsal vakaları olan ailelerde, meme karsinomu gelişimi için genel riski belirlemede yardımcı olabilir (Keen et al. 2004).

1.2.3.2. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

Epidermal büyüme faktörü reseptörünün fizyolojik işlevi (EGFR) epitel doku gelişimini ve homeostazı düzenlemektir. Patolojik durumlarda, çoğunlukla akciğer ve meme kanserinde ve glioblastomda, EGFR bir tümörjenezin tetikleyicisidir (Sigismund et al. 2017). Epidermal büyüme faktörü reseptörü aile üyeleri, EGFR, HER2, HER3 ve HER4, tirozinkinaz aktivitesine sahiptir. EGF reseptörleri, heterodimerler oluşturma ve dış uyaranlarla aktivasyondan sonra birçok hücresel yolun kademesini başlatma kabiliyetine sahiptir. Epidermal büyüme faktörü tarafından tetiklenen kaskad bağlayıcı reseptörü, Ras, Raf ve MAPK gibi birçok onkoproteini içerir. (Hong-Feng et al. 2013). Bu kaskad sırasındaki onkojenik mutasyonlar, kontrolsüz bölünmeyi uyarır. Meme kanseri hastalarının yarısında, epidermal büyüme faktörü reseptörünün aşırı ekspresyonu fark edilir. Meme kanserinde, EGFR ekspresyon seviyesi veya gen mutasyon durumu, belirli tedaviler için hastaları seçmek için giderek daha fazla kullanılmaktadır (Hiroko et al. 2012).

1.2.3.3. CerbB-2 (HER2/Neu)

HER2/Neu olarak da bilinen CerrB-2, 17q12 lokasyonunda bulunur ve hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol oynar (Harbeck ve Gnant 2016). HER2, diğer 3 reseptörle birlikte epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesinin bir parçasıdır: epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER1, erbB1), HER2 (erbB2), HER3 (erbB3) ve HER4 (erbB4). En aktif ve tümörü teşvik eden kombinasyonun HER2 / HER3 dimeri olduğu düşünülmektedir. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü HER2 aşırı ekspresyonu, meme kanseri tümörlerinin yaklaşık %20-30'unda mevcuttur (Mitri et al. 2012). HER2 gen transkripsiyonundaki anormallikler, genç tanı ve düşük yaşam beklentisi ile ilişkilidir. Ayrıca, HER2 aşırı ekspresyonu, aksiller düğümlerin miktarı, morfolojik farklılıklar ve eksik ER (östrojen reseptörü) ve PgR (progesteron reseptörü) ile ilişkilidir. İnsituduktal karsinomların neredeyse yarısında HER2 aşırı ekspresyonu gözlenir (Park et al. 2006).

1.2.3.4. Ras Proteinleri

RAS ailesinin onkojenleri, çoğalma, hayatta kalma ve farklılaşma dahil olmak üzere hücrenin birçok faaliyetini düzenler. Bu genlerdeki aktive edici mutasyonlar, birçok kanser türü için ortak olaylardır.

Ras aktivasyonunun biyolojik önemi ile ilgili çelişkili noktalardan biri, hücre çoğalması üzerindeki ikili etkisidir (pro- veya anti-proliferatif) (Zamkova et al. 2013). Ras proteinleri, guanin nükleotidini bağlama yeteneğine sahip G protein ailesinin üyeleri olarak sınıflandırılır (Sprang et al. 2016). Ras süper ailesi üyeleri (H, K, N ve M-Ras) GTP'ye bağımlı proteinlerdir ve GTPase aktivitesi gösterirler. Ras proteinleri, hücre dışı uyaranlarla aktive edilir (Calaf et al. 2016). Ras proteinleri, EGF'nin reseptörü EGFR'ye başlatılması yoluyla aktive edilir. Ras protein aktivasyonu, hücre proliferasyonu ile ilişkilidir. Ras geni üzerindeki çeşitli mutasyonlar, Ras'ın aktif olmayan mekanizmasının inhibisyonuna neden olur (Zenonos et al. 2013). Özellikle, K-Ras'ın, insanlarda tüm kanserlerin yüzde 30'unda, işlev mutasyonunun bir kazanımı olarak mutasyona uğradığı gözlemlenir (Lauren et al. 2016). Ras aşırı ekspresyonu, meme kanserleri arasında en yaygın mutasyon türüdür. Aşırı H-Ras ekspresyonu lenf nodu metastazında ve kanserin ileri histolojik fenotipinde gözlenir (Friederike et al. 2000).

1.2.3.5. c-Myc

c-Myc, meme kanseri hastalarının 1/3'ünde mutasyona uğradığı gözlemlenen 8q24 yerleşimli proto-onkogendir (Osborne et al. 2004). Meme hastalarının çoğunda c-Myc geni aşırı miktarda ekspresyona uğrar. Ayrıca, MYC geninin transkripsiyonunun ve translasyonunun artmasının, tümör derecesine bağlı olarak meme kanseri hastalarının yaklaşık yüzde 30-50'si olduğu tahmin edilmektedir. Östrojen tedavisinin, hücrede aynı şekilde c-Myc seviyelerini düşürmede etkili olduğu görülmüştür; östrojen karşıtı ilaçlar c-Myc'nin aşırı ifadesine neden olur.

Ayrıca, c-Myc protein seviyesindeki artışın, tümörün in situ durumdan invaziv karsinoma dönüşümü ile ilişkili olduğu, artan saldırganlık ve daha düşük beklentisi ile ilişkili olduğu klinik çalışmalarla gözlenmektedir (ElsM et al. 1996, Scorilas et al. 1999).

1.2.3.6. p53 Proteini

Bir tümör baskılayıcı olarak, p53 geni, DNA hasarı, DNA onarımı, hücre döngüsü düzenlemesi ve apoptozda hayati bir rol oynar (Ozaki et al. 2011). P53 nükleer fosfoproteinindeki somatik hücre mutasyonu, primer meme kansinomu vakalarının yaklaşık %20 ile 30'unda görülür. P53 mutasyonlu tümörlerin yüksek derecede invaziv, kötü farklılaşmış, yüksek dereceli meme tümörleri olma olasılığı daha yüksektir. P53 mutasyonlarının, tamamen malign ve istilacı fenotipleri olan tümörlerin gelişiminden önce gelebileceği varsayılmaktadır. Bu nedenle, mutant p53'ün, daha sonraki meme kanserojenezi için riski öngören bir biyobelirteç olduğu ileri sürülmüştür. ER'nin, p53 ve MDM2 içeren kompleksleri oluşturmak için p53'ün amino terminali ile fiziksel olarak birleştiği gösterilmiştir (Rossner et al. 2009). Meme kanseri hastalarının yüzde 15'inde p53 mutasyonunun olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, meme kanseri hastalarının yüzde 39'u p53 proteinini aşırı ifade eder.

Ek olarak, p53 aşırı ekspresyon profili değil, ancak P53 genindeki herhangi bir yanlışlık veya diğer mutasyonlar, meme kanserinden ölümlerle ilişkilidir. p53 mutasyonları sadece meme kanseri ile değil aynı zamanda kolon kanseri, miyelom ve lenfoma gibi birçok kanserle de ilişkilidir. p53 mutasyonlarının, bir tümörün agresifliği ile yüksek derecede ilişkili olduğu bulunmuştur (Baker, et al. 2010).

1.2.3.7. Ataksi telenjiektazi mutasyona uğramış protein(ATM)

ATM geni 11q23 kromozomunda bulunur ve 66 eksondan oluşur. ATM proteini, 350.6 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahiptir ve protein kinaz aktivitesine sahip bir fosfatidilinositol 3-kinaz alanı içeren bir maya ve memeli proteinleri ailesi ile ilgilidir. Bu proteinlerin tümü, DNA ve hücre döngüsü kontrolündeki hasarın tespiti ve onarımının bazı yönleriyle ilgilidir. Bununla birlikte, ATM geninin heterozigot mutasyonuna sahip kadınlarda, meme kanseri riski daha fazladır. ATM proteininin DNA hasarından sonra p53 aktivasyonu için kritik bir protein olduğu bilinmektedir. Bir serin/treoninkinaz olarak ATM, geri besleme mekanizması proteini mdm2'nin fosforilasyonu yoluyla p53'ü aktive eder. Mdm2'nin fosforilasyonu, p53'ü çekirdeğe yerleştiren mdm2 proteininin kendi kendine yayılma özelliğini tetikleyerek, diğer birçok tümör supresyon geninin transkripsiyonuna sebep olabilir (Angele ve Hall 2000).

1.2.4. Meme Kanserinde Tedavi Stratejiler

Meme kanseri tedavisi genellikle cerrahi tedavisi, radyasyon tedavisi, hormonal tedavi, hedefe yönelik tedavi ve kemoterapiyi içerir. Kansere teşhis edildiğinde, ne kadar gelişmiş olduğuna bağlı olarak ona bir aşama atanır. Aşama, doktorların en uygun tedaviyi ve prognozu belirlemesine yardımcı olur.

1.2.4.1. Cerrahi Tedavi

Meme kanserinin tedavisi için ilk seçenek cerrahi işlemle tümör dokusunun vücuttan alınmasıdır. Tümörün yerleşimine ve evresine bağlı olarak uygulanabilecek farklı cerrahi yöntemler vardır. Bunlardan biri, memenin geri kalanı korunurken sadece tümörün ve çevresindeki sağlıklı dokuların bir kısmının alındığı göğüs koruyucu cerrahidir. Bu ameliyatı geçiren hastalar için, herhangi bir kanserli hücrenin varlığını kontrol etmek üzere kol altında bulunan lenf düğümlerinin biyopsisi olan lenf düğümü diseksiyonu yapılabilir. Diğer bir yaklaşım kanserli tüm memeyi, kol altındaki lenf düğümlerinin bir kısmını ve bazen göğsün üzerinden geçen kasları çıkarmaktır (National Cancer Institute, 2012). Geleneksel olarak ameliyatın amacı primer meme lezyonunu ve aksiller lenf bezlerini tamamen çıkarmaktır (Davies 2015).

1.2.4.2. Radyasyon Tedavisi

Radyasyon tedavisi, kanser hücrelerini öldüren, yüksek enerjili radyasyon kullanan bir tedavi seçeneğidir. Meme dokusunda kanserin tekrar oluşma ihtimalini ortadan kaldırmak için genellikle meme koruyucu bir ameliyattan sonra uygulanır. Ayrıca kanserin kemik veya beyin metastazını tedavi etmekte de tercih edilir. Genel olarak, radyasyon tedavisi vermenin iki yolu vardır. Birincisi radyasyonun vücudun dışındaki bir makine tarafından tümöre odaklandığı dış ışın radyasyonu. İkincisi brakiterapi olarak da bilinen iç radyasyondur. Radyoaktif maddelerin doğrudan memeye kateterler yoluyla verilmesini içerir. Ameliyat türü, kanser evresi ve hastanın yaşı seçeneklerinden birini seçmek için önemli faktörlerdir (Mikulandra et al. 2016).

1.2.4.3. Hormonal Tedavi

Hormon tedavisi, hormona duyarlı kanserleri, hormon üretimini inhibe ederek veya hormon-reseptör etkileşimini bloke ederek tedavi etmenin bir yoludur. Meme kanserleri hormonlara cevap veren iki tip reseptör taşır. Östrojen reseptörü, progesteron reseptörü veya her iki reseptör işe dahil edilir. (Dunnwald et al. 2007). Östrojenler meme kanserinde çok önemli bir rol oynarlar ve hedef alıcılara bağlanarak meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını teşvik ederler. Meme kanserlerinin çoğunluğu (%70) ER-pozitifdir (Davies 2015). Tüm hormon reseptörleri için negatif olan meme kanseri tipleri, hormon tedavisi ile tedavi edilemez ve ER (+) veya PR (+) kanserleri ile karşılaştırıldığında daha düşük hayatta kalma şansına sahiptir. Meme kanseri için hormon tedavisi, östrojen üretimini modüle ederek veya östrojen-östrojen reseptörü etkileşimini bloke ederek yapılır (Breastcancer.org. 2013). Aromataz inhibitörleri, seçici östrojen reseptörü modülatörleri ve östrojen reseptörü aşağı regülatörleri, hormon tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardır.

1.2.4.4. Kemoterapi Tedavisi

Kemoterapi, bir tedavi yöntemi olarak tümör hücrelerini öldürebilen ilaçların veya ilaç kombinasyonlarının kullanılmasıdır. Kemoterapinin temel amacı, kanser hücrelerini zayıflatmak veya tahrip etmek ve tekrarlama riskini azaltmaktır (<http://www.breastcancer.org/treatment>). Evreye ve kanser türüne bağlı olarak, ilaçlar kombinasyon halinde kullanılabilir (<http://www.breastcancer.org/treatment>). Kemoterapi için kullanılan ilaçlar, aşağıda sıralandığı gibi etki mekanizmalarına bağlı olarak birkaç sınıfa ayrılmıştır (Malhotra et al. 2003).

- Alkilleyici ajanlar, amino, karboksil ve DNA, RNA fosfat grupları ve bunların fonksiyonunu bozan proteinlerle kovalent bağ oluşturan ilaçlardır. Bu ilaçlar hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında bölünen hücreleri öldürür.
- Antimetabolitler, DNA ve RNA sentezi için kullanılan moleküllerin analoglarıdır. Etkilerini hücre döngüsünün S aşamasında gösterirler. Bu nedenle, bu ilaç sınıfı genellikle hızlı büyüyen tümörler için kullanılır. 5-Fluorourasil, bu sınıf için yaygın olarak kullanılan bir örnektir.

- Taksanlar, mikrotübül montajını ve stabiliteyi destekleyen ilaçlardır, bu nedenle mitozda hücre döngüsünü bloke eder. Bu, mikrotübül sökme işlemini bloke ederek M fazında tutuklamaya neden olur. Dosetaksel bu grup için bir örnektir.
- Antrasiklinler, bir glikozit grubuna sahip bir amino şekerin karakteristik yapısına sahip antibiyotiklerdir. Doksorubisin ve duanorubisin bu sınıfta ait iki ilaçtır.

1.3. 5-Fluorourasil (5-FU)

5-Fluorourasil kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son 20 yılda, 5-FU'nun etki mekanizmasının daha fazla anlaşılması, antikanser aktivitesini artıran stratejilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu ilerlemelere rağmen, ilaç direnci, 5-FU'nun klinik kullanımını için önemli bir sınırlama olmaya devam etmektedir. DNA mikrodizi profili gibi yeni ortaya çıkan teknolojiler, 5-FU'ya karşı dirence aracılık etmede rol oynayan yeni genleri tanımlama potansiyeline sahiptir. Bu tür hedef genler, kemoterapi için yeni hedefler olarak veya 5-FU bazlı kemoterapiye yanıtın öngörücü biyobelirteçleri olarak terapötik açıdan değerli olabilir. Antimetabolit ilaçları, temel biyosentetik süreçleri inhibe ederek veya DNA ve RNA gibi makro moleküllere dahil edilerek ve normal fonksiyonlarını inhibe ederek çalışır. Floropirimidin 5-fluorourasil her iki fonksiyonuda beraber gerçekleştirir. Floropirimidinler, 1950'lerde, sıçan hepatomlarının RNA'da bulunan dört bazdan biri olan pirimidinurasil'i normal dokulara göre daha hızlı kullandığı ve urasil metabolizmasının antimetabolit kemoterapisi için potansiyel bir hedef olduğunu belirten gözlemi takiben geliştirilmiştir. 5-FU'nun sitotoksikite mekanizması, fluoronükleotitlerin RNA ve DNA'ya yanlış eşleşmesine ve nükleotit sentetik enzim timidilatsentaz (TS)'nin inhibisyonuna bağlanmıştır. 5-FU, kolorektal ve meme kanserleri dahil olmak üzere bir dizi kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Her ne kadar diğer kemoterapotik ajanlarla kombinasyon halinde 5-FU, göğüs, baş ve boyun kanserlerinde yanıt oranlarını ve sağ kalımını arttırsa da, kolorektal kanserde 5-FU'nun en büyük etkiye sahip olduğu görülüyor. Florourasil, bir antineoplastik anti-metabolittir.

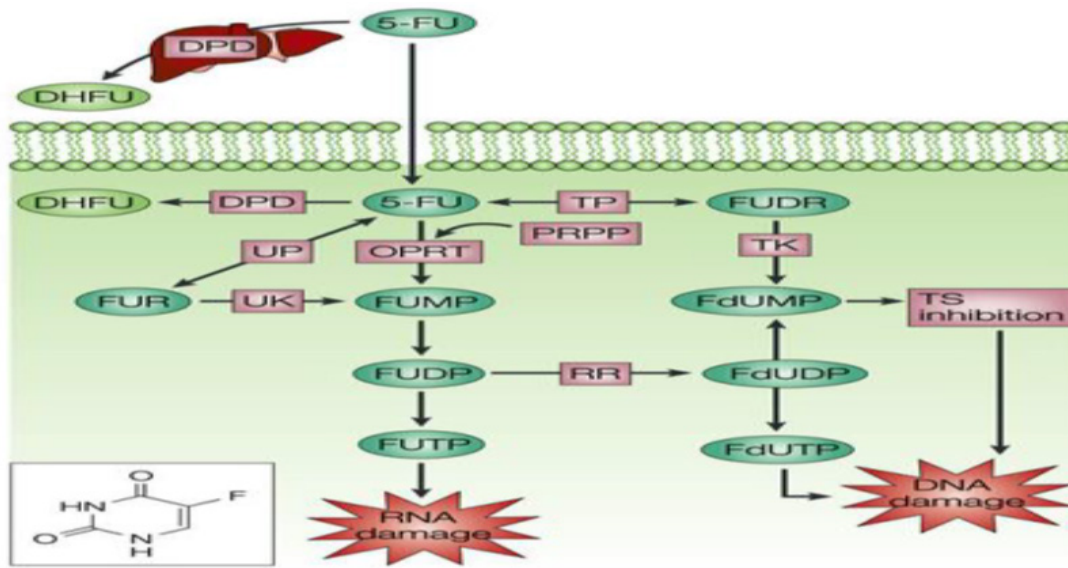
Anti-metabolitler, DNA'nın yapı taşları haline gelen pürin veya pirimidin olarak maskelenir. Bu maddelerin normal hücre gelişimi ve bölünmesini durdurarak "hücre" döngüsü sırasında "S" aşamasında DNA'ya karışmasını önlerler. Florourasil, sitozin nükleotidini deoksi türevine dönüştüren bir enzimi bloke eder ve böylece DNA sentezini ayrıca inhibe eder. Çünkü Florourasil, timidin nükleotidinin DNA zincirine dahil edilmesini bloke eder (Longley et al. 2003).

1.3.1. 5-FU Etki Mekanizması

5-FU, hidrojen yerine C5 konumunda bir flor atomu olan bir urasil analogudur. Hücrelere urasil ile aynı kolaylaştırılmış taşıma mekanizmasını kullanarak hızla girer.

Plazmadaki 5-FU'nun yarı ömrü 10 ila 20 dakikadır ve 5-FU'nun yaklaşık %80'i, esas olarak karaciğerde katabolize edilirken, geri kalanı idrarda değişmeden atılır (Wohllhuter et al. 1980). 5-FU hücre içinde çeşitli aktif metabolitlere dönüştürülür. Bu metabolitler florodeoksiüridinmonofosfat (FdUMP), florodeoksiüridintrifosfat (FdUTP) ve floroüridintrifosfat (FUTP) tır. Bu aktif metabolitler, RNA sentezini ve TS'in etkisini bozar. 5-FU katabolizmasındaki hız sınırlayıcı enzim, 5-FU'yu dihidroflorourasile (DHFU) dönüştüren dihidropirimidin dehidrojenazdır (DPD). Uygulanan 5-FU'nun %80'ninden fazlası normal olarak birincil olarak DPD'nin bolca eksprese edildiği karaciğerde katabolize edildiği düşünülmektedir. Timidilatsentaz (TS) enzimi, kofaktör olarak indirgenmiş folat 5,10-metilenetetrahidrofolatı (CH₂THF) kullanılarak deoksiüredinmonofosfatı (dUMP) deoksitimiidinmonofosfata (dTMP) dönüştürür. DTMP'nin tükenmesi, çeşitli geri bildirim mekanizmaları yoluyla diğer deoksinükleotitlerin (dATP, dGTP ve dCTP) seviyelerinde bozulmaları indükleyen deoksitimidintrifosfatın (dTTP) daha sonra tükenmesine yol açar. Deoksinükleotit havuzu dengesizliklerinin (özellikle dATP / dTTP oranı), DNA sentezini ve onarımını ciddi şekilde bozduğu ve öldürücü DNA hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, TS inhibisyonu, dUMP'nin birikmesine neden olur ve daha sonra deoksiüredinetripfosfat (dUTP) seviyelerinde artışa yol açar.

Hem dUTP hem de 5-FU metabolit FdUTP, DNA ile yanlış ilişki kurabilir. DUTP yanlış eşleşmesine bağlı DNA hasarı, dUTP'nin hücre içi birikimini sınırlayan pirofosfatazdUTPase seviyelerine oldukça bağlıdır. Timidilat, timidin kinazın etkisiyle timidinden kurtarılabilir, ve böylece TS eksikliğinin etkileri hafifletilebilir. Bu kurtarma yolu, 5-FU'ya karşı potansiyel bir direnç mekanizmasını temsil eder.



Şekil 1.4. 5-FU metabolizması (Longley et al. 2003)

5-FU metaboliti FUTP, RNA'ya kapsamlı bir şekilde dahil edilerek normal RNA işlemini ve işlevini bozar. 5-FU'nun RNA'ya yanlış birleşmesi ile klonojenik potansiyel kaybı arasında önemli korelasyonlar insan kolon ve meme kanseri hücre dizilerinde gösterilmiştir. FUTP'nin RNA'ya dahil edilmesi, sırayla olgunlaşmamış ribozomal RNA'ların (rRNA'lar) ve yanlış katlanmış tRNA'ların oluşumuna yol açan RNA işlemini etkileyebilir. Kolorektal kanser CRC'lerin tedavi stratejileri hastalığın evresine göre farklılık gösterir. Aşama I-II için baskın yaklaşım cerrahi parça alma, yüksek riskli evre II veya evre III adjuvan kemoterapi için ve evre IV için kemoterapidir. 5-FU metabolizmasından sorumlu enzimlerin katalize edici etkinliği ve değişimleri, öngörücü ve prognostik belirleyicileri tanımlamak için derinlemesine incelenmiştir.

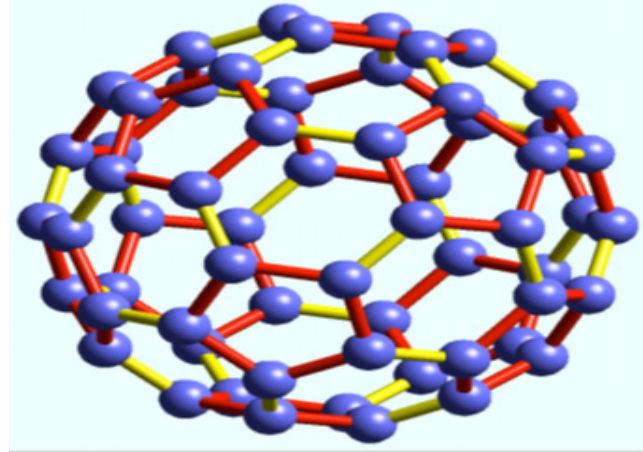
Çalışmalar, düşük TS ekspresyonunun 5-FU'ya daha iyi bir yanıt oranı ile ilişkili olduğunu ve TS enzim seviyelerinde akut artışın ilaç direncinden sorumlu olabileceğini göstermiştir. Yüksek DPD seviyeleri ve dUTPase, TS inhibitörlerine direnç ile ilişkilidir. 5-FU, kolorektal kanser tedavisinde 40 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. 5-FU intravenöz olarak verilir ve optimum dozu ve uygulama modunu belirlemek için çeşitli farklı programlarda kullanılmıştır. Gelişmiş kolorektal kanserde tek ajan olarak 5-FU için genel yanıt oranı oldukça sınırlıdır (yaklaşık %10-15); ancak son 20 yılda, 5-FU'nun antikanser aktivitesini arttırmak ve klinik direncin üstesinden gelmek için önemli modülasyon stratejileri geliştirilmiştir.

Sonuç olarak, 5-FU hem ilerlemiş hem de erken evre kolorektal kanserin tedavisi için ana ajan olarak kalmıştır. 5-FU'nun antikanser aktivitesini modüle etmek için araştırılan stratejiler arasında 5-FU bozunmasının azaltılması, 5-FU aktivasyonunun artırılması ve FdUMP'un TS bağlanma aktivitesinin artırılması yer alır (Longley et al. 2003).

1.4. Fullerene C₆₀

Fullerenler altıgen ve beşgenlerde düzenlenmiş sp² karbon atomlu oyuk kafes molekülleridir. C₆₀'ın keşfedilmesinden bu yana, C₇₀, C₇₂, C₇₄, C₇₆, C₇₈ ve C₈₄ gibi diğer fullerenler de üretildi. Fullerene kafesinin çapı yaklaşık 7–10 Å'dır. Moleküler ağırlıkları yüksek olmasına rağmen, küresel bir geometride düzenlenmiş çok sayıda karbon atomu nedeniyle, fullerenler, steroid hormonları ve peptit alfa helisleri gibi çoğu küçük organik moleküle benzerdir. İlaç tasarımı ve gelişimi açısından önemli bir özelliktir (Zhou 2013). Küresel şekillerinden ve bir nanometre boyutundan dolayı fullerenler genellikle buckyball veya karbon nanomalzemeleri olarak adlandırılır. Fullerene, Eylül 1985'te Rice Üniversitesi'ndeki Huston'da, Richard Smalley, Robert Curl ve Harry Kroto'nun bulunduğu bir grup tarafından deneysel olarak keşfedildi (Ulloa 2013). Fullerene karbon nano-partikülü, izole edilen ilk ve daha kararlı karbon olup 12 beşgen ve 20 altıgen içerir. C₆₀'ın toksik etkisi, yüzey aktif madde veya organik çözücü ile artar. C₆₀'ın kimyasallara yüksek elektron ilgisi, hücre zarının içine geçmesine izin verir ve sitozol içindeki metabolik sürece müdahale eder (Baldrighi 2016).

Bu özellikler, hücre lipid zarına kolayca nüfuz etme kabiliyetleri nedeniyle fullerenin biyolojik nesnelere kullanılmasını sağlar. Düşük konsantrasyonlarda, C₆₀ fullereninin normal hücrelerde akut toksik etki göstermediği ve ayrıca, C₆₀ fullereninin, onkolojik hastalıkların tedavisi için fotodinamikterapi de dahil olmak üzere, geleneksel ilaçların kanser hücrelerine hedefli olarak verilmesi de dahil olmak üzere, antitümör terapisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Lynchak 2017).



Şekil 1.5. C_{60} fullerene nanopartikülünün şematik gösterimi (Ulua 2013)

1.4.1. Fullerene C_{60} ve Kanser

Nanoteknoloji, çeşitli alanlarda nanomalzemelerin önemli yeni uygulamaları için ortaya çıkmaktadır. Nanomalzemeler, nano ölçekte (1-100 nm) bir veya daha fazla dış boyuta sahip maddeler olarak tanımlanır. Nanopartiküllerin dış boyutlarından, yüksek fiziksel ve kimyasal aktivitelerinden dolayı sadece sanayide değil, aynı zamanda bilimsel ve tıbbi araştırmalarda da yararlanma çabaları sürmektedir (Stefano et al. 2012). Kanser tedavisinde, nanopartiküller (NP) tek başına veya kemoterapötikler, antijen veya antikolar gibi farklı tipte moleküllerle kombinasyon halinde, otofaji modülasyonu yoluyla kanser hücrelerinin ölüme duyarlılığını arttırmak için kullanılabilir.

Fullerene C_{60} , geometrik yapısı ve eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle tasarlanmış güçlü bir anti-kanser, sitoprotektif ve sitotoksik etkiye sahip NP'dür (Panzarini et al. 2013).

Küresel şekillerinden ve bir nanometre boyutundan dolayı fullerenler genellikle buckyball veya karbon nanomalzemeleri olarak adlandırılır. Biyolojik açıdan bakıldığında, fullerenler, reaktif oksijen türlerini ve reaktif azot türlerini temizleyen ve detoksifiye edebilen güçlü antioksidanlardır (Zhou 2013). Hem fagositik hem de fagositik olmayan mekanizmalar tarafından nanomalzemelerin endositozu en sık lizozom içselleşmesi ile sonuçlanır. Endolizozomal yolağa ek olarak, son kanıtlar nanomalzemelerin de otofajiyi tetikleyebileceğini göstermektedir (Stern et al. 2008).

C_{60} fullerene son zamanlarda antikanser tedavisinde kullanım için umut verici bir ajan olarak kabul edilmiştir. C_{60} fulleren ve türevleri biyoyumlu, düşük konsantrasyonlarda normal dokular üzerinde toksik etki göstermez ve güçlü serbest radikal temizleyici özelliğine sahiptir. C_{60} fullerene nanopartikülü, fare karaciğer kanseri, akciğer kanseri ve sıçan kolorektal kanserine karşı tümör inhibitör aktivitesine sahiptir (Prylutska et al. 2011). Fulleren ve türevleri reaktif oksijen türlerini temizlemek için kullanılan etkili nanopartiküllerdir (Wanget al 2014). C_{60} , kanser proliferasyonunu azaltır, fotodinamik (ROS) üretimini ve oksidatif stres ile *in vitro* tümör büyümesini azaltır. Oksidatif strese bağlı *in vitro* sitotoksositeye ek olarak, düşük dozlarda nano C_{60} , muhtemelen bazı hücre içi proteinlerin otofajik sindirimini indükleyerek, ROS'dan bağımsız olarak tümör hücresi proliferasyonunu yavaşlatır. Fulleren biyomolekül konjugatları çok yüksek bir antineoplastik etkinlik gösterir. Örneğin, paclitaxel ve doxorubicin (Dox) gibi antikanser preparatların C_{60} fullerene kimyasal olarak bağlanması, bu ilaçların farmakokinetiğinde bir iyileşme sağlar ve terapötik etkinliğini artırır. Ek olarak, dox ve cisplatin (Cis)'in C_{60} fullerene ile konjugasyonunun, *in vitro* çeşitli insan tümör hücre hatlarına karşı toksisitesinde önemli bir artışa yol açtığını ve bu ilaçların *in vivo* olarak Lewis akciğer karsinomunun büyümesi üzerindeki inhibitör etkisini büyük ölçüde arttırdığını göstermiştir.

C_{60} fullerene esaslı nano-formülasyonların altta yatan antineoplastik etkisinin mekanizmasının, tümör hücreleri üzerindeki doğrudan etkinin (oksidatif stresin modülasyonu, apoptoz, nekroz ve otofajinin), tümörlerin mikro-çevre üzerindeki etkisinin (tümör dokularına kan temininin azaltılması) ve konakçı bağışıklık sisteminin aktivasyonu ile bağlantılı olduğu belgelenmiştir (Franskevych et al. 2015). C_{60} fullerenler normal hücrelerde hiçbir akut toksik etki göstermez. Ayrıca, C_{60} fullereninin, onkolojik hastalıkların tedavisi için fotodinamik tedavi ve geleneksel ilaçların kanser hücrelerine hedefli şekilde verilmesi dahil, antitümör terapisinde kullanılabileceği de bildirildi. (Prylutska et al. 2011).

1.5. Serbest Radikaller

Serbest radikaller normal hücrel metabolizmanın ürünleridir. Serbest bir radikal, değer kabuğunda veya dış yörüngede bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektron içeren bir atom veya molekül olarak tanımlanabilir ve bağımsız olarak var olabilir. Serbest radikalın tek elektron sayısı, kararsız, kısa ömürlü ve yüksek oranda reaktif hale gelir. Yüksek aktivite nedeniyle, stabilite elde etmek için diğer bileşiklerden elektronları soyutlayabilirler. Böylece saldırıya uğrayan molekül elektronunu kaybeder ve serbest radikal haline gelir ve sonunda canlı hücreye zarar veren bir zincir reaksiyon kaskadını başlatır. ROS/RNS, yaşam sistemine hem faydalı hem de toksik bileşikler olarak iki yönlü bir iş oynar.

Orta veya düşük seviyelerde ROS/RNS, faydalı etkilere sahiptir ve bağışıklık fonksiyonu gibi (yani patojenik mikroorganizmalara karşı savunma), bazı hücrel sinyalyollarında, mitojenik cevapta ve redoks regülasyonunda olduğu gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonları içerir. Ancak daha yüksek konsantrasyonda, hem ROS hem de RNS, sırasıyla oksidatif stres ve nitrozatif stres oluşturarak biyomoleküllerde potansiyel hasara neden olur. (Phaniendra et al. 2015).

Oksidatif stres ve nitrozatif stres, bir tarafta aşırı ROS/RNS üretimi ve diğer tarafta enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan eksikliği olduğunda gelişir.

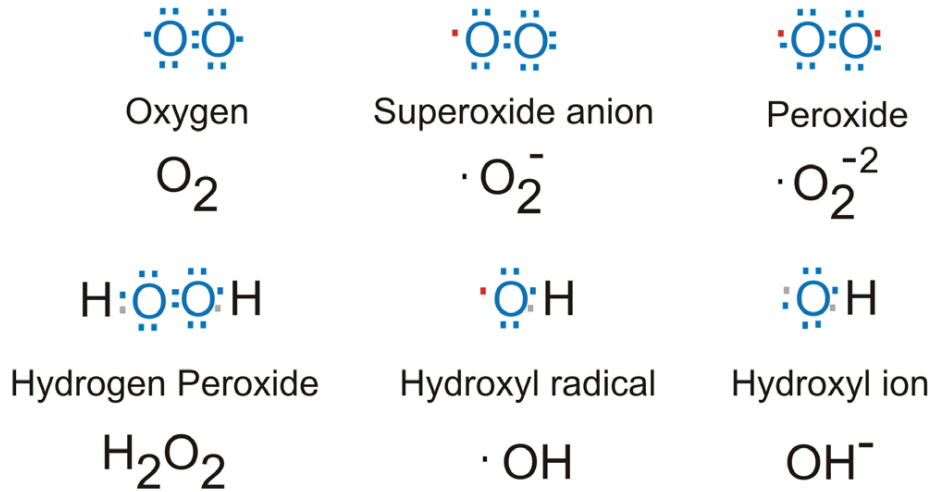
Hem reaktif oksijen türleri hem de reaktif azot türleri olan serbest radikaller, hem endojen kaynaklardan (mitokondri, peroksizomlar, endoplazmik retikulum, fagositik hücreler, arakidonik asit metabolizması vb.) hem de eksojen kaynaklardan (kirlilik, alkol, sigara, ağır metaller, geçiş metalleri, endüstriyel çözücüler, ilaçlar, kimyasal maddeler, ozon, uv ışınlar) türetilir. Serbest radikaller, çeşitli önemli sınıfları olumsuz yönde etkileyebilir nükleik asitler, lipitler ve proteinler gibi biyolojik moleküllerin, normal redoks durumunu değiştirerek, oksidatif stresin artmasına yol açarlar. Serbest radikallerin oksidatif strese neden olduğu, diabetes mellitus, nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson hastalığı-PD, Alzheimer hastalığı-AD), kardiyovasküler hastalıklar (ateroskleroz ve hipertansiyon), solunum yolu hastalıkları (astım), katarakt gelişimi, romatoid artrit ve çeşitli kanserlerde (kolorektal, prostat, meme, akciğer, mesane kanserleri) gibi çeşitli hastalık koşullarında rol oynadığı bildirilmiştir (Behrend et al. 2003). Kanser, insanlarda önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Serbest radikaller, DNA'da farklı kimyasal değişikliklere neden olur, böylece mutajenik olabilirler ve kanser etiyolojisine dahil olabilirler. Özellikle kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla daha yüksek ROS seviyelerine sahiptir ve metabolik hızlarının yüksek olması nedeniyle mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna daha duyarlıdır. Kanser hücreleri, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcıların kaybı nedeniyle yüksek seviyelerde oksidatif stres gösterir. ROS, büyüme sinyallerini ve gen ekspresyonunu değiştirerek, kanser hücrelerinin sürekli çoğalmasına neden olur. ROS, baz modifikasyonları, silme işlemleri, iplik kopması, kromozomal düzenlemeler ve DNA'nın hiper ve hipo-metilasyonunu indükleyerek DNA'ya zarar verebilir (Valko et al. 2006).

1.5.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Oksijen hayat için vazgeçilmez bir elementtir. Hücreler enerji üretmek için oksijen kullandıklarında, serbest radikaller, ATP (adenozintrifosfat) üretimi mitokondri tarafından üretilir (Pham-Huy et al. 2008).

Toplam oksijen tüketimimizin yaklaşık %90'ı mitokondriyal solunum zincirinde kullanılır (Starkov 2008). Çoğu reaktif oksijen türü, mitokondriyal elektron taşınması sırasında yan ürünler olarak üretilir. Ayrıca ROS, metal katalizli oksidasyon reaksiyonlarının gerekli ara maddeleri olarak oluşturulur.

Atomik oksijen, dış elektron kabuğunda ayrı yörüngelerde iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Bu elektron yapısı, oksijeni radikal oluşumuna duyarlı hale getirir. Elektronların eklenmesi yoluyla oksijenin ardışık olarak azaltılması, bir dizi ROS oluşumuna yol açar: süperoksit; hidrojen peroksit; hidroksil radikali; hidroksil iyonu; ve nitrik oksit.



Şekil 1.6. Yaygın reaktif oksijen türlerinin elektron yapıları

Reaktif oksijen türleri aerobik metabolizmanın yan ürünleridir. ROS sıklıkla oksidatif stres ilkesiyle ilişkilendirilir. Yüksek ROS seviyelerinin oluşumu, hücrelerin DNA hasarına, proteinlerin ve lipitlerin oksidasyonuna yol açabileceği ve fonksiyonlarını değiştirdiği için zararlıdır (Held 2015).

1.5.1.1. Süperoksit radikali (O_2^-)

Moleküler oksijene bir elektron ilavesiyle O_2^- oluşur ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$). En yaygın ROS olan süperoksit anyonu (O_2^-) mitokondride, kardiyovasküler sistemde ve vücudun diğer kısımlarında üretilir ve biyomoleküllere aktivitesi düşüktür. Elektron taşıma zinciri (ETC), oksijenin kısmi indirgenmesi yoluyla çoğu süperoksit oluşumundan sorumludur.

Aerobik metabolizmada, oksijenin çoğu mitokondriyal solunum zincirinde suya indirgenir. Bununla birlikte, oksijen moleküllerinin küçük bir kısmı (%1-2) süperoksit anyon radikali line dönüştürülür.

1.5.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), ROS arasında en az reaktif olan ve metal iyonlarının yokluğunda fizyolojik pH ve sıcaklık altında stabil olan nötr bir moleküldür. H_2O_2 vücudumuzda çok sayıda reaksiyonla oluşur ve güçlü türler verir. Hidrojen peroksit, $O_2^{\cdot-}$ 'in bir elektron almasıyla ya da moleküler oksijene (O_2) iki elektron eklenmesiyle doğrudan meydana gelir. ($O_2^{\cdot-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$), ($O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$).

Hidrojen peroksit, süperoksit anyonundan süperoksitdismutaz (SOD) enzimi tarafından katalize edilen bir dismutasyon reaksiyonu yoluyla üretilir. Amino asit oksidaz ve ksantinoksidaz, süperoksit anyonundan da H_2O_2 üretebilir. Biyolojik zarlara kolayca nüfuz edebilir. H_2O_2 'nin DNA üzerinde direkt bir etkisi yoktur, ancak geçiş metali iyonlarının varlığında hidroksil radikalini (OH^{\cdot}) üreterek DNA'ya zarar verebilir. H_2O_2 'yi detoksifiye eden başlıca antioksidan enzim sistemleri, katalaz, glutatyonperoksidaz ve peroksiredoksinlerdir.

1.5.1.3. Hidroksil radikali (OH^{\cdot})

Hidroksil radikali, hidroksit iyonunun nötr şekli olup oldukça reaktif ve tehlikeli bir serbest radikaldir.

Metal iyonları varlığında süperoksit anyonu ve H_2O_2 'den oluşabilir ve yaklaşık 10^{-9} 'sn lik çok kısa olan bir in vivo yarı ömre sahiptir.

DNA, proteinler, lipitler ve karbonhidratlar dahil olmak üzere hem organik hem de inorganik moleküller ile güçlü bir şekilde reaksiyona girebilir ve hücrelere diğer ROS'ların yapabileceğinden daha fazla hasar verebilir.

H_2O_2 'nin metal iyonlarıyla (Fe^{+2} veya Cu^+) reaksiyona girdiği, genellikle ferritin ve seruloplazmin veya diğer moleküller gibi farklı proteinlerle kompleks halinde bağlandığı bir

Fenton reaksiyonunda oluşturulur. Stres koşulları altında, fazla miktarda O_2^- - ferritinden serbest demir çıkarır ve serbest kalan demir, OH^- oluşturmak üzere Fenton reaksiyonuna katılır. Hidroksil radikali Haber-Weiss reaksiyonu adı verilen bir reaksiyonda, süperoksit radikali ile H_2O_2 arasındaki reaksiyondan da oluşur ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH^- + OH + O_2$) (Karabulut ve Gülay 2016).

1.6. Hücre Ölüm Mekanizmaları

1.6.1. Apoptozis

Hücre ölümü normal gelişimin önemli bir parçasıdır ve sürekli devam eder. İnsan vücudu yaklaşık 10^{14} hücreden oluşur. Tüm organizmanın işlevselliğini sağlamak için her gün milyarlarca hücre ölmektedir. Böylece, vücut büyüklüğü aynı kalır çünkü hücre bölünmesi hücre ölümünü tam olarak dengeler. Sonunda, apoptozis terimi, programlanmış hücre ölümü veya hücrenin kendini kontrollü bir şekilde imha etmesine yol açan morfolojik süreçleri tanımlamak için kullanıldı ve 1972 yılında ilk önce Kerr, Wyllie ve Currie tarafından yayınlanan bir yayında tanıtıldı (Anita et al. 2014). Yunancada ‘apo’ =ayrı, ‘ptosis’=düşen anlamında ağaçlardan yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir. Bu benzetme, canlı maddenin ölümünün organizmaların yaşam döngüsünün ayrılmaz ve gerekli bir parçası olduğunu vurgulamaktadır (Van Cruchten et al. 2002). Apoptoz, hücre büzülmesi, hücre zarı bozulması, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, kromatin yoğunlaşması, organeleri içeren veziküllerin oluşması ve DNA parçalanması dahil olmak üzere tipik morfolojik değişikliklere yol açan bir dizi biyokimyasal olay içerir (Jin 2005).

Hücre homeostazının sürdürülmesi için, bir hücre popülasyonu sayısındaki artış ve azalış arasındaki oranın özenle dengelenmesi gerekir. Gelişme sırasında, artık ihtiyaç duyulmayan yapılar apoptozis tarafından desteklenir.

Yaşam boyunca apoptoz, yaşlı, enfekte olmuş, zarar görmüş veya genetik olarak hasara uğramış hücreler gibi yararsız veya potansiyel olarak tehlikeli olan hücreleri elimine eder. Apoptozisin azalması kansere neden olabilir. Ortalama olarak yetişkin insanlarda her gün 50 ila 70 milyar hücre apoptozis nedeniyle ölmektedir. Mitoz, hücre ölümü olmadan devam ederse, 80 yaşındaki bir insan 2 ton kemik iliği ve lenf nodu ve 16 km uzunluğunda bir bağırsağa sahip olurdu. Apoptotik hücre ölümü modu, çok hücreli organizmaların gelişiminde ve dokulardaki hücre popülasyonlarının fizyolojik ve patolojik koşullar üzerine düzenlenmesi ve korunmasında önemli rol oynayan aktif ve tanımlanmış bir süreçtir (Anita et al. 2014).

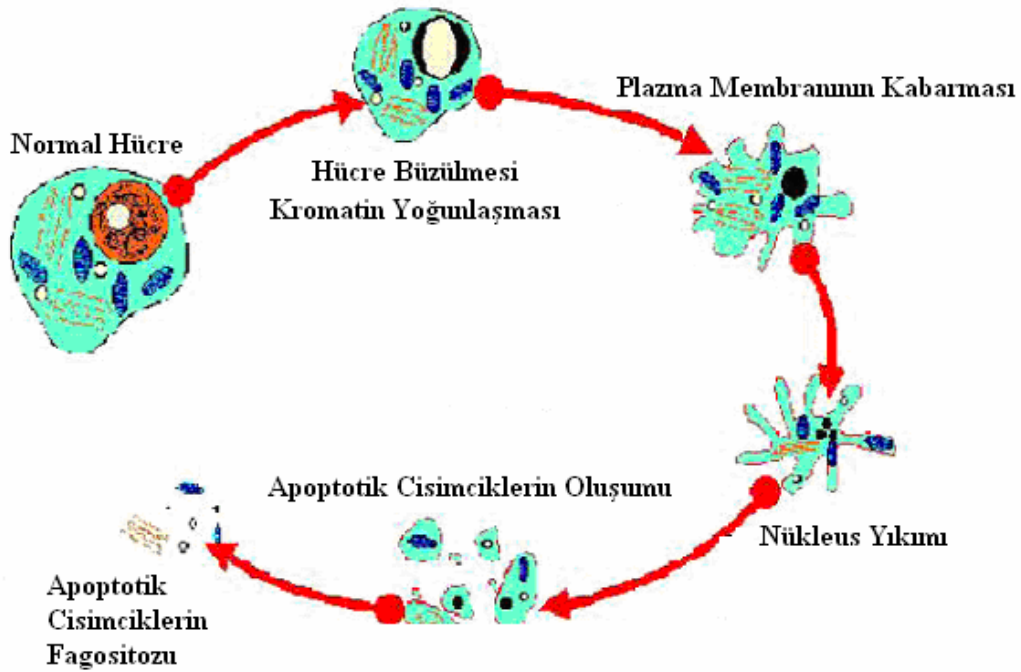
1.6.1.1. Apoptozisin Morfolojisi

Apoptoz, bütünlüğünü kaybetmeden hücre zarının sızması, kromatin yoğunlaşması, genomik DNA fragmantasyonu ve spesifik fagositoz sinyal molekülleri (örn. fosfatidilserin) hücre yüzeyinde maruz bırakılması dahil olmak üzere spesifik morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahip ayırt edici bir hücre ölüm türüdür. Bu morfolojik değişikliklerden sonra hücreler, membranla çevrili apoptotik cisimciklere bölünür ve makrofajlar veya komşu hücreler tarafından yutulur (Mirkes 2002).

Işık ve elektron mikroskopisi apoptoz sırasında meydana gelen çeşitli morfolojik değişiklikleri tanımlamıştır. Apoptozun erken süreci boyunca, hücre büzülmesi ve piknoz ışık mikroskopisi ile görülebilir. Hücre büzülmesiyle hücreler daha küçülür, sitoplazma yoğundur ve organeller daha sıkı bir şekilde paketlenir. Pinozis, kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve bu apoptozun en karakteristik özelliğidir. Hematoksilin ve eozin boyası ile yapılan histolojik incelemede, apoptoz tekli hücreleri veya küçük hücre kümelerini içerir.

Apoptotik hücre, koyu eozinofilik sitoplazma ve yoğun mor nükleer kromatin fragmanları olan yuvarlak veya oval bir kütle olarak görülür. Elektron mikroskopisi, hücre altı değişiklikleri daha iyi tanımlayabilir.

Kromatin yoğunlaşma aşamasının başlarında, elektron yoğun nükleer malzeme, düzgün bir şekilde yoğun çekirdekler olabilir. “Plazma zarının kanaması”, ardından karyorreksis ve hücre parçalarının “tomurcuklanma” adı verilen bir işlem sırasında apoptotik cisimlere ayrılması ile meydana getirilmesine rağmen, nükleer zarın altında çevresel olarak karakteristik olarak birikir. Apoptotik cisimler, nükleer bir parçası olan veya olmayan, sıkıca paketlenmiş organelleri olan sitoplazmadan oluşur. Organel bütünlüğü hala korunur ve bunların hepsi sağlam bir plazma membranı içine alınır. Bu cisimler daha sonra makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagositozlanır ve fagolisozomlar içinde bozunur (Elmore 2007).



Şekil 1.7. Apoptosis'in morfolojik değişiklikleri (Mirkes PE 2002)

1.6.1.2. Apoptozis Mekanizmaları

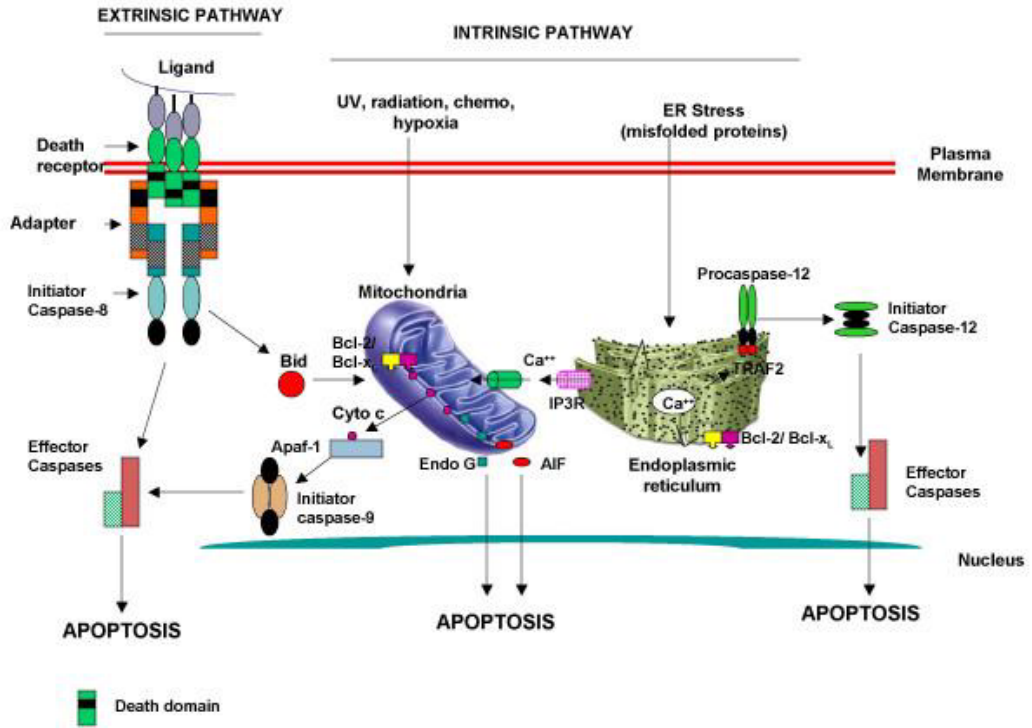
İki ana apoptotik yol vardır: Mitokondriyal (içsel) yol ve Hücre ölüm reseptörü (dışsal) yoldur. Birinci yol, uyarıldığında, mitokondriden sitokrom-c salınmasına ve ölüm sinyalinin aktivasyonuna yol açan intrinsik veya mitokondriyal yoldur. Ekstrinsik veya sitoplazmik yol olarak adlandırılan ikincisi, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesinin bir üyesi olan Fas ölüm reseptörü yoluyla tetiklenir. Her iki yol da, düzenleyici ve yapısal molekülleri parçalayan ve hücrenin ölümüyle sonuçlanan kaspaz adı verilen proteaz kaskadının aktivasyonunu içeren son ortak yola yolaçar. Yollar birbirine bağlıdır; bu nedenle, iki yol arasındaki ayrım basittir. İçsel yolda Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, dışsal aracılı apoptozun inhibisyonuna yol açabilir; tersine, TNF α , NFkB ekspresyonunu arttırabilir ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin antiapoptotik üyelerini uyarabilir (Irene et al. 2005).

Apoptozun hücre içi mekanizmasına, hücre dışı proteolitik bir kaskad aracılığıyla, kaspaz denilen bir proteaz ailesi aracılık eder. Kaspazlar (sistein aspartata özgü proteazlar), apoptozun başlatılması ve uygulanmasında rol oynayan hücre içi protein ailesidir (Ashe et al.2003).

Kaspazların aktif bölgelerinde bir sistein vardır ve spesifikaspartik asit kalıntılarında sonra hedef proteinlerini ayırırlar. Kaspazlar, aspartik asitlerde diğer kaspazlar tarafından bölünme ile aktive edilen, prokaspazlar adı verilen aktif olmayan öncüler olarak ifade edilir. Memelilerde şimdiye kadar 14 kaspaz tanımlanmıştır. Apoptoza karışan kaspazlar etki mekanizmaları ile alt sınıflara ayrılmıştır. Akış yukarıdaki başlatıcılara başlatıcılar (kaspazlar -2, -8, -9 ve -10) denir, başlatıcılar tarafından aktive edilen aşağı akışlı kaspazlara, yürütücüler veya efektörler (kaspazlar -3, -6 ve -7) denir. Kaspazlar, birkaç hücrel proteini parçalayarak veya aktive ederek yada inaktive ederek apoptotik yürütme yollarına öncülük eden sinyal araçlarıdır (Li and Yuan, 2008).

Ekstrinsik (dışsal yol), ölüm reseptörleri, membrana bağlı Fas ligandı, Fas kompleksleri, Fas ile ilişkili ölüm bölgesi ve kaspaz -8 ve 10 dahil olmak üzere, apoptoza yol açan aşağı akış kaspazlarının geri kalanını aktive eden çeşitli protein üyelerini içerir. Dışsal yolun aktivasyonu, ölüm reseptörleri (DR'ler) adı verilen hücre yüzeyi reseptörlerinin ligasyonu ile başlatılır.

Fas tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve aynı zamanda Apo-1 veya CD95 olarak da adlandırılır. Diğer TNF reseptörleri arasında TNFR1, DR3 (Apo 2), DR4 (tümör nekroz faktörü ile ilgili apoptozu indükleyen ligand reseptörü 1 (TRAIL R1), DR5 (TRAIL R2) ve DR6 bulunur. Fas sinyalizasyonu, dönüştürülmüş veya virüs bulaşmış hücrelerin bağışıklık gözetiminde ve kendi kendine reaktif lenfositlerin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynar. Bu nedenle, bu yoldaki kusurlar birçok malignitede ve otoimmün hastalıklarda görülür. Fas ligand (FasL) -Fas sistemi esas olarak ölüme bağlı fonksiyonları ile tanınır, ancak aynı zamanda iyi tanımlanmamış birkaç proliferatif ve enflamatuar sinyal yolunda da rol oynar. Bir ölüm uyarısı yolu tetiklediğinde, membrana bağlı FasL aktif olmayan Fas kompleksleri ile etkileşime girer ve ölüme neden olan sinyal kompleksini oluşturur. Fas ölümüne neden olan sinyalizasyon kompleksi, adaptör proteini Fas ile ilişkili ölüm bölgesi proteini ve kaspazlar 8 ve 10'u içerir ve kaspaz 8'in aktivasyonuna yol açar, bu da aşağı akış kaspazlarının geri kalanını aktive edebilir. Bazı hücrelerde, kaspaz-8'in aktivasyonu, ölümün gerçekleştirilmesi için tek gereklilik olabilirken, diğer hücre tiplerinde, kaspaz-8, sitokrom-c'nin daha sonraki salımına yol açan Bid'i (Bcl-2 ailesinin proapoptotik bir üyesi) parçalayarak intrinsi kapoptotik yolla etkileşir. Çeşitli yollar ve proteinler dışsal yolun aktivasyonunu düzenler.



Şekil 1.8. Apoptoz Mekanizmaları (Gupta et al. 2006)

Bazı hematolojik malignitelerde Fas geninin mutasyonları veya delesyonları bulunduğundan, bu modülatörlerin düzensizliği de malign transformasyona yol açabilir. Yolun düzenleyicileri, NFkB ve FasL genini düzenleyen aktive edici protein 1 gibi transkripsiyon faktörlerini içerir, çünkü transkripsiyonel olarak inaktif bir genidir. Yolun diğer inhibitörleri arasında FAP-1, Fas ile ilişkili ölüm-etki-alanı-protein benzeri interlökin-1-dönüştürücü enzim benzeri inhibitör protein ve DcR3, TRAIL R-3 / DcR1 ve TRAIL R gibi çözünür tuzak reseptörleri bulunur. Bu tuzak reseptörleri, ligand ile rekabete rağmen Fas'ın FasL tarafından uyarılmasını antagonize eder.

İntrinsik yolun en önemli düzenleyicilerinden biri, Bcl-2 protein ailesidir. Bcl-2, B-hücresi folikülerlenfomalarında, kromozom 14'ün translokasyon kırılma noktasında keşfedilen bir onkogendir. Bcl-2 familyası apoptozun anahtar düzenleyicileridir ve t (14; 18) kromozomal translokasyonları olmasa bile birçok malignitede aşırı eksprese edilir.

Bcl-2'nin artan ekspresyonu kemoterapötik ilaçlara ve radyasyon terapisine direnç sağlarken, Bcl-2 ekspresyonunu azaltmak antikanser ilaçlara apoptotik yanıtları teşvik edebilir.

Ek olarak, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, hücre döngüsü bölünmesinin G0 fazında hücrelerin birikmesine neden olabilir ve kemorezistansa katkıda bulunabilir. Bcl-2 ailesi, Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk gibi proapoptotik üyeleri ve Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1 gibi antiapoptotik üyeleri içerir. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerinin dengesi bozulduğunda, etkilenen hücrelerde düzensiz apoptoz ile sonuçlanır. Bu, bir veya daha fazla anti-apoptotik proteinin aşırı ekspresyonundan veya bir veya daha fazla pro-apoptotik proteinin düşük ekspresyonundan veya her ikisinin bir kombinasyonundan kaynaklanabilir (Li and Yuan, 2008).

Antiapoptotik Bcl-2 üyeleri, sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozun baskılayıcıları olarak hareket ederken, proapoptotik üyeler destekleyici olarak hareket ederler. Bu etkiler sadece Bcl-2 miktarına göre Bcl-2 ve Bax arasındaki dengeye bağlıdır. Bir ölüm sinyalini takiben proapoptotik proteinler, aktivasyonları ve apoptoza yol açan mitokondriya translokasyonları ile sonuçlanan defosforilasyon ve bölünmeyi içeren post translasyonel modifikasyonlara uğrarlar. Yalnızca BH3 içeren tüm moleküller, intrinsik proapoptotik aktivite-lerini uygulamak için çok bölgeli BH3 proteinlerine (Bax, Bak) ihtiyaç duyar. DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu ve endoplazmik retikulum stresi gibi hücrel stres zamanlarında, apoptozun başlatıcıları olan sadece BH3 proteinleri aktive edilir.

Apoptotik uyarılara yanıt olarak, dış mitokondriyal membran geçirgen hale gelir, bu da sitokrom-c ve ikincil mitokondriden türetilmiş kaspazaktivatörünün salınmasına yol açar (düşük pI ile doğrudan IAP bağlayıcı protein olarak da adlandırılır). Sitozolde serbest bırakılan sitokrom-c, Apaf-1 ile etkileşime girerek kaspaz-9 proenzimlerinin aktivasyonuna yol açar. Aktif kaspaz-9 daha sonra kaspaz kaskadının geri kalanını aktive eden ve apoptoza yol açan kaspaz-3'ü aktive eder. Aktive edilmiş kaspazlar nükleer lamininın parçalanmasına ve çekirdeğin kaspaz-3 yoluyla parçalanmasına yol açar (Irene et al. 2005).

1.6.2. Apoptoz ve Kanser Tedavisi

Kanseri tedavi etmenin bir yolu, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini kontrol altına almak veya muhtemelen sonlandırmaktır. Hücrenin ölüm için kendi mekanizmasını kullanmak oldukça etkili bir yöntemdir. Ek olarak, apoptozu hedeflemek en başarılı cerrahi olmayan tedavidir. Apoptozu hedeflemek de tüm kanser türleri için etkilidir, çünkü apoptoz sakınma bir kanser belirtisidir ve kanserin nedeni veya tipine özgü değildir.

Hem intrinsik (iç) hem de ekstrinsik (dış) yollarda çeşitli aşamaları hedefleyen birçok anti-kanser ilacı vardır. Terapötik hedefleme için iki yaygın strateji, proapoptotik moleküllerin uyarılması ve antiapoptotik moleküllerin inhibisyonudur. Araştırılan bazı hedefler arasında ölüm reseptörleri için ligandlar, BCL-2 inhibitörleri, XIAP inhibisyonu ve apoptotik sinyaller olarak işlev gören alkilfosfolipid analogları (APL) bulunmaktadır. Yollardaki herhangi bir aşama tedavi için hedeflenebilir, ancak hangi hedefin en etkili olduğuna dair bir gösterge yoktur. Daha fazla apoptozu indükleyen antikanser ilaçları tasarlandıkça, en etkili hedefler belirlenecektir (Pfeffer et al. 2018).

1.6.3. Otofaji

Geçtiğimiz on yıl, otofaji adı verilen temel bir hücre biyolojisi yolunda (Yunanca kendi kendini (oto) yeme (faji)) bir araştırma patlamasına tanık oldu. Otofaji için gerekli olan evrimsel olarak korunan genlerin (başlangıçta mayada tanımlanmıştır) keşfi, bilim adamlarının otofajinin çok çeşitli homeostatik, gelişimsel ve diğer fizyolojik fonksiyonlarını ortaya çıkarmasını sağlamıştır. Ayrıca, artan kanıtlar otofajinin düzensizliğinin geniş bir memeli hastalığı yelpazesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bilim adamları arasında otofajiyi doğru bir şekilde tespit edebilmek ve işlevini çeşitli biyolojik süreçlerde, özellikle memeli sistemlerinde incelemek için hızla artan bir ihtiyaç vardır (Mizushima et al. 2010).

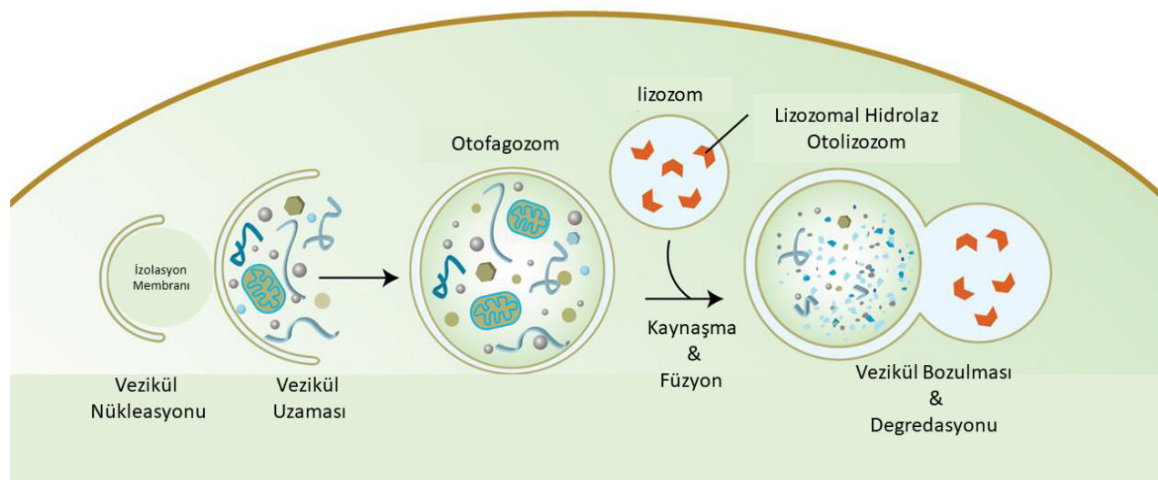
Otofaji, enerji kaynağı olarak çalışan önemli besin maddelerinin yokluğunda vücutta hücrel homeostazı korumak için gerekli bir mekanizmadır. Bu süreç, protein agregatları ve hasarlı veya yaşlı organeller gibi sitoplazmik bileşenlerin, otofagosomlar adı verilen çift membranlı veziküller yoluyla tutulmasıyla başlar. Sonra, alıkonan maddeler, elde edilen makromoleküllerin imhası ve sonunda geri dönüştürülmesi için lizozomlar ya da vakuoller gibi yıkım organellerine aktarılmaktadır (Ramírez et al. 2016).

Hücrel homeostazda otofajinin kritik bir fonksiyonu protein ve organel kalite kontrolüdür (Mizushima et al. 2008), ancak yine de hücrede yararlı bir rolünün geri dönüşüm mekanizması olarak tanınması yıllar almıştır. 1990'lara kadar otofaji yolu hakkında çok az şey biliniyordu ve araştırmalar sadece fenotipik çalışmalarla sınırlıydı. Otofajide yer alan proteinleri anlamının ve 2016'da Yoshinori Ohsumi'ye Nobel ödülünü kazanmanın yolunu açan Ohsumi Laboratuvarı'nın çalışmasıydı.

Maya hücrelerinde basit ama zarif bir model sistemi kurması, otofaji ile ilgili birçok geni (ATG) tanımlamasını sağladı (Mizushima 2018). Otofajinin, bir hücrenin proteomunun yarısını etkileyebilen metabolizma ve protein yıkımı üzerinde önemli bir etkisi vardır.

Otofajide, mitokondri gibi organeller de dahil olmak üzere sitoplazmik bileşenler ilk önce bir membran kesesi ile sarılır. Her ne kadar endoplazmik retikulum, golgi veya fagofor adı verilen daha az karakteristik bir membran bölmesi otofagosom membranlarının kökenleri olarak önerilmiş olsa da, son çalışmalar, otofajik veziküllerin küçük zar yapılarının çekirdeklenmesi, montajı ve uzaması yoluyla *de novo* oluşturulabileceğini göstermektedir. Bu zarların kapatılması, otofagosomlar olarak adlandırılan çift zar yapılarının oluşumuyla sonuçlanır. Birkaç adımdan sonra, otofagosomların dış zarlarının ve geç endozomların veya lizozomların füzyonu ile otolizozomlar üretilir.

Lizozomal hidrolazlar, otofagosomun sitoplazma kaynaklı içeriklerini iç zarıyla birlikte bozar (Gözüaçık ve Kimchi 2004).



Şekil 1.9. Otofaji aşamalarının şematik gösterimi (Mendelez ve Levine, 2009)

1.6.3.1. Otofajinin Moleküler Mekanizması

Otofaji, fagofos toplanma bölgelerinde otofagosomların oluşumu ile başlatılır.

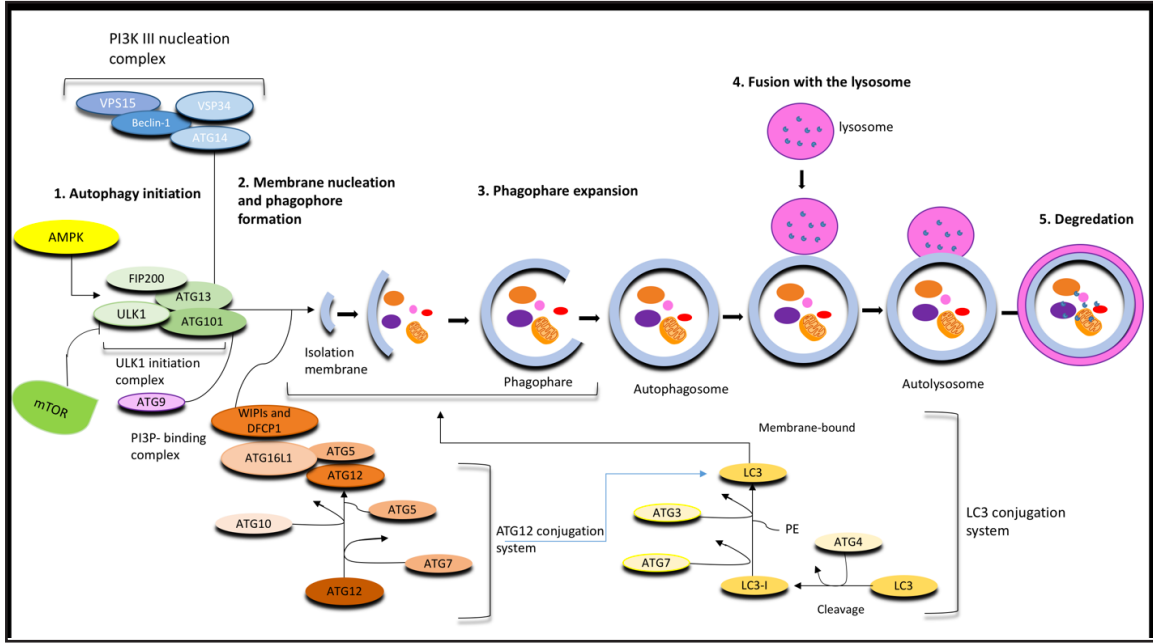
Otofaji genellikle açlığa yanıt olarak aktive edilir. Buna ek olarak, rapamisin veya PP242 gibi bazı kimyasallar otofajinin aktivasyonuna neden olabilir.

Otofaji ayrıca hipoksik durum, oksidatif stres veya ER stresi nedeniyle de tetiklenebilir (Suzuki et al. 2001). İlk olarak mayada tanımlanan 30'dan fazla 'Otofajiye bağlı'(ATG) protein, çift membran veziküllerinin oluşumu, lizozom füzyonu ve bozunması gibi otofajik sürecin düzenlenmesinde yer alır (Santana-Codina et al.2017). ATG gen ürünlerinden oluşan bir dizi protein kompleksi, otofagosomların oluşumunu koordine eder. Atg1 / ULK1 kompleksi (mayada Atg1 ve memelilerde ULK1) otofagosom oluşumunun önemli bir pozitif düzenleyicisidir (Wong et al. 2013).

Otofajinin ilk adımı, ULK1/2, RB1 ile indüklenebilir sarmal bobin proteini1, otofajiyle ilişkili protein 13 ve Otofajiyle ilişkili protein 101'den oluşan Unc-51 benzeri kinaz (ULK) kompleksi tarafından başlatılır. ULK kompleksi, otofagosom adı verilen çift membranlı vezikülün başlaması için gereklidir. Vesiküler sıralama proteini 34 kompleksi / fosfatidilinositol-3-fosfat kinaz III, Beclin1, VPS15 ve ATG14'ten oluşur ve uygun fagofor oluşumu için gereklidir. ATG5-ATG12 ve mikrotübül ile ilişkili protein 1 hafif zincir 3 (LC3) sistemi iki ubikitin benzeri konjügasyon sistemidir ve otofagosomun uzamasını ve kapanmasını düzenler.

İlk olarak, ATG7 (bir E1 ubikitin aktive edici enzim gibi) ve ATG10 (bir E2 ubikitin-konjüğe enzim) ATG12'yi ATG5'e konjüğe eder. Bu ATG12 – ATG5 konjüğü, multimerik ATG12 – ATG5 – ATG16L kompleksini oluşturmak için ATG16L'ye bağlanır (Itakura ve Geng 2008).

İkinci ubikitin benzeri sistemde, LC3 (Mikrotübül ile ilişkili protein 1 hafif zincir 3) lipit fosfatidil etanolamin (PE) ile konjüğe olur ve bu işlem, otofagosom ile ilişkili olan sitosolik çözünür LC3-I'in LC3-II'ye lipitlenmesine yol açar. Son aşamada, otofagosomlar, parçalayıcı enzimler içeren lizozomlarla kaynaşır ve otofagolizozom oluşumuna yol açar (Suzuki et al. 2007).



Şekil 1.10. Otofajinin moleküler mekanizmaları (Hansen et al. 2018)

1.6.3.2. Otofajinin Moleküler Regülasyonu

Otofaji, bozulmuş organeller ve gereksiz proteinler veya lipitler gibi hücrel bileşenlerin parçalanması için gerekli olan katabolik bir süreçtir ve hücrel homeostazda rol oynar (Dikic et al. 2018), (Saha et al. 2018).

Otofajinin moleküler regülasyonu iki farklı şekilde gerçekleşir: a) enerjinin açlığına veya tükenmesine yanıt olarak mTORC1'in (memeli Rapamisin Hedefi) aktivasyonu yoluyla ve b) AMP ile aktifleştirilen protein kinaz tarafından düzenlenen enerji tespiti yoluyla (AMPK). Otofaji ayrıca Beclin 1 (homolog Atg6) proteini, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) sınıf III (PI3KC3 / Vps34), p150 ve Atg14L veya UV radyasyon direnci ile ilişkili gen proteininden oluşan Beclin 1 protein kompleksi tarafından da düzenlenebilir. Otofaji, mTOR yolunun aktivasyonunu kontrol eden fosfatidilinositol-3-kinaz yolunu (PI3K / AKT) düzenleyen büyüme faktörlerinin uyaralarıyla aşağı regülasyona yanıt verir; ikincisi, amino asitler ve büyüme faktörleri de dahil olmak üzere besinlerle ilişkili sinyaller tarafından aktive edilen bir çoklu protein ve makromoleküler (mTORC1) kompleksinde bulunur ve kompleks Beclin 1 ile etkileşerek otofajiyi aşağı regüle eder. Otofaji ayrıca AMP (AMPK) tarafından aktive edilen protein kinaz aktivitesinin artması yoluyla hücrel enerji tükenmesine bağlı kontrole cevap verir. Beclin 1 kompleksi, otofagosom oluşumu ile ilişkili faktörleri toplayan fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) üretir.

Otofajinin inhibisyonu için serin/treonin kinaz mTOR proteini insan hücrelerinde en önemlisidir; inhibisyon, otofaji sinyal yolunu başlatmak için gerekli olan proteinlerin hiper fosforilasyonunun sürdürülmesi yoluyla meydana gelir. mTORC1, otofajiyi bastırırken besinlerin, büyüme faktörlerinin ve hormonların mevcudiyetine yanıt olarak protein sentezini, hücre bölünmesini ve metabolizmayı destekler. mTOR C-terminalinin farklı bölgelerinde edinilen mutasyonlar, hiperaktivasyonunu artırır ve tümör hücrelerinin kontrolsüz büyümesine yarar (Ramírez et al. 2016). Otofaji üç ana türe ayrılır: Makro-, Mikro- ve Şaperon-aracılı- otofaji. Hem Mikro hem de Şaperon aracılı otofaji, yükün lizozom içine doğrudan translokasyonunu kullanır. Birincisi, sitoplazmanın doğrudan yutulmasıyla, ikincisi hedef proteinleri tanıyan şaperonları kullanır. Mikrootofaji, sitoplazmik içeriklerin direk olarak lizozom tarafından pinositozudur. Sitoplazmik içerik lizozom membranının içe çökmesi ile lizozom içinde hapsedilir (Mizushima et al. 2008). Şaperon aracılı otofajide, KFERQ ile ilişkili bir pentapeptid motifi içeren proteinler lizozomal membran boyunca taşınır. Makro otofajinin en belirgin morfolojik tezahürü, oluşumu mayadan insanlara yüksek oranda korunmuş olan çift (veya çoklu) -membran bağlı vakuollerdir. Makrootofaji yıkıma uğrıtılacak hedef molekülleri çevrelerindeki diğer sitoplazmik içerikten ayıran çift katlı membran sistemlerinin (otofagozomların) oluşumuyla karakterizedir.

Yıkıma uğrıtılacak protein, karbohidrat, lipid, RNA, mitokondriyon ve peroksizom gibi organeller otofagozomların içine hapsedilip lizozomlara taşınarak, lizozomal enzimlerle parçalanırlar. Otofagozomlar ER'daki içerik olarak Pİ3-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 (Burscha et al. 2008).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, canlı hücrelerin ait oldukları organizma dışında laboratuvar ortamında (in vitro) kültüre edilmesidir. Hücre kültürü çalışmalarında amaca yönelik olarak primer hücre kültürü ya da hücre hatları (cell line) tercih edilebilmektedir. Primer hücre kültürü canlıdan alınarak direkt kültür edilen ve belirli bir süre yaşayabilme kabiliyetine sahip hücrelerin oluşturduğu hücrelerdir. Hücre hattı ise hücrelerin karakter olarak sahip olduğu (kanser hücreleri gibi) veya hücrelerin transformasyona uğratılarak sınırsız çoğalma kapasitesine sahip olmasıyla oluşan hücrelerdir. İnsan meme adenokarsinom hücre hattı MCF-7 Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hocalarından Dr. Öğr. Üyesi Can Ali AĞCA tarafından temin edilmiştir. Hücreler, ilgili flasklar içerisinde %10 fetal sıgır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 64 µg/mL penisilin ve 100 µg/ML streptomisin ile desteklenen RPMI 1640 besiyerinde kültüre edilmiştir.

2.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültür Kaplarına Hücrelerin Ekilmesi

Daha önceden dondurulmuş halde sıvı azot tankında -196°C'de saklanmış olan kriyotüplerdeki MCF-7 hücre örnekleri 37°C'lik su banyosunda hızla çözüldü. (Hücrelerin bulunduğu tüpün tamamen suya batırılmamasına dikkat ettik). Hücreler çözüldükten sonra tüp kapağı %70'lik etil alkol ile silindi. 15 mL'lik falkon tüpe 5 mL RPMI (%10 FBS, %1 antibiyotik(S/P), RPMI) konarak hücrelerin çok hassas ve yavaş bir şekilde aktarımı gerçekleştirildi. Ortamın (Frezeen medium) uzaklaştırılması için 3000rpm'de 4 dk santrifüj işlemine tabi tutularak işlemin sonlanması ile beraber süpernatant kısım aspire edildi. Daha sonra 10-15 mL RPMI ile homojenizasyonu sağlanan hücreler 75 cm'lik flaska aktararak ataç olması, yapılması planlanan deney çalışmasına göre ekim gerçekleştirmek ve tedavi uygulayabilmek için yeterli konfluense ulaşması amacıyla %5'lik CO₂ inkübatöründe 1-2 gün inkübe edildi. Yeterli konfluense ulaşılmış kültüre edilmiş olan hücrelerden besi ortamı aspire edilerek 3 mL PBS ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı.

3 ml tripsin EDTA eklemesinin ardından 4 dk%5'lik CO₂ inkübatöründe inkübasyonu ile hücreler kültür kabından kaldırıldı. 5 mL RPMI ile flask yıkanarak (hücrelerin tek tarafta toplanması amacıyla eğimli bir şekilde tutularak yıkama yapıldı) hücreler falkon tüp içersine alındı. 4 dk 3000 rpm'desantrifüj işleminin uygulanmasının ardından süpernatant kısım aspire edildi ve pelet kısmının 5 ml RPMI ile homojenizasyonu sağlandı.

2.3. Hücre Sayımı

Hücre sayımı Thoma lamı adı verilen özel sayım lamlarında yapıldı. Çalışmaya göre ekim yapabilmek için öncesinde hücre sayısının hesaplanması amacıyla, 20 µL hücre solüsyonu + 20 µL tripan blue ile homejenize edildi ve thoma lamına lamel yerleştirilerek üzerinde bulunan iki sayım bölmesine lamelin kenarından hassasiyetle karışımdan aktarıldı. İverted mikroskopta 10X'de en büyük kareye odaklandırılarak iki bölümünde sayımı gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa ekilecek toplam hücre sayısının hücre sayısı (iki bölümdeki toplam hücre sayısının ortalaması) x 10000 x 2 x dilüsyon oranı (5 mL) formülüyle hesaplanmasının ardından kuyucuk başına deneyler için toplam volum WST-1 100µL, protein (western blot) izolasyonu 3 mL ve ROS 1 mL olacak şekilde RPMI ile tamamlandı. Ekimden sonra hücrelerin gece boyunca tutunması için CO₂inkübatöründe bekletildi. Daha sonra literatür araştırmaları ile belirlenen dozlarda tedavi ajanları ile hücreler ayrı ayrı muamele edilerek elde edilen sonuçlar neticesinde en uygun doz aralığı belirlendi. Belirlenen dozlarda 5-FU (25, 50, 100, 250, 500 µM), C₆₀ (100, 250, 500, 1000 nm) ve 5-FU+C₆₀ (25, 50, 100, 250, 500µM + 500, 1000 nm) kombinasyonları ile tedavi edildi. 24 saatlik tedavi süresinin dolması ile hücreler kazıyıcı yada tripsin-EDTA yardımı ile toplandı veya kültür kabında deneyler devam ettirildi. Bu işlemlerin tamamı WST-1 (96 kuyucuklu kültür kabına her kuyucuğa 3x10³ hücre/ 3 tekrarlı), ROS (12 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucuğa 25x10³) ve Western Blot (6cm²'lik 6 petri kabında her kuyucuğa 25x10⁴hücre) deneylerinin ön aşaması olarak aynı biçimde gerçekleştirildi.

2.4. Hücre Canlılık Testi

Deneyde tedaviden sonra hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı nicel olarak saptanması WST-1 kit ile belirlenmektedir. Kararlı (dayanıklı)tetrazolium tuzu olan WST-1 hücrelerde gerçekleşen kompleks hücresel mekanizma ile çözülebilir formazana dönüşmektedir. Bu dönüşüm canlı hücrelerde NAD(P)H'nın glikolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle oluşan formazan miktarı direkt olarak kültürde metabolik olarak aktif hücreleri (canlı hücreleri) göstermektedir.

Proliferasiyona uğrayan hücrelerin dehidrogenaz enzim aktivitesi sonucu mor renkli formazana dönüşümü sonucu ELİSA plate reader ile 495 nm’de ölçümüne dayanmaktadır. Tedarikçi firmanın geliştirmiş olduğu protokol takip edilmiştir (BOSTER Antibody and ELİSA Experts, BOSTER BIOLOGICAL TECHNOLOGY Co.,Ltd., 3942 B ValleyAve, Pleasanton, CA, 94566, WST-1 Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit, Catalog no.: AR1159).

Yapılan deneyde;

- 1- 96’lık petri planelere 3×10^3 hücre ekimi yapılmış ve hücrelerin flaskın yüzeyine yapışması için gece boyunca $37\text{ }^\circ\text{C}$ ’lik CO_2 inkübatöründe beklemeye alınmıştır.
- 2- Bir sonraki gün belirtilen konsantrasyonlarda 5-FU ($25\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $250\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$), C_{60} (100nm , 250nm , 500nm , 1000nm) ve 5-FU+ C_{60} kombinasyonları ($25\text{-}500\mu\text{M}$, $500\text{-}1000\text{nm}$) ile tedavi edildi.
- 3- 24 saatlik tedavinin ardından kuyucuklardan eski besiyeri aspire edilir.
- 4- Karanlık ortamda tedavi edilen kuyucuklardan her birine $10\mu\text{l}$ WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) kiti ve $90\mu\text{l}$ RPMI eklemesi ile hazırlanan solüsyondan $100\mu\text{l}$ eklenerek alüminyum folyo ile kaplandı.
- 5- 2-4 saat boyunca $37\text{ }^\circ\text{C}$ ’lik %5’lik CO_2 inkübatöründe inkübe edildi.
- 6- Belirtilen sürenin dolmasının ardından 495 nm dalga boyunda 96’lık petri plate mikro ELISA okuyucuda (Versamax microplate reader, Molecular Devices) okundu. Elde edilen verilerden sitotoksosite grafikleri elde edildi. Şekil 2.1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar



Şekil 2.1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan cihazlar

- A) Class IIA Laminar Kabin
- B) Santrifüj
- C) Karbondioksitli inkubator
- D) İvert mikroskop
- E) UV-spektrofotometre
- F) Su banyosu

2.5. ROS (Reaktif Oksijen Türleri)

Bu deney, hücre kültüründe oksidatif stres parametreleri olarak bilinen hidrojen peroksit, nitrik oksit, peroksil radikali ve peroksinitrit anyonlarını da içeren toplam reaktif oksijen ve nitrojen türlerini in vitro olarak ölçmemize olanak sağlayacaktır. Hücre kültürü örneklerinin hazırlanması ve hücre kültüründe oksidatif strese bağlı ROS ve RNS oluşumu in vitro DCFDA deney kiti kullanılarak ve kit protokolüne göre florometrik yöntemle belirlendi. Bu deney için 12 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucuğa 25×10^3 hücre ekiminin gerçekleştirilip CO_2 inkübatöründe gece boyunca tutunması için bekletildi. Bir gecenin ardından kültür kabına yapışmış olan hücrelere sırasıyla; kontrol, 5-FU (25, 50, 100, 250, 500, 1000 μM), C_{60} (100, 250, 500, 1000 nm) ve 5-FU+ C_{60} (25, 50, 100, 250, 500 μM +1000 nm) belirlenen konsantrasyonlar ortamdaki RPMI'ın aspire edilmesinin ardından uygulandı ve toplam hacim 1 mL olacak şekilde ayarlandı. Tedaviden 24 saat sonrasında ortamdaki RPMI aspire edilerek her bir kuyucuk 300 μL PBS ile yıkanarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 300 μL tripsin-EDTA koyularak 4 dk boyunca CO_2 inkübatöründe bekletildi. Bekleme esnasında 2 mL'lik ependorf tüplerin üzerine örnek konsantrasyonları yazıldı. Dikkatli bir şekilde örnekler karıştırılmadan her bir kuyucuk 1 mL RPMI ile hafif eğimli biçimde tutulan kültür kabından yıkanarak ependorflara aktarımı sağlandı. 4 dk 3000 rpm'de santrifüj işlemi yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet kısmında bulunan hücrelerin üzerine 500 μL PBS eklenerek pipetaj yapıldı. Ardından 4 dk 3000rpm'de santrifüj yapılarak ortam tekrar aspire edildi. PBS ile 25 μM 'a sahip 10 mL glukoz çözeltisi hassas terazide 0,0360g tartılarak hazırlandı.

Hazırlanan çözeltiliye karanlık ortamda 3 μL DCFDA aktarılarak karıştırıldı. Her bir örnek içerisine yine karanlık ortamda 500 μL glukoz + DCFDA karışımından eklenerek pipetleme yapıldı ve 45 dk boyunca CO_2 inkübatörüne bırakıldı. Sürenin tamamlanması ile ROS deneyi için özel olarak tasarlanmış beyaz 96 kuyucuklu kültür kabına karanlık ortamda ilk sıra kör olarak kabul edilip karışımdan ve 2. sıradan itibaren örneklerden sırasıyla 3 tekrarlı olacak şekilde her kuyucuğa 100 μL bırakıldı. Ardından Elisa-reader cihazında kuyucuklar ve 485/535 nm ayarlaması yapılarak sonuç alındı. Daha sonra veriler doğrultusunda bilgisayar ortamında grafik çizimi gerçekleştirildi.

2.6. Western Blot

Western Blot Yönteminin Aşamaları :

- Protein izolasyonu (örneklerin hazırlanması)

- SDS-PAGE jel elektroforezi
- Proteinlerin jelden membrana transferi
- Bovine Serum Albumin (BSA) ile blokaj
- Membranın primer antikor ile inkübasyonu
- Membranın sekonder antikor ile inkübasyonu
- Görüntüleme

2.6.1. Protein İzolasyonu

6 cm²'lik hücre kültür kaplarından kazıyıcı ile toplanmış hücreler santrifüj işlemine tabi tutularak süpernatant kısım aspire edildi. 1X'lik lizis tampondan 15ml'lik falkon tüpe 5 mL aktarıldı. Tampon içerisine 5 µL PMSF, DTT ve deamino benzamidine, löpeptin proteinaz inhibitörleri eklendi ve homojenizasyonu sağlandı. Her bir örnek üzerine hücre sayısı ile doğru orantılı olacak şekilde 250 µL lizis tampon eklenerek karıştırıldı ve buz üzerinde 60 dk'lık inkübasyonun ardından santrifüj işlemine tabi tutuldu. Hassas bir şekilde pelet kısma dokunmadan süpernatant yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.

1 (Dye reagent concantrate)/4(dH₂O) oranında Bradford yöntemi için boya hazırlanarak yeni ependorflara her bir örnekten 5 µL + 1mL boya, kör için 1 mL boya + 5 µL lizis buffer eklendi ve spektrofotometre cihazında 595 nm'de absorbans değerlerinin ölçümü yapıldı. (Biomethod-GBC (Bradford) Ölçüm sonrasında en düşük absorbansa sahip örnek için konsantrasyon 20 µL olarak belirlenerek buna bağlı diğer örneklerin oran orantıdan konsantrasyon hesaplamaları yapıldı. Kalan örneklerden her bir ependorfa 100 µL + 25 µL sample buffer eklenerek Dry Blok cihazında 5 dk 95 oC'de ısıya maruz bırakılarak üç boyutlu yapısı degrade edildi. Hazırlanan ve kalan protein örnekleri -20 °C'de muhafaza edildi.

2.6.2. SDS- PAGE Elektroforezi

Bradford yöntemi ile absorbansları ölçülerek konsantrasyon hesaplamaları yapılan örnekler belirlenen miktarlarda her bir kuyucuğa ayrı ayrı yüklenerek SDS-PAGE'de yürütüldü.

Bunun için, %12'lik oranda hazırlanmış ayırma jeli ve yığma jeli hazırlandı. Jeller hazırlanırken polimerleşmeyi sağlayan temel etken madde olan TEMED eklendi. Kalın cam arkada, ince cam önde olacak şekilde birleştirilerek kasete yerleştirilerek sıkıştırıldı.

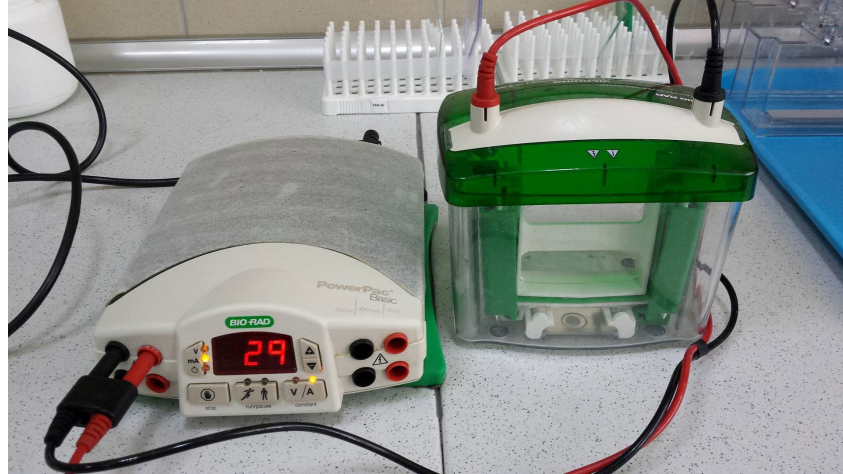
Hazırlanan jeller polimerleşmenin hemen gerçekleşmesi ihtimali ile iyice homojenizasyonu sağlandıktan sonra hızlı ve hassas bir şekilde iki cam arasına aktarıldı. Üzerine yığılma jel için bırakılmış olan boşluğa 1mL propanol koyularak jelin düzgün bir biçimde polimerleşmesi sağlandı. Kurutma kağıdı ile dikkatlice propanol uzaklaştırıldı. Jelde partikül kalması gibi bir durum göz önünde bulundurularak kurutma kağıdının jele temas etmemesine dikkat edildi. Ayırma jelinin polimerleşmesinin ardından 2 mL hazırlanmış olan yığılma jel koyularak iki cam arasına tarak yerleştirildi. Polimerleşmenin gerçekleşmesi ile beraber camlar kasetten alınarak taraklar çıkartıldı ve kuyucuklar iç tarafa dönük şekilde ve karşısına da kalın bir cam ile beraber yürütme tankına yerleştirildi. İki cam arasına yeni hazırlanmış 1X'lik Fresh Running Tampon aktarıldı. Tankta belirlenen hizaya göre önceden kullanılmış Fresh Running tampon konuldu. Kuyucuklara sırasıyla örnek tampon (5µL), marker (3µL) ve hesaplamalar doğrultusunda örnek yüklemeleri gerçekleştirildi. Örneklerin yüklenmesi ile kırmızı ve siyah bölmelere dikkat ederek tankın kapağı kapatıldı. Cihaz açıldıktan sonra 25 mA'de yaklaşık olarak 120 dk bant oluşumu gözlemlenene kadar yürütüldü.

Tablo 2.1. Ayırma jel bileşimi (%12 Ayırma Jel İçeriği)

Solüsyon	Konsantrasyon (5ml için)
ddH ₂ O	1,7 mL
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	2,0 mL
TrisHCl 1.5 M PH: 8.8	1,3 mL
SDS %10	50 µL
APS (Amonyum Persülfat) %10	50 µL
TEMED	2 µL

Tablo 2.2. Yığılma jel bileşimi (Yığılma Jeli İçeriği)

Solüsyon	Konsantrasyon (2 ml için)
ddH ₂ O	1,4 mL
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	330 µL
TrisHCl 1 M PH: 6.8	250 µL
SDS %10	20 µL
APS (Amonyum Persülfat) %10	20 µL
TEMED	2µL



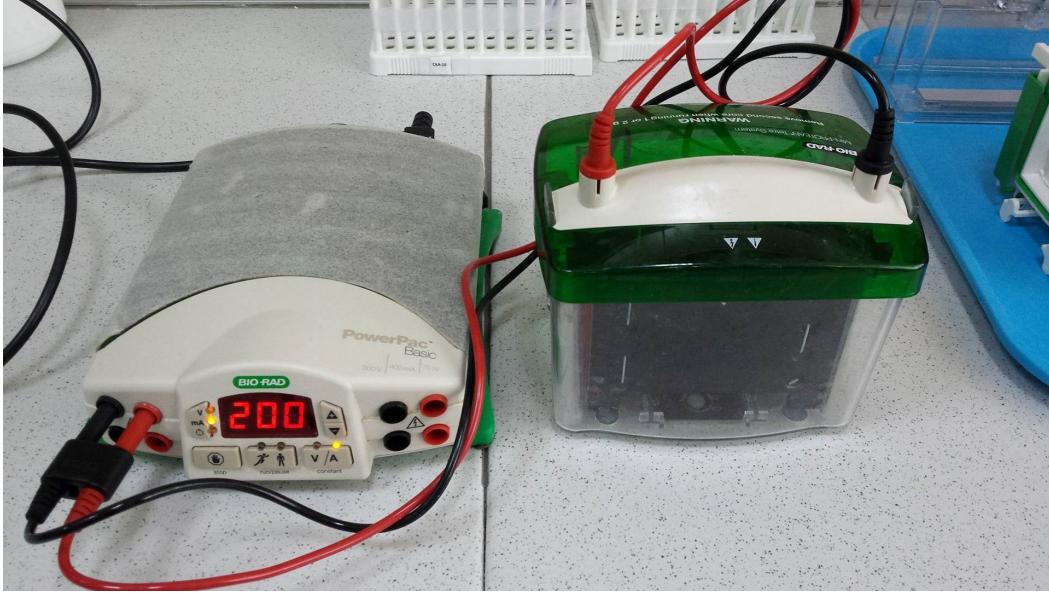
Şekil 2.2. SDS-PAGE deneyi sırasında kullanılan sistemin fotoğrafı, (Çalışan jel sistemi)

2.6.3. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra örneklerin jelden PVDF membrana transferi için düzenek hazırlandı. Sandviç kasetinin siyah kısmının üzerine transfer tampon ile ıslatılarak sırasıyla sünger iki adet ince bir adet kalın kurutma kağıdı ve üzerine yığma jel kısmı uzaklaştırılarak jel yerleştirildi. İlk olarak metanol daha sonra transfer tampon ile ıslatılan membranın pürüzsüz kısmı jele dönük olacak şekilde hassasiyetle yerleştirildi. Roler kullanılarak membranda oluşan hava boşlukları dikkatlice düzeltildi. Üzerine transfer tampon ile ıslatılan iki ince kurutma kağıdı ve sünger yerleştirilerek sandviç düzeneği kapatıldı. Tanka siyah ve kırmızı kısma dikkat edilerek sandviç yerleştirildi. Uzun süreli transfer esnasında oluşacak ısıyı engellemek amacıyla tankın içerisine buz aküsü yerleştirildi. Tankta belirtilen 4 gel yazan kısma kadar transfer tampon ile dolduruldu. 200 mA'de 120 dakikalık transfer için cihaz çalıştırıldı.

Tablo 2.3. Transfer Tampon İçeriği (1X Fresh Transfer Buffer İçeriği)

28,8 g	Glisin
6,04 g	Tris Base
200 mL	Methanol
1,6 L	AutoclavedH ₂ O



Şekil 2.3. Tipik bir Western Blot Deneyi sırasında proteinlerin jelden membrana transferi

2.6.4. Bovine Serum Albumin (BSA) ile Blokaj

Membrana transferinin gerçekleşmesinin ardından membranda ki gözeneklerin kapanması için BSA ile blokaj yapıldı ve nonspesifik bağlanmalar ortadan kaldırıldı. %5'lik BSA TBS-T ile hazırlandı. 1 g BSA alınıp TBS-T ile 20 mL tamamlandı. Çalkalayıcı da 60 dk 25°C'de inkübasyona bırakılır.

2.6.5. Membranın Primer Antikor ile inkübasyonu

%5'lik 5 mL BSA solüsyonu 50 mL'lik Falcon tüp içerisinde hazırlandı. Hazırlanan solüsyon içerisine dilüsyon oranına göre primer antikor eklendi. (Örn: 10 µL) Membran falkonun içerisine kondu. +4 °C'de çalkalayıcı üzerinde gece boyu inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda 5 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. (İlk yıkama 10 dk olabilir).

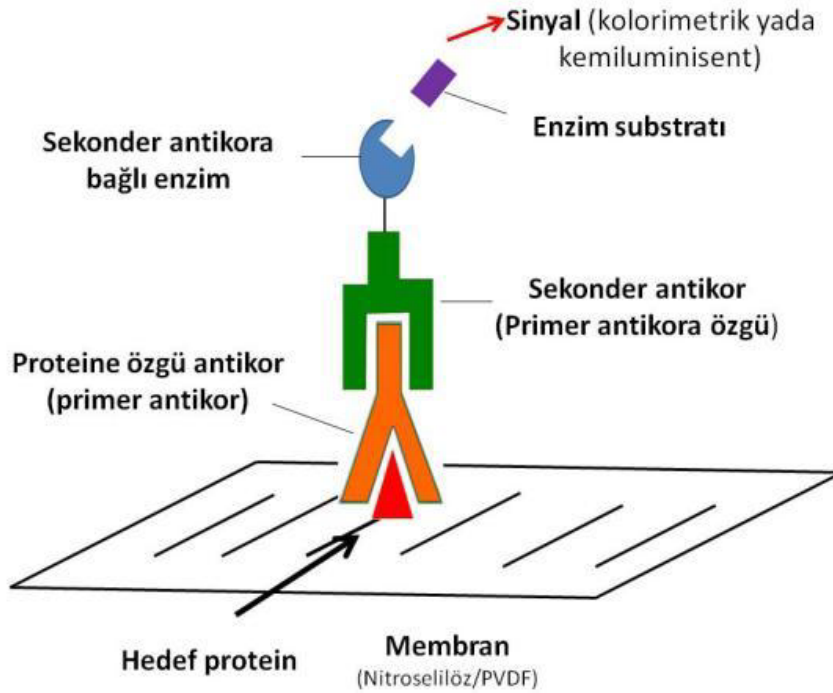
2.6.6. Membranın Sekonder Antikor ile inkübasyonu

Membran sekonder antikorla inkübe edildi. Yıkama sonunda sekonder antikor eklendi. Primer antikor Mouse ise sekonder antikorda Mouse olmalıdır. %5 lik 20 mL BSA solüsyonu 50 mL Falcon tüp içerisinde hazırlandı.

Hazırlanan solüsyon içerisine $1\mu\text{L}$ sekonder antikor eklendi. Solüsyon membran üzerine döküldü. Shaker ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 5 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı (İlk yıkama 10 dk olabilir).

2.6.7. Görüntüleme

Membranlar X-Ray cihazı ile görüntülenmek üzere hazırlandı. Görüntü almak için ECL solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyon A ve B olarak iki tiptir. A ve B solüsyonundan 4'er mL alındı ve membran üzerine eklendi. Ardından membran X-Ray kasetlerine alınarak X-Ray cihazı ile sonuç alındı. Ve protein ekspresyon seviyeleri gözlemlendi.



Şekil 2.4. Western Blotlama yönteminin şematik gösterimi (Web, 2020)

2.6.8. İstatistiksel Analiz

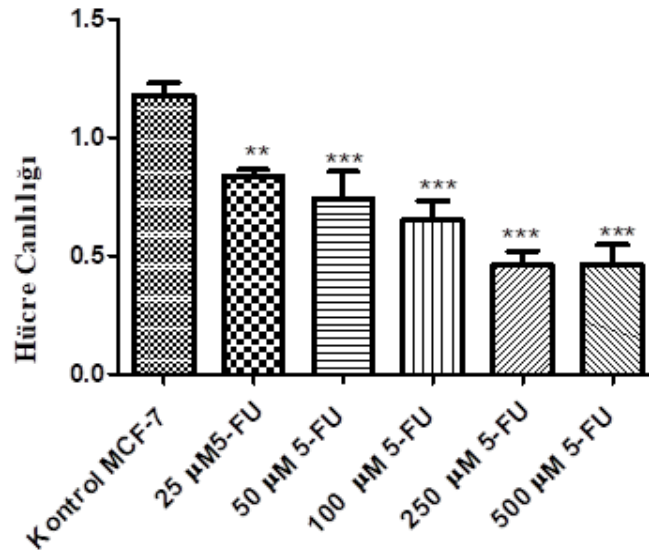
Tüm veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin istatistiksel değerlendirilmeleri (tek yönlü=one-way) Anova Tukey ile analiz edildi. Sonuçlar $n = 3$ için ortalama \pm SEM'dir. Önemli farklılıklar (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$) ile gösterilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. 5-Fluorourasil'in MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Üretici firmanın geliştirdiği protokol doğrultusunda bölüm 2.4'de anlatıldığı gibi 5-FU'nun MCF-7 hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkisi deneyleri yapılarak sonuçlar (tekyönlü=one-way) Anova Tukey ile analiz edildi.

Elde ettiğimiz bulgularda, 5-FU'nun malign MCF-7 hücrelerinde doza bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azaltan anlamlı bir rolünün olduğu belirlendi [Şekil 3.1].

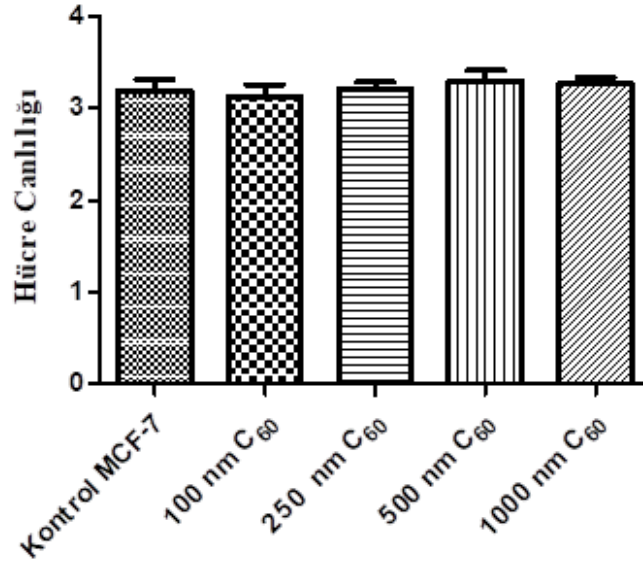


Şekil 3.1. MCF-7 hücre hattında 5-Fluorourasil'in hücre canlılığı üzerine etkisi

3.2. C₆₀ Fullerenin MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Bölüm 2.4. anlatıldığı gibi C₆₀'ın MCF-7 hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkisi deneyleri yapılarak sonuçlar (tekyönlü=one-way) Anova Tukey ile analiz edildi.

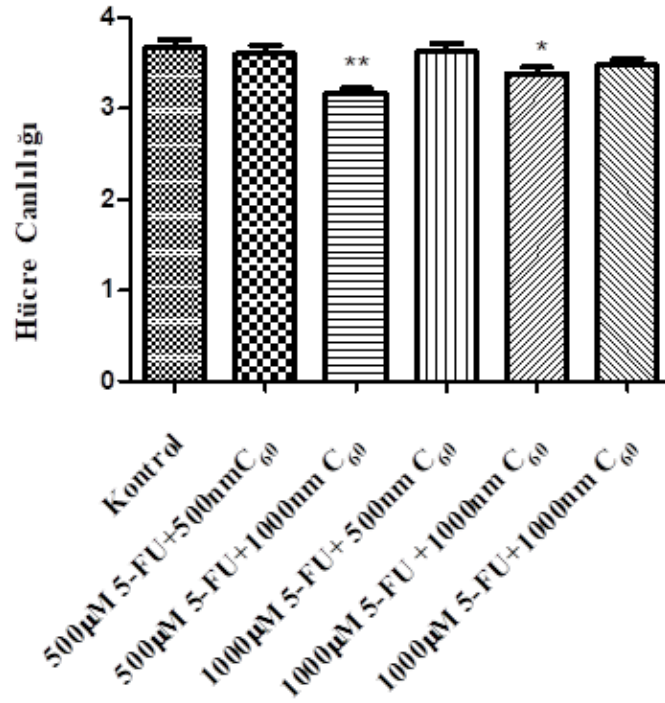
Elde ettiğimiz bulgular, yapılan çalışmanın kontrol grubuyla kıyaslandığında nanoparçacık C₆₀ fullerenin, malign MCF-7 hücrelerinde önemli bir değişim oluşturmadığı belirlendi. [Şekil 3.2].



Şekil 3.2. MCF-7 hücre hattında C₆₀ Fullerenin hücre canlılığı üzerine etkisi

3.3. 5-FU + C₆₀ Fullerenin MCF-7 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

5-Fluorourasil (5-FU) + C₆₀ fulleren kombinasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisini incelemek için, üretici firmanın geliştirdiği protokol kullanılarak tedavi edilen MCF-7 hücre hattının WST-1 sonuçları elde edilmiştir. Sonuçlar (tekyönlü=one-way) Anova Tukey ile analiz edildi. Elde ettiğimiz bulgular, 5-FU + C₆₀ etken maddelerinin kombinasyonlarının kontrol grubuyla kıyaslandığında 5-FU + C₆₀ dozlarının uygulanan hücre grupları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farka neden olmadıkları saptandı[Şekil 3.3].

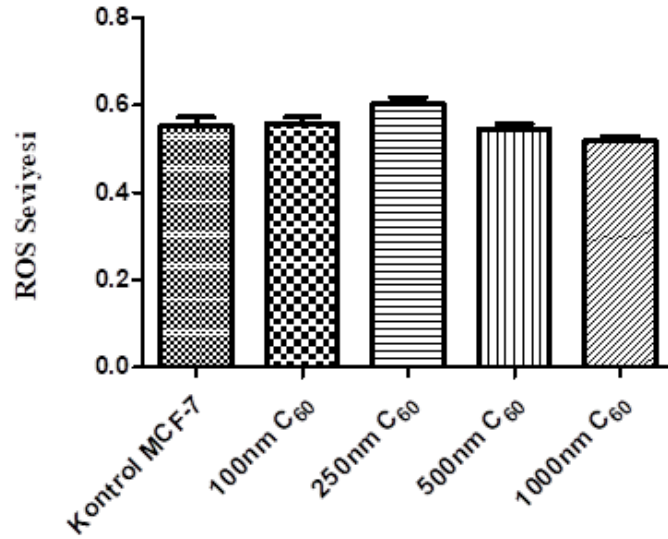


Şekil 3.3. MCF-7 hücre hattında 5-FU+C₆₀ fulleren kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi

3.4. 5-FU' nun MCF-7 Hücre Hattında ROS Düzeyinin Ölçülmesi

Hücrelerdeki ROS düzeylerini belirlemek amacıyla DCFD-A kiti (ABCAM, DCFD-A Cellular ROS Detection Assay Kit, ab113851) kullanılarak değerlendirildi.

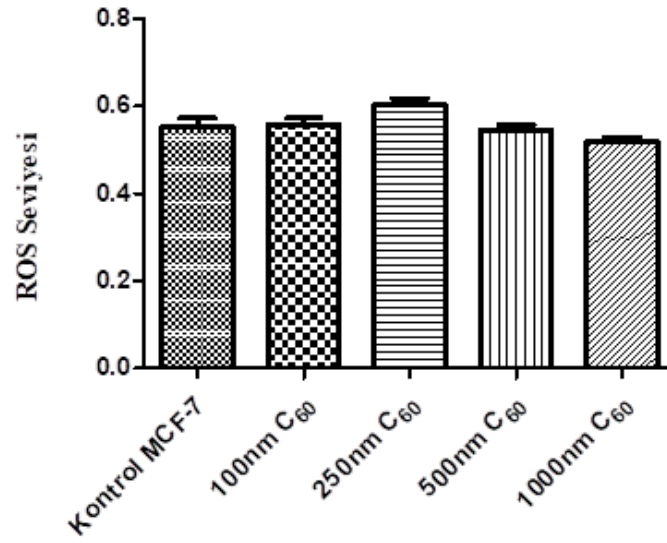
Deneyin temel prensibi, hücre içi ROS'un temel kaynağı olan kompleks I (NADH dehidrogenase) ve kompleks III (cytochrome c reductase) mitokondriyal elektron taşıma zincirinin bir üyesidir. Bu iki kompleks, elektron taşımanın mitokondri membran potansiyeli tarafından yavaşlatılması sonucu ROS üretmektedir. Hücre içinde oluşan hidroksil ve diğer ROS aktivitesi, floresan boya olan 2,7 dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) ile belirlenip ELISA plate reader ile ölçülmesine (Ex485 nm/Em535 nm) dayanmaktadır. Sonuçlar (tekyönlü=one-way) AnovaTukeyile analiz edildi [Şekil 3.4.].



Şekil 3.4. MCF-7 hücre hattında 5-Fluorourasil (5-FU)'nun hücre içi ROS düzeyine olan etkisi

5-Fluorourasil tedaviden sonra malign kanser MCF-7 hücre hattında oksidatif stres indükleyicisi olarak rol oynar. Şekilde gösterildiği gibi belirtilen dozlarda kullanılan 5-FU hücre içi ROS'u indükleyerek MCF-7 hücrelerinde ROS'u arttırdığı belirlendi.

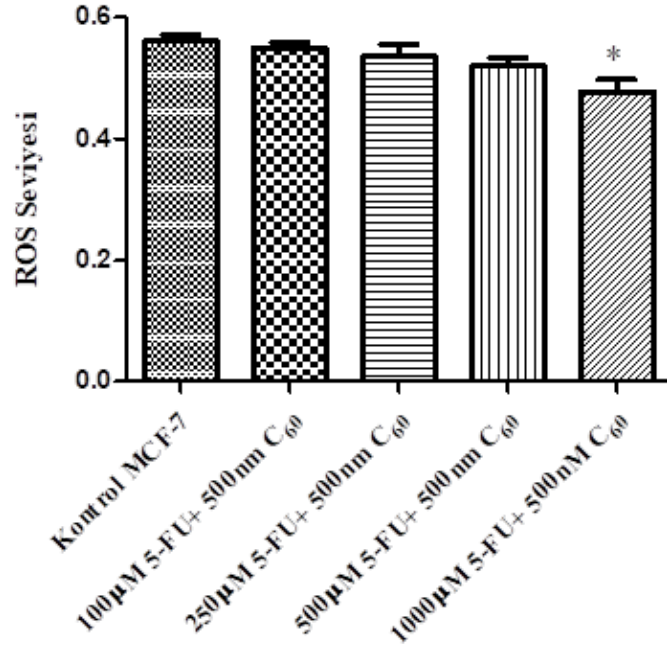
3.5. C₆₀ Fullerenin MCF-7 Hücre Hattında ROS Düzeyinin Ölçülmesi



Şekil 3.5. MCF-7 hücre hattında C₆₀ Fullerenin hücre içi ROS düzeyine olan etkisi

Elde ettiğimiz bulgular, kontrol grubuyla kıyaslandığında, nanopartikül C₆₀ fullerenin tüm dozlarında ROS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

3.6. 5-FU + C₆₀ Fullrenin MCF-7 Hücre Hattında ROS Düzeyinin Ölçülmesi



Şekil 3.6. MCF-7 hücre hattında 5-FU +C₆₀ kombinasyonunun hücre içi ROSdüzeyineolan etkisi

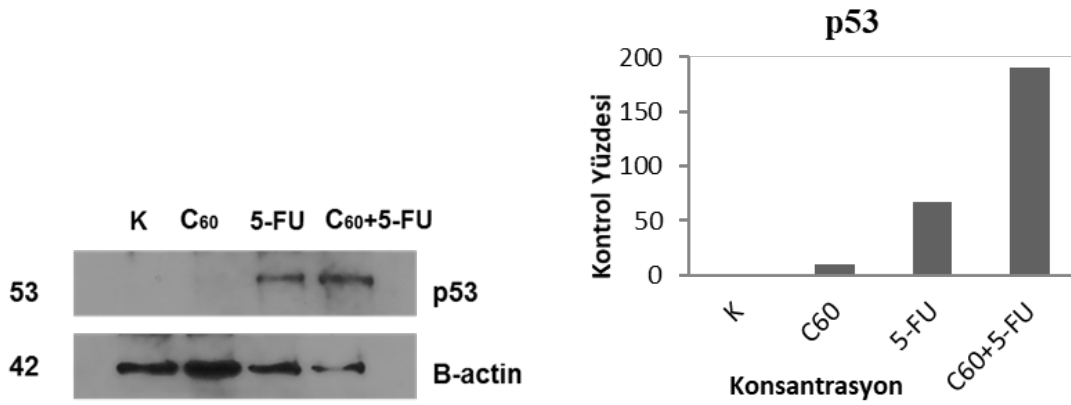
Araştırmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre 5-FU+C₆₀ kombinasyonlarında kontrol grubuna kıyasla hücre içerisinde ROS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

3.7. 5-FU, C₆₀ ve 5-FU+C60 kombinasyonunun MCF-7 Hücre Hattında p53 Üzerine Etkisi

İnsan meme kanseri MCF-7 hücre hattında programlanmış hücre ölüm mekanizmalarının (apoptoz ve otofaji) uyarılmasını sağlamak için hücreleri 24 saat boyunca 5-FU, C60 ve 5-FU+C60 kombinasyonu ile muamele ettik ve sonra western blot yöntemini kullanarak p53 ve TIGAR proteinlerinin ekspresyonları belirlendi. Sonuçları, GraphPad prizma tek yönlü ANOVA Tukey parametrik olmayan analiz kullanıldı.

P53 proteini, hücrelerin düzgün çalışması için gerekli olan birçok işlemin düzenleyici bir faktördür ve yaşamı ve ölümü ile ilişkili bir dizi işleme karşılık gelir.

P53 proteini, hücresel DNA'nın onarımını düzenler ve genin hasarı çok ciddi olduğunda ve onarılması mümkün olmadığında apoptozu indükler. Bu protein aynı zamanda hücrelerin yaşlanmasının ve hücresel döngünün sonraki aşamalarına giren ve çıkan hücrenin düzenlenmesinden sorumludur (ikincisi ile ilgili olarak, p53 proteini G1 / S veya G2 / M kontrol noktalarında hücredeki onarım mekanizmalarını çalıştırmak için hücresel döngüyü durdurabilir). Protein p53 ayrıca anjiyogenezi ve oksidatif şokun indüklenmesini engeller.



Şekil 3.7. 24saatlik ilaç uygulaması sonrası Western Blot yöntemiyle p53, B-Aktin tayini 1-Kontrol, 2-C₆₀, 3- 5-FU, 4- 5-FU + C₆₀ B-Aktin; 42 kDa, p53; 53kDa

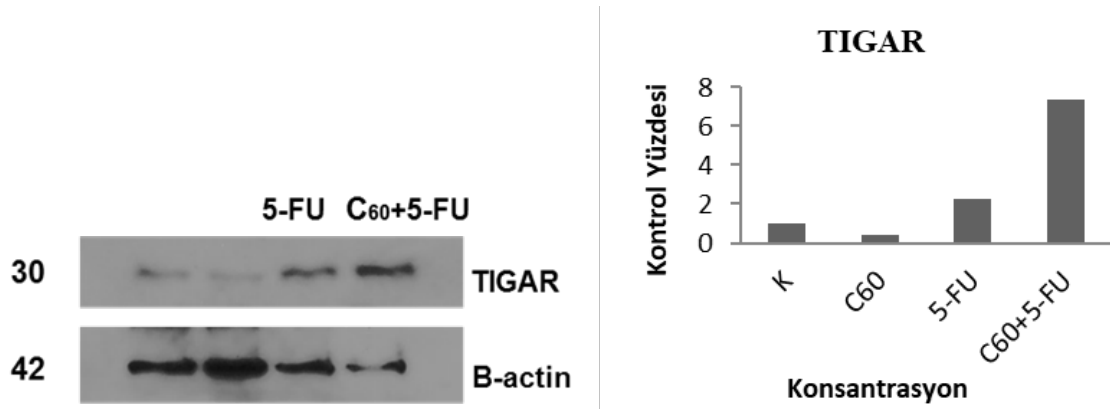
Hücre ölümlerinin apoptozis ile olup olmadığı Western Blot yöntemi ile araştırıldı. Buna göre, MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında 24 saatlik ilaç uygulaması sonrasında 5-FU ve 5-FU + C₆₀ gruplarında DNA hasarı ve stresle karşılaşan hücreler olduğu için p53 bu hücrelerde indüklendi ve ifadesi arttı. Buradan kanserli hücre ölümlerinin apoptoza geçişini sağlamaya yardımcı olduğu belirlendi.

3.8. 5-FU, C₆₀ ve 5-FU+C₆₀ kombinasyonunun MCF-7 Hücre Hattında TIGAR Üzerine Etkisi

TIGAR (TP53 ile indüklenen glikoliz ve apoptoz regülatörü) glikolizi düzenleme ve oksidatif strese karşı koruma işlevi gören yeni bir p53 ile indüklenebilir olan proteindir. TIGAR, ROS seviyelerini düşürebilir ve ROS ile ilişkili diğer apoptotik sinyallere duyarlılığı zaltabilir ve p53'ün tümör baskılayıcı etkilerine aracılık etmede önemli bir bileşen olması muhtemeldir.

Benzer şekilde, TIGAR, Fru-2,6-P2 seviyelerinde düşüşe neden olur ve böylece bu aşamada glikolizi bloke ederek NADPH üretimi sağlayarak hücreleri oksidatif stresten koruması için pentoz fosfat yolu gibi diğer yollarayönlendirilmesini teşvik eder.

5-FU, C₆₀ ve 5-FU+C₆₀ kombinasyon dozlarında TIGAR proteini üzerine yapılan tedaviden 24 saat sonra sonuçlar Western Blotlama yöntemiyle analiz edildi [Şekil 3.8].



Şekil 3.8. 24saatlik ilaç uygulaması sonrası Western Blot yöntemiyle, TIGAR, B-Aktin tayini 1-Kontrol, 2-C60, 3- 5-FU, 4- 5-FU + C60 B-Aktin; 42kDa, TIGAR; 30kDa

Elde ettiğimiz bulgular kontrol grubuyla kıyaslandığında 5-FU ve 5-FU+C60 gruplarında artışa neden olduğu ve bu grupların TIGAR ifadesini indükleyerek hücrelerin apoptoza gitmesine yardımcı olduğu tespit edilmiştir. Ancak C₆₀ fulleren grubunda kontrol düzeyine göre ekspresyonun azaldığı tespit edilmiştir.

Kanser, dünya çapında birçok ülkede önde gelen ölüm sebeplerinden biridir. Hem insidans hem de ölüm oranı açısından mevcut yükün, artan yaşam süresi ve kanser riskini artıran yaşam tarzı sorunları sebebiyle hızla artması beklenmektedir. Meme kanseri, milyonlarca kadının hayatını birdenbire bozmaya devam etmektedir. 2018 yılı itibariyle dünya çapında 2,1 milyon yeni meme kanseri vakasının teşhis edilmesi beklendiği öngörülmüştür. Yıllar boyunca meme kanseri, hem insidans hem de ölüm oranı açısından sürekli olarak kadınlarda en iyi kanserler arasında yer almıştır. Ancak değişen popülasyon dinamikleri, tarama yöntemleri, tedaviler vb. ile bazı kanserlerin göreceli sıralaması değişmiştir. Akciğer kanserinden sonra, meme kanserinin genel olarak en sık görülen ikinci kanser olduğu tahmin edilmektedir (1.7 milyon vaka, %11,9), ancak nispeten olumlu prognoz nedeniyle ölüm nedeni olarak 5. sıradadır (522.000, %6,4) (Aamir Ahmed 2014).

1973 yılında Dr. Soule ve Michigan Kanser Vakfı'ndaki meslektaşları tarafından kurulan ve adlarından türetilen MCF-7 hücreleri, metastatik hastalığı olan 69 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Yapılan çalışmalar, MCF-7 antikanser ilaçlarla ilgili olanlar da dahil olmak üzere dünya çapında meme kanseri araştırmaları için uygun bir model hücre dizisi olduğunu kanıtlamaktadır. MCF-7 hücreleri hormon reseptörleri yani östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörleri pozitif olan luminal moleküler alt tipine aittir. MCF-7, normal olarak düşük metastatik potansiyele sahip olduğu düşünülen zayıf agresif ve invazif olmayan bir hücre hattıdır (Comşa 2015).

Bu tez çalışması, in vitro deneyleri içeren bir hücre kültürü çalışmasıdır. Hücre hatları, laboratuvar araştırmalarının birçok yönünde ve özellikle kanser araştırmalarında in vitro modeller olarak yaygın olarak kullanılabilirlerinden, meme kanserinde moleküler tanı için anahtar bir unsur gibi görünmektedir (Aamir Ahmed 2014).

Antimetabolitlerin ileri evre meme kanserleri için tedavi edici olarak başarılı oldukları kanıtlanmıştır, ancak sıklıkla tedavi rejimlerini sınırlayabilen ciddi yan etkiler eşlik etmektedir. Hücre proliferasyonunu inhibe eden bir antimetabolit olan 5-Flourourasil, çeşitli katı tümörler için standart kemoterapi protokollerinde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. 5-FU için makul yanıt oranları bildirilmiş olmasına rağmen, klinik sonuçları iyileştirmek ve kemoterapötik müdahaleler için doğal bir sorun olan sitotoksik yan etkileri azaltmak için sürekli araştırma gereklidir. 5-FU, timidilat sentaz inhibisyonu yoluyla DNA sentezinin güçlü bir inhibitörü olarak işlev gören etkili bir antikanser ajanı olduğunu kanıtlamıştır (Ferguson ve Orlando 2014). Bazı araştırmacılar, 5-FU'nun hücre döngüsünün durmasına ve hücre apoptozuna bmeden olabileceğini bildirmişlerdir (Tseng et al. 2004).

Büyük karbon kafes molekülü olan fullerene C_{60} buckyball, küresel bir şekil oluşturan 12 beşgen ve 20 altıgen halkanın oluşturduğu bir kombinasyondur (Ulao 2013). Benzersiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle, fullerene C_{60} , antikanser tedavisi de dahil olmak üzere birçok biyomedikal uygulama için potansiyel adaydır (Zogovic et al. 2009). C_{60} fulleren, son zamanlarda antikanser tedavisinde kullanım için ümit verici bir ajan olarak kabul edilmiştir. C_{60} fulleren ve türevleri biyoyumludur, normal dokular üzerinde düşük konsantrasyonlarda toksik etki göstermez, güçlü serbest radikal temizleyici ve antioksidan potansiyeline sahiptir (Prylutska et al. 2014).

Reaktif oksijen türleri, en dıştaki elektron kabuklarında tek bir eşleşmemiş elektrona sahip olan radikaller, iyonlar veya moleküllerdir. Bu karakter nedeniyle, ROS oldukça reaktiftir. Hemen hemen tüm kanserlerde, tümör gelişimi ve ilerlemesinin birçok yönünü destekledikleri yüksek reaktif oksijen türleri oranları tespit edilmiştir. Bununla birlikte, tümör hücreleri ayrıca ROS'tan detoksifiye etmek için yüksek antioksidan protein seviyelerini ifade eder, bu da kanser hücresi işlevi için hücre içi ROS seviyelerinin hassas bir dengesinin gerekli olduğunu düşündürür.

Bununla birlikte, tümör hücreleri ayrıca ROS'tan detoksifiye etmek için yüksek antioksidan protein seviyelerini de ifade eder, bu da kanser hücresi işlevi için hassas bir hücre içi ROS seviyeleri dengesinin gerekli olduğunu gösterir. Düşük dozlarda hidrojen peroksit ve süperoksit, çok çeşitli kanser hücresi tiplerinde hücre çoğalmasını uyarır. Örneğin, meme kanseri hücrelerinde hücre içi oksidatif stres, östrojenin mitokondriye translokasyonu yoluyla artar (Yarh ve Storz 2010). Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, hücre homeostazının merkezi bir bileşenidir. İnme, miyokardiyal enfarktüs, kemik iliği ve organ reddi, otoimmün ve nörodejeneratif bozukluklar, kötü huylu neoplazmalar ve ayrıca kemoterapötik ve radyoterapötik tedaviye tümör tepkisi gibi birçok hastalık, artan veya azalan apoptoz oranı ile ilişkilidir. Kanser hücreleri genellikle apoptozdan kurtulabilir ve bu da onları neredeyse ölümsüz hale getirir (Grosse et al. 2014). p53, DNA'ya zarar veren ajanlara maruz kalma, hipoksi, ve onkojen aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli hücre streslere yanıt olarak büyümenin durması, yaşlanma veya apoptozu indükleyerek bir tümör baskılayıcı görevi görür. Bu tepkiler bir hücreyi kontrolsüz çoğalmaya ve tümöre dönüşüme karşı korur. Tümör baskılayıcı gen olan TP53, insandaki kanser hücrelerinin ~%50'sinde mutasyona uğramıştır. En önemli p53 işlevlerinden biri, apoptozu aktive etme kabiliyetidir ve bu sürecin bozulması, tümör ilerlemesini teşvik edebilir (Burns ve El-Dery 1999). Otofajinin tipik bir programlanmış hücre ölümü türü olduğu düşünülmektedir ve hücre organelin lizozomal bozunmasına ve protein geri dönüşümüne bağlıdır. Bu amaçla, otofajinin hücre ölümünde iki ucu keskin bir kılıç olduğu düşünülmektedir.

Bir yandan, bir tür programlanmış hücre ölümü olduğu varsayılıyor. Öte yandan, otofaji aktivasyonu, birikmiş protein veya hasarlı organın temizlenmesine katkıda bulunur. Otofaji düzeylerinin artması, besin ve oksijen açısından zayıf tümör bölgelerinde gözlenir (Yang et al. 2018).

TP53 ile uyarılan glikoliz ve apoptoz düzenleyici (TIGAR), fruktoz-2,6-bifosfataz olarak işlev gören, p53 ile indüklenebilir bir gendir (Li et al. 2019). TIGAR ekspresyonu, hücrelerdeki fruktoz-2,6-bifosfat seviyelerini düşürerek glikolizin inhibisyonuna ve nikotinamid adenin dinükleotid oluşturmak için pentoz fosfat yoluyla (PPP) hücre içi reaktif oksijen türleri seviyelerini düşürür. (Bensaad et al. 2006).

Bu tez çalışmasında, 5-FU, C_{60} ve 5-FU+ C_{60} kombinasyonunun sitotoksik etkileri, WST-1 yöntemi kullanılarak araştırılmış ve 5-FU'nun zaman ve konsantrasyona bağımlı olarak insan MCF-7 meme kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler meydana getirdiği belirlendi. WST-1 absorbans sonuçları kullanılarak, kontrol grubuna göre, her bir grubun % hücre canlılık değerleri hesaplandı. Literatür çalışmalarına bakıldığında 5-FU'nun kanser hücrelerinde proliferasyonunu inhibe ettiğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. J.Cai ve ark. yaptıkları çalışmada 5-FU ile tedavi edilmiş insan meme kanseri MCF-7 hücrelerinde farklı şekilde eksprese edilen proteinlerin analizi üzerine etkilerini araştırdıkları ve doza bağlı olarak 5-FU'nun tedavisinin hücre büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir (Cai et al. 2014). Akbari ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da 5-Florourasil'in insan meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkinliği konsantrasyona ve doza bağlı olarak araştırılmış 5-FU'nun MCF-7 hücreleri ile 24 saat muamelesinden sonra, 1,3 $\mu\text{g} / \text{ml}$ konsantrasyonunda hücrelerin %50'sini inhibe ettiğini ve 48 saat sonra 0,38 $\mu\text{g} / \text{ml}$ konsantrasyonunda hücrelerin %50'sini inhibe ettiğini göstermişlerdir (Akbari et al. 2013). Gee ve ark.'nın yaptıkları başka bir çalışmada da 5-FU'nun antitümör etkilerini gösterip MCF-7 meme kanseri hücrelerinde proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Zhi et al 2014).

Yapılan başka bir çalışmada Jeannette E. Ferguson ve Robert A. Orlando, çeşitli antikanser özelliklerinden dolayı, doğal ürün kurkumin'i 5-FU ile birleştirerek, meme kanseri hücre çoğalmasını önlemede sinerjik gelişmeler ve 5-FU kaynaklı sitotoksositeye karşı koruma sağlayıp sağlamayacağını araştırdıkları ve aslında hem curcumin hem de 5-FU, birleştirme deneyleri kullanılarak meme kanseri hücrelerinde DNA sentezini inhibe ettiğini bununla birlikte, kombine tedavinin sinerjik bir gelişme göstermediğini fakat kurkumin ilavesiyle 5-FU inkübasyonları tekrarlandığında, hücrelerin 5-FU sitotoksitesine karşı kurkumin ile 7-10 kat koruma sağladığını göstermişlerdir.

Bu bulgular, 5-FU tedavisi sırasında bir adjuvan tedavi olarak kurkuminin eklenmesinin, normal hücreleri azaltılmış canlılıktan koruyarak ve böylece daha yüksek dozlama veya daha uzun tedavi sürelerine izin vererek 5-FU'nun kemoterapötik etkililiğini artırabileceğini göstermektedir (Ferguson ve Orlando 2014).

Bu, durum özellikle ciddi sitotoksitelerden muzdarip olan ve sık kesintilere veya hatta tedavi rejimlerinin erken sonlandırılmasına ihtiyaç duyan kişiler için önemlidir. Bizim çalışmamızda 24 saat süreyle 5-FU ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerine uyguladığımız WST-1 analizi sonuçlarından, hücre yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığı tespit edildi. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçların önceki çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlendi.

Öte yandan Yumeng Wei ve ark., yaptıkları araştırmalarda 5-FU'nun tek başına veya diğer kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon halinde, klinik olarak meme kanseri olan hastaların tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı ve bununla birlikte, araştırmalar, 5-FU ve kurkumin kombinasyonunun meme kanseri tedavisi için etkili bir strateji olabileceğini, ilaç direncini aştığını ve 5-FU'nun neden olduğu toksisiteyi azalttığını bildirmişlerdir (Wei et al. 2018).

Bizim çalışmalarımızda C_{60} fullerenin sitotoksik etkileri MCF-7 hücre hattında WST-1 yöntemi ile araştırıldı. Elde edilen bulgulara göre C_{60} nanopartikülünün tek başına uygulanması ile dikkate değer bir etki gözlemlenmedi. Çalışmamız diğer bulgularla karşılaştırıldığında çalışmamızı destekleyen sonuçların olduğu belirlendi. Wang ve ark. yaptıkları çalışmada C_{60} 'ın A549 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, değerlendirilmiş, A549 hücreleri, 6 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (12.5, 25, 50, 100 ve 200 g / ml) C_{60} ile muamele edilmiş C_{60} 'ın A549 hücrelerine kolayca girebildiğini ve A549 hücreleri üzerinde çok az doğrudan önemli toksisite gösterdiğini, hücre canlılığında önemli bir azalmaya yol açmadığını bildirmişlerdir (Wang et al. 2014).

Öte yandan Kaisar Raza ve ark. tarafından yapılan çalışmada MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde Naive C_{60} Fullerene'nin (Naive CF) 1mg/mL ve 10mg/mL konsantrasyonlarında önemli bir sitotoksitenin bulunmadığını tespit etmişlerdir (Raza 2015). Ayrıca, Panchuk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada antikanser ilaç doksorubisinin (Dox) biyolojik hedeflerine iletilmesi için saf C_{60} fulleren tedavisi ile HCT116 kolon kanseri hücresi ve MCF-7 meme kanseri hücre hattında toksisiteyi arttırdığı ve hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir (Panchuk et al. 2015).

Franskevych ve arkadaşlarınınanoyapı ile işlenmiş L1210 lösemi hücrelerine, C₆₀ fullerenin fotositotoksik etkisini değerlendirmişlerdir. Düşük konsantrasyon aralığında C₆₀ fulleren sitotoksitesinin olmaması hakkındaki verilerle uyumlu olduğu görülmüş, ve zamana bağlı olarak C₆₀ ile tedavi edilen lösemik hücrelerin canlılığının kısmen azaldığını bildirmişlerdir (Franskevych et al. 2016). Çalışmamız da MCF-7 hücrelerine 5-FU+C₆₀ kombinasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra hücrelerin canlılığı (WST-1) değerlendirildi. MCF-7 hücrelerinde sinerjistik olarak anlamlı bir etki gözlenmedi. Çalışmamızda 24 saat süreyle doza bağlı 5-FU, Fullerene C₆₀ ve 5-FU+C₆₀ grupları ile inkübe ettiğimiz MCF-7 hücrelerinin ROS üzerindeki etkileri incelendi. Buna göre 5-FU ile işleme tutulan hücrede, konsantrasyona bağlı olarak ROS seviyelerinin arttığı tespit edildi. Chiara Focacetti ve ark. yaptıkları çalışmada HCMs ve endotel hücrelerinde doza ve zamana bağlı hücre içi ROS üretimini araştırmış ve 5-FU'nun ROS oluşumunu indüklediğini ve ROS üretiminde anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir (Focacetti et al. 2015).

Suzuki ve ark. yaptıkları bir çalışmada ise insan pankreas kanseri kök hücrelerinin 5-FU ile tedavisinin hücre içi ROS üretimini arttırdığını bulmuşlardır (Suzuki et al. 2015). Benzer şekilde Darsingry ve ark. 5-FU tedavisinin koleraktal kanser hücrelerinde hücre içi ROS'un verimli üretimine yol açtığını bulmuştur. Bizim çalışmalarımızda C₆₀ fullerenin MCF-7 hücre hattında ROS düzeyinin incelenmesinde de hücreler C₆₀ fulleren ile (100, 250, 500 nM) dozlarda tedavi edilmiş ve tedavi uygulamasından sonra hücreler 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır, elde edilen bulgular kontrol grubuyla kıyaslandığında, ROS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Ayrıca fullerene C₆₀ ve 5-FU+C₆₀ ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinin ROS yoğunluğunda da anlamlı bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi. Bu kapsamda Singh ve ark. yaptıkları çalışmada 3BP (3-bromopyruvate) veya 2DG (2-deoxyglucose) tedavisinin CMZ (chlormethiazole) ile kombinasyonu, MCF-7 hücresinde ROS seviyelerinin düşmesine neden olduğunu tespit etmişlerdir (Singh et al. 2016).

Çalışmamızda, C₆₀ (500 nm), 5-FU (500µM) ve 5-FU+C₆₀ (500 nm+500µM) kombinasyonu ile muamele edilmiş insan meme kanseri MCF-7 hücreleri üzerindeki aktiviteleri apoptotik ve otofajik ölüm yollarında etkin olan p53 ve TIGAR proteinlerinin ekspresyonları Western Blot yöntemiyle doza ve zamana bağlı incelendi. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre kontrol ve C₆₀ gruplarında DNA'nın hasar görmediği gözlemlendi ve p53 ifadesinin az miktarda olduğu belirlendi. Fakat 5-FU ve 5-FU+C₆₀ gruplarında DNA hasarı ve stresle karşılaşan hücreler olduğu gözlemlendi için bu grupların apoptoz ve otofaji indüksiyonunu düzenleyerek p53 geni ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artışın olduğu bulundu.

p53 ekspresyonundaki bu aktivite, p53 kontrollü tümör baskılamasının ana mekanizması olarak kabul edilebilir. Nabeya ve ark. ile Pickard ve ark., 5-FU'nun p53 geninin ekspresyonunu indüklediğini, ardından Bax ve p21 gibi transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere çeşitli genlerin transkripsiyonunun indüklendiğini bildirdi; bu, hücre büyümesinin durması ve apoptozun indüklenmesi ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, p53 geni apoptozun 5-FU tarafından indüksiyonunda önemli bir rol oynayabilir (Matsuura et al. 2000).

Ayrıca Osaki ve arkadaşları, yaptıkları in vitro çalışmalarında 5-FU'nun p53 gen ekspresyonu yoluyla insan mide kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklediğini bildirmişlerdir. 5-FU uygulamasının insan mide ve kolon kanserlerinde apoptotik hücre ölümünü önemli ölçüde artırdığı açıkça gösterilmiştir. P53'ün şimdi bir G1 / S hücre döngüsü kontrol noktasının bir düzenleyicisi ve DNA'ya zarar veren ajanlara maruz kalan hücrelerde bir apoptoz indükleyicisi olarak hareket ettiği bildirilmiştir (Osaki et al. 1997). Yang ve arkadaşları çalışmalarında, 5-FU'nun, otofaji aktivasyonu yoluyla HCT-116'da apoptozu ortaya çıkardığını kanıtlamışlardır. Otofajinin aktivasyonu, organellerin ve proteinlerin kendi kendine tüketimini teşvik edebilir. 5-Florourasilin, otofajiyi aktive ederek p53 ekspresyonunu artırdığını ve p53 ifadesini desteklediğini göstermişlerdir. 5-FU'nun HCT-116 hücrelerinde otofajik yanıtları indüklediğini bildirmişlerdir (Yang et al. 2018). P53 tümör baskılayıcı protein, apoptoz, yaşlanma ve hücre döngüsü durması dahil olmak üzere çeşitli hücresel yanıtları başlatarak kanser gelişimini inhibe eder.

Buna ek olarak, son çalışmalar p53'ün hücre metabolizmasını da etkileyebildiğini göstermiştir. Çalışmamızda ayrıca C₆₀ (500nm), 5-FU (500µM) ve 5-FU+C₆₀ kombinasyonunun (500 nm+500µM) MCF-7 hücre hattında TIGAR proteini üzerine yapılan tedaviden 24 saat sonra sonuçlar Western Blotlama yöntemiyle analiz edildi.

Araştırmanın odak noktası olan C60 ve 5-FU'nun ayrı ayrı kullanımlarında ve kombinasyonlarında kontrol grubuna kıyasla hücre içerisinde 5-FU grubunda ROS artışının olduğu ve buna bağlı olarak TIGAR'ın ROS'un baskılaması amacı ile ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bilimsel literatürün gösterdiği gibi TIGAR, meme kanserlerinin çoğunda yüksek oranda eksprese edilir ve meme kanserindeki karsinom hücreleri sıklıkla düşük glikoliz ve apoptoz oranlarına sahiptir (Ko et al. 2016).

Xie ve ark., TIGAR'ın hem apoptozu hem de otofajiyi inhibe etme kabiliyetine dayanarak kanser hücresinin hayatta kalması üzerinde durmuşlardır.

Öte yandan, son zamanlarda yapılan bir dizi çalışma, TIGAR ekspresyonu, glioblastoma, invazif meme kanserleri ve kolorektal kanserler gibi insan kanserlerinde önemli ölçüde artmıştır. P53 ile indüklenen glikoliz ve apoptoz düzenleyici (TIGAR) glikolizi inhibe ederek daha yüksek hücre içi NADPH, daha düşük reaktif oksijen türleri ve otofaji aktivitesi ile sonuçlanır. Antikanser ilaç epirubisin ile tedavi edilen karaciğer veya akciğer kanseri hücrelerinde, TIGAR seviyeleri doza ve zamana bağlı bir şekilde arttığını bildirmişlerdir. TIGAR'ın hem apoptozu hem de otofajiyi inhibe ettiğini ve bunun, tümör kemoterapisine yanıt olarak tümör hücresinin hayatta kalması üzerinde ikili bir etkiye neden olduğunu ortaya koymuşlardır (Xie et al. 2014).

Buna karşın, Huo ve arkadaşlarının çalışmasında, PALB2 ile ilişkili bir meme kanseri modeli oluşturup ve karakterize etmişlerdir. Dahası, bu modeli kullanarak p53 ve otofajinin, oksidatif stres ve DNA hasarı ile ilişkili meme kanserindeki rolünü araştırmışlardır. Sonuçlarında, PALB2 kaybıyla ortaya çıkan DNA hasarı ve oksidatif stres karşısında, p53'ün kanser gelişimine bir engel olduğunu, buna karşın otofajinin hücre hayatta kalmasını ve tümörjenezini kolaylaştırdığını göstermişlerdir (Huo et al. 2013).

Otofaji, oksidatif stresi ve DNA hasarı yanıt aktivasyonunu hafifletmek için önemli olan hücre içi bir atık boşaltma ve stres azaltma mekanizmasıdır; kanseri baskılayabilir veya destekleyebilir, ancak meme kanserindeki rolü bilinmemektedir. Son on yıldaki deneysel kanıtlar, p53'ün hücre içi lokalizasyonuna ve etki şekline bağlı olarak, otofajinin bir aktivatörü veya inhibitörü olarak hareket edebileceğini ikna edici bir şekilde bildirmektedir (Mrakovcic ve Fröhlich 2018).

Sonuç olarak; Çalışmalarımızda antimetabolit grubu ilaç olan 5-FU'nun MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattında kayda değer anti-kanser aktivite ve ROS seviyelerinde artışa neden olduğu belirlenirken C_{60} 'ın MCF-7 hücre hattında aynı aktivitelerinin olmadığını gördük. 5-FU, MCF-7 hücrelerinde doza ve zamana bağlı bir şekilde hücre canlılığını inhibe etti ve apoptoz ve otofajiyi indükledi. Antitümör ilaçların sitotoksik etkisinin bir modülatörü olarak C_{60} uygulaması, antikanser tedavisindeki yaklaşımları değiştirmek için umut vericidir. Çalışmamızda, p53'ü 5-FU ve C_{60} ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde otofajiyi ve apoptozu düzenleyen bir moleküler merkez olarak düşünerek, bu yeni deneysel verilerin ışığında, tümör hücrelerinde apoptotik ve otofajik yolun bir aracısı olarak p53 sinyaline odaklanabiliriz. Ayrıca sonuçlarımız 5-FU'nun TIGAR üzerindeki etkilerini ROS bağımlı etkisine aracılık eder ve olası kanser tedavisi için daha iyi bir 5-FU ve kombinasyon tedavisidüşünülebilir. Ayrıca, östrojen reseptörü pozitif olan MCF-7 hücre hattından

farklı olan; MDA-MB 231, MCF10A, T47D gibi farklı özellikteki insan meme kanseri hücre hatları çalışılarak 5-FU, C₆₀ ve yeni kombine tedaviler ile meme kanserinde apoptoz ve otofajinin rolünün anlaşılması için daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Ahmed A, (2014) Breast Cancer Metastasis and Drug Resistant. *Epidemiology of Breast Cancer in Women* 1152: 9-31

Akbari R, Javar HA (2013) Efficacy of Capecitabine and 5- Fluorouracil (5-FU) on the human breast cancer cell line (MCF7) – effect of concentration. *American Journal of Research Communication* 1(6): 75-91

Americancancersocietycancer.org | 1.800.227.2345 (erişim tarihi: 20.02.2019)

Angele S, Hall J (2000) The ATM gene and breast cancer: is it really a risk factor. *Mutation Research*, 462(2-3):167-78

Anita Sharma HP, Jain P, Amit P (2014) Apoptosis (Programmed Cell Death) – A Review. *World Journal of Pharmaceutical Research* 3(4): 1854-1872

Ashe PC, Berry M (2003) Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27: 199– 214

Baker L, Quinlan PR, Patten N, Ashfield A, Birse-Stewart-Bell LJ, McCowan C (2010) p53 mutation, deprivation and poor prognosis in primary breast cancer. *British Journal of Cancer* 102(4): 719-26

Baldrighi M, Trusel M, Tonini R, Giordani S (2016) Carbon Nano materials Interfacing with- Neurons:An Invivo Perspective. *Frontiersin Neuroscience* 10(250): 1-27

Behrend L, Henderson G, Zwacka RM (2006) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transactions* 31(6): 1441-44

Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MNC, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousde KH (2006) TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* 126: 107–120

Bertram JS (2000) The molecular biology of cancer. *Medicine* 21(6): 167-223

Boland CR, Goel A (2005) Somatic evolution of cancer cells. *Seminars in cancer biology* 15(6): 436-50

Buerger H, Simon R, Schäfer KL, Diallo R, Littmann R, Poremba C, vanDiest PJ, Dockhorn-Dworniczak B, Böcker W (2000) Genetic relation of lobular carcinoma in situ, ductal carcinoma in situ, and associated invasive carcinoma of the breast. *Clin Pathol: Mol Pat- hol* 53: 118–121

Burns TF, El-Deiry WS (1999) The p53 Pathway and Apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* 181: 231–239

Burscha W, Karwana A, Mayer M, Dornetshuber J, Fröhweina U (2008) Cell death and autophagy: Cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology* 254(3): 147-57

Cai J, Chen S, Zhang W, Wei Y, Lu J, Xing J, Dong Y (2014) Proteomic analysis of differentially expressed proteins in 5-fluorouracil-treated human breast cancer MCF-7 cells. *Clin Transl Oncol* 16: 650–659

Calaf GM, Quinones JA (2016) Ras protein expression as a marker for breast cancer. *Oncology Letters* 11: 3637-3642

Casteel E, Gerry RB (2000) Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 62: 51–62

Comşa Ş, Maria A, Raica CM (2015) The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* 35: 3147-3154

Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z (2016) Cancer Hall marks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer* 7(10): 1281-1294

Davies EL (2015) Breast cancer. *Medicine* 44: 1

Dikic I, Elazar Z (2018) Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Molecular Cell Biology* 19: 349-364

Dunnwald LK, Rossing MA, Li C (2007) Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research* 9(1): 1-10

Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35(4): 495– 516

ElsM JJ, Barns Jan GMK, Marcelhid Iris L vS, Muime P, Look Wim vP John AF (1996) TP53 and MYC Gene Alterations Independently Predict Poor Prognosis in Breast Cancer Patients. *Genes Chromosomes&Cancer* 16: 170-179

Ferguson JE, Orlando, RA (2014) Curcumin Reduces Cytotoxicity of 5-Fluorouracil Treatment in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Medicinal Food s.* 1–6

Focaccetti C, Bruno A, Magnani E, Bartolini D, Principi E (2015) Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PLoSOne* 10(2): 1-25

Franskevych DV, Prylutska SV, Grynyuk II, Grebinyk DM, Matyshevskaya OP (2015) Enhanced Cytotoxicity of Photoexcited Fullerene C60 and Cisplatin Combination Against Drug Resistant Leukemic Cells. *Experimental Oncology* 37: 187–191

Franskevych DV, Grynyuk, II, Prylutska SV, Matyshevskaya OP (2016) Modulation of cisplatin-induced reactive oxygen species production by fullerene C60 in normal and transformed lymphoid cells. *Biochem J.* 88: 1-7

Friederike CL, Anna DD, Nissi M, Varki Anne MW, Darren EC, Gerry RB (2000) Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 62: 51–62

Geng J, Klionsky DJ (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Reports* 9: 859–864

Gou HF, Xiang Li, Meng Q, Ke C, Long-Hao L, Hang D, Ye C, Yuan T, Feng G, Feng Z, Hai-Tao M, Jun G, Jing-Mei S, Feng X, Feng B, Jian-Jun G, Ji-Yan L (2013) Epidermal

Growth Factor Receptor (EGFR)- RAS Signaling Pathway in Penile Squamous Cell Carcinoma. *PlosOne* 8(4): 1-6

Gözüaçık D, Kimchi A (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23: 2891–2906

Grosse J, Warnke E, Wehland M, Pietsch J, Pohl F, Wise P, Magnusson NE, Eilles C, Grimm D (2014) Mechanisms of apoptosis in irradiated and sunitinib-treated follicular thyroid cancer cells. *Apoptosis* 19: 480–490

Hanahan D, Weinberg AR (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646–674

Hanahan D, Weinberg AR (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57–70

Harbeck N, Gnant M (2017) *Breast Cancer Seminar*. 389: 1134–50

Held P (2015) An Introduction to Reactive Oxygen Species. *Bio. Tek. White Paper*, p. 1-21

Hembruff ST, Jokar I, Yang İ, Cheng N (2010) Loss of Transforming Growth Factor- β Signaling in Mammary Fibroblasts Enhances CCL2 Secretion to Promote Mammary Tumor Progression through Macrophage-Dependent and Independent Mechanisms. *Neoplasia* 12: 425–433

Hiroko M, Dongwei Z, Chandra B, Hiroyoshi D, Gabriel H, Naoto TU (2012) Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat* 136: 341-345

<http://www.breastcancer.org/treatment> (erişim tarihi: 11. 12. 2019)

Huo Y, Cai H, Teplova I, Colin CB, Chen G, Price S, Barnard N, Ganesan S, Karantza V, White E, Xia B (2013) Autophagy opposes p53-mediated tumor barrier to facilitate tumorigenesis in a model of PALB2-associated hereditary breast cancer. *Cancer Discov* 3(8): 894–907

Irene M, Ghobrial MD, Adjei TEA (2005) Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J Clin* 55: 178–194

Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N (2008) Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell* 19: 5360–5372

Jin Z, El-Deiry WS (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy* 4(2): 139-163

Karabulut H, Gülay MŞ (2016) Serbest radikaller. *MAKÜ Sağlık Bil. Enst. Derg* 4(1): 50-59

Keen JK, Davidson NE (2003) The Biology of Breast Carcinoma. *Cancer Supplement* 97(3): 826- 833

Ko YH, Vida DM, Roche M, Lin Z, Menezes DW, Seifert E (2016) TP53-inducible Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) Metabolically Reprograms Carcinoma and Stromal Cells in Breast Cancer. *The Journal of Biological Chemistry* 291(51): 26291–26303

Lauren L, Siewertszvan R, Vasilena Z, Janets W, Rick J, Jansen D (2016) SIAH and EGFR, Two RAS Pathway Biomarkers are Highly Prognostic in Locally Advanced and Metastatic Breast Cancer. *EBio Medicine* 11: 183–198

Li J, Yuan J (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27: 6194-6206

Li Z, Shao Z, Chen S, Huang D, Peng Y, Chen S, Ma K (2019) TIGAR impedes compression-induced intervertebral disc degeneration by suppressing nucleus pulposus cell apoptosis and autophagy. *J Cell Physiol*, p. 1–15

Liou GY, Storz P (2010) Reactive oxygen species in cancer. *NIH Public Access* 44(5): 1-3

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003) 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature Publishing Group* 3: 330-338

Luo J, Solimini NL, Elledge SJ (2009) Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* 136: 824-837

Lynchak OV, Prylutsky YI, Rybalchenko VK, Kyzyma OA, Soloviov D, Kostjukov VV, Evstigneev MP, Ritter U, Scharff P (2017) Comparative Analysis of the Antineoplastic Activity of C60 Fullerene with 5-Fluorouracil and Pyrrole Derivative InVivo. *Nanoscale Research Letters* 12(8): 1-6

Matsuura T, Fukuda Y, Fujitaka T, Nishisaka T, Sakatani H (2016) Preoperative Treatment with Tegafur Suppositories Enhances Apoptosis and Reduces the Intratumoral Microvessel Density of Human Colorectal Carcinoma. *Cancer* 88: 1007-15

Mikulandra M, Božina I, Orešković LB (2016) Radiation Therapy For Breast Cancer. *Lib On-col* 44: 21–30

Mirkes Philip E (2012) 2001 Warkany Lecture: To Die or Not to Die, the Role of Apoptosis in Normal and Abnormal Mammalian Development. *Teratology* 65: 228–239

Mitri Z, Constantine T, O'Regan R (2012) The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy Research and Practice*, p. 1-8

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182): 1069–1075

Mizushima N, Yoshimori TL (2010) Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* 140: 313-323

Mizushima N (2018) A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nature Cell Biology*, p. 1-7

Mrakovcic M, Fröhlich LF (2012) p53-Mediated Molecular Control of Autophagy in

Osaki M, Tatebe S, Goto A, Hayashi H, Oshimura M, Ito H (1997) 5-Fluorouracil (5-FU) induced apoptosis in gastric cancer cell lines: role of the p53 gene. *Apoptosis* 2: 221–226

Osborne C, Wilson P, Tripathy D (2004) Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications (2004) *The Oncologist* 9: 361- 377

Ozaki T, Nakagawara A (2011) Role of p53 in cell death and human cancers *Cancers* (3): 994-1013

Panchuk RR, Prylutska SV, Chumak SV, Skorokhyd NR, Lehka LV, Evstigneev MV, Prylutskiy YI, Berger W, Heffeter P, Scharff P, Ritter U, Stoika RS (2015) Application of C60 Fullerene-Doxorubicin Complex for Tumor Cell Treatment In Vitro and In Vivo. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 11: 1139–1152

Panzarini E, Inguscio V, AnnaTenuzzo B, Carata E, Dini L (2013) Nanomaterials and Autophagy: New Insights in Cancer Treatment. *Cancers* 5: 296-319

Park K, Han S, Kim HJ, Kim J, Shin E (2006) HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* (48): 702–707

Pfeffer CM, Singh ATK (2018) Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Science* 19: 448-458

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008) Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science* 4(2): 89-96

Phaniendra A, Babu Jestadi D, Periyasamy L (2015) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem* 30(1): 11–26

Prylutska S, Grynyuk I, Matyshevska O, Prylutskiy Y, Evstigneev M, Scharff P, Ritter U (2014) C60 fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment. *Drugs RD*, 14: 333-340

Prylutska SV, Burlaka AP, Klymenko PP, Grynyuk I, Prylutskiy YI, Schütze C, Ritter U (2011) Using water-soluble C60 fullerenes in anticancer therapy. *Cancer Nano* 2: 105–110

Ramírez KS, Rodríguez JM, González SB (2016) Molecular mechanisms of autophagy and its role in cancer development. *Rev. Fac. Med.* 64(3): 529-35

Raza K (2015) C60 Fullerenes for Delivery of Docetaxel to Breast Cancer Cells: A promising approach for enhanced efficacy and better pharmacokinetic profile. *International Journal of Pharmaceutics* 495(1): 551-559

Rieger P (2004) The biology of cancer genetics. *Seminars in Oncology Nursing* 20(3): 145-154

Rossner PJ, Gammon MD, Zhang YJ, Terry MB, Hibshoosh H, Memeo L (2009) Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. *Journal of Cell and Molecular Medicine* 13: 3847-57

Saha S, Panigrahi DP, Patil S, Bhutia SK (2018) Autophagy in health and disease: a comprehensive review. *Biomed Pharmacother* 104: 485-95

Santana-Codina N, Mancias JD, Kimmelman AC, (2017) The Role of Autophagy in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology* 1: 19-39

Scorilas A, Trangas T, Yotis J, Pateras C, Talieri M (1999) Determination of c-myc amplification and overexpression in breast cancer patients: evaluation of its prognostic value against c-erbB-2, cathepsin-D and clinico pathological characteristics using univariate and multivariate analysis. *British Journal of Cancer* 81(8): 1385–1391

Sharma GN, Dave R, Sharma KK (2010) Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology&Research* 1(2): 109-126

Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L (2017) Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular Oncology* 12: 3–20

Singh S, Rajendran R, Kuroda K, Isogai E, Krstic-Demonacos M, Demonacos C, (2016) Oxidative stress and breast cancer biomarkers: the case of the cytochrome P450 2E1. *J Cancer Metastasis Treat* 2: 268-276

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute* 53(3): 661-674

Sprang SR (2016) Activation of G proteins by GTP and the mechanism of G α -catalyzed GTP hydrolysis. *Biopolymers* 105(8): 449–462

Starkov AA (2008) The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *National of Health Institutes* 1147: 37–52

Stefano DD, Carnuccio R, ChiaraMaiuri M (2012) Nanomaterials Toxicity and Cell Death Modalities. *Journal of Drug Delivery*, s. 1-14

Stern ST, Johnson DN (2008) Role for nanomaterial-autophagy interaction in neurodegenerative disease. *Autophagy* 4(8): 1097-1100

Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 20: 5971-5981

Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre- autophagosomal structure organization. *Genes to Cells* 12: 209–218

Suzuki S, Okada M, Shibuya K, Seino M, Sato A, Takeda H (2015) JNK suppression of chemotherapeutic agents-induced ROS confers chemoresistance on pancreatic cancer stem cells. *Oncotarget* 6: 458-470

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (2018) Türkiye Kanser İstatistikleri, Ankara

Tseng YS, Tzeng CC, Chiu AWH, Lin CH, Won SJ, Wu C, Liua HS (2003) Ha-ras over expression mediated cell apoptosis in the presence of 5-fluorouracil. *Experimental Cell Research* 288: 403–414

Ulloa E (2013) Fullerenes and their Applications in Science and Technology. *Introduction to Nanotechnology Conference*, p. 1–5

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1–40

Van Cruchten S, Van den Broeck W (2002) Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anat. Histol. Embryol* 31: 214–223

Wang F, Jin C, Liang H, Tang Y, Zhang H, Yang Y (2014) Effects of fullerene C60 nanoparticles on A549 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37(2): 656-661

Wei Y, Yang P, Cao S, Zhao L (2018) The combination of curcumin and 5-fluorouracil in cancer therapy. *Archives of Pharmacal Research* 41: 1–13

Wohlhuete RM, McIvor RS, Plagemann PGW (1980) Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid to cultured mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology* 104(3): 309-319

Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X (2013) The ULK1 complex sensing nutrient signals for autophagy activation *Autophagy* 9: 124–137

Xie JM, Li B, Yu HP, Gao QG, Li W, Wu HR, Qin ZH (2014) TIGAR Has a Dual Role in Cancer Cell Survival through Regulating Apoptosis and Autophagy. *Cancer Research* 74: 5127-5138

Yang J, Zhang Q, Liu T (2010) Autophagy facilitates anticancer effect of 5-fluorouracil in HCT-116 cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 14(5):1141-1147

Yoshida K, Miki Y (2004) Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science* 95(11): 866-871

Zenonos K, Kyprianou K (2013) RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncology* 5(5): 97-101

Zhi G, Wang X, Liyu T, Yang N, Sun Y, Hao Li CL, Sun X (2014) Morphine improved the antitumor effects on MCF-7 cells in combination with 5-Fluorouracil. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 68(13): 299-305

Zhou Zh (2013) Liposome formulation of fullerene-based molecular diagnostic and therapeutic agents, *Pharmaceutics* 5: 525-541

Zogovic NS, Nikolic NS, Vranjes-Djuric SD, Harhaji LM, Vucicevic LM, Janjetovic KD, Misirkic MS, Todorovic-Markovic BM, Markovic ZM, Milonjic SK, Trajkovic VS (2009) Opposite effects of nanocrystalline fullerene (C60) on tumour cell growth in vitro and in vivo and a possible role of immune suppression in the cancer-promoting activity of C60, *Biomaterials* 30(36): 6940-6946

ÖZGEÇMİŞ

Havva AYBEK 08.08.1984 yılında Bingöl'de doğdu. Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümün'de 2003-2007 yılları arasında okudu. 2008-2010 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2014-2015 Eğitim-Öğretim yılında Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora programına başladı. Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Eczane Hizmetleri Programında Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir. Evli ve iki çocuk annesidir.