

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

DİKUMAROLÜN BİR ANTİKANSER AJANI OLARAK MİTOTİK VE MAYOTİK
HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİ

Duru Aras

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Alp Can

Eş Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Özgür Çınar

Haziran

2014

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Duru Aras

İmzası



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ DEĞERLENDİRME VE SINAV
TUTANAĞI

BİYOTEKNOLOJİ

I. ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: Duru Aras

NUMARASI: 10420124

ANABİLİM DALI: Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı

DANIŞMANI: Prof.Dr. Alp Can

PROGRAMI: DOKTORA

TEZİN ADI: Dikumarolün Bir Anti Kanser Ajanı Olarak Mitotik ve Mayotik Hücreler Üzerine Etkileri

II. TOPLANTI BİLGİLERİ

İLGİ : Enstitü Yönetim Kurulunun 30/05/2014 tarih ve 9912 sayılı toplantısında oluşturulan jüri

TOPLANTI TARİHİ : 06/06/2014

SAATİ : 14 : 00

TOPLANTI YERİ : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Seminer Salonu

III. DEĞERLENDİRME VE SONUÇ

- ☐ Kişisel raporların tartışılması sonucunda savunmaya değer bulunan ve aday tarafından başarıyla savunulan tezin **KABUL EDİLMESİNE**
- ☒ Kişisel raporların tartışılması sonucunda tezin **DÜZELTİLDİKTEN** sonra savunulmasına
- ☐ Kişisel raporların tartışılması sonucunda savunmaya değer bulunmayan tezin **REDDEDİLMESİNE**

☒ OY BİRLİĞİ

☐ OY ÇOKLUĞU ile karar verildi.

İmza Ördemli Prof.Dr. Zekir Korkusuz

BASKAN

Prof.Dr. Esra Embeli (Unvan, Ad, Soyad, İmza)

ÜYE

(Unvan, Ad, Soyad, İmza)

Prof.Dr. Serim Aydin

ÜYE

(Unvan, Ad, Soyad, İmza)

Prof.Dr. Halil Özdoy

(Unvan, Ad, Soyad, İmza)

Prof.Dr. Alp Can

ÜYE

(Unvan, Ad, Soyad, İmza)

- EK: 1) Kişisel Raporlar
2) Tez savunma sınav duyurusu
3) Katılım Listesi

Detaylı Bilgi İçin : TEL: Santral: 0(312) 215 90 01-08

WEB: <http://www.biotech.ankara.edu.tr/>

Ens.Sek. 3446; Öğr.İşl. 3449-3459;

e-mail: biotech@ankara.edu.tr

Evrak 3442

Mali İşl. 3458

ÖZET

Doktora Tezi

Dikumarolün Bir Antikanser Ajanı Olarak Mitotik ve Mayotik Hücreler Üzerine Etkileri

Duru Aras

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Alp Can

Çeşitli kanser hücre hatlarında bazı kumarin türevlerinin antikanser etki gösterdiği bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bir kumarin türevi olan dikumarolün çeşitli kanser hücre hatlarında hücre çoğalmasını baskıladığını, bazı antikanser ajanlarının sitotoksik etkilerini değiştirdiğini ve pankreas kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü arttırdığını ortaya koymaktadır. Yaygın olarak kullanılan bazı antikanser ajanları gonad yetmezliğine ve buna bağlı olarak infertiliteye neden olmaktadır. Çalışmamızda dikumarolün bir antikanser ajanı olarak klinik kullanım potansiyelinin doğurganlığın korunması yönünden değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla dişi BALB/c farelerin ovaryumlarından ovositler ve bunları barındıran granüloza hücreleri izole edilmiştir. Dikumarol uygulanan ovositlerin in vitro matürasyonları izlenerek, metafaz-II aşamasına ulaşan ovositler mayoz mekiği ve kromozom morfolojileri açısından değerlendirilmiştir. Dikumarolün granüloza hücrelerinde hücre çoğalması, canlılık oranları ve apoptotik hücre ölümüne etkileri Vero (maymun böbrek epiteli) ve MCF-7 (insan meme kanseri) hücre hatlarıyla karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. İntraperitoneal olarak dikumarol uygulanan farelerde ovaryumun farklı bileşenlerinde apoptozun değişimi incelenmiştir.

Çalışmamızda dikumarolün Vero ve MCF-7 hücrelerinde hücre çoğalmasını baskıladığı, canlılık oranlarını düşürdüğü ve apoptotik hücre ölümünü arttırdığı gözlenmiştir. Doz ve süre bağımlı bu etkiler granüloza hücrelerinde izlenmemiştir. İn vivo veya in vitro dikumarol uygulamasının ovosit matürasyonunu engellemediği belirlenmiştir. Metafaz-II evresine ulaşan ovositlerde mayoz mekiği ve kromozom morfolojileri normal görünümde izlenmiştir. İn vivo dikumarol uygulanan farelerin ovaryumlarında apoptotik hücre ölümünde bir artışa rastlanmamıştır. Hücre bölünmesi üzerine etkili olması beklenen bir antikanser ajanının hücre çoğalmasını baskılarken ve/veya hücre ölümünü uyarırken sağlıklı hücrelere zarar vermemesi istenir. Bu çerçeveden bakıldığında elde ettiğimiz bulgular dikumarolün ideal bir antikanser ajanı olduğunu ortaya koymaktadır.

Dikumarol bir hücre içi oksidoredüktaz olan NQO1'in inhibitörüdür. Son yıllarda dikumarolün mikrotübülüsleri stabilize edebildiği öne sürülmektedir. Farklı çalışmalar dikumarolün antikanser etkilerini NQO1 proteininin inhibisyonu veya mikrotübülüs stabilizasyonu ile açıklamaktadır. Çalışmamızda her iki hipotez de şu gerekçelerle reddedilmiştir: 1) Vero hücrelerinde NQO1 ifadesine rastlanmamıştır. 2) Dikumarol uygulanan Vero, MCF-7 ve granüloza hücrelerinde mitozun duraklamadığı gösterilmiştir. 3) Dikumarol uygulanan germinal vezikül evresindeki ovositler mayoz bölünmelerini tamamlamıştır. Çalışmamızda Vero ve MCF-7 hücreleri kültür ortamında hızlı çoğalan, granüloza hücreleri ise yavaş çoğalan hücreler olarak tanımlanmıştır. Buna göre dikumarolün antikanser etkileri hücrelerin çoğalma hızlarıyla ilişkili olabilir. İlerleyen çalışmalarda bu ilişkiyi düzenleyen moleküler mekanizmaların aydınlatılması literatüre önemli katkı sağlayacaktır.

2014, 107 sayfa

Anahtar kelimeler: Dikumarol, Meme kanseri, İnfertilite, NQO1, Mikrotübülüs, Mitoz, Mayoz

ABSTRACT

PhD Thesis

Effects of Dicoumarol on Mitotic and Meiotic Cells as an Anticancer Agent

Duru Aras

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Alp Can

It is known that certain coumarin derivatives indicate anticancer effects at various cancer cell lines. Recent studies suggest that dicoumarol, a coumarin derivative, suppresses cell proliferation in various cancer cell lines, changes cytotoxic effects of certain anticancer agents and increases apoptotic cell death at pancreatic cancer cells. Some widely used anticancer agents consequently lead to gonadal failure and thus infertility. This study targets to assess the potential clinical use of dicoumarol as an anticancer agent in terms of fertility preservation. For this purpose, oocytes and surrounding granulosa cells were isolated from the ovaries of female BALB/c mice. In vitro maturation of dicoumarol treated oocytes were monitored. Metaphase-II stage oocytes were examined in terms of meiotic spindle and chromosome morphology. Dicoumarol's effects on cell proliferation, viability and apoptotic cell death in granulosa cells, as well as Vero (monkey kidney epithelial) and MCF-7 (human breast cancer) cell lines were determined. Apoptotic changes in the ovaries of dicoumarol treated mice were marked.

The study has shown that dicoumarol suppresses cell proliferation, decreases viability and increases apoptotic cell death in Vero and MCF-7 cells. The dose and duration dependent effects were not observed in granulosa cells. It is also determined that in vivo or in vitro dicoumarol application doesn't block oocyte maturation. Meiotic spindle and chromosome morphology of metaphase-II stage oocytes were normal. Ovaries of dicoumarol treated mice had shown no significant change in apoptosis. Cell division targeted anticancer agents are expected to inhibit cell proliferation and/or induce cell death without damaging healthy cells. From this point of view our findings reveal that dicoumarol is an ideal anticancer agent.

Dicoumarol is an inhibitor of NQO1 protein which is an intracellular oxidoreductase. In recent years it has been suggested that dicoumarol is able to stabilize microtubules. Different studies disclose the anticancer effects of dicoumarol as the inhibition of NQO1 or the stabilization of microtubules. In our study both hypothesis were rejected due to following reasons: 1) No NQO1 expression was observed in Vero cells. 2) No pause in mitosis has been shown in dicoumarol treated Vero, MCF-7 or granulosa cells. 3) Dicoumarol treated germinal vesicle stage oocytes has completed meiosis in given time. In our study Vero and MCF- 7 cells were described as rapidly proliferating cells in culture media, where granulosa cell proliferation is gradually slow. Accordingly dicoumarol's anticancer effects may be associated with the proliferative properties of the cells. Following studies enlightening the molecular mechanisms regulating this relationship will provide an important contribution to the literature.

2014, 107 pages

Keywords: Dicoumarol, Breast cancer, Infertility, NQO1, Microtubulus, Mitosis, Meiosis

TEŞEKKÜR

2010 yılında çıktığım bu yolda sona yaklaşırken; beni ailesinin bir ferdinden ayırmayan, desteğini her koşulda hissettiğim, örnek insan ve değerli danışmanım **Prof. Dr. Alp Can'a**, bilime tutkuyla, bana sabır ve anlayışla yaklaşan değerli eş danışmanım **Doç. Dr. Özgür Çınar'a**, yaratıcı zekası ve samimiyetini benden esirgemeyen değerli hocam **Uzm. Dr. Sinan Özkavukcu'ya**, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam **Doç. Dr. Çiler Çelik Özenci'ye**, bana olan güvenine layık olmaya çalıştığım değerli hocam **Doç. Dr. Lale Delilbaşı'na**, birlikte çok şey paylaştığım değerli çalışma arkadaşlarım **Banu Boz, Zeynep Çakar ve Dr. Zeynep Gülhan'a**, değerli ekip arkadaşlarım **Reza Dastouri, Hakan Coşkun ve Dr. Deniz Balcı'ya**, benden destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen **Dr. Aynur Karadağ'a**, sevgili öğrencilerim **Burcu Çetinkaya ve Betül Koca'ya**, sorularımı hiçbir zaman cevapsız bırakmayan **Dr. Günseli Deniz ve Dr. Tülin Özkan'a**, başta **Prof. Dr. Sümer Aras** olmak üzere öğrencisi olduğum **Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü** öğretim üyeleri, uzmanları, asistanları ve personeline, değerli dönem arkadaşlarım **Nazlı Sözmen, Sezen Güntekin, Mehmet Altay Ünal, Aslı Fazlıoğlu ve Aslı Dağeri'ne**, tez çalışmamı yürüttüğüm **Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı** öğretim üyeleri, uzmanları, asistanları ve teknisyenlerine, tez çalışmamı SBAG kodlu ve 109S415 numaralı projeye destekleyen **TÜBİTAK'a**, akademik dünyadan uzak, bana yakın dostlarım **Aslı Gözlükaya ve Selin Akkoç'a**, İsviçre'den kalbime dokunabilen, her geçen gün daha çok özlenen **Eylül Tuncer'e**, benden sevgi ve şefkatini hiçbir zaman esirgemeyen, ilham kaynağım **Bahadır Tosun'a** ve başta beni her koşulda seven ve koruyan, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili annem ve babam **Türkan ve Halim Aras** olmak üzere bu süreçte bana sabır ve anlayışla yaklaşan tüm aileme ve dostlarıma teşekkür ederim.

Sözlerimi tamamlarken bizlere ilimin en hakiki mürşit olduğunu öğreten ulu önderimizi şükranla anıyorum. Ey büyük Atatürk; açtığın yolda, gösterdiğin hedefe durmadan yürüyeceğime and içerim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER DİZİNİ.....	11
1. GİRİŞ	13
2. KURAMSAL TEMELLER	15
2.1. Dişi Üreme Sistemi	15
2.1.1. Foliküler Gelişim ve Ovulasyon	15
2.1.2. Mayoz Bölünme	18
2.2. Hücre Döngüsü ve Denetim Mekanizmaları.....	20
2.2.1. Mitoz Bölünme.....	25
2.3. Programlı Hücre Ölümü (Apopitoz)	28
2.4. Kanser Gelişimi ve Tedavi Yöntemleri	33
2.4.1. Kanser Tedavilerinde Mikrotübülüslerin Stabilizasyonu	35
2.4.1.1. Dikumarol.....	37
2.5. Kanser Hastalarında Doğurganlığın Korunmasına Yönelik Tedaviler	39
3. GEREKÇE VE AMAÇ.....	41
4. MATERYAL VE YÖNTEM	43
4.1. MATERYAL	43
4.1.1. Dikumarol Çözeltilisinin Hazırlanması ve Fizyolojik pH'da Çözünürlüğünün Kontrolü.....	43
4.1.2. Granüloza Hücrelerinin ve Ovositlerin İzolasyonu	44
4.1.3. Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinin Kültürü, Sayımı ve Canlılık Analizleri	44
4.1.4. Ovositlerin Kültürü	45
4.1.4.1. Mikroenjeksiyon	45
4.1.4.2. İn vitro matürasyon	45
4.1.5. Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinde İmmünoflüoresan İşaretlemeler.....	45
4.1.5.1. Fiksasyon	45
4.1.5.1. Çoğalan hücrelerin işaretlenmesi	46
4.1.5.2. DNA kırıklarının işaretlenmesi	46
4.1.5.3. Fosfotidilserin moleküllerinin işaretlenmesi.....	46
4.1.5.4. NQO1 proteininin işaretlenmesi.....	46
4.1.5.5. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi	46
4.1.5.6. Görüntüleme.....	46
4.1.6. Ovositlerde İmmünoflüoresan İşaretlemeler.....	47

4.1.6.1. Fiksasyon	47
4.1.6.2. Mayoz mekiğinin işaretlenmesi	48
4.1.6.3. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi	48
4.1.6.4. Görüntüleme.....	48
4.1.7. OVARYUM DOKUSUNDA İMMÜNOFLÜORESAN İŞARETLEMELER.....	48
4.1.7.1. Fiksasyon	48
4.1.7.2. DNA kırıklarının işaretlenmesi	48
4.1.7.3. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi	49
4.1.7.4. Görüntüleme.....	49
4.1.8 VERO VE MCF-7 HÜCRELERİNDE WESTERN BLOT ANALİZLERİ.....	49
4.1.8.1. Protein izolasyonu	49
4.1.8.2. Protein miktarının hesaplanması.....	49
4.1.8.3. Proteinlerin jel elektroforezle ayrıştırılması	50
4.1.8.4. İmmünoablota	51
4.2. YÖNTEM	53
4.2.1. DİKUMAROL ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI VE FİZYOLOJİK PH'DA ÇÖZÜNÜRLÜĞÜNÜN KONTROLÜ.....	53
4.2.3. VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN KÜLTÜRÜ, SAYIMI VE CANLILIK ANALİZLERİ	54
4.2.3.1. Vero ve MCF-7 hücrelerinin kültürü, sayımı ve canlılık analizleri	54
4.2.3.2. Granüloza hücrelerinin kültürü, sayımı ve canlılık analizleri.....	55
4.2.4. OVOSİTLERİN KÜLTÜRÜ	55
4.2.4.1. Mikroenjeksiyon	55
4.2.4.2. İn vitro matürasyon	56
4.2.5. VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE İMMÜNOFLÜORESAN İŞARETLEMELER.....	56
4.2.5.1. Fiksasyon	56
4.2.5.2. Çoğalan hücrelerin işaretlenmesi	56
4.2.5.3. DNA kırıklarının işaretlenmesi	57
4.2.5.4. Fosfotidilserin moleküllerinin işaretlenmesi.....	57
4.2.5.5. NQO1 proteininin işaretlenmesi.....	57
4.2.5.6. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi	57
4.2.5.7. Görüntüleme.....	57
4.2.6. OVOSİTLERDE İMMÜNOFLÜORESAN İŞARETLEMELER.....	58
4.2.6.1. Fiksasyon	58
4.2.6.2. Mayoz mekiğinin işaretlenmesi	58
4.2.6.3. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi	58
4.2.6.4. Görüntüleme.....	58
4.2.7. OVARYUM DOKUSUNDA İMMÜNOFLÜORESAN İŞARETLEMELER.....	59
4.2.7.1. Fiksasyon	59
4.2.7.2. DNA kırıklarının işaretlenmesi	59
4.2.7.3. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi	59
4.2.7.4. Görüntüleme.....	59
4.2.8. VERO VE MCF-7 HÜCRELERİNDE WESTERN BLOT ANALİZLERİ.....	60
4.2.8.1. Protein izolasyonu	60
4.2.8.2. Protein miktarının hesaplanması.....	60
4.1.8.3. Proteinlerin jel elektroforezle ayrıştırılması	60
4.2.8.4. İmmünoablota	61
4.2.9. VERİLERİN ANALİZİ.....	62
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	63
5.1. VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA ÖZELLİKLERİ.....	63
5.2. DİKUMAROLÜN VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA ÖZELLİKLERİNE ETKİLERİ 65	

5.3. DİKUMAROLÜN VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE MİTOZA ETKİLERİ	70
5.4. DİKUMAROLÜN VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN CANLILIK ORANLARINA ETKİLERİ	73
5.5. DİKUMAROLÜN VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE APOPİTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİLERİ.....	76
5.6. DİKUMAROLÜN VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE NQO1 İFADESİNE ETKİLERİ	82
5.7. DİKUMAROLÜN OVOSİT MAYOZ MEKİĞİNE ETKİLERİ	84
5.8. DİKUMAROLÜN OVOSİT MATÜRASYONUNA ETKİLERİ.....	86
5.9. DİKUMAROLÜN OVARYUM DOKUSUNDA APOPİTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİLERİ	88
 6. TARTIŞMA VE SONUÇ	 90
6.1. DİKUMAROLÜN VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	90
6.2. DİKUMAROLÜN OVOSİTLER VE OVARYUM DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	95
6.3. SONUÇ	96
 KAYNAKLAR.....	 98
EK1: ETİK KURUL KARARI	102
 ÖZGEÇMİŞ	 103
 TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR.....	 106

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2.1.2.1. MAYOZUN EVRELERİ	19
ŞEKİL 2.1.2.2. OVOSİT MATÜRASYONUNUN FARKLI AŞAMALARI	19
ŞEKİL 2.1.2.3. MAYOZDA KROMOZOMLARIN DOĞRU AYRILAMAMASI	20
ŞEKİL 2.2.1. HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN EVRELERİ	22
ŞEKİL 2.2.2. DNA HASARINA P53 YANITI	23
ŞEKİL 2.2.1.1. M-SİKLİN YIKIMININ APC TARAFINDAN UYARILMASI	26
ŞEKİL 2.2.1.2. MİTOZUN EVRELERİ VE İNTERFAZ	27
ŞEKİL 2.2.1.3. METAFAZ/ANAFAZ GEÇİŞİNİN APC TARAFINDAN DENETİMİ	28
ŞEKİL 2.3.1. ÖNKASPAZLARIN YARIKILANMA YOLUYLA ETKİNLEŞMESİ	30
ŞEKİL 2.3.2. EKSTRİNSİK VE İNTRİNSİK YOLAK	31
ŞEKİL 2.3.3. BCL-2 PROTEİN AİLESİ ÜYELERİ VE APOPTOZLA İLİŞKİLERİ	32
ŞEKİL 2.4.1. KANSERİN MİKROEVİRİMSEL GELİŞİMİ	33
ŞEKİL 2.4.2. MİTOJENİK SİNYALLERE RAS VE MYC YANITI	34
ŞEKİL 2.4.1.1. MİKROTÜBÜLÜS YAPISI	36
ŞEKİL 4.2.1.1. DİKUMAROLÜN FARKLI KÜLTÜR ORTAMLARI VE PH'LARDA ÇÖZÜNÜRLÜK GRAFİĞİ	54
ŞEKİL 4.2.4.1.1. MİKROENJEKSİYON YÖNTEMİ	56
ŞEKİL 5.1.1. VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN ZAMANA KARŞI ÇOĞALMA EĞRİLERİ	63
ŞEKİL 5.2.1. ÇOĞALAN VERO VE MCF-7 HÜCRELERİNDE KI-67 İFADESİ	65
ŞEKİL 5.2.2. DİKUMAROL UYGULANAN VERO VE MCF-7 HÜCRELERİNDE KI-67 İFADESİNİN KONTROL GRUBUNA GÖRE DEĞİŞİMİ	66
ŞEKİL 5.2.3. VERO HÜCRE SİYİLLERİNİN DİKUMAROL DOZU VE ZAMANA BAĞLI DEĞİŞİM GRAFİĞİ	68
ŞEKİL 5.2.4. MCF-7 HÜCRE SİYİLLERİNİN DİKUMAROL DOZU VE ZAMANA BAĞLI DEĞİŞİM GRAFİĞİ	69
ŞEKİL 5.2.5. DİKUMAROLÜN VERO VE MCF-7 HÜCRELERİ İÇİN IC-50 DEĞERİNİN HESAPLANMASI	70
ŞEKİL 5.2.6. GRANÜLOZA HÜCRE SİYİLLERİNİN DİKUMAROL DOZU VE ZAMANA BAĞLI DEĞİŞİM GRAFİĞİ	70
ŞEKİL 5.3.1. A.VERO, B.MCF-7 VE C.GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE MİTOTİK HÜCRE SİYİLLERİNİN DİKUMAROL DOZUNA BAĞLI DEĞİŞİM GRAFİĞİ	72
ŞEKİL 5.4.1. VERO HÜCRELERİNİN CANLILIK ORANLARININ DİKUMAROL DOZU VE ZAMANA BAĞLI DEĞİŞİM GRAFİĞİ	74
ŞEKİL 5.4.2. MCF-7 HÜCRELERİNİN CANLILIK ORANLARININ DİKUMAROL DOZU VE ZAMANA BAĞLI DEĞİŞİM GRAFİĞİ	75
ŞEKİL 5.4.3. GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN CANLILIK ORANLARININ DİKUMAROL DOZU VE ZAMANA BAĞLI DEĞİŞİM GRAFİĞİ	76
ŞEKİL 5.5.1. DİKUMAROL UYGULANAN VERO VE MCF-7 HÜCRELERİNDE TUNEL İŞARETLEMELERİ	77
ŞEKİL 5.5.2. A.VERO, B.MCF-7 VE C.GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE APOPTOTİK HÜCRE SİYİLLERİNİN DİKUMAROL DOZUNA BAĞLI DEĞİŞİM GRAFİĞİ (TUNEL)	79
ŞEKİL 5.5.3. DİKUMAROL UYGULANAN GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE ANNEXİN-V İŞARETLEMELERİ	80
ŞEKİL 5.5.4. DİKUMAROL UYGULANAN A.VERO, B.MCF-7 VE C.GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE APOPTOTİK HÜCRE SİYİLLERİNİN KONTROL GRUBUNA GÖRE DEĞİŞİMİ (ANNEXİN-V)	81
ŞEKİL 5.6.1. MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE NQO1 İFADESİ	82
ŞEKİL 5.6.2. DİKUMAROL UYGULANAN VERO VE MCF-7 HÜCRELERİNDE NQO1 PROTEİNİNİN MİKTARI (WESTERN BLOT)	83
ŞEKİL 5.6.3. DİKUMAROL UYGULANAN GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE NQO1 İFADESİNİN KONTROL GRUBUNA GÖRE DEĞİŞİMİ	83
ŞEKİL 5.7.1. DİKUMAROL VE PAKLİTAKSEL UYGULAMALARININ MAYOZ MEKİĞİNE ETKİLERİ	85
ŞEKİL 5.8.1. FARKLI YÖNTEMLERLE DİKUMAROL UYGULANAN OVOSİTLERİN MATÜRASYON ORANLARI	87
ŞEKİL 5.8.2. DİKUMAROL UYGULANAN FARELERDE OVOSİT MATÜRASYONU ORANLARI	88
ŞEKİL 5.9.1. DİKUMAROL UYGULANAN FARELERİN OVARYUM DOKUSUNDA TUNEL İŞARETLEMELERİ	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE 2.2.1. OMURGALILARDA HÜCRE DÖNGÜSÜNDE GÖREV ALAN BAŞLICA CDK'LER VE İLGİLİ SIKLIKLAR	22
ÇİZELGE 2.2.2. OMURGALILARDA HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN DENETİMİNDE GÖREV ALAN BAŞLICA PROTEİNLER	24
ÇİZELGE 2.2.2. (DEVAM) OMURGALILARDA HÜCRE DÖNGÜSÜNÜN DENETİMİNDE GÖREV ALAN BAŞLICA PROTEİNLER	25
ÇİZELGE 2.3.1. MEMELİLERDE BAŞLICA KASPAZLAR VE GÖREVLERİ	31
ÇİZELGE 2.4.1.1. MİTOTİK ZEHİRLERİN MİKROTÜBÜLSİNE BAĞLANMA BÖLGELERİNE GÖRE SINIFLANDIRILMASI	37
ÇİZELGE 2.4.1.2. MİTOTİK ZEHİRLERİN ETKİLİ OLDUKLARI KANSER TÜRLERİ VE BUNLARLA İLİŞKİLİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR	38
ÇİZELGE 5.1.1. VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN KENDİNİ İKİYE KATLAMA SÜRELERİNİN HESAPLANMASI	64
ÇİZELGE 5.1.1. (DEVAM) VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN KENDİNİ İKİYE KATLAMA SÜRELERİNİN HESAPLANMASI	64
ÇİZELGE 5.2.1. VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN DEĞİŞEN DİKUMAROL DOZLARINDA ZAMANA KARŞI ÇOĞALMA SONUÇLARI	67
ÇİZELGE 5.2.1. (DEVAM) VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN DEĞİŞEN DİKUMAROL DOZLARINDA ZAMANA KARŞI ÇOĞALMA SONUÇLARI	68
ÇİZELGE 5.3.1. VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN DEĞİŞEN DİKUMAROL DOZLARINDA MİTOTİK HÜCRE SAYISI SONUÇLARI	71
ÇİZELGE 5.4.1. VERO VE MCF-7 HÜCRELERİNİN DEĞİŞEN DİKUMAROL DOZLARINDA ZAMANA KARŞI CANLILIK SONUÇLARI	73
ÇİZELGE 5.4.1. (DEVAM) VERO VE MCF-7 HÜCRELERİNİN DEĞİŞEN DİKUMAROL DOZLARINDA ZAMANA KARŞI CANLILIK SONUÇLARI	74
ÇİZELGE 5.5.1. VERO, MCF-7 VE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN DEĞİŞEN DİKUMAROL DOZLARINDA APOPTOTİK HÜCRE SAYISI SONUÇLARI	78
ÇİZELGE 5.8.1. FARKLI YÖNTEMLERLE DİKUMAROL UYGULANAN OVOSİTLERDE MATÜRASYON SONUÇLARI	86
ÇİZELGE 5.8.2. DİKUMAROL UYGULANAN FARELERDE OVOSİT MATÜRASYONU SONUÇLARI	87
ÇİZELGE 6.1.1. DİKUMAROLÜN MİTOTİK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİNİN LİTERATÜRLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ	92
ÇİZELGE 6.1.1. (DEVAM) DİKUMAROLÜN MİTOTİK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİNİN LİTERATÜRLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ	93

SİMGELER DİZİNİ

µm	mikrometre
mm	milimetre
mM	milimolar
g	gram
mL	mililitre
N	normal
cm ²	santimetrekare
mm	milimetre
mM	milimolar
µL	mikrolitre
nm	nanomolar

Kısaltmalar

YÜT	Yardımla Üreme Teknikleri
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
FSH	Follicle Stimulating Hormone
LH	Luteinizing Hormone
KOK	Kumulus-Ovoforus Kompleksi
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
MI	Metafaz-I
MII	Metafaz-II
GV	Germinal vezikül
DNA	Deoksiribonükleik Asit
S	Sentez
M	Mitoz
G ₂	Gap 2
G ₁	Gap 1
G ₀	Gap 0
Cdk	Cyclin dependent kinase
Cdc	Cell division cycle
SCF	Skp, Cullin, F-box containing complex

APC	Anaphase Promoting Complex
MAP	Microtubule Associated Proteins (bkz. 2.1.1.)
Mad	Mitotic arrest deficient
Caspase	CysteinyI aspartic acid proteases
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
NuMA	Nuclear Mitotic Apparatus Protein
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase [TdT] dUTP Nick End Labeling
PS	Phosphotydlserine
ROS	Reactive Oxygen Species
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
BCL-2	B Cell Lymphoma
IAP	Inhibitors of Apoptosis
AIF	Apoptosis Inducing Factor
CAD	Caspase Activated DNase)
BH	BCL-2 Homology
GTP	Guanosine Triphosphate
MAP	Mitogen Activated Protein (bkz. 2.3.1.)
Rb	Retinablastoma
MCAK	Mitotic Centromere Associated Kinesin
NQO1	NAD(P)H Oxidoreductase 1
NAD(P)H	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
PMSG	Pregnant Mare's Serum Gonadotropin
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

1. GİRİŞ

Kanser dünyada en sık karşılaşılan ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır. 2007 yılında tüm dünyada gerçekleşen ölümlerin yaklaşık %13'ü kanserden kaynaklanmaktadır. Kanserın yol açtığı ölümlerin oranı Afrika'da (muhtemelen enfeksiyon ve kazalar nedeniyle gerçekleşen ölümlere bağılı olarak) yalnız %4'ken, Kuzey Amerika'da bu oran %23'e kadar çıkmaktadır. Her yıl tüm kanser tiplerine bağılı ölümlerin başında yılda 1,4 milyon ölümle akciğer kanseri gelmektedir. Bunu mide, karaciğer, kalın bağırsak ve meme kanserleri izlemektedir (1).

Artan kanser sıklığına karşılık olarak geliştirilen teknolojiler sağkalım oranlarını arttırmaktadır. Dünyada her yıl 10,9 milyon kişiye kanser tanısı konmaktadır. Son beş yıl içinde kanser tanısı konmuş kişilerden 24,6 milyonunun halen hayatta olduğı tahmin edilmektedir. Bu kişilerin yaklaşık yarısı Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da yaşamaktadır. En sık karşılaşılan kanserler akciğer, meme ve kalın bağırsak kanserleridir. Gelişmekte olan ülkelerde kansere yakalanma riskindeki artışın 2025 yılına kadar devam edeceği, gelişmiş ülkelerde ise sabit düzeyde kalacağı öngörülmektedir (2).

Kanser tedavisi temel olarak kanserin tipine ve evresine göre planlanır. Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan yöntemlerin başında tek başlarına veya birlikte uygulanabilen cerrahi, radyoterapötik ve kemoterapötik yöntemler gelmektedir (3). Bazı kanser türleri çeşitli radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarına karşı direnç geliştirmiştir veya geliştirmektedir (4). Kemoterapi uygulamalarının sık gözlenen bulantı, kusma, iştah kaybı, zayıflama, halsizlik ve kan hücrelerinde azalma gibi yan etkileri hastaların yaşam kalitelerini düşürmektedir. Bazı kanser ilaçlarının uygulandığı hastalarda tedaviden yıllar sonra lösemi gelişme riski artmaktadır (3). Yaygın olarak kullanılan bazı kanser ilaçları gonad yetmezliğine ve buna bağılı olarak infertiliteye neden olmaktadır (5-7).

İnfertilite bir yıldan uzun süreli düzenli cinsel ilişkiye karşın gebe kalamama durumu olarak tanımlanır . İnsanda infertilitenin giderilmesine yönelik tedavi yaklaşımları ilk kez 1978 yılında uygulanmaya başlamıştır. Yıllar içinde gelişen yeni teknikler ve teknolojiler günümüzde Yardımla Üreme Teknikleri (YÜT) başlığı altında toplanmıştır (8). Kelime

anlamı “dondurma yoluyla saklama” olan “kriyoprezervasyon” YÜT’de ilk kez 1776 yılında hayvan spermelerinde yavaş dondurma yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle dondurulan spermelerde çözme sonrası hareketlilik tespit edildiği 1938 yılında bildirilmiştir. İlerleyen yıllarda tavşan ovositlerinin kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiş, 1977 yılında dondurulup çözülen fare ovositleriyle fertilizasyon ve canlı doğumlar bildirilmiştir (9). İn vitro fertilizasyon (IVF) YÜT’de en sık kullanılan yöntemlerden birisidir (8). İnsanda IVF sonrası dondurulup çözülen embriyolarla ilk gebelik 1983 yılında ve ilk doğum 1984 yılında elde edilmiştir. İnsan ovositlerinin kriyoprezervasyonu embriyo dondurma işlemlerine alternatif olarak, doğabilecek etik ve yasal sorunların çözümü için geliştirilmiştir. Ancak halen uygulanmakta olan protokollerle elde edilen yetersiz canlılık ve fertilizasyon oranları yöntemin YÜT’de rutin olarak kullanımını kısıtlamaktadır. Buna karşın ovosit kriyoprezervasyonu prematür over yetmezliği, pelvik hastalıklar, ameliyat ve radyoterapi/ kemoterapi uygulamaları nedeniyle üreme kapasitesini kaybetme riski olan kadınlarda tek çözüm olarak gösterilmektedir (9). Çocukluk çağı kanserlerinde gametlerin dondurulması mümkün değildir. Son yıllarda gonadların kriyoprezervasyonu alanındaki gelişmeler çocukluk çağı kanserlerinde olduğu kadar, erişkin kadınlarda da doğurganlığın korunması yönünden umut vericidir (7); ancak bu alandaki klinik araştırmaların sayısı henüz yeterli sayıya ulaşmamıştır (9).

Çeşitli kanser türlerinin bazı kanser ilaçlarına karşı geliştirdiği direnç, kanser tedavilerinin yukarıda sözü edilen yan etkileri ve kanser hastalarında doğurganlığın korunmasına yönelik tedavi seçeneklerinin yetersizliği birlikte değerlendirildiğinde yeni antikanser ajanlarının tanımlanmasına olan ihtiyacın gün geçtikçe arttığı görülmektedir. Bu amaçla çalışmamızda son yıllarda öne çıkan yeni bir antikanser ajanı olan dikumarolün klinik kullanım potansiyeli kanser hastalarında doğurganlığın korunması yönünden ele alınmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Dişi Üreme Sistemi

2.1.1. Foliküler gelişim ve ovulasyon

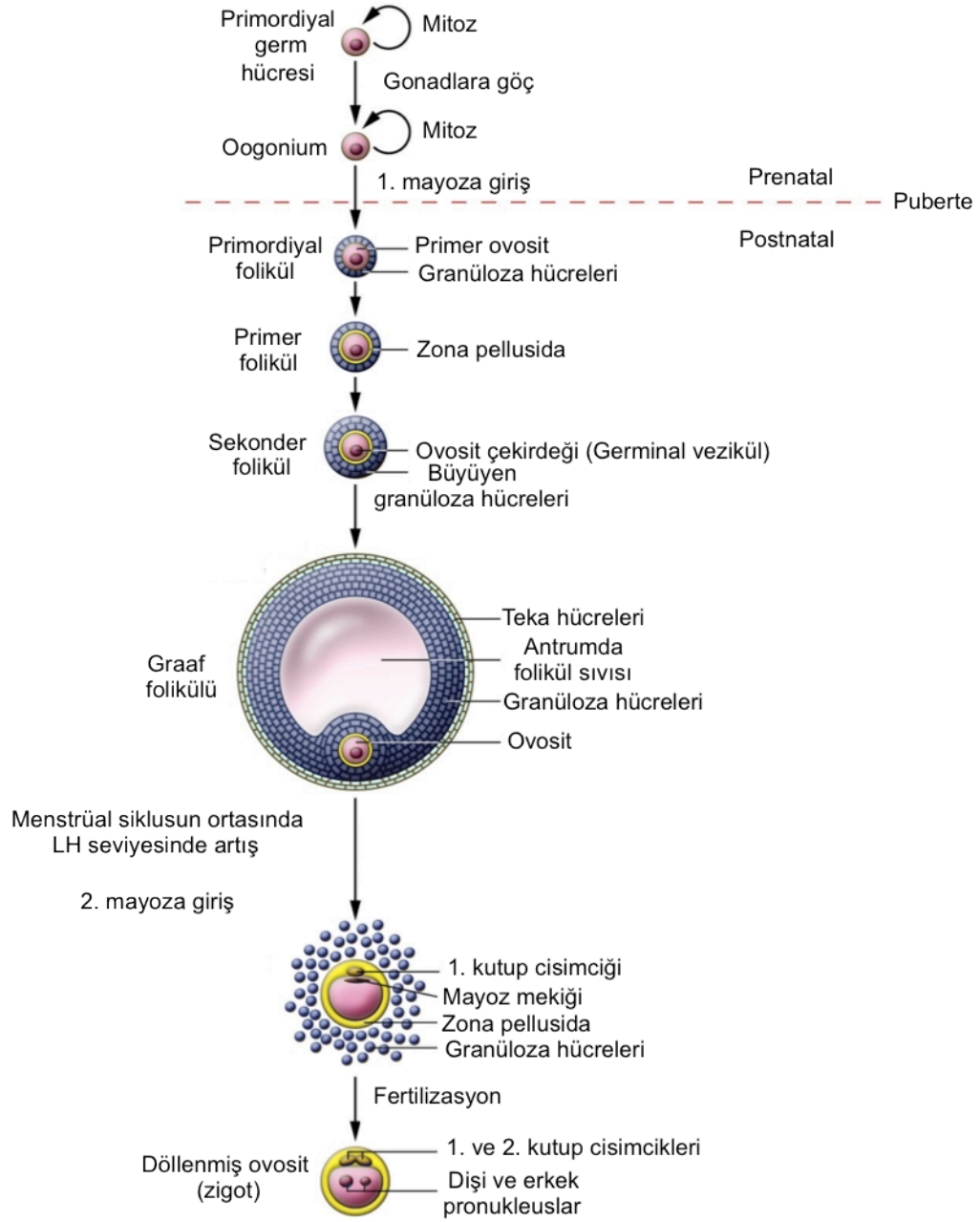
Dişi üreme sistemi bir çift ovaryum, bir çift tuba uterina, uterus, vajina ve dış genital organlardan oluşur. Ovaryumlar dıştan germinal epitel adı verilen tek katlı yassı bir epitelle çevrilidir ve korteks ve medulla olmak üzere iki bölüme ayrılmıştır. Medulla organın orta kısmında gevşek bağ dokusu yapısındadır ve kan damarlarından zengindir (8).

Embriyonik yaşam boyunca vitellus kesesini döşeyen endodermal hücreler gelişimin 6. haftasında ovaryumlara göç ederek *oogonia* (tekil; *oogonium*) adını alır. Oogonia ovaryumların korteksinde mitozla çoğalır ve folikül adı verilen özelleşmiş yapılar içine yerleşir. Yeni doğan bir kız çocuğunun ovaryumlarında yaklaşık 400.000 folikül bulunur. Foliküller gelişim evrelerine göre primordial foliküller, primer foliküller, sekonder foliküller ve Graaf folikülleri (olgun foliküller) olmak üzere dörde ayrılır. Ovaryan döngünün foliküler evresinde primordial folikülden Graaf folikülü gelişir (10) (Şekil 2.1.1.1.).

Ovaryum foliküllerinin gelişimi ve steroidogenez gonadotropinler (FSH; Follicle Stimulating Hormone ve LH; Luteinizing Hormone), ovaryum steroidleri ve foliküler hücrelerin otokrin ve parakrin salgılarıyla kontrol edilir. Puberteden sonra yalnız 400 folikül ovulasyona uğrar, geri kalanlar dejenere olur ve atretik folikül adını alır. Foliküler evre 6-12 ovositin gelişimiyle başlar. Bu gelişim FSH bağımlıdır. Döngünün 6. gününde yalnız bir folikül gelişimini sürdürür, diğerleri atrezi denilen bir olayla dejenere olur.

Primordial folikül en çok bulunan ve en küçük (25 µm çapında) foliküldür. Bu folikülde dişi gamet hücresi olan ovosit granüloza hücreleri de denilen yassı foliküler hücrelerle çevrilmiştir. Primordial foliküller fetal ovaryumda geliştikten sonra bir dinlenme evresine girer ve burada bekler. Bekleme evresinden çıkan foliküllere primer foliküller denir. Bunlar tek tabakalı veya çok tabakalı kübik granüloza hücreleriyle çevrili olabilir. Foliküler hücreler kendilerini ovaryumun stromasından ayıran bir bazal lamina tarafından

desteklenir. Primer folikül evresinde primer ovosit zona pellusida denilen glikoprotein bir kılıf sentezlemeye başlar. Zona pellusida granüloza hücrelerini ovositten ayırır.



Şekil 2.1.1.1. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi ve Ovosit Matürasyonu (11)

Kalınlaşan zona pellusida ve hormonal uyarılara yanıt olarak sürekli bölünen granüloza hücreleri sekonder folikülü oluşturur. Folikülü çevreleyen stromal hücreler teka denilen hücresel bir kapsül yapar. Bu kapsül daha sonra teka interna ve teka eksterna olmak üzere iki tabakaya ayrılır. Teka interna tarafından sentezlenen bir androjen öncülü testesteron üretimi için granüloza hücrelerine taşınır. Daha sonra testesteron aromataz enzimi tarafından östradiyole çevrilir. Teka eksterna bağ dokusundan oluşur ve ovaryum stromasıyla devam eder.

Bu sırada granüloza hücreleri arasında Call-Exner cisimleri denilen küçük hücreler arası boşluklar oluşur. Bu boşluklar folikül sıvısı içerir ve zamanla birleşerek daha büyük bir boşluk olan antrumu yapar. Antrumun oluşumuyla ovositi çevreleyen granüloza hücreleri yeniden düzenlenir; ovositle folikül duvarı arasında yer alan bir grup foliküler hücre kumulus ooforus adını alır. Ovositin bu hücrelerle birlikte oluşturduğu yapıya Kumulus-Ovoforus Kompleksi (KOK) denir.

Graaf folikülü en büyük foliküldür. 15-20 mm çapındadır. Ovulasyondan hemen önce primer ovosit folikül içinde eksentrik bir konum alır. Zona pellusidaya sıkıca yapışık tek sıralı foliküler hücreler korona radyata olarak adlandırılır. Graaf folikülünde ovosit korona radyatayla birlikte kumulus ooforustan ayrılır ve folikül sıvısı içinde serbestçe yüzer. Bu sırada foliküler hücreler sahip oldukları FSH reseptörlerine ek olarak LH reseptörleri kazanırlar.

Menstrual siklusun ortasında olgun folikül ovaryum yüzeyinden dışarı doğru bir çıkıntı yapar. LH düzeyinin aniden artması sonucu teka eksterna içinde başlayan proteolitik etkinlik Graaf folikülünün yırtılmasını kolaylaştırır. Ovosit ovaryum dışına atılarak ovaryumlara çok yaklaştıran uterus tüplerine gider. Bu olaya ovulasyon denir.

Ovulasyondan birkaç saat önce foliküler hücre tabakası ve teka interna hormon salgılayan bir bez olan korpus luteuma dönüşmeye başlar. Folikülün bazal membranı yıkılır. Başlangıçta damarsız olan foliküler hücre kümesi içine kan damarları girer. Antrum boşluğuna kan dolar ve pıhtılaşır yeni oluşmuş kan damarları fibroblastlar ve kollajen lifler tarafından istila edilir. Foliküler hücreler foliküler lutein hücrelere dönüşerek tipik olarak steroid sentezleyen hücre özellikleri gösterir ve FSH ve LH hormonlarına yanıt olarak

progesteron ve östrojen salgılar. Teka interna hücreleri de teka lutein hücrelerine dönüşerek LH uyarısına yanıt verir. Teka lutein hücrelerinden androstenediyon ve progesteron salgılanır. Androstenediyon daha sonra foliküler lutein hücrelerde östrodiyole çevrilir. Fertilizasyon olmamışsa korpus luteum ovulasyondan yaklaşık 14 gün önce gerileme evresine girer. Fertilizasyon ve devamında trofoblastlardan HCG (Human Chorionic Gonadotropin) salınımı korpus luteumu büyüme yönünde uyarır ve progesteron ve östrojen üretimi sürer (10).

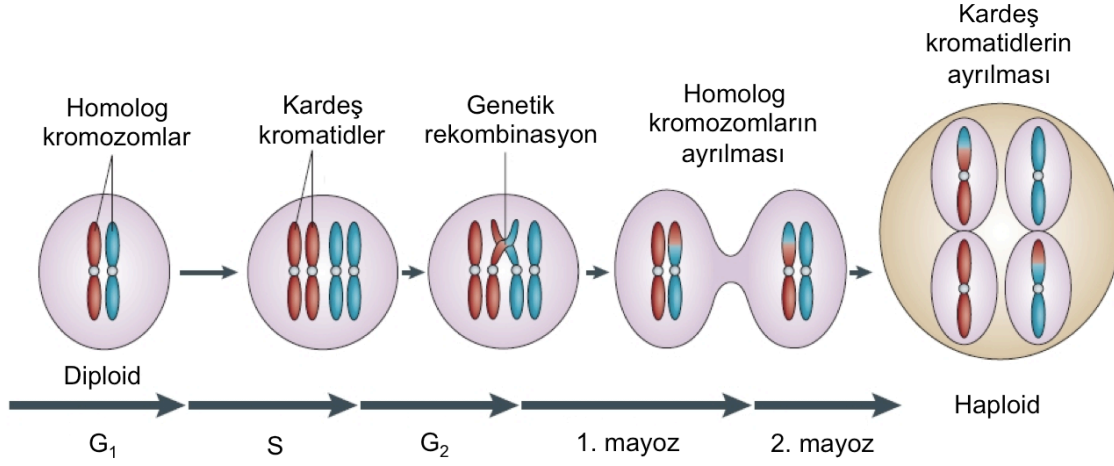
2.1.2. Mayoz Bölünme

Eşeyli üreyen organizmalarda kromozom takımları bir türün tüm üyelerinde ortak olan otozomal kromozomlardan ve cinsiyete göre farklılık gösteren cinsiyet kromozomlarından oluşur. Diploid ($2n$) bir hücre çekirdeğinde her kromozomun birbirine benzer iki tipi bulunur. Bunlar homolog kromozomlar olarak adlandırılır. Homolog kromozomlardan biri dişi ebeveynden, diğeri erkek ebeveynden kaynaklanır.

Somatik hücrelerin diploid, germ hücrelerinin ise haploid (n) sayıda kromozom içerdiği ilk kez 1883 yılında keşfedilmiştir. Buna göre germ hücreleri mitozdan farklı olarak kromozom sayısının yarıya indirildiği özelleşmiş bir bölünme türüne ihtiyaç duyar. Bu bölünme türü Yunanca'da azalmak anlamına gelen *meiosis* (mayoz) olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.1.2.1.). Mayoz bölünmede hücre döngüsünün S evresinde kopyalanan DNA önce homolog kromozomlarına (metafaz-I; MI), ardından kardeş kromatidlerine (metafaz-II; MII) ayrılır. 1. mayoz bölünmenin profaz evresinde homolog kromozomlar arasında genetik rekombinasyon gerçekleşir. Yeni doğacak bireyler arasında genetik çeşitliliği sağlayan bu olay eşeyli üremenin doğal seçimdeki en önemli avantajlarından biridir.

Dişide doğumdan sonra puberteye kadar ve pubertede foliküler evre boyunca profaz-1'de bekleyen ovosit birinci mayoz bölünmesini ovulasyondan hemen önce tamamlar. Birinci mayoz bölünme sonunda sekonder ovosit ve 1. kutup cisimciği oluşur. Sekonder ovosit MII evresine ulaştığında mayoz bölünme durur. Fertilizasyon gerçekleştiğinde sekonder ovosit haploid duruma ulaşmak üzere ikinci mayoz bölünmeyi tamamlar ve 2. kutup cisimciğini oluşturur. Kutup cisimciklerinin varlığı ovositin mayozun hangi evresinde olduğunun anlaşılmasına yardımcı olur. MII evresindeki fertilizasyona hazır ovositler olgun (matür)

ovositler, MI evresindeki ve çekirdek zarının henüz yıkılmadığı germinal vezikül (GV) evresindeki ovositler olgun olmayan (immatür) ovositler olarak sınıflandırılır. GV evresinden MII evresine uzanan bu süreç ovosit matürasyonu olarak bilinir (Şekil 2.4.1.1. ve 2.1.2.2.).



Şekil 2.1.2.1. Mayozun Evreleri (12)

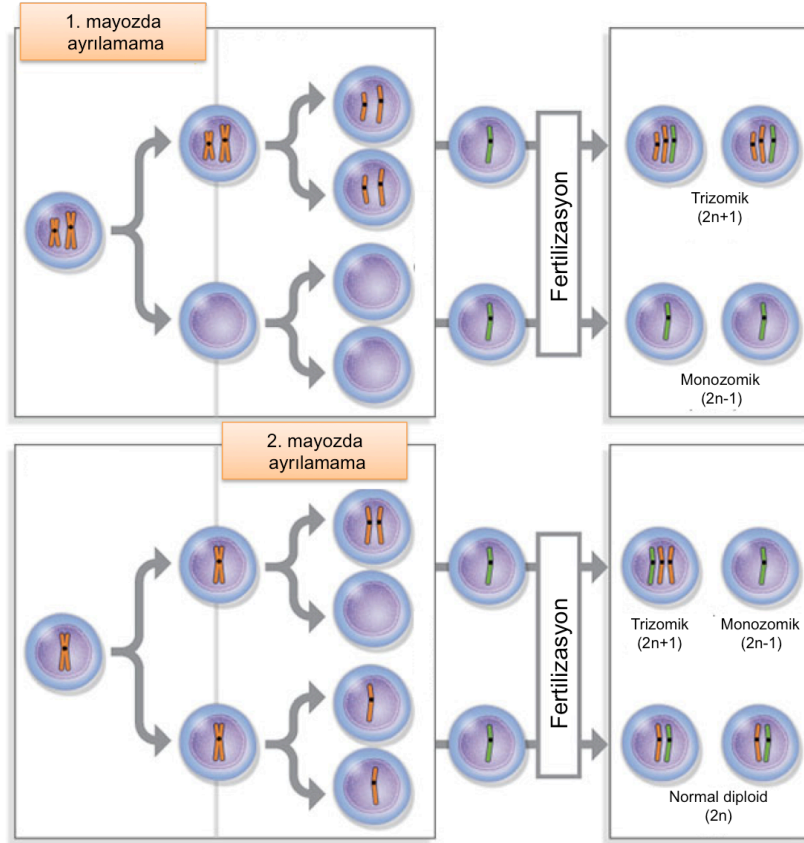


Şekil 2.1.2.2. Ovosit Matürasyonunun Farklı Aşamaları

Solda GV, ortada MI ve sağda MII evresinde insan ovositlerinin invert mikroskop görüntüleri izlenmektedir.

Bazen mayoz sırasında kromozomlar dört haploid hücreye eşit olarak dağılmaz. Bu gibi olağan dışı mayoz bölünmeler birinci veya ikinci metafazda kromozomların düzgün ayrılamamasından kaynaklanır (Şekil 2.1.2.3.). Bu tür ayrılma hatalarının birçoğu dişilerde gerçekleşir ve ilerleyen anne yaşıyla artar. İnsanda hatalı ayrılma sıklığının yüksek oluşu

(mayoz bölünmelerin yaklaşık %10'u) yüksek orandaki erken gebelik kayıplarının bir nedeni olabilir.



Şekil 2.1.2.3. Mayozda kromozomların doğru ayrılamaması

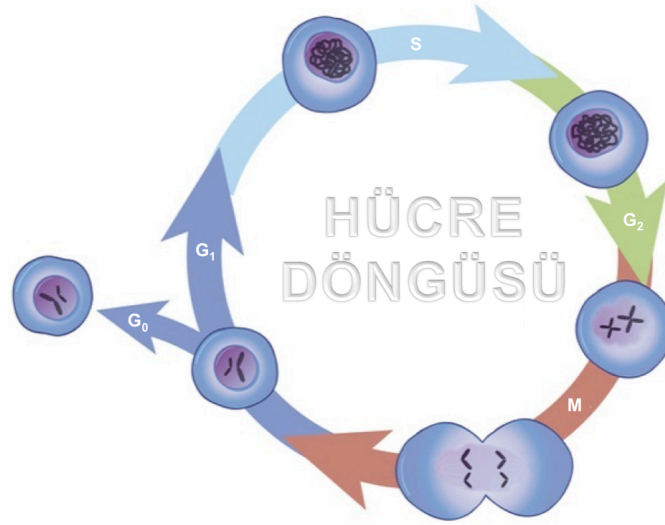
Gerek somatik hücreler, gerekse germ hücreleri bölünmeden önce hücre döngüsü olarak bilinen ve sıkı denetim mekanizmalarıyla kontrol edilen bir hazırlık evresinden geçer.

2.2. Hücre Döngüsü ve Denetim Mekanizmaları

Canlı organizmalar genetik bilgiyi sonraki nesillere aktararak kendilerini çoğaltırlar. Hücre kendi başına çoğalan en küçük birimdir ve bütün canlı türlerinde genetik bilginin aktarımını sağlar. Canlı organizmaların birçoğu tek hücrelidir, diğerleri hücre gruplarının özelleşerek farklı görevler üstlendiği büyük ve çok hücreli yapılardır. Gerek bakteriler gibi basit tek hücreli canlılar, gerekse insan gibi karmaşık çok hücreli canlılar başlangıçta tek bir hücrenin bölünmesiyle oluşurlar. Hücre döngüsü hücrenin büyüklüğünün ve içeriğinin iki katına çıktığı ve ardından hücre bölünmesinin gerçekleştiği olaylar dizisidir. Hücre

döngüsünün en temel işlevi genetik olarak eş iki yavru hücrenin oluşumudur. Genetik materyal olan DNA'nın kopyalanması hücre döngüsünün S (Sentez) evresinde gerçekleşir. Tipik bir memeli hücresinde S evresi 10-12 saat sürer, bu süre hücre döngüsünün yaklaşık olarak yarısıdır. S evresini kardeş kromatidlerin zıt kutuplara ayrıldığı ve hücrenin bölündüğü M (Mitoz) evresi izler. M evresi tipik bir memeli hücresinde bir saatten kısa sürede tamamlanır. Ökaryotlarda S/M evreleri arasında G_2 (Gap 2) ve M/S evreleri arasında G_1 (Gap 1) evreleri hücrenin protein kütlesini ve organellerini iki katına çıkarması ve hacimce büyümesi için gereklidir. G_1 evresinin sonunda hücre dışı koşulların uygunluğuyla büyüme ve bölünme sinyallerinin varlığı denetlenir. Koşullar elverişli, büyüme ve bölünme sinyalleri mevcutsa hücre döngüsü S evresiyle devam eder. Koşullar elverişli değilse hücre G_1 evresini yavaşlatabilir veya G_0 (Gap 0) evresine geçebilir. G_0 evresi hücrenin yeniden çoğalmaya başlamadan önce günler, haftalar ve hatta yıllar boyunca kalabileceği özel bir durgunluk evresidir. G_1 , S ve G_2 evreleri bir arada interfaz adını alır. İnterfaz 24 saatlik bir hücre döngüsünün yaklaşık 23 saatini oluşturur. G_0 evresi hücre veya organizma ölünceye kadar sürebilir (13) (Şekil 2.2.1.).

Ökaryotlarda hücre döngüsü karmaşık bir düzenleyici protein ailesi tarafından yönetilir. Siklin bağımlı kinazlar (Cdk; Cyclin dependent kinase) ve bunlara bağlanan siklinler bu proteinlerin başında gelir. Siklinler bağlandıkları Cdk'nin üç boyutlu yapısını değiştirerek hücre döngüsünde işlev gören proteinlerin fosforilasyonunu sağlarlar (14). Omurgalılarda hücre döngüsünde görev alan başlıca Cdk'ler ve ilgili siklinler Çizelge 2.2.1.'de özetlenmiştir. Görüldüğü gibi birden fazla siklin aynı Cdk'ye bağlanabilir. Cdk substratlarına erişebilirlik hücre döngüsü boyunca değişir (Örneğin M evresinde görev alan bazı proteinler fosforillenme için yalnız G_2 evresinde mevcuttur). Böylece farklı hücre döngüsü olayları farklı Cdk-siklin kompleksleri tarafından yönetilir. Omurgalılarda siklinler Cdk'lere bağlandıkları hücre döngüsü evresine göre dört sınıfa ayrılırlar: G_1 -siklinler, G_1 /S-siklinler, S-siklinler ve M-siklinler. G_1 -siklinler ve G_1 /S-siklinler G_1 evresinin sonunda hücreyi DNA kopyalamasına yönlendirirler. S-siklinler DNA kopyalamasının başlamasından ve M-siklinler mitozun ilerlemesinden sorumludurlar (13).

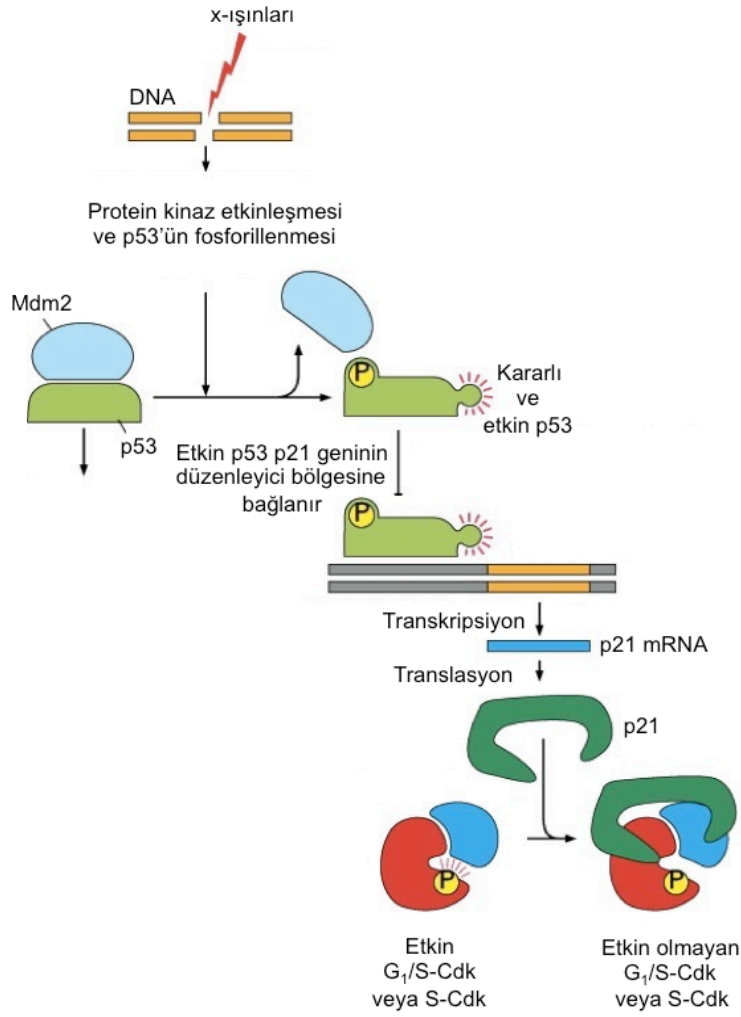


Şekil 2.2.1. Hücre Döngüsünün Evreleri (12)

Çizelge 2.2.1. Omurgalılarda Hücre Döngüsünde Görev Alan Başlıca Cdk'ler ve İlgili Siklinler (13)

Hücre döngüsü evresi	Cdk	İlgili siklin
G ₁	Cdk4, Cdk6	Siklin D (Memelilerde D1, D2 ve D3)
G ₁ /S	Cdk2	Siklin E
S	Cdk2	Siklin A
M	Cdk1	Siklin B

Memelilerde DNA hasarına duyarlı denetim noktaları geç G₁ ve geç G₂ evrelerinde S ve M evrelerine geçişi düzenlerler. Geç G₁ evresinde DNA hasarı tespit edilirse p53 proteini S evresine geçişi gen düzeyinde baskılar (Şekil 2.2.2.). Geç G₂ evresinde DNA hasarı tespit edilirse Cdc25 (Cell division cycle 25) fosfatazın inhibisyonu M evresine geçişi engeller (13). Omurgalılarda hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan bu ve diğer belli başlı proteinler işlevleriyle birlikte Çizelge 2.2.2.'de özetlenmiştir. M evresinde yer alan denetim noktaları "Mitoz bölünme" başlığı altında anlatılmıştır.



Şekil 2.2.2. DNA Hasarına p53 Yanıtı (13)

Normal koşullarda Mdm2 (Mouse double minute 2) p53'ü ubiquitinleyerek degradasyon yönünde uyarır. DNA hasarında çeşitli protein kinazlar p53'ü fosforiller ve Mdm2 p53'ten ayrılır. Yüksek miktarda p53 birikimi p21'i kodlayan gen bölgesini uyarır. Bir siklin kinaz inhibitörü (CIK; Cyclin Kinase Inhibitors) olan p21 G₁ ve G₁/S evrelerine özgü Cdk-siklin komplekslerini etkisizleştirir ve S evresine geçiş baskılanır.

Çizelge 2.2.2. Omurgalılarda Hücre Döngüsünün Denetiminde Görev Alan Başlıca Proteinler (13)

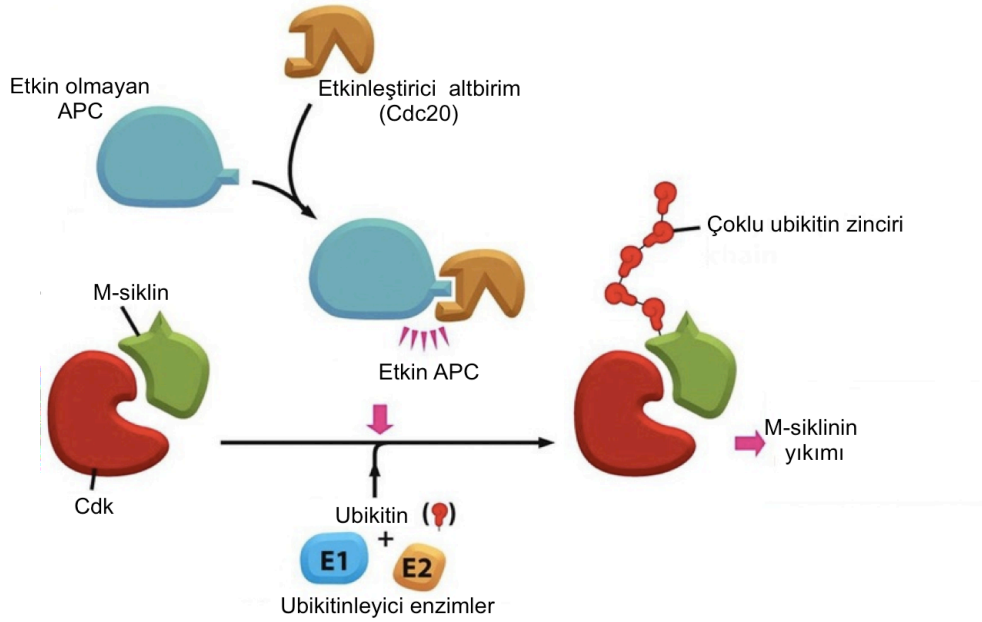
Protein ailesi	Adı	İşlevi
Cdk'leri değiştiren protein kinazlar ve protein fosfatazlar	Cdk etkinleştirici kinaz	Cdk'leri özel bir bölgeden fosforilleyerek etkinleştirir, eklenen fosfat etkinleştirici fosfat adını alır
	Wee1 kinaz	Cdk'leri etkinleştirici fosfata yakın bir bölgeden ikinci kez fosforilleyerek etkisizleştirir, eklenen fosfat engelleyici fosfat adını alır, başlıca görevi M evresine geçişi durdurmaktır
	Cdc25 fosfataz	Cdk'lerden engelleyici fosfatı kaldırır, başlıca görevi M evresine geçişi sağlamaktır
Cdk engelleyici proteinler	p27	G ₁ /S ve S evrelerine özgü Cdk'leri etkisizleştirir, başlıca görevi farklı hücrelerin hücre döngüsünden çıkmasını sağlamaktır
	p21	p53 tarafından gen düzeyinde etkinleştirilir, başlıca görevi DNA hasarı sonrası G ₁ /S ve S evrelerine özgü Cdk'leri etkisizleştirmek ve S evresine geçişi durdurmaktır
	p16	G ₁ evresine özgü Cdk'leri etkisizleştirir, kanserde sıklıkla baskılanır

Çizelge 2.2.2. (devam) Omurgalılarda Hücre Döngüsünün Denetiminde Görev Alan Başlıca Proteinler

Ubikitin ligazlar ve etkinleştiricileri	SCF (Skp, Cullin, F-box containing complex)	Başta Cdk engelleyici proteinler olmak üzere G ₁ evresi denetim noktalarında görevli proteinlerin ubikitinlenmesini uyarır
	APC (Anaphase Promoting Complex)	M-siklinlerin ubikitinlenmesini uyarır, başlıca görevi metafazdan anafaza geçişi sağlamaktır
	Cdc20	APC'yi etkinleştirir
	Hct1 (Cdh1)	APC etkinliğini anafazdan sonra ve G ₁ boyunca korur, başlıca görevi M-siklin yıkımının devamını sağlamaktır
Gen düzenleyici proteinler	E2F	Hücre dışı mitojenlere yanıt olarak uyarılır, başlıca görevi G ₁ /S-siklinler, S-siklinler ve DNA sentezi için gerekli proteinleri gen düzeyinde etkinleştirmektir
	p53	DNA hasarında uyarılır, başlıca görevi hücre döngüsünü durdurmak ve DNA hasarının tamir edilemediği durumlarda programlı hücre ölümünü uyarmaktır

2.2.1. Mitoz bölünme

Mitozun moleküler temelleri G₂ evresinde atılır. Memelilerde siklin B (Çizelge 2.2.1.) sentezi hücre döngüsü boyunca sürekli. G₂ evresinde siklin B'nin yıkımı (Şekil 2.2.1.1.) durdurulur ve M-Cdk birikimi başlar. M-Cdk'ler G₂ evresi boyunca Wee1 kinaz tarafından etkisizleştirilir ve M evresine geçerken Cdc25 fosfataz tarafından etkinleştirilir (Çizelge 2.2.2.). DNA hasarında bu mekanizma tersine işler (13) (bkz 2.2.).

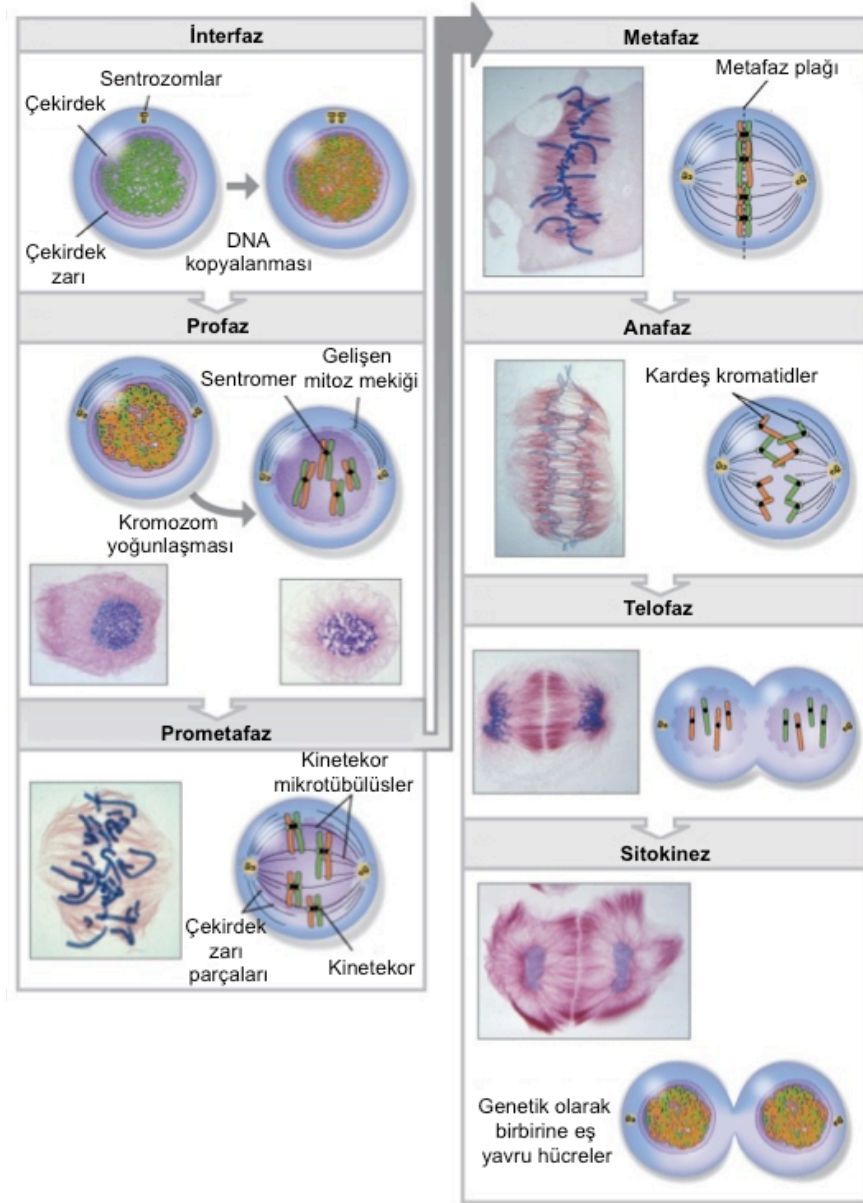


Şekil 2.2.1.1. M-siklin Yıkımının APC Tarafından Uyarılması (13)

Hücrede M-siklin yapımı sürekli. Mitozda anafazdan sonra ve G_1/S evrelerinde Cdc20 APC'yi etkinleştirir. Etkin APC M-siklinleri ubiquintileyerek degradasyon yönünde uyarır. Böylece bu evrelerde M-Cdk birikimi baskılanmış olur.

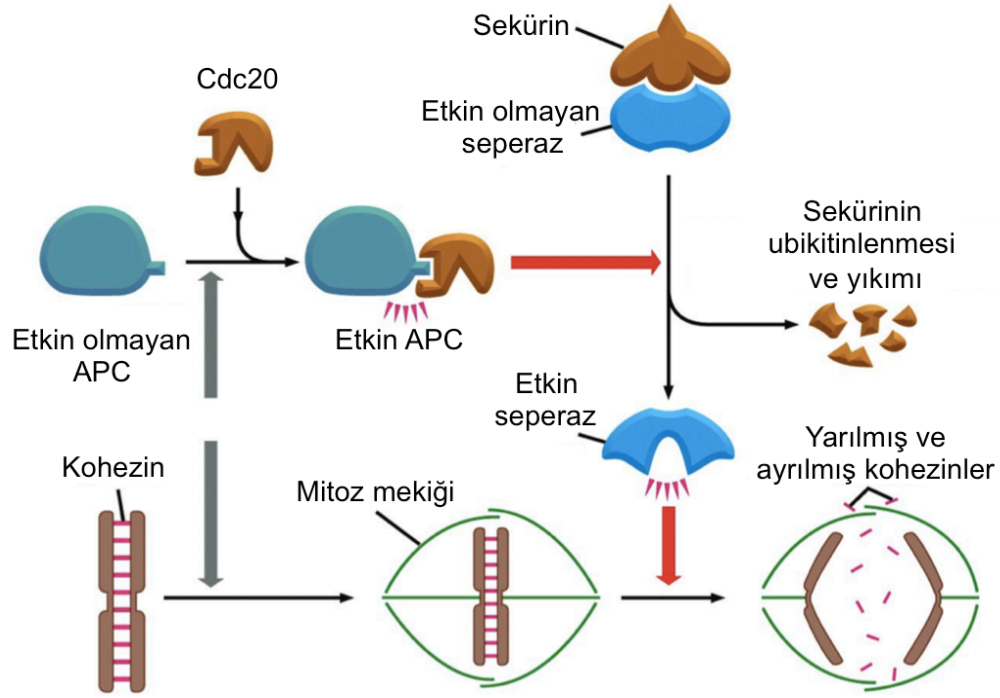
M-Cdk'ler mitozun birbirini izleyen 6 evresi (Şekil 2.2.1.2.) boyunca farklı görevler üstlenirler. Profaz evresinde kromozomların yoğunlaşmasından sorumlu kondensin (çok altbirimli bir protein kompleksi) M-Cdk'ler tarafından etkinleştirilir. Bu sırada birbirinin eşi iki sentrozom çekirdeğin dışında mitoz mekiğini oluşturmaya başlar. Prometafaz evresinde M-Cdk'ler çekirdek zarının yapısında bulunan lamin proteinlerini fosforiller. Böylece çekirdek zarı yıkılır ve kromozomlar kinetokor bölgelerinden mitoz mekiğinin mikrotübülüslerine tutunur. Metafaz evresinde kardeş kromatidler bölünme düzlemi boyunca doğrusal olarak dizilir (12). Memelilerde her bir kinetokorun mikrotübülüslerle doğru bir şekilde bağlanıp bağlanmadığı (kromozomların doğru dizilimde olup olmadığı) denetlenir. Kromozomlar doğru dizilimdeyse APC metafaz evresinden anafaz evresine geçişi sağlar (Şekil 2.2.1.3.). Anafaz evresinde mikrotübülüsler kardeş kromatidleri zıt kutuplara çekerler. Son derece özelleşmiş bu hareket dinamik instabilite adını alır ve M-Cdk'lerin mikrotübülüs ilişkili proteinleri (MAP; Microtubule Associated Proteins) fosforillemesiyle sağlanır (13). Metafaz/anafaz geçişi denetim noktasında oluşacak bir hata

kardeş kromatidlerin düzgün olarak ayrılamamasına ve buna bağlı olarak anöploidiye neden olabilir. Telofaz evresinde zıt kutuplarda iki yavru çekirdeğin oluşumu tamamlanır. Ardından sitoplazma aktin ve miyozin altbirimlerinden oluşan kasılabilir bir halka yardımıyla ikiye bölünür. Sitokinez adı verilen bu evreyle mitoz tamamlanır (12).



Şekil 2.2.1.2. Mitozun Evreleri ve İnterfaz (12)

Şematik çizimlere eşlik eden mikrograflarda zambak çiçeğine ait hücrelerde mitozun evreleri izlenmektedir.



Şekil 2.2.1.3. Metafaz/Anafaz Geçişinin APC Tarafından Denetimi (13)

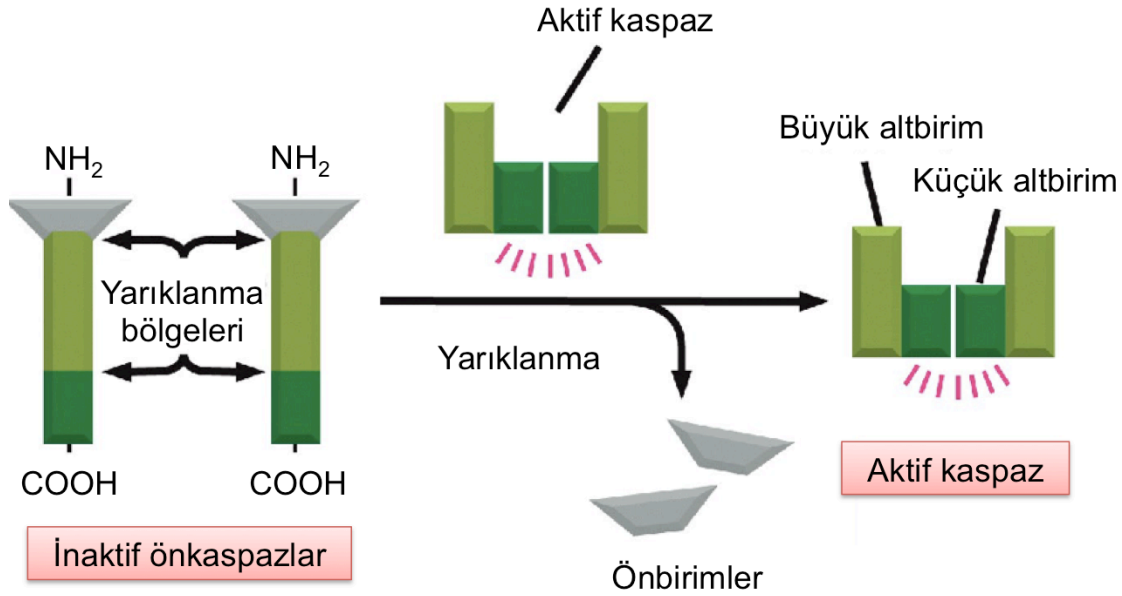
Mitoz mekiğine tutunmamış kardeş kromatid çiftleri Mad2 (Mitotic arrest deficient 2) proteini tarafından işaretlenir. Mad2 Cdc20'yi etkisizleştirir. Metafazda kromozomlar doğru dizildiğinde Mad2 baskısı ortadan kalkar, Cdc20 APC'yi etkinleştirir ve sekürinin ubikitinlenerek yıkımına yol açar. Sekürinin yıkımı separazı etkinleştirir. Normalde kardeş kromatidler kohezin (çok altbirimli bir protein kompleksi) tarafından bir arada tutulur. Separaz kohezin altbirimlerinden birini parçalar. Böylece mikrotübülüslerin çekme kuvveti kardeş kromatidleri ayırmaya yeterli olur.

2.3. Programlı Hücre Ölümü (Apoptoz)

Karmaşık çok hücreli canlılarda hücre çoğalması hücre ölümüyle dengededir. Hücre ölümü kendiliğinden veya programlı olabilir. Ölüm şeklini doku tipi, dokunun gelişimin hangi aşamasında olduğu, fizyolojik veya patolojik koşullar ve bunlara bağlı hücre ölüm sinyalleri belirler. Akut bir hasar sonucu ölen hücre tipik olarak şişer, patlar ve içeriğini komşu hücreler üzerine boşaltarak enflamatuvar yanıtı neden olur. Bu tip hücre ölümünde gözlenen morfolojik değişiklikler nekroz adını alır. Apoptoz homeostazın sağlanmasında önemli rol oynayan programlı hücre ölümü türüdür. Nekrozun aksine komşu hücrelere zarar vermez. Çeşitli proteinlerin üç boyutlu yapılarının yeniden düzenlenmesiyle kontrol edilen bir dizi hücre içi yolak içerir. Bu yolaklar hücre dışı (ekstrinsik yolak) veya hücre içi (intrinsik yolak) uyarılarla etkinleşebilir. Her iki durumda hücre aynı geri dönüşümsüz

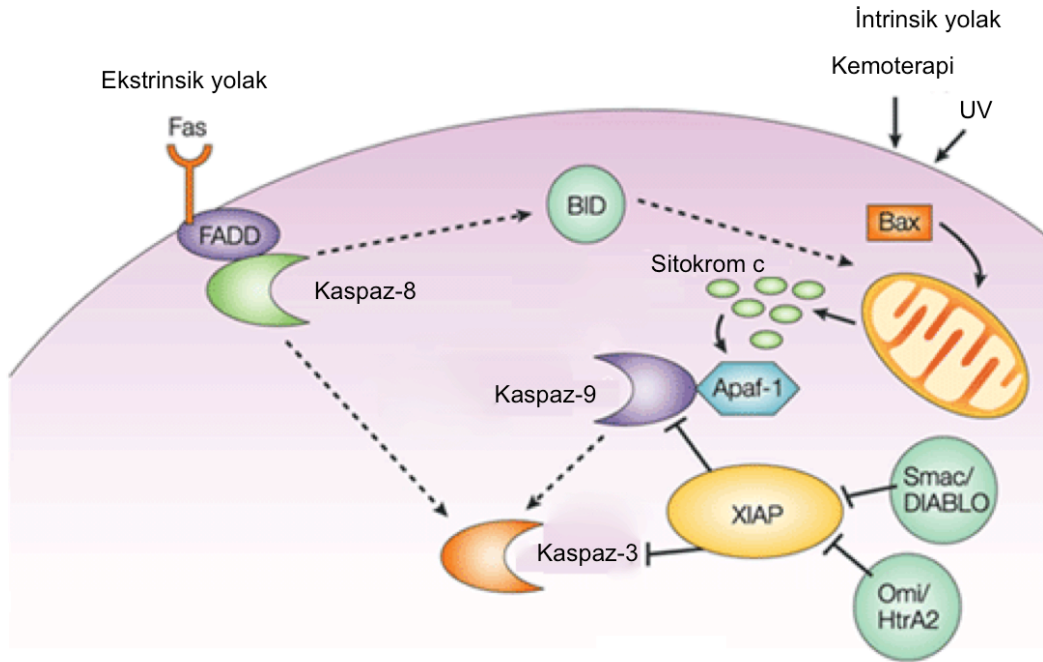
noktaya doğru ilerler. Kaspaz (Caspase; Cysteiny aspartic acid proteases) adı verilen bir proteaz ailesi hedef proteinlerini (PARP; Poly (ADP-ribose) polymerase, NuMA; Nuclear Mitotic Apparatus Protein vb.) (15) aspartik asitlerinden keserek apoptozun tipik morfolojik değişikliklerini başlatır (13). Hücre büzülür ve yoğunlaşır, hücre iskeleti yıkılır, çekirdek zarı dağılır ve çekirdek DNA'sı parçalanır. Kırık DNA parçaları TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase [TdT] dUTP Nick End Labeling) adı verilen özelleşmiş bir yöntemle tespit edilebilir (bkz. 5.5 ve 5.9). Apoptotik hücrenin yüzeyi fosfotidilserin (PS) vb. moleküllerle işaretlenir. PS molekülleri Annexin-V tarafından, Annexin-V komşu hücreler veya makrofajlar tarafından tanınır ve apoptotik hücre fagosite edilir. Apoptotik hücreler PS moleküllerinin Annexin-V'le işaretlenmesine dayalı yöntemlerle belirlenebilir (15) (bkz. 5.5).

Kaspazlar hücre içinde etkin olmayan öncüller (önkaspazlar) şeklinde sentezlenirler ve yarıklanma yoluyla etkinleşirler (Şekil 2.3.1.). Fas (Fatty acid synthase) gibi hücre dışı ölüm sinyalleri transmembran ölüm reseptörleri (FADD; Fas-Associated Death Domain) tarafından algılandığında hücre içi uyarlayıcı proteinler önkaspaz-8'e bağlanır. Önkaspaz-8 yarıklanarak etkin kaspaz-8'i oluşturur (13) (Şekil 2.3.2./Ektrinsik yolak). Çeşitli büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin yokluğu gibi negatif uyaranlar veya radyasyon, toksinler, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest oksijen radikalleri (ROS; Reactive Oxygen Species) gibi pozitif uyaranlar hücre içi apoptotik yolları harekete geçirir. İç mitokondriyal membran potansiyeli düşer ve bazı proapoptotik proteinler sitozole salınır. Bunlardan sitokrom-c Apaf-1'le (Apoptotic protease activating factor-1) birleşerek apoptozom denilen yapıyı oluşturur. Apoptozom önkaspaz-9'dan etkin kaspaz-9'un oluşumunu uyarır (Şekil 2.3.2./İntrinsik yolak). Başlatıcı kaspazlar olan kaspaz-8 ve kaspaz-9 uygulayıcı kaspazlardan kaspaz-3'ü etkinleştirir (Şekil 2.3.2.). Uygulayıcı kaspazlar çekirdek laminlerini keserek çekirdek zarının geri dönüşümsüz yıkımını uyarır ve endonükleazları etkinleştirirerek DNA yıkımını tetikler (15). Memelilerde farklı görevler üstlenen bu ve diğer kaspazlar işlevleriyle birlikte Çizelge 2.3.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.3.1. Önkaspazların Yarıklanma Yoluyla Etkinleşmesi (13)

Apoptozun başlıca hücre içi düzenleyicileri BCL-2 (B Cell Lymphoma-2) ailesi proteinleridir. BCL-2 ailesinin üyelerinden BCL-2 ve Bcl-XL mitokondriyondan sitokrom-c salınımını durdurur ve apoptozu engeller. Aynı ailenin üyesi olan Bad (BCL-2 associated death promoter) BCL-2 ve BCL-XL'yi etkisizleştirir. Bax (BCL-2 associated X protein) ve Bak (BCL-2 homologous antagonist/killer) mitokondriyondan sitokrom-c salınımını uyarır. Bid (BH3 interacting domain death agonist) Bax ve Bad'ı etkinleştirir (16) (Şekil 2.3.3.). BCL-2 protein ailesinin apoptozun düzenlenmesinde görev alan bu ve diğer üyeleri işlevleriyle birlikte Şekil 2.3.3.'de özetlenmiştir. Hücre içi apoptoz düzenleyicilerinin bir diğer önemli ailesi apoptozun inhibitörleridir (IAP; Inhibitors of Apoptosis). IAP apoptozu önkaspaz veya kaspazların etkinleşmesini engelleyerek baskılar. İntrinsik yolda mitokondriyondan sitokrom-c'yle birlikte salınan SMAC/Diablo ve serin proteaz HtrA2/OMI IAP'nin baskılanmasından sorumludur (Şekil 2.3.2.). Apoptozun ilerleyen evrelerinde mitokondriyondan ikincil olarak salınan proapoptotik proteinler endonükleaz G, AIF (Apoptosis Inducing Factor) ve CAD (Caspase Activated DNase) DNA fragmentasyonunu ve kromozomal kondensasyonu uyarır (15).

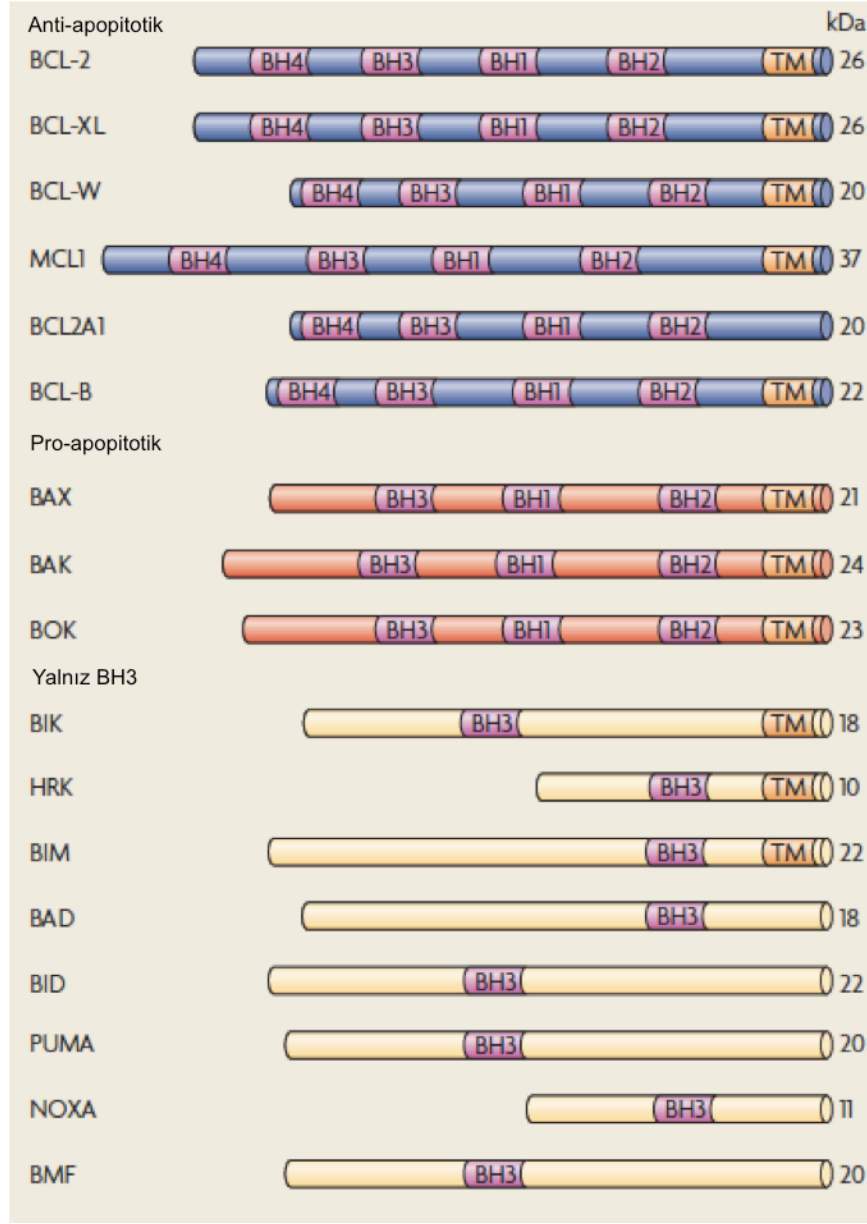


Şekil 2.3.2. Ekstrinsik ve İntrinsik Yolak (17)

XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis): İyi bilinen bir IAP'dir.

Çizelge 2.3.1. Memelilerde Başlıca Kaspazlar ve Görevleri (18)

Başlatıcı kaspazlar	Uygulayıcı kaspazlar	Enflamatuvar kaspazlar
Kaspaz 2 Mitokondriyondan sitokrom-c, SMAC/Diablo, AIF salınımı, BAX'ın sitoplazmadan mitokondriyona geçişi Kaspaz 8 Bid ve kaspaz-3'ün etkinleşmesi Kaspaz 9 Kaspaz 3 ve 7'nin etkinleşmesi Kaspaz 10 Kaspaz-3'ün etkinleşmesi	Kaspaz 3 DNA-PK (DNA Dependent Protein Kinase), PKCγ (Protein Kinase C-γ) U1-70kD ve ICAD'ın (Inhibitors of CAD) etkisizleştirilmesi Kaspaz 3, 6 ve 7 Ortak substratlar olan PARP, lamin, fodrin ve BCL-2'nin etkinleşmesi	Kaspaz 1, 4 ve 5 Enflamatuvar yanıt oluşturulan pro-IL-1β (IL; Interleukin), pro-IL-18, IL-1F7 gibi öncül proteinlerin etkinleşmesi

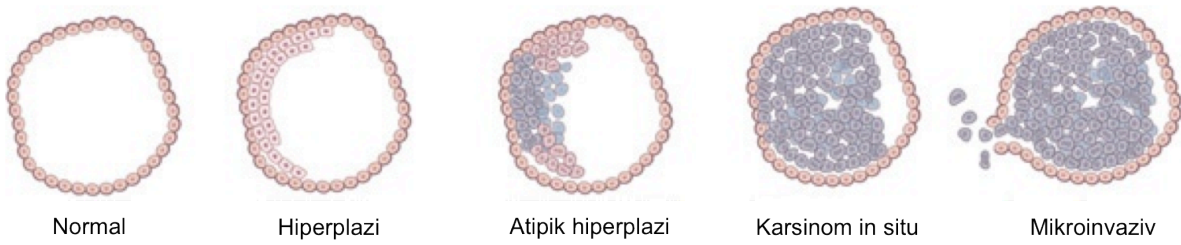


Şekil 2.3.3. Bcl-2 Protein Ailesi Üyeleri ve Apoptozla İlişkileri (16)

Apoptozu baskılayan (**anti-apoptotic**) BCL-2 ailesi proteinleri BH1 (BCL-2 Homology 1), BH2, BH3 ve BH4 olmak üzere 4 farklı homolog altbirim içerirler. Apoptozu uyaran (**pro-apoptotic**) BCL-2 ailesi proteinlerinde BH4 altbirimi bulunmaz. BCL-2 protein ailesinin üçüncü üyeleri (**BH3-only**) normalden fazla ifade edildiklerinde apoptozu uyarırlar ve yalnız BH3 altbirimleri içerirler. Bazı BCL-2 ailesi proteinlerinde BH altbirimlerine ek olarak transmembran (TM) altbirimleri bulunur. Bu altbirimler proteinlerin membran yapılarıyla ilişkilerini düzenlerler.

2.4. Kanser Gelişimi ve Tedavi Yöntemleri

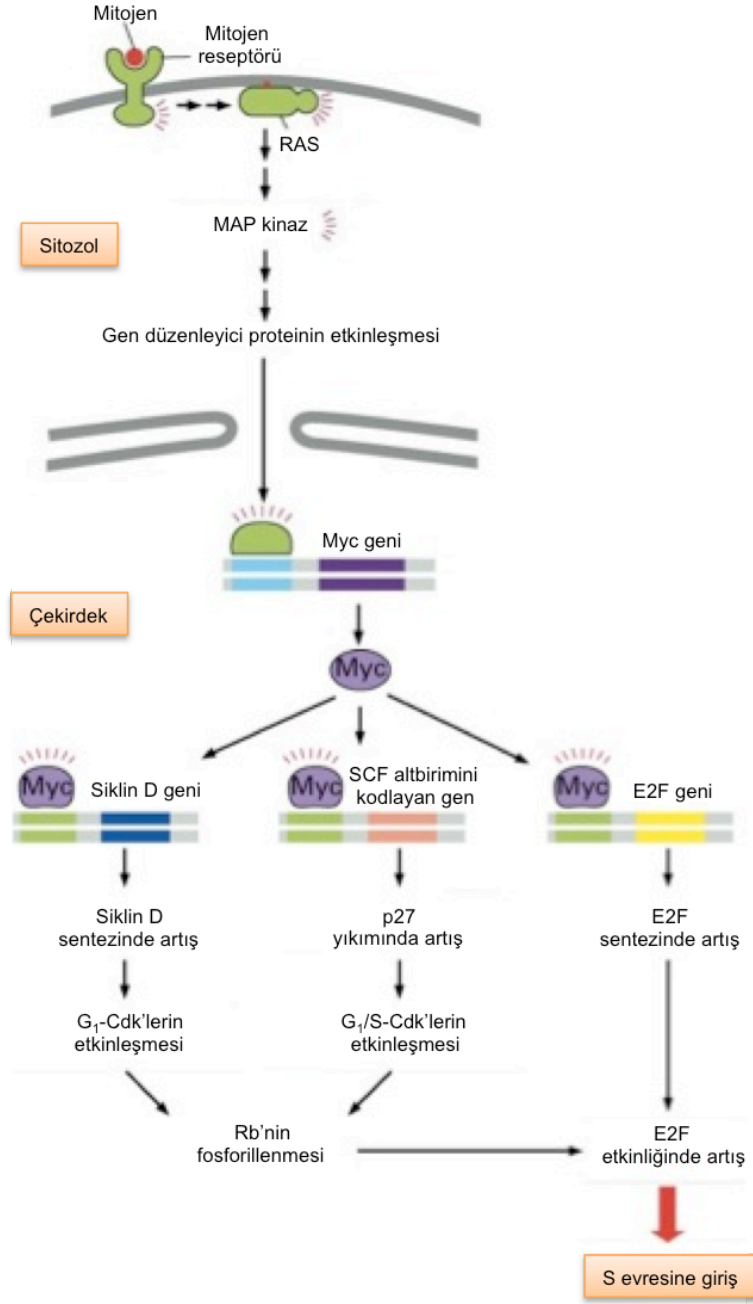
Bir kanser hücresi hücre döngüsündeki normal sınırlamalara karşı koyarak çoğalır ve diğer hücreler için ayrılmış alanlara yerleşerek yayılır (Şekil 2.4.1.). Kanser hücresi çoğunlukla rastlantısal mutasyonların yavaş birikimiyle oluşur. Bu mutasyonlar kimyasal karsinojenler, X-ışınları gibi iyonlaştırıcı radyasyonlar veya virüsler aracılığıyla oluşabilir. Her üç koşulda hücre DNA onarım mekanizmalarında yüksek hızda mutasyon birikimine izin verecek genetik bir bozukluk taşır (13).



Şekil 2.4.1. Kanserın Mikroevrimsel Gelişimi (12)

Herhangi bir toplumun gelişiminde evrim hızı dört ana parametreye bağlıdır: Mutasyon hızı, birey sayısı, üretkenlik hızı ve seçici üstünlük. Benzer olarak tümör gelişimi de ardışık mutasyon basamakları ve doğal seçim gerektirir. Kontrolsüz hücre çoğalması kanserin gelişen evreleri boyunca her basamakta yeni mutasyonlarla desteklenir. Mutasyonlar arttıkça atipik hiperplazi karsinoma dönüşür ve son evrede mutant hücreler kan ve lenf damarları yoluyla farklı doku ve organlara göç eder (metastaz).

Hücre içi sinyal yollarının bileşenlerini kodlayan genlerin birçoğu ilk olarak kanser başlatıcı genler (onkogenler) olarak tanımlanmıştır. Hayvan hücrelerinde hücre bölünmesi çeşitli mitojenlerle uyarılır. Mitojen sinyali bir GTPaz olan Ras'ı ve Ras çeşitli MAP (Mitojen Activated Protein) kinazları etkinleştirir. MAP kinazlar Myc geninin ifadesinde, Myc G₁ ve G₁/S-Cdk'lerin etkinliklerinde artışa neden olur (Şekil 2.4.2.). Ras'ın tek bir aminoasidindeki mutasyon Ras'a bağımlı sinyal yollarının mitojenlerin yokluğunda dahi devamlı uyarılmasını sağlar. Benzer olarak Myc'nin aşırı ifadesine neden olan mutasyonlar ölçsüz hücre büyümesi ve çoğalmasına yol açarak kanser gelişimine olanak tanır (13).



Şekil 2.4.2. Mitojenik Sinyallere Ras ve Myc Yanıtı (13)

Normal hücrelerde tümör baskılayıcı genler hücre döngüsü evreleri arasında kısıtlayıcı basamaklar olarak işlev görür. Tümör baskılayıcı bir gen ürünü olan Rb (Retinablastoma) proteini hücrenin bölünme döngüsüne girişini ve DNA kopyalamasının başlamasını denetler. Rb proteini Cdk4-siklin D kompleksi (Çizelge 2.4.1.) tarafından fosforillenirse hücre G1 evresinden S evresine geçer (Şekil 2.4.2.). Cdk4-siklin D kompleksi p16 proteini

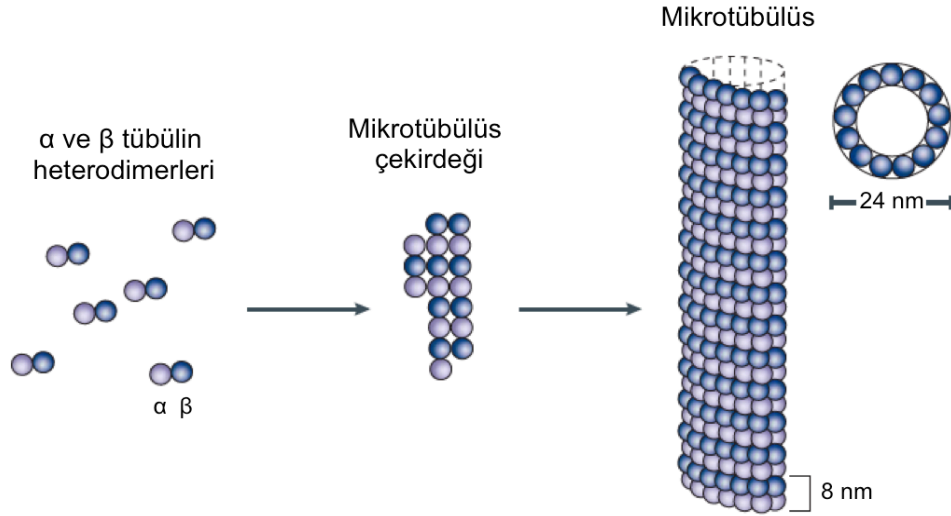
tarafından etkisizleştirilir ve Rb tümör baskılayıcı işlevini yerine getiremez. p16 geni kanserde sıklıkla düzenleyici DNA'sının metillenmesi aracılığıyla baskılanır. Sağlıklı bir hücre tek bir onkogen veya tümör baskılayıcı gendeki mutasyonu saptar, hücre döngüsünü durdurur veya programlı hücre ölümünü başlatır. Deneysel olarak aşırı Ras ve Myc ifade eden hücrelerde kontrolsüz hücre çoğalması bir başka tümör baskılayıcı gen olan p53 bağımlı yollar tarafından engellenir (Şekil 2.4.2.). p53 etkinliğinin kaybı kanser hücrelerinin DNA hasarına rağmen yaşamasına ve çoğalmasına olanak tanır.

Yukarıda örneklendiği gibi kanserin moleküler temelleri çoğunlukla hücre döngüsü veya hücre ölümünün kusurlu denetimine dayanır. Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran bu özellikler kansere karşı geliştirilen tedavilere temel oluşturur. Örneğin kanser hücrelerinde DNA tamir mekanizmalarının kaybı genetik kararsızlığa neden olur. Bu durum radyasyon terapisinde normal hücrelere avantaj sağlar. Hücre döngüsünün farklı evrelerine özgü sitotoksik ajanlar yalnız çoğalan hücreleri hedef alır (13). Bunlardan M evresine özgü olanlar “Kanser tedavilerinde mikrotübülüslerin stabilizasyonu” başlığı altında anlatılmıştır. Antimetabolitler doğal bileşiklere benzer yapılarıyla diğer sitotoksik ajanlardan ayrılırlar. Çoğunlukla etkilerini bir enzim veya reseptörün substratıyla yarışarak ortaya koyarlar. Bunlardan bazıları yalnız kanser hücrelerinde ifade olan veya kanser hücrelerinde ifadesi artan enzim ve reseptörlere özgüdür ve normal hücrelere zarar vermezler. Benzer olarak sitotoksik ajanların birçoğu kansere özgü moleküler mekanizmaların ürünlerini hedef alır. Buna karşın yaygın olarak kullanılan sitotoksik ajanların yan etkileri kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. Dahası sık karşılaşılan kanser türleri belirli tedavi yöntemlerine ve/veya antikanser ajanlarına karşı direnç geliştirmiştir (4). Günümüzde hayvan modellerinde yürütülen çeşitli gen terapisi çalışmalarında belirli kanserlere özgü onkogenlerin baskılanması ve/veya tümör baskılayıcı genlerin uyarılması amaçlanmaktadır (12).

2.4.1. Kanser tedavilerinde mikrotübülüslerin stabilizasyonu

Mikrotübülüsler α ve β -tübulin dimerlerinden oluşan dinamik polimerlerdir (Şekil 2.4.1.1.). Ökaryotlarda hücre içi taşıma sisteminde, sinyal iletiminde ve hücre bölünmesinde görev alırlar. İşlevleri α ve β -tübulin proteinlerinin post-translasyonel modifikasyonlarıyla veya tübülüne bağlanabilen düzenleyici proteinlerce belirlenir. Bunlar dinein ve kinezin gibi

motor proteinlerden aralarında statmin, dinaktin 1, MCAK (Mitotic Centromere Associated Kinesin) ve MAP4'ün de bulunduğu mikrotübülüs düzenleyici proteinlere kadar çok çeşitli olabilir. Belirli kanser türlerinde bu proteinlerden bazılarının ifadesi artar veya azalır. Her iki durumda M evresine özgü antikanser ajanlarına duyarlılık değişir (19).



Şekil 2.4.1.1. Mikrotübülüs Yapısı (19)

Tübülün heterodimerlerinin polimerizasyonu mikrotübülüs çekirdeğini oluşturur. Mikrotübülüsler mikrotübülüs çekirdeğinden gelişir. Polimerizasyon dinamikleri çekirdeğe yakın (-) uçta yavaş, çekirdeğe uzak (+) uçta hızlı seyredir.

Mikrotübülüsler mitozun profaz evresinde kardeş kromatidleri kinetikor bölgelerinden kendilerine bağlar. Mitozun metafaz evresinde kromozomların bölünme düzlemi boyunca doğrusal dizilimi mikrotübülüslerin kontrolündedir. Anafazda kromozomların zıt kutuplara taşınmasında mikrotübülüsler eş zamanlı olarak uzar ve kısalır. Bu hareket gergin bir kuvvet yaratır. Hücre metafazdan anafaza geçmeden önce bu kuvvetin sağlandığından emin olmalıdır. Mikrotübülüs stabilize edici ajanlar mikrotübülüslerin dinamik hareketlerini kısıtladığında metafazdan anafaza geçiş baskılanır. Her bir kardeş kromatid kinetikor mikrotübülüslere bağlı olsa dahi hücre apoptoza yönelir (13).

Farklı mitotik zehirler mikrotübülüslerin farklı bağlanma bölgelerinden yalnız birini tanır (19). Çizelge 2.4.1.1.'de yaygın olarak kullanılan mikrotübülüs stabilize edici ajanlar mikrotübülüslere bağlandıkları bölgelere göre sınıflandırılmıştır. Farklı mitotik zehirler yüksek dozlarda uygulandığında mikrotübülüs polimerizasyonunu uyarabilir veya

baskılayabilir. Düşük dozlarda ise hemen hemen tümü mikrotübülüslerin hareketlerini kısıtlar. Şaşırtıcı bir şekilde mikrotübülüs polimerizasyonunu uyaran veya baskılayan bu ajanlar başta nörotoksisite olmak üzere benzer yan etkiler gösterirler. Buna karşın antikanser etkileri hücre tipine göre değişir (19). Yaygın olarak kullanılan mikrotübülüs stabilize edici ajanların hangi kanser türlerinde kullanıldıkları ve bunlarla ilişkili güncel klinik araştırmalar Çizelge 2.4.1.2.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4.1.1. Mitotik Zehirlerin Mikrotübülüslere Bağlanma Bölgelerine Göre Sınıflandırılması

Vinka bölgesi	Kolçisin bölgesi	Taksen bölgesi	Diğer
Vinblastin Vinkristin Vinorelbin Vinflunin Kriptofisin 52 Halikondrinler Hemiasterlinler	2-metoksiöstradiol Metoksibenzen- sulfonamid	Paklitaksel Dosetaksel Epotilonlar	Estramustin

2.4.1.1. Dikumarol

Dikumarol çeşitli bitki ve mantarlarda doğal olarak bulunur, K vitamini antagonistidir ve bu özelliğiyle bir antikoagülan olarak işlev görür. Sıklıkla *Melilotus alba* ve *Melilotus officinalis*'den izole edilir. Dikumarolün iyileştirici etkisini konu alan araştırmalar tarihte Perslere kadar uzanır. Dikumarolün atası olan kumarin ve türevlerinin çeşitli kanser hücre hatlarında hücre çoğalmasını baskıladığı bilinmektedir (20). Dikumarolün çeşitli kanser hücre hatlarında hücre çoğalmasını baskıladığı, bazı antikanser ajanlarının sitotoksik etkilerini değiştirdiği ve pankreas kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü arttırdığı bildirilmiştir (bkz. 6.1.). Son yıllarda yapılan çalışmalar dikumarolün in vitro koşullarda tübüline bağlanabildiğini (20) ve mikrotübülüs depolimerizasyonunu geciktirdiğini (21) ortaya koymaktadır. Buradan yola çıkan araştırmacılar dikumarolün sitotoksik etkilerini mikrotübülüs stabilizasyonu aracılığıyla ortaya koyduğunu öne sürmüştür (20, 21). Bu hipotezin tüm fikri haklarını 2002 yılında belgelenen bir patentle Jacobs ve ark. almıştır. Günümüzde bu hipotezi destekleyecek yeterli kanıt bulunmamaktadır. Araştırmalar hızla

dikumarolün inhibitörü olduğu NQO1 (NAD(P)H Oxidoreductase 1) proteini üzerine yoğunlaşmaktadır.

Çizelge 2.4.1.2. Mitotik Zehirlerin Etkili Oldukları Kanser Türleri ve Bunlarla İlişkili Klinik Araştırmalar

Mitotik Zehir	Kanser türü	Klinik araştırmalar	Yayınlar
Vinblastin	Lenfoma, testis kanseri	Klinik kullanımda	(22-24)
Vinkristin	Lösemi, lenfoma	Klinik kullanımda	(25, 26)
Vinorelbin	Solid tümörler, lenfoma, akciğer kanseri	Klinik kullanımda	(27, 28)
Vinflunin	Mesane, akciğer ve meme kanserleri	Faz III	(24, 29)
Kriptofisin 52	Solid tümörler	Faz III	(30, 31)
Halikondrinler	-	Faz I	(32)
Hemiasterlinler	-	Faz I	(33, 34)
2-metoksiöstradiol	-	Faz I	(35, 36)
Metoksibenzen-sulfonamid	Solid tümörler	Faz I ve II	(37)
Paklitaksel	Ovaryum, meme ve akciğer tümörleri	Klinik kullanımda	(38, 39)
Dosetaksel	Prostat, beyin ve akciğer tümörleri	Faz I, II ve III	(40)
Epotilonlar	Paklitaksele dirençli tümörler	Faz I, II ve III	(41, 42)
Diskodermolit	-	Faz I	(43, 44)
Estramustin	Prostat kanseri	Faz I, II ve III	(45)

NQO1 çok işlevli bir hücre içi oksidoredüktazdır. Başlıca görevleri ROS'un redüksiyonu ve p53 proteininin stabilizasyonudur (46-49). p53 stabilizasyonu DNA hasarına yanıtta p53 birikimi için gereklidir (Şekil 2.1.2.) NQO1'in enzimatik işlevi NAD(P)H bağımlıdır; tipik olarak NAD(P)H yükseltgenirken, NQO1 substratı indirgenir. Dikumarol NAD(P)H'la yarışarak enzimin substratına bağlanmasını engeller (50, 51). NQO1 ifadesi (muhtemelen p53 proteiniyle olan bağlantısı nedeniyle) bazı kanserli dokularda normal dokuya göre artmaktadır. Kimi araştırmacılar bu artışı kanserli dokuların hedeflenmesinde bir avantaj olarak görmektedir (47, 48). Son yıllarda dikumarolün sitotoksik etkileri NQO1'in inhibisyonu ile ilişkilendirilmektedir (52, 53). Bu hipoteze göre dikumarol ROS redüksiyonuna engel olarak hücreyi apoptoza sürüklemektedir. Ancak ROS redüksiyonu birden çok katalizörle denetlenir (54). Dolayısıyla dikumarol varlığında gelişen apoptotik değişimlerin NQO1 proteininin inhibisyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığı diğer tüm faktörler elenerek titizlikle araştırılmalıdır.

2.5. Kanser Hastalarında Doğurganlığın Korunmasına Yönelik Tedaviler

Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bazı antikanser ajanlarının gonad yetmezliğine ve buna bağlı olarak infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (5-7, 55). Kanser tedavisi gören erişkin erkeklerde spermatogonyumların dondurularak saklanması rutin bir uygulamayken, kadınlarda doğurganlığın korunmasına yönelik tedavi seçenekleri kısıtlıdır (7). Sıçanlarla yapılan bir çalışmada sisplatin ve paklitakselin tek başına veya birlikte kullanımının primordiyal folikül kaybını arttırdığı gösterilmiştir (56). Brachet ve ark. (57) çocukluk çağı kanserlerinin prokarbazin ve būsülfan kombinasyonu ile tedavisinde erken menopoz belirtilerinin geri dönüşümsüz olarak arttığını bildirmiştir. Bir başka çalışmada çocukluk çağı kanserlerinde rokarbazin, klorambusil, vinblastin veya prednizolon tedavisinin gonad fonksiyonlarının kaybına neden olduğu gösterilmiştir (58). Koyama ve ark. (59) lenfomanın siklofosfamidle tedavisinin kanda FSH düzeylerini değiştirdiğini ve amenoreye neden olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada tedavi sonrası alınan over biyopsilerinde folikül veya ovosite rastlanmamıştır.

Kriyoprezervasyon beş önemli aşamada gerçekleştirilir. Bunlar; 1) su kristalizasyonundan kaynaklanabilecek hücresel hasarı azaltan kriyoprotektanlarla ilk etkileşim, 2) sıfır derecenin altındaki sıcaklıklara kadar dondurma 3) saklama 4) çözme ve 5) dilusyon

yoluyla kriyoprotektanların ortamdan uzaklaştırılması olarak sıralanabilir. Hücre canlılığı için en kritik aşamalar 1. ve 5. aşamalardır. Ovosit söz konusu olduğunda ise hücre büyüklüğü yüksek sıvı içeriği nedeniyle önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (9). Yavaş dondurma yöntemiyle dondurulup çözülen ovositlerden elde edilen ilk gebelik 1986 yılında Chen ve ark. (60) tarafından bildirilmiştir. Aynı yıl ve takip eden yıllarda 4 gebelik ve canlı doğum daha gerçekleşmiştir (9). 1988 yılında immatür ovositlerin kriyoprezervasyonu ile elde edilen (61), bundan 10 sene sonra dondurulup çözülen ovositlerin mikroenjeksiyonu ile elde edilen ilk doğumlar bildirilmiştir (62). Vitrifikasyon ani sıcaklık düşüşüne karşın hızlı oluşuyla su kaybını ve buz kristali oluşumunu en aza indirgeyen bir dondurma yöntemidir (9). Vitrikasyon yöntemiyle dondurulup çözülen ovositlerden elde edilen ilk gebelik 1999 yılında rapor edilmiştir (63). 2005 yılında yapılan bir çalışmada (64) insan ovositleri Cryotop adı verilen bir materyal içerisinde vitrifiye edilmiş ve bu işlem sonrasında oldukça yüksek kabul edilebilecek gebelik oranlarına (%41,3) ulaşılması heyecan yaratmıştır. Ancak 10 yılı aşkın uygulama süresine karşın ovosit kriyoprezervasyonu ile elde edilen sınırlı sayıda gebelik ve canlı doğumlar yöntemin rutin kullanımını kısıtlamıştır. Buna karşın ovosit kriyoprezervasyonu prematür over yetmezliği, pelvik hastalıklar, ameliyat ve radyoterapi/ kemoterapi uygulamaları nedeniyle üreme kapasitesini kaybetme riski olan kadınlarda tek çözüm olarak gösterilmektedir (9). Çocukluk çağı kanserlerinde gametlerin dondurulması mümkün değildir. Son yıllarda gonadların kriyoprezervasyonu alanındaki gelişmeler çocukluk çağı kanserlerinde olduğu kadar, erişkin kadınlarda da doğurganlığın korunması yönünden umut vericidir (7); ancak bu alandaki klinik araştırmaların sayısı henüz yeterli sayıya ulaşmamıştır (9).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Günümüzde kanser hastalarının sağkalım oranları gelişen teknolojilere paralel olarak artmaktadır (2). Yaygın olarak kullanılan bazı antikanser ajanları gonad yetmezliğine ve buna bağlı olarak infertiliteye neden olmaktadır (5-7). Kanser tedavisi gören erişkin erkeklerde spermatogonyumların dondurularak saklanması rutin bir uygulamayken, kadınlarda doğurganlığın korunmasına yönelik tedavi seçenekleri kısıtlıdır (7). Ovosit kriyoprezervasyonunda halen uygulanmakta olan protokollerle elde edilen canlılık ve fertilizasyon oranları yetersizdir. Buna karşın ovosit kriyoprezervasyonu radyoterapi veya kemoterapi uygulamaları nedeniyle üreme kapasitesini kaybetme riski olan kadınlarda doğurganlığın korunmasına yönelik tek çözüm olarak gösterilmektedir (9). Sık karşılaşılan kanser türleri belirli tedavi yöntemlerine ve/veya antikanser ajanlarına karşı direnç geliştirmiştir (4). Kanser tedavilerinin yan etkileri ve kanser hastalarında doğurganlığın korunmasına yönelik tedavi seçeneklerinin yetersizliği de göz önüne alındığında yeni antikanser ajanlarının tanımlanmasına olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Tez danışmanım Prof. Dr. Alp Can'ın yürütücülüğünü üstlendiği ve proje asistanı olarak görev aldığım "Ovosit kriyoprezervasyonunda mikrotübülüs stabilizasyonunun mayoz mekiği üzerine koruyucu etkisinin araştırılması" başlıklı TÜBİTAK projesinde elde ettiğimiz bulgular son yıllarda düşük sitotoksitesiyle öne çıkan **dikumarolün ovosit matürasyonunu engellemediğini** ortaya koymaktadır. Çeşitli kanser hücre hatlarında bazı kumarin türevlerinin antikanser etki gösterdiği bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bir dikumarolün çeşitli kanser hücre hatlarında hücre çoğalmasını baskıladığını, bazı antikanser ajanlarının sitotoksik etkilerini değiştirdiğini ve pankreas kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü arttırdığını ortaya koymaktadır. Bu bulgularla birlikte değerlendirildiğinde ön bulgularımız kanser tedavilerinde doğurganlığın korunması yönünden son derece önemlidir.

Buradan yola çıkarak çalışmamızda dikumarolün bir antikanser ajanı olarak mitotik ve mayotik hücreler üzerine etkilerinin değerlendirilmesi planlanmıştır. Mitotik hücreler biri normal ve diğeri kanser özellikte iki hücre hattıyla, dişi üreme sistemi hücrelerinden granüloza hücreleri olarak belirlenmiştir. Deneyimlerimiz doğrultusunda mayotik hücrelerin dişi BALB/c farelerden elde edilmesi kararlaştırılmıştır.

Buna göre çalışmamızın amacı mitotik hücreler üzerine etkilerini ele alarak dikumarolün antikanser özelliklerini ve bunun mekanizmalarını ortaya koymak ve dikumarolün dişi üreme sistemi hücreleri üzerine etkilerini inceleyerek kanser tedavilerinde doğurganlığın korunmasına yönelik yeni seçenekler sunmaktır. Bu doğrultuda çalışmamızın hedefleri; 1) dikumarolün yeni bir antikanser ajanı olarak klinik kullanımına ilişkin in vitro çalışmaların tamamlanması 2) dikumarolün dişi üreme sistemi üzerine potansiyel yan etkilerinin belirlenmesi 3) çalışmanın dikumarolün kemoterapötik etkinliğinin ölçüleceği in vivo çalışmalara zemin oluşturması olarak sıralanabilir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

1. 30 adet 21 günlük dişi BALB/c fare (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı)¹
2. Vero hücre hattı (Afrika yeşil maymunu böbrek epitel hücreleri) (CCL-81TM, ATCC)
3. MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) hücre hattı (Epitel kökenli insan meme kanseri hücreleri) (HTB-22TM, ATCC)

4.1.1. Dikumarol çözeltisinin hazırlanması ve fizyolojik pH'da çözünürlüğünün kontrolü

1. 10 mM dikumarol (3,3'-Methylene-bis [4-hydroxycoumarin]) çözeltisi:

Dikumarol (Sigma, M1390)_____0,168 g

dH₂O _____30 mL

1 N NaOH çözeltisiyle pH 11,9'a ayarlandı ve distile suyla toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.9

2. Kültür ortamı: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Ham's F12 (Sigma, D0547), 1,2 g/L NaHCO₃ (Sigma, S5761), %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma, D9665), %1 penisilin-streptomisin (Sigma, P0781), %1 amfoterisin B (Sigma, A2942) (pH: 7,3 ve pH: 11,9)
3. Gamet kültür ortamı (G-IVFTM Plus ,Vitrolife) (pH: 7,3)
4. Manyetik karıştırıcı (Jenway)
5. pH metre (Jenco)
6. Spektrofotometre (Thermo Scientific)

¹ Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 24/07/2013 tarihli ve 2013-14-98 sayılı izniyle gerçekleştirilmiştir (Ek-1: Etik Kurul Kararı).

4.1.2. Granüloza hücrelerinin ve ovositlerin izolasyonu

1. 5 IU/mL PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, Sigma, G4877)
2. G-MOPSTM Plus (Vitrolife, 10135)
3. Kültür ortamı: DMEM Ham's F12 (Sigma, D0547), 1,2 g/L NaHCO₃ (Sigma, S5761) %10 FBS (Sigma, D9665), %1 penisilin-streptomisin (Sigma, P0781), %1 amfoterisin B (Sigma, A2942)
4. Gamet kültür ortamı (G-IVFTM Plus, Vitrolife)
5. Paslanmaz çelik cerrahi makas ve penset² (Electron Microscopy Sciences)
6. İnsülin enjektörü (Steril Hayat Şırınga)
7. 25 cm², 60 mm çaplı veya tek kuyucuklu steril polistren hücre kültür kapları (Orange Scientific)
8. Denüasyon pipeti (The Stripper[®], Origio)
9. 80 µm denüasyon pipet ucu (Cook)
10. Stereomikroskop (Nikon)
11. İnkübatör (Sanyo)

4.1.3. Vero, MCF-7 ve granüloza hücrelerinin kültürü, sayımı ve canlılık analizleri

4. Kültür ortamı: DMEM Ham's F12 (Sigma, D0547), 1,2 g/L NaHCO₃ (Sigma, S5761), %10 FBS (Sigma, F9665), %1 penisilin-streptomisin (Sigma, P0781), %1 amfoterisin B (Sigma, A2942)
5. Yıkama çözeltisi (D-PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline): PBS (Sigma, P4417), 0,6 mM CaCl₂·2H₂O (Sigma, C7902), 0,5 mM MgCl₂·6H₂O (Sigma, M2393)
6. Tripsin EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) (Biochrom, L2123)
7. %0,01 Poli-L-lizin (Sigma, P8920)
8. 12 mm çaplı yuvarlak cam lamel (Fisher Scientific)
9. 75 cm², 24 kuyucuklu veya 100 mm çaplı steril polistren hücre kültür kapları (Orange Scientific)

² Tüm cam ve metal malzemeler otoklavda (Hanshin) 132°C'de 15 dk. sterilize edilmiştir.

10. 15 mL'lik steril polipropilen konik tüpler (Biochrom)
11. Çalkalamalı su banyosu (Memmert)
12. İnvert mikroskop (Olympus)
13. Santrifüj (Hettich)
14. İnkübatör (Sanyo)
15. Hücre sayımı ve canlılık analizi cihazı (Vi-cell[®], Beckman Coulter)

4.1.4. Ovositlerin kültürü

4.1.4.1. Mikroenjeksiyon

1. Gamet kültür ortamı (G-IVFTM Plus, Vitrolife)
2. Mineral yağı (OvoilTM, Vitrolife)
3. 60 mm çaplı steril polistren hücre kültür kapları (Orange Scientific)
4. İnvert mikroskop (Olympus)
5. Mikromanipülatör (Eppendorf)
6. Yağlı mikroenjektör (CellTram[®], Eppendorf)
7. Tutucu mikropipet (Holding[®], Origio)
8. Enjeksiyon mikropipeti (ICSI[®], Origio)

4.1.4.2. İn vitro matürasyon

1. Gamet kültür ortamı (G-IVFTM Plus, Vitrolife)
2. Stereomikroskop (Nikon)
3. İnkübatör (Sanyo)

4.1.5. Vero, MCF-7 ve granüloza hücrelerinde immünoflüoresan işaretlemeler

4.1.5.1. Fiksasyon

1. Yıkama çözeltisi (D-PBS): PBS (Sigma, P4417), 0,6 mM CaCl₂·2H₂O (Sigma, C7902), 0,5 mM MgCl₂·6H₂O (Sigma, M2393)
2. Saf metanol (Scharlau, ME0301)
3. PBS (Sigma, P4417)
4. %2 NaN₃ (Sigma, S2002)

4.1.5.1. oęalan hücrelerin işaretlenmesi

1. Monoklonal anti-ki-67 fare IgG (Sigma, A8604), PBS (Sigma, P4417) içinde 1:100 seyreltme
2. FITC (Fluorescein Isothiocyanate) konjuge kei anti-fare IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-095-166), PBS (Sigma, P4417) içinde 1:100 seyreltme

4.1.5.2. DNA kırıklarının işaretlenmesi

1. In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, 11 684 795 910)

4.1.5.3. Fosfotidilserin moleküllerinin işaretlenmesi

1. Monoklonal anti-annexin-V fare IgG (Sigma, A8604), PBS (Sigma, P4417) içinde 1:20 seyreltme
2. FITC (Fluorescein Isothiocyanate) konjuge kei anti-fare IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-095-166), PBS (Sigma, P4417) içinde 1:100 seyreltme

4.1.5.4. NQO1 proteininin işaretlenmesi

1. Monoklonal anti-NQO1 fare IgG (Cell Signaling, 3187), PBS (Sigma, P4417) içinde 1:50 seyreltme
2. FITC-konjuge kei anti-fare IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-095-166), PBS (Sigma, P4417) içinde 1:100 seyreltme

4.1.5.5. Hcre ekirdeęinin işaretlenmesi

1. 7-AAD (7-aminoactinomycin D, Sigma, 9400), PBS (Sigma, P4417) içinde 10 μ M

4.1.5.6. Görüntüleme

1. PBS (Sigma, P4417)
2. Kapatma zeltisi: 1:1 PBS (Sigma, P4417):Gliserol (Sigma, G5516), 1 μ g/mL Hoechst 33258 (Sigma, H6024)
3. Lam (Citoglass)
4. Lazer taramalı konfokal mikroskop (Carl Zeiss)

4.1.6. Ovositlerde immünoflüoresan işaretlemler

4.1.6.1. Fiksasyon

1. Mikrotübülüs stabilize edici karışım (5X):

PIPES (Sigma, P1851)_____ 15,12 g

MgCl₂·6H₂O (Sigma, M2393)_____ 0,51 g

EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid, Applichem, A0878)_____ 0,48 g

dH₂O_____ 100 mL

2. Mikrotübülüs stabilize edici fiksatif:

Mikrotübülüs stabilize edici karışım (5X)_____ 2 mL

D₂O_____ 5 mL

1 M DTT (1,4-Dithio-DL-threit(ol), Applichem, A2948)_____ 10 µL

1 mg/mL paklitaksel (Sigma, T7402)_____ 10 µL

1 mg/mL aprotinin (Sigma, A6279)_____ 1 µL

Formaldehit (Sigma, F1635)_____ 540 µL

%10 Triton (Sigma, X100)_____ 100 µL

Toplam hacim distile suyla 10 mL'ye tamamlandı.

3. Tek kuyucuklu steril polistren hücre kültür kabı (Orange Scientific)

4. 72 kuyucuklu steril polistren hücre kültür kabı (Greiner)

5. PBS (Sigma, P4417)

6. %2 NaN₃ (Sigma, S2002)

4.1.6.2. Mayoz mekiğinin işaretlenmesi

1. Monoklonal anti- α -tübülün fare IgG (Sigma, T9026), PBS (Sigma, P4417) içinde 1:100 seyreltme
2. Monoklonal anti- β -tübülün fare IgG (Sigma, T4026), PBS (Sigma, P4417) içinde 1:100 seyreltme
3. FITC-konjuge keçi anti-fare IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-095-166), PBS (Sigma, P4417) içinde 1:100 seyreltme

4.1.6.3. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi

1. 7-AAD (Sigma, 9400), PBS (Sigma, P4417) içinde 10 μ M

4.1.6.4. Görüntüleme

1. PBS (Sigma, P4417)
2. Kapatma çözeltisi: 1:1 PBS (Sigma, P4417):Gliserol (Sigma, G5516), 1 μ g/mL Hoechst 33258 (Sigma, H6024)
3. Lam (Citoglass)
4. 12 mm çaplı yuvarlak lamel (Electron Microscopy Sciences)
5. Lazer taramalı konfokal mikroskop (Carl Zeiss)

4.1.7. Ovaryum dokusunda immünoflüoresan işaretlemeler

4.1.7.1. Fiksasyon

1. Paraformaldehit (Sigma, 158127)
2. Sükroz (Sigma, S7903)
3. Poli-L-lizin (Sigma, P8920)
4. Kriyomatriks (Shandon, 6769006)
5. Lam (Citoglass)
6. Kriyomikrotom (Shandon)

4.1.7.2. DNA kırıklarının işaretlenmesi

1. PAP-Pen (Sigma, Z377821)

2. In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, 11 684 795 910)

4.1.7.3. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi

1. 7-AAD (Sigma, 9400), PBS (Sigma, P4417) içinde 10 µM

4.1.7.4. Görüntüleme

1. PBS (Sigma, P4417)
2. Kapatma çözeltisi: 1:1 PBS (Sigma, P4417):Gliserol (Sigma, G5516), 1 µg/mL Hoechst 33258 (Sigma, H6024)
3. Lamel (Citoglass)
4. Lazer taramalı konfokal mikroskop (Carl Zeiss)

4.1.8 Vero ve MCF-7 hücrelerinde Western Blot analizleri

4.1.8.1. Protein izolasyonu

1. Yıkama çözeltisi (D-PBS): PBS (Sigma, P4417), 0,6 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, C7902), 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, M2393)
2. Hücre lizis çözeltisi: 100 mm çaplı polistren hücre kültür kabı (Biochrom) için 100 µL Cell Extraction Buffer (Invitrogen, FNN0011), 2 µL Protease Inhibitor Coctail (Sigma, P2714)
3. Scraper (Orange Scientific)
4. Vorteks (IKA)
5. Ultrasonikatör (Sonopuls)
6. Soğutmalı santrifüj (Hettich)
7. -80°C derin dondurucu (Snijders Scientific)

4.1.8.2. Protein miktarının hesaplanması

1. Cell Extraction Buffer (Invitrogen, FNN0011)
2. 10.000 mg/mL BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, A9418)
3. BCA (Bicinchoninic Acid, Sigma, BCA1-1KT)
4. 96 kuyucuklu steril polistren hücre kültür kabı (Orange Scientific)

5. Spektrofotometre (Thermo Scientific)

4.1.8.3. Proteinlerin jel elektroforezle ayrıştırılması

1. pH: 8,8 Tris HCl çözeltisi (4X):

Tris (Bio-Rad, 161-0716)_____18,15 g

dH₂O_____40 mL

1 N HCl çözeltisiyle pH 8,8'e ayarlandı ve distile suyla toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

SDS (Sodium Dodecyl Sulphate, Bio-Rad, 161-0302)_____0,4 g

2. pH: 6,8 Tris HCl çözeltisi (4X):

Tris (Bio-Rad, 161-0716)_____6,05 g

dH₂O_____40 mL

1 N HCl çözeltisiyle pH 6,8'e ayarlandı ve distile suyla toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

SDS (Bio-Rad, 161-0302)_____0,4 g

3. Ayrıştırma jeli:

pH: 8,8 Tris HCl çözeltisi (4X)_____3,75 mL

37,5:1 Acrylamide:Bis (Bio-Rad, 161-0146)_____5 mL

dH₂O_____6,25 mL

TEMED (Tetramethylethylenediamine, Bio-Rad, 161-0800)_____10 µL

%10 APS (Ammonium Per Sulphate, Bio-Rad, 161-0700)_____50 µL

4. Toplama jeli:

pH: 6,8 Tris HCl çözeltisi (4X)_____ 650 µL
37,5:1 Acrylamide:Bis (Bio-Rad, 161-0146)_____ 1,25 mL
dH₂O_____ 3,05 mL
TEMED (Bio-Rad, 161-0800)_____ 5 µL
%10 APS (Bio-Rad, 161-0700)_____ 25 µL

5. Elektroforez çözeltisi (5X):

Tris (Bio-Rad, 161-0716)_____ 9 g
Glisin (Bio-Rad, 161-0718)_____ 43,2 g
SDS (Bio-Rad, 161-0302)_____ 3 g
dH₂O_____ 600 mL

pH'ın 8,3-8,6 aralığında olduğu kontrol edildi, pH ayarı yapılmadı, pH ölçümünden sonra toplam hacim distile suyla 1000 mL'ye tamamlandı.

6. 1 mm boşluklu kalın ve 12,5 cm x 6,5 cm x 1,5 mm ince camlar (Bio-Rad)
7. 10 kuyucuklu 1 mm jel tarağı (Bio-Rad)
8. Jel dökme standı (Bio-Rad)
9. Protein ladder (Bio-Rad, 161-0324)
10. Laemmli tamponu (2X) (Sigma, S3401)
11. Manyetik karıştırıcı (Jenway)
12. pH metre (Jenco)
13. Mini Protean[®] dikey elektroforez sistemi (Bio-Rad)
14. Güç kaynağı (Bio-Rad)

4.1.8.4.İmmünoiblotlama

1. Blotlama çözeltisi (10X):

Tris (Bio-Rad, 161-0716)_____ 3 g

Glisin (Bio-Rad, 161-0718)_____ 14,3 g

dH₂O_____ 700 mL

pH'ın 7,8-8 aralığında olduğu kontrol edildi, pH ayarı yapılmadı.

Saf metanol (Scharlau, ME0301)_____ 200 mL

Distile suyla toplam hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

2. Nitroselüloz membran (Bio-Rad)
3. Sünger (Bio-Rad)
4. Kurutma kağıdı (Bio-Rad)
5. Ponceau-S (Sigma, P3504)
6. TBS (Tris Buffered Saline) çözeltisi (10X):

Tris (Bio-Rad, 161-0716)_____ 60,55 g

NaCl (Sigma, S7653)_____ 80,66 g

dH₂O_____ 800 mL

1 N HCl çözeltisiyle pH 7,4'e ayarlandı ve distile suyla toplam hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

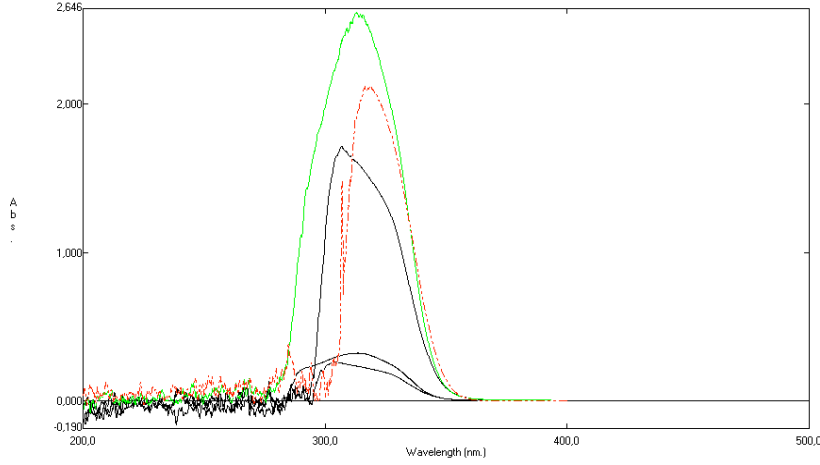
7. Yıkama çözeltisi (TBS-T): TBS çözeltisi (1X), %0,01 Tween-20 (Bio-Rad, 170-6531)
8. Bloklama çözeltisi: TBS-T, %5 yağsız süt tozu (Pınar)
9. Monoklonal anti-NQO1 fare IgG (Cell Signaling, 3187), bloklama çözeltisi içinde 1:1000 seyreltme
10. Monoklonal anti- β -aktin fare IgG (Abcam, ab8226), bloklama çözeltisi içinde 1:1000 seyreltme
11. Peroksidaz-konjuge keçi anti-fare IgG (Bio-Rad, 172-011), bloklama çözeltisi içinde 1:3000 seyreltme
12. Kemoluminesan substrat (Sigma, CPS-1-60)

13. Film (Amersham, 28906837)
14. Developer (Electron Microscopy Sciences, 74961-01)
15. Fiksatif (Electron Microscopy Sciences, 74962-01)
16. Stripping Buffer (Pierce, 21059)
17. Hiperfilm kaset (Bio-Rad)
18. Manyetik karıştırıcı (Jenway)
19. pH metre (Jenco)
20. Sallayıcı (Daigger)
21. Mini Trans-Blot[®] blotlama sistemi (Bio-Rad)
22. Güç kaynağı (Bio-Rad)

4.2. Yöntem

4.2.1. Dikumarol çözeltisinin hazırlanması ve fizyolojik pH'da çözünürlüğünün kontrolü

1. 10 mM stok dikumarol çözeltisi pH: 11,9 kültür ortamında, pH: 7,3 kültür ortamında ve pH: 7,3 gamet kültür ortamında 100 kat seyreltildi.
2. Spektrofotometrik ölçümler 562 nm dalga boyunda yapıldı (Şekil 4.2.1.1.).



Şekil 4.2.1.1. Dikumarolün Farklı Kültür Ortamları ve pH’larda Çözünürlük Grafiği

pH: 11,9 kültür ortamında 100 μ M dikumarol (yeşil eğri), pH: 7,3 kültür ortamında 100 μ M dikumarol (kırmızı eğri) ve pH: 7,3 gamet kültür ortamında 100 μ M dikumarol çözeltilerinin birbirine yakın absorbans değerlerine sahip olduğu gözlemlendi. İlerleyen deneylerde in vitro dikumarol uygulamaları düşük pH’lı kültür ortamlarında güvenle yapıldı.

4.2.3. Vero, MCF-7 ve granüloza hücrelerinin kültürü, sayımı ve canlılık analizleri

4.2.3.1. Vero ve MCF-7 hücrelerinin kültürü, sayımı ve canlılık analizleri

1. Vero veya MCF-7 hücreleri sıvı azot tankından 37°C’ye ayarlı çalkalamalı su banyosuna alındı.
2. Hücreler çözünür çözünmez konik tüpe aktarıldı. Tüpe 5 mL kültür ortamı eklendi ve hücreler 150g’de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
3. Hücre pelleti 10 mL kültür ortamıyla karıştırıldı ve 75 cm² kültür kabına alındı.
4. Hücreler 37°C ve %5 CO₂’e ayarlı inkübatörde kültüre edildi. Kültür ortamı pH takibi yapılarak yaklaşık 24 saatlik aralıklarla değiştirildi.
5. %80-90 konfluensiye ulaşan hücreler D-PBS’le yıkandı.
6. Hücreler 3 mL Tripsin-EDTA’yla 37°C’de 5 dk. tutularak kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı ve konik tüpe aktarıldı. Tüpe 9 mL kültür ortamı eklendi ve hücreler 150g’de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
7. Hücre pelleti kültür ortamıyla karıştırıldı. 1 mL hücre süspansiyonu hücre sayımı ve canlılık analizi için ayrıldı.
8. Hücre büyüklükleri Vi-cell[®] cihazına Vero hücreleri için 15-20 μ m, MCF-7 hücreleri için 20-25 μ m olarak tanımlandı ve 1 mL kültür ortamına düşen hücre sayısı belirlendi.

9. Canlılık oranları tripan mavisi yöntemiyle belirlendi. Tripan mavisi yöntemi Vi-cell® cihazıyla şu şekilde uygulandı: 1 mL hücre süspansiyonu 0,1 mL %0,4'lük tripan mavisi çözeltisiyle karıştırıldı. Canlı hücreler renksiz, ölü hücreler mavi renkte izlendi.
10. Hücre sayısı deney planına uygun olarak ayarlandı ve hücreler uygun hücre kültür kaplarına alındı (bkz. 5.1., 5.2., 5.3., 5.4., 5.5. ve 5.6.).

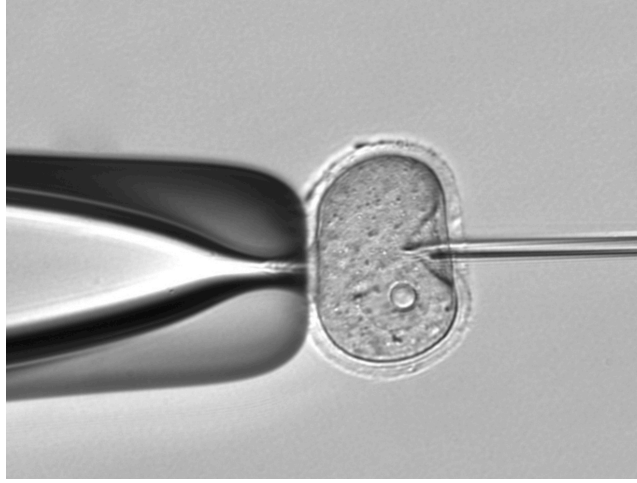
4.2.3.2. Granüloza hücrelerinin kültürü, sayımı ve canlılık analizleri

1. Granüloza hücreleri primer hücre kültürünün ardından D-PBS'le yıkandı (bkz. 4.2.2.).
2. Hücreler 3 mL Tripsin-EDTA'yla 37°C'de 5 dk. tutularak kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı ve konik tüpe aktarıldı. Tüpe 3 mL kültür ortamı eklendi ve hücreler 150g'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
3. Hücre pelleti kültür ortamıyla karıştırıldı. 1 mL hücre süspansiyonu hücre sayımı ve canlılık analizi için ayrıldı.
4. Hücre büyüklüğü Vi-cell® cihazına 15-50 µm olarak tanımlandı ve 1 mL kültür ortamına düşen hücre sayısı belirlendi.
5. Canlılık oranı tripan mavisi yöntemiyle belirlendi (bkz. 4.2.3.1.9.).
6. Hücre sayısı deney planına uygun olarak ayarlandı ve hücreler uygun hücre kültür kaplarına alındı (bkz. 5.1., 5.2., 5.3., 5.4., 5.5. ve 5.6.).

4.2.4. Ovositlerin kültürü

4.2.4.1. Mikroenjeksiyon

1. 60 mm çaplı hücre kültür kaplarında 100 µL'lik gamet kültür ortamı damlacıkları oluşturuldu.
2. Kültür kabına damlacıkların üzerini tamamen kapatacak kadar mineral yağı eklendi.
3. GV evresindeki ovositler damlacıklara yerleştirildi.
4. Ovosit tutucu mikropipetle sabitlendi.
5. Ovosit sitoplazmasına enjeksiyon mikropipetiyle deney planına uygun (bkz. 5.8.) dikumarol dozu enjekte edildi (Şekil 4.2.4.1.1.).



Şekil 4.2.4.1.1. Mikroenjeksiyon Yöntemi

Tutucu mikropipetle sabitlenen GV evresindeki bir fare ovositine enjeksiyon mikropipetiyle 100 μ M dikumarol uygulandı. **Objektif:** 20x

4.2.4.2. İn vitro matürasyon

1. GV evresindeki ovositler 18 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂'e ayarlı inkübatörde gamet kültür ortamı içinde inkübe edildi.
2. 18. saatin sonunda ovositlerin matürasyon aşamaları değerlendirildi (bkz. 5.8.).
3. MII evresindeki ovositler seçilerek takip eden deneylerde kullanılmak üzere uygun hücre kültür kaplarına alındı (bkz. 5.7.).

4.2.5. Vero, MCF-7 ve granüloza hücrelerinde immünoflüoresan işaretlemeler

4.2.5.1. Fiksasyon

1. 24 kuyucuklu kültür kaplarında poli-L-lizin kaplı yuvarlak lamellere ekili hücreler D-PBS'le yıkandı.
2. Her bir kuyucuğa 1 mL metanol eklendi ve hücreler +4°C'de 10 dk. fikse edildi.
3. Lameller PBS'le iki kez yıkandı ve %0,02 sodyum azidli PBS içinde +4°C'de saklandı.

4.2.5.2. Çoğalan hücrelerin işaretlenmesi

1. Lameller 10 μ L anti-ki-67 antikoruyla nemli ortamda 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

2. Lameller PBS'le yıkandı ve 10 µL flüoresan işaretli sekonder antikorla nemli ortamda 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

4.2.5.3. DNA kırıklarının işaretlenmesi

1. DNA kırıkları TUNEL yöntemiyle işaretlendi.
2. 450 µL substrat (flüoresan işaretli nükleotid) çözeltisi, 50 µL enzim (TdT) çözeltisiyle karıştırıldı.
3. Lameller 10 µL karışımla nemli ortamda 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

4.2.5.4. Fosfotidilserin moleküllerinin işaretlenmesi

1. Lameller 10 µL anti-annexin-V antikoruyla nemli ortamda 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
2. Lameller PBS'le yıkandı ve 10 µL flüoresan işaretli sekonder antikorla nemli ortamda 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

4.2.5.5. NQO1 proteininin işaretlenmesi

1. Lameller 10 µL anti-NQO1 antikoruyla nemli ortamda 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
2. Lameller PBS'le yıkandı ve 10 µL flüoresan işaretli sekonder antikorla nemli ortamda 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

4.2.5.6. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi

1. Lameller PBS'le yıkandı ve 10 µL 7-AAD'yle nemli ortamda 37°C'de 30 dk. inkübe edildi.

4.2.5.7. Görüntüleme

1. Lameller PBS'le yıkandı ve lama damlatılan 3 µL kapatma çözeltisi üzerine kapatıldı. Lamellerin etrafı tırnak cılasıyla çerçeveselendi.
2. Preparatlar gözlem yapılınca kadar -20°C'de saklandı.
3. Hücreler lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntülendi.
4. Granüloza hücrelerinde NQO1 proteininin miktarı deney grupları arasında sinyal eşikleme yöntemiyle karşılaştırıldı. Sinyal eşikleme yöntemi şu şekilde uygulandı: Uygulanan lazer gücü sabit tutuldu. Detektör kazancı (detector gain), arttırıcı kazancı

(amplifier gain) ve iğne deliği (pinhole) değerleri sinyalin en güçlü alındığı bölgenin 8 bitlik görüntüsünde 255. gri değerinden 10-20 sinyal almayı sağlayacak yoğunluk (intensity) değerine ayarlandı. 50. gri değerinin üzerindeki toplam yoğunluk değeri (μm^2) NQO1 proteininin miktarı olarak kabul edildi.

4.2.6. Ovositlerde immünoflüoresan işaretlemeler

4.2.6.1. Fiksasyon

1. Tek kuyucuklu kültür kabına 1 mL mikrotübülüs stabilize edici fiksatif eklendi ve ovositler 37°C'de 30 dk. fikse edildi.
2. Ovositler PBS'le iki kez yıkandı ve %0,02 sodyum azidli PBS içinde +4°C'de saklandı.

4.2.6.2. Mayoz mekiğinin işaretlenmesi

1. Ovositler 72 kuyucuklu kültür kabına alındı.
2. Ovositler α -tübülün ve β -tübülün antikorlarının toplam 10 μL 'lik 1:1 karışımıyla nemli ortamda 37°C'de 90 dk. inkübe edildi.
3. Ovositler PBS'le yıkandı ve 10 μL flüoresan işaretli sekonder antikorla nemli ortamda 37°C'de 90 dk. inkübe edildi.

4.2.6.3. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi

1. Ovositler PBS'le yıkandı ve 10 μL 7-AAD'yle nemli ortamda 37°C'de 45 dk. inkübe edildi.

4.2.6.4. Görüntüleme

1. Ovositler PBS'le yıkandı ve 3 μL kapatma çözeltisiyle lam ve yuvarlak lamel arasına sıkıştırıldı. Lamellerin etrafı tırnak cılasıyla çerçevelendi.
2. Preparatlar görüntüleme yapılıncaya kadar -20°C'de saklandı.
3. Ovositler lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntülendi.

4.2.7. Ovaryum dokusunda immünoflüoresan işaretlemler

4.2.7.1. Fiksasyon

1. Vücut dışına alınan ovaryumlar (bkz. 4.2.2.) %3.5 paraformaldehit içine alındı ve oda sıcaklığında 24 saat fikse edildi.
2. Ovaryumlar 1.2 M süktroz çözeltisi içine alındı ve +4°C’de 24 saat inkübe edildi.
3. Ovaryumlar kriyomatriks içine gömüldü ve metal yüzey üzerinde -60°C’de donduruldu.
4. Kriyomikrotomun çalışma sıcaklığı -30°C’ye ayarlandı ve poli-L-lizin kaplı lamalar üzerine 10 µm kalınlığında doku kesitleri alındı.

4.2.7.2. DNA kırıklarının işaretleme

1. Kesitler distile suda 5 dk. bekletildi ve kriyomatriks uzaklaştırıldı.
2. Kesitlerin çevresi PAP-Pen’le çizildi.
3. DNA kırıkları TUNEL yöntemiyle işaretleme.
4. 450 µL substrat çözeltisi, 50 µL enzim çözeltisiyle karıştırıldı.
5. Kesitler dokunun üzerini kapatacak kadar karışımla nemli ortamda 37°C’de 1 saat inkübe edildi.

4.2.7.3. Hücre çekirdeğinin işaretleme

1. Kesitler PBS’le yıkandı ve dokunun üzerini kapatacak kadar 7-AAD’yle nemli ortamda 37°C’de 30 dk. inkübe edildi.

4.2.7.4. Görüntüleme

1. Kesitler PBS’le yıkandı ve dokunun üzerini kapatacak kadar kapatma çözeltisiyle lam ve lamel arasına sıkıştırıldı. Lamellerin etrafı tırnak cilasıyla çerçeveselendi.
2. Preparatlar görüntüleme yapılmaya kadar -20°C’de saklandı.
3. Kesitler lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntüleme.

4.2.8. Vero ve MCF-7 hücrelerinde Western Blot analizleri

4.2.8.1. Protein izolasyonu

1. 100 mm çaplı hücre kültür kaplarına ekili hücreler D-PBS'le yıkandı.
2. Kültür kabına hücre lizis çözeltisi eklendi ve hücreler kültür kabı yüzeyinden kazınarak konik tüpe alındı.
3. Hücreler ultrasonikatörde 1 s.'de 5 sinyal gönderilerek mekanik olarak parçalandı.
4. Hücreler 1 saat buz üzerinde bekletildi ve 10 dk.'da bir karıştırıldı.
5. Hücreler +4°C'de 15000g'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant (protein lizati) bir sonraki aşamaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

4.2.8.2. Protein miktarının hesaplanması

1. 10.000 mg/mL BSA çözeltisi Cell Extraction Buffer içinde ardarda 7 kez 1:1 sulandırıldı. Her bir sulandırmada azalan konsantrasyonda BSA çözeltileri elde edildi (sırasıyla 5.000 mg/mL, 2.500 mg/mL, 1.250 mg/mL, 625 mg/mL, 312,5 mg/mL, 156,25 mg/mL, 78,125 mg/mL). BSA çözeltileri bilinmeyen protein miktarının tayininde standart olarak kullanıldı, Cell Extraction Buffer kör (sıfır değeri) olarak kabul edildi.
2. Protein standartları, protein lizatları ve Cell Extraction Buffer 200 µL BCA içinde 100 kat seyreltildi ve 96 kuyucuklu kültür kabına aktarıldı.
3. Kültür kabı 60°C'de 15 dk. inkübe edildi ve BCA'nın renk değiştirmesi sağlandı.
4. Spektrofotometrik ölçümler 562 nm dalga boyunda yapıldı.
5. Her bir protein lizatında toplam protein miktarı protein standartlarının absorbans değerlerine göre hesaplandı.

4.1.8.3. Proteinlerin jel elektroforezle ayrıştırılması

1. Kalın ve ince camlar jel dökme standına yerleştirildi.
2. Ayrıştırma jeli kalın cam ve ince cam arasında oluşturulan 1 mm boşluğa döküldü ve katılaşması beklendi.
3. Toplama jeli ayrıştırma jeli üzerine döküldü, jel üzerinde jel tırağıyla 10 adet kuyucuk oluşturuldu ve jelin katılaşması beklendi.

4. Her bir protein lizatından 50 µg protein Laemmli tamponuyla 1:1 oranında karıştırıldı.
5. 5 µL protein ladder Laemmli tamponuyla 1:1 oranında karıştırıldı.
6. Protein lizatları ve protein ladder 3 boyutlu yapılarını kaybederek jel üzerinde kolay hareket edebilmeleri için 90°C’de 5 dk. inkübe edildi.
7. Katılaştıran jel elektroforez tankına yerleştirildi ve tank elektroforez çözeltisiyle dolduruldu.
8. Protein lizatları ve protein ladder her bir kuyucuğa 50 µg protein gelecek şekilde kuyucuklara yüklendi.
9. Güç kaynağı elektroforez tankına bağlandı, 100 V’a ayarlandı ve çalıştırıldı.
10. Proteinler jelin en alt ucuna kadar yürüdüğünde elektroforez işlemi sonlandırıldı.

4.2.8.4. İmmünoblotlama

1. Jel +4°C’ye soğutulmuş blotlama çözeltisi içine alınarak camlardan ayrıldı.
2. Nitroselüloz membran, süngerler ve kurutma kağıtları blotlama çözeltisi içine alındı.
3. Sünger üzerine sırasıyla kurutma kağıdı, jel, nitroselüloz membran, kurutma kağıdı ve sünger yerleştirildi.
4. Oluşturulan sandviç blotlama tankına yerleştirildi ve tank blotlama çözeltisiyle dolduruldu.
5. Tank manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi.
6. Güç kaynağı elektroforez tankına bağlandı, 32 V’a ayarlandı ve çalıştırıldı.
7. Proteinler jelden membrana aktarılmak üzere gece boyunca +4°C’de tutuldu.
8. Takip eden tüm inkübasyonlar oda sıcaklığında cam Petri kabı içinde ve sallayıcı üzerinde yapıldı.
9. Membran Ponceau-S’de 5 dk. inkübe edildi ve proteinler kırmızı renkte izlendi. Ponceau-S membrandan TBS çözeltisiyle (1X) uzaklaştırıldı.
10. Membran bloklama çözeltisinde 1 saat inkübe edildi.
11. Membran anti-NQO1 antikoruyla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ve ardından TBS-T’yle 30 dk. yıkandı.
12. Membran peroksidaz işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ve ardından TBS-T’yle 30 dk. yıkandı.
13. Takip eden işlemler karanlık ortamda yapıldı.

14. Membran kemoluminesan substratla 5 dk. inkübe edildi, kurutuldu ve hiperfilm kaset içine aktarıldı.
15. Film membranın üzerine gelecek şekilde hiperfilm kaset içine yerleştirildi. 1-5 dk. boyunca kemoluminesan ışımının membrandan filme geçişi sağlandı.
16. Film sırasıyla developer, fiksatif ve distile sudan geçirildi.
17. Protein ladder ve deney grupları film üzerinde asetat kalemle işaretlendi.
18. Membran Stripper Buffer'la 15 dk. inkübe edildi ve ardından TBS-T'yle 3 kez 15 dk. yıkandı.
19. Membran anti- β -aktin antikoruyla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ve ardından TBS-T'yle 30 dk. yıkandı.
20. 12-18. aşamalar tekrarlandı.
21. Membran TBS-T içinde +4°C'de saklandı.

4.2.9. Verilerin analizi

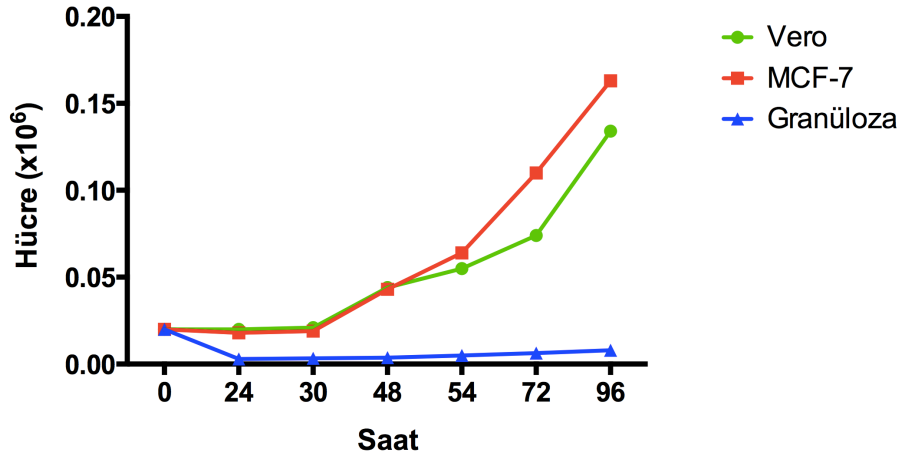
1. Western Blot ölçümleri ImageJ 1.47v programıyla gerçekleştirildi.
2. Tüm grafikler Graphpad Prism Version 6.0c programıyla oluşturuldu. Ortalama değerler ve standart sapmalar program tarafından 3 teknik veya 3 biyolojik tekrar esas alınarak hesaplandı.
3. Deney grupları arasında farkın anlamlılığı SPSS 15.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programıyla değerlendirildi. Normal dağılım gösteren veriler One-way ANOVA (Analysis of Variance) ve Fisher's LSD (Least Significant Difference) testleriyle, normal dağılım göstermeyen veriler Chi-square (X^2) testiyle analiz edildi. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinin Çoğalma Özellikleri

60 mm kültür kaplarına kültür kabı başına 20.000 hücre ekildi. Hücreler 24, 30, 48, 54, 72 ve 96. saatlerde sayıldı. Çalışmamızda tüm deneyler 3 kez tekrarlandı. Tüm hesaplamalarda ortalama değerler dikkate alındı.

Vero ve MCF-7 hücreleri 8. saatte kültür kabı yüzeyine tutundu. Hücreler 30. saate kadar uzayan *lag* fazının ardından *log* fazına girdi (Şekil 5.1.1.). Kendini ikiye katlama süreleri Çizelge 5.1.1.'de gösterildiği gibi hesaplandı. Hesaplamalarda *log* fazı değerleri dikkate alındı. Buna göre kendini ikiye katlama süresi Vero hücreleri için 25 saat, MCF-7 hücreleri için 22 saat olarak belirlendi.



Şekil 5.1.1. Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinin Zamana Karşı Çoğalma Eğrileri

Granüloza hücrelerinin çoğalma özellikleri primer hücre kültürünü izleyen ilk pasajda (P₁) değerlendirildi. Hücreler 10. saatte kültür kabı yüzeyine tutundu. 24. saatte hücre sayısı yaklaşık 10 kat azaldı ($3 \pm 1 \times 10^3$). İlerleyen saatlerde hücre sayısı artmakla birlikte, bu artış logaritmik değildi (48, 72 ve 96. saatler için sırasıyla $3,7 \pm 2,1 \times 10^3$, $6,3 \pm 1,5 \times 10^3$ ve $8 \pm 2 \times 10^3$) (Şekil 5.1.1.). 24. saatten önce hücre artışı izlenmediğinden hesaplamalarda ilk 24 saat dikkate alınmadı. Buna göre granüloza hücreleri için kendini ikiye katlama süresi 51 saat olarak belirlendi (Çizelge 5.1.1.).

Çizelge 5.1.1. Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinin Kendini İkiye Katlama Sürelerinin Hesaplanması

Hücre tipi	0. saat	24. saat	30. saat	48. saat
Vero ($\times 10^3$)	20	20,3 $\pm$ 4,5	21 $\pm$ 4	44,3 $\pm$ 15
MCF-7 ($\times 10^3$)	20	18,3 $\pm$ 1,2	19,3 $\pm$ 0,6	42,7 $\pm$ 8,3
Granüloza ($\times 10^3$)	20	3 $\pm$ 1	3,3 $\pm$ 2,3	3,7 $\pm$ 2,1

Çizelge 5.1.1. (devam) Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinin Kendini İkiye Katlama Sürelerinin Hesaplanması

DT: Kendini ikiye katlama süresi

T: *log* fazının başından itibaren geçen saat cinsinden süre

Xb: *log* fazının başında hücre sayısı

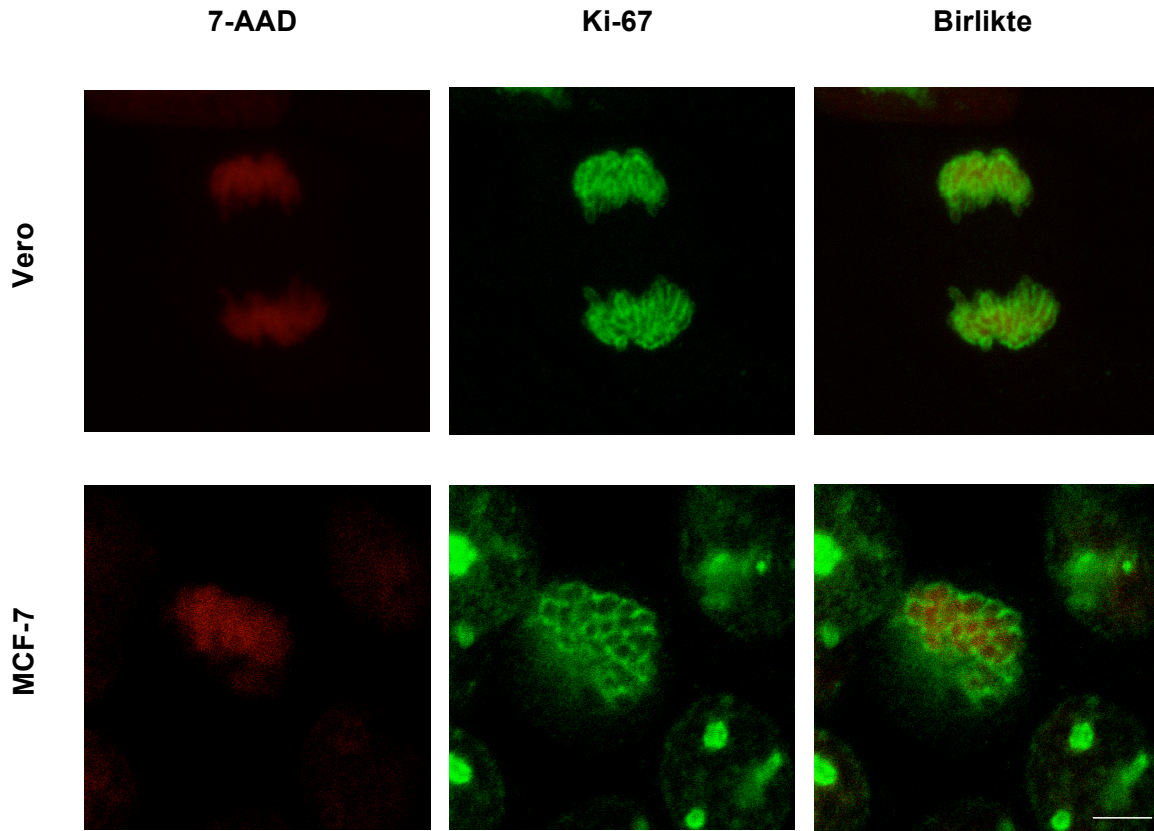
Xe: 96. saatin sonunda hücre sayısı

Hücre tipi	54. saat	72. saat	96. saat	DT=Tln2/ ln(Xe-Xb)
Vero ($\times 10^3$)	54,7 $\pm$ 14,5	73,7 $\pm$ 24,7	134,7 $\pm$ 42,8	25 saat
MCF-7 ($\times 10^3$)	63,7 $\pm$ 7,1	106 $\pm$ 21,2	163,3 $\pm$ 15,3	22 saat
Granüloza ($\times 10^3$)	5 $\pm$ 2	6,3 $\pm$ 1,5	8 $\pm$ 2	51 saat

5.2. Dikumarolün Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinin Çoğalma Özelliklerine Etkileri

24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilen Vero ve MCF-7 hücrelerine 30. saatte 0 veya 100 μ M dikumarol uygulandı. Hücreler dikumarol uygulamasını izleyen 48. saatte fiks edildi ve çoğalan hücrelerin belirlenmesi amacıyla anti-ki-67 antikoruyla işaretlendi.

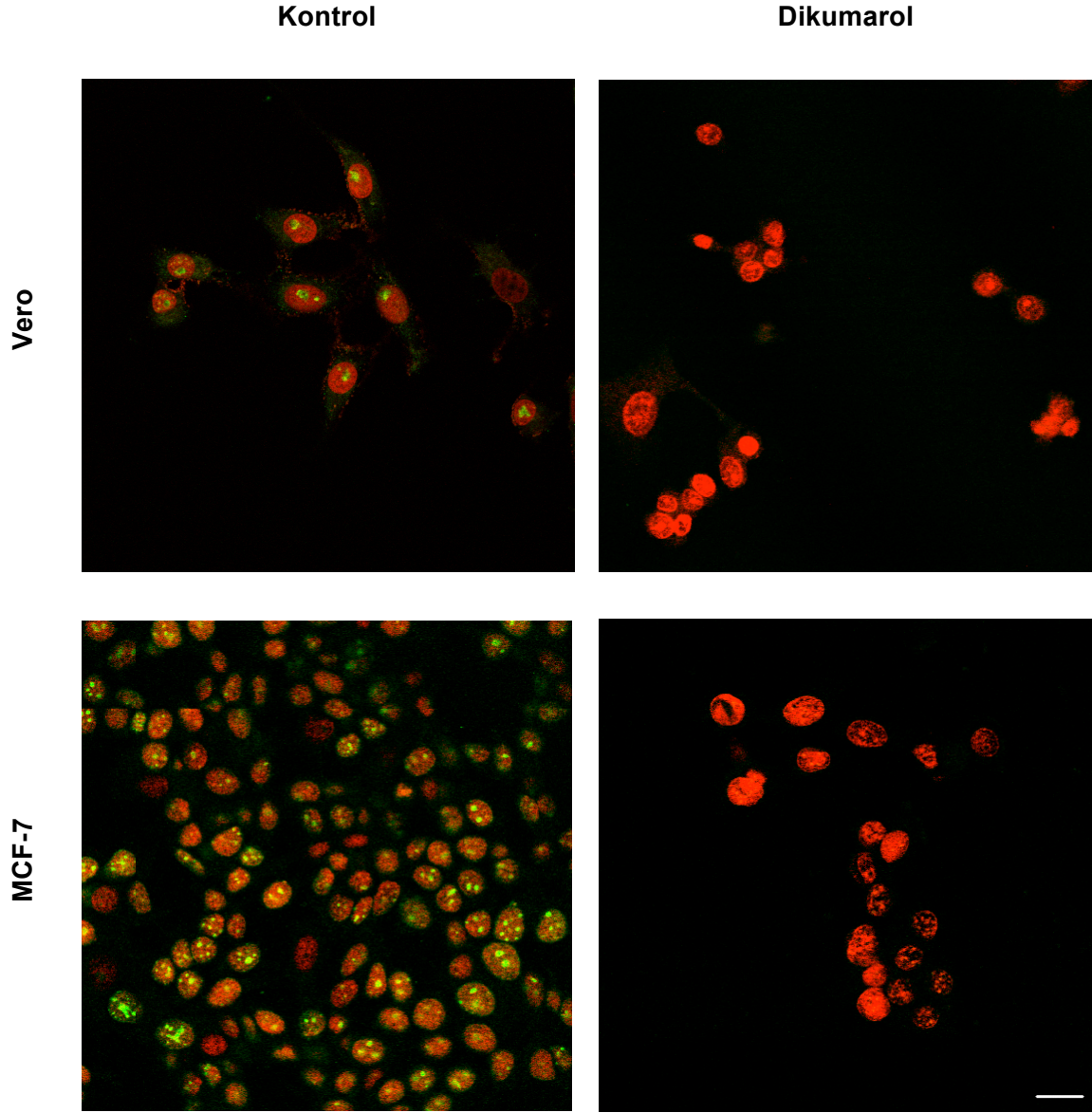
Ki-67 antijeni tipik olarak çoğalma özelliği gösteren interfaz evresindeki hücrelerde çekirdekçikte, mitozun farklı evrelerinde kromozomların etrafında izlendi. Hücreler kontrol gruplarında çoğalma özelliği gösterirken 100 μ M dikumarol uygulanan gruplarda Ki-67 işaretlenmesi izlenmedi (Şekil 5.2.1. ve 5.2.2.).



Şekil 5.2.1. Çoğalan Vero ve MCF-7 Hücrelerinde Ki-67 İfadesi

Ki-67 antijeni dikumarol uygulanmayan bir Vero hücresinde mitozun anafaz evresinde, dikumarol uygulanmayan bir MCF-7 hücresinde mitozun metafaz evresinde kromozomların etrafında izlendi.

Ölçek çubuğu: 5 μ m



Şekil 5.2.2. Dikumarol Uygulanan Vero ve MCF-7 Hücrelerinde Ki-67 İfadesinin Kontrol Grubuna Göre Değişimi

Ki-67 antijeni dikumarol uygulanmayan kontrol gruplarında interfaz evresindeki Vero ve MCF-7 hücrelerinde çekirdekçikte izlenirken, 100 μ M dikumarol uygulanan gruplarda hiçbir hücrede izlenmedi. **Yeşil sinyal:** Ki-67 antijeni, **Kırmızı sinyal:** Çekirdek, **Ölçek çubuğu:** 20 μ m

60 mm kültür kaplarına kültür kabı başına 20.000 hücre ekildi. Vero ve MCF-7 hücrelerine 30. saatte 0, 10, 50, 100 veya 200 μM , granüloza hücrelerine 30. saatte 0, 50 veya 100 μM dikumarol uygulandı. Hücreler dikumarol uygulamasını izleyen 24 ve 48. saatlerde sayıldı.

Dikumarol uygulanmayan Vero hücrelerinin sayısı 24 saatlik kültürün sonunda yaklaşık 2 kat artarken ($44,3 \pm 15 \times 10^3$), dikumarol uygulanan gruplarda hücre sayısında kontrol grubuna göre doza bağlı olarak bir düşüş izlendi (10, 50, 100 ve 200 μM için sırasıyla $41,3 \pm 14 \times 10^3$, $34 \pm 11,1 \times 10^3$, $29,3 \pm 10,5 \times 10^3$ ve $19,7 \pm 3,8 \times 10^3$). Bu düşüşün kontrol grubuyla 200 μM dikumarol uygulanan grup arasında anlamlı olduğu saptandı ($p=0,026$). 48 saatlik kültür boyunca dikumarol uygulanmayan Vero hücrelerinin sayısı logaritmik olarak artmaya devam ederken ($73,7 \pm 24,7 \times 10^3$), dikumarol uygulanan gruplarda hücre sayısı kontrol grubuna göre doza bağlı olarak azaldı (10, 50, 100 ve 200 μM için sırasıyla $70 \pm 20 \times 10^3$, $46,3 \pm 16,3 \times 10^3$, $32,3 \pm 11,2 \times 10^3$ ve $19 \pm 3,5 \times 10^3$). Kontrol grubuyla 100 ve 200 μM dikumarol uygulanan gruplar arasında 48 saatlik kültürün sonunda hücre sayıları açısından anlamlı fark izlendi (sırasıyla $p=0,013$ ve $p=0,003$) (Çizelge 5.2.1. ve Şekil 5.2.3.).

Çizelge 5.2.1. Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinin Değişen Dikumarol Dozlarında Zamana Karşı Çoğalma Sonuçları

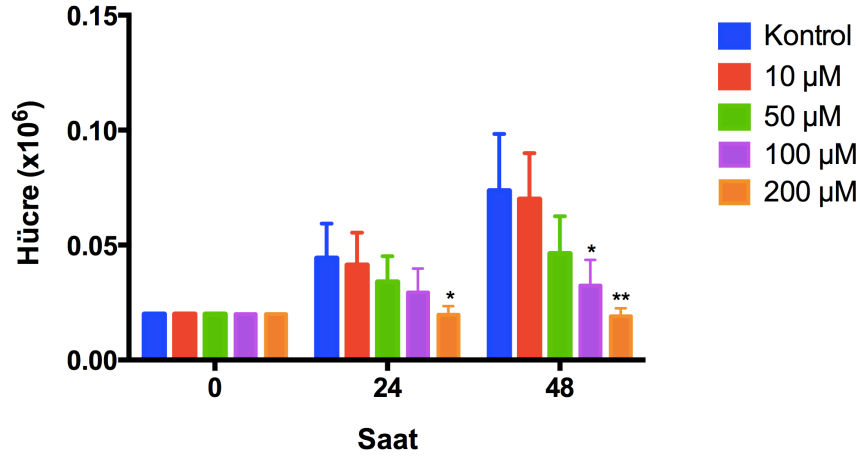
$p < 0,05$ kontrol grubuna göre hücre sayısı açısından anlamlı farkın olduğuna işaret etmektedir.

Hücre tipi	0. saat	24. saat				
	-	Kontrol	10 μM	50 μM	100 μM	200 μM
Vero ($\times 10^3$)	20	$44,3 \pm 15$	$41,3 \pm 14$ $p=0,758$	$34 \pm 11,1$ $p=0,301$	$29,3 \pm 10,5$ $p=0,144$	$19,7 \pm 3,8$ $p=0,026$
MCF-7 ($\times 10^3$)	20	$42,7 \pm 8,3$	34 ± 4 $p=0,045$	$29 \pm 2,7$ $p=0,005$	$25,7 \pm 2,1$ $p=0,001$	$23,3 \pm 3,2$ $p < 0,001$
Granüloza ($\times 10^3$)	20	$24,3 \pm 4$	-	$22,3 \pm 2$ $p=0,426$	22 ± 2 $p=0,357$	-

Çizelge 5.2.1. (devam) Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinin Değişen Dikumarol Dozlarında Zamana Karşı Çoğalma Sonuçları

p<0,05 kontrol grubuna göre hücre sayısı açısından anlamlı farkın olduğuna işaret etmektedir

Hücre tipi	48. saat				
	Kontrol	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM
Vero (x10 ³)	73,7±24,7	70±20 p=0,795	46,3±16,3 p=0,074	32,3±11,2 p=0,013	19±3,5 p=0,003
MCF-7 (x10 ³)	106±21,2	70,3±10 p=0,004	48±11,4 p<0,001	30±3 p<0,001	22±4,4 p<0,001
Granüloza (x10 ³)	23,7±1,2	-	22,3±2,3 p=0,382	22,3±1,5 p=0,382	-



Şekil 5.2.3. Vero Hücreleri Sayılarının Dikumarol Dozu ve Zamana Bağlı Değişim Grafiği

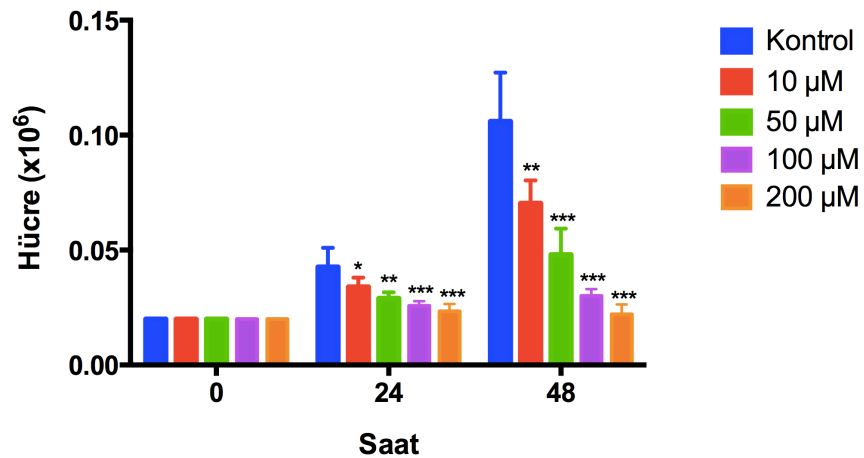
24. saatte kontrol grubuyla 200 µM dikumarol uygulanan grup arasında, 48. saatte kontrol grubuyla 100 ve 200 µM dikumarol uygulanan gruplar arasında hücre sayısı açısından anlamlı fark izlendi.

* p<0,05, ** p<0,01

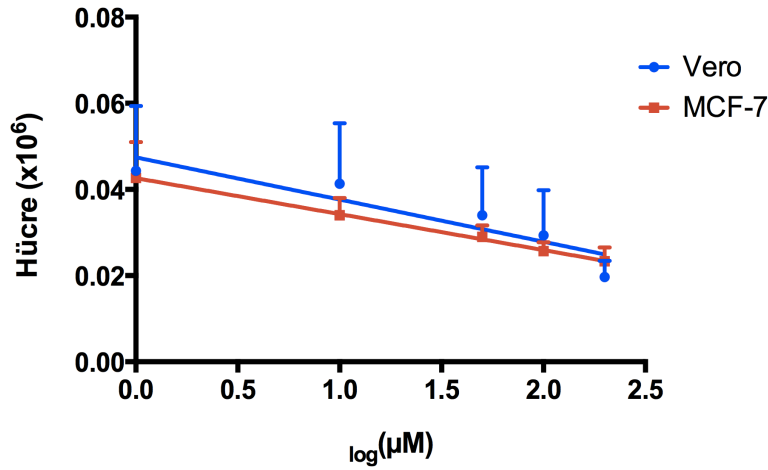
Dikumarol uygulanmayan MCF-7 hücrelerinin sayısı 24 saatlik kültürün sonunda yaklaşık 2 kat artarken ($42,7 \pm 8,3 \times 10^3$), dikumarol uygulanan gruplarda hücre sayısı kontrol grubuna göre doza bağlı olarak azaldı (10, 50, 100 ve 200 µM için sırasıyla $34 \pm 4 \times 10^3$, $29 \pm 2,7 \times 10^3$, $25,7 \pm 2,1 \times 10^3$, $19,7 \pm 3,8 \times 10^3$ ve $23,3 \pm 3,2 \times 10^3$). Kontrol grubuyla dikumarol uygulanan tüm gruplar arasında 24 saatlik kültürün sonunda hücre sayıları açısından anlamlı fark izlendi (10, 50, 100 ve 200 µM için sırasıyla p=0,045, p=0,005, p=0,001 ve p<0,001). 48 saatlik kültür boyunca dikumarol uygulanmayan MCF-7 hücrelerinin sayısı logaritmik olarak artmaya devam ederken ($106 \pm 21,2 \times 10^3$), dikumarol uygulanan gruplarda

hücre sayısı kontrol grubuna göre doza bağlı olarak azaldı (10, 50, 100 ve 200 μM için sırasıyla $70,3 \pm 10 \times 10^3$, $48 \pm 11,4 \times 10^3$, $30 \pm 3 \times 10^3$ ve $22 \pm 4,4 \times 10^3$). Kontrol grubuyla dikumarol uygulanan tüm gruplar arasında 48 saatlik kültürün sonunda hücre sayıları açısından anlamlı fark izlendi (10, 50, 100 ve 200 μM için sırasıyla $p=0,004$, $p<0,001$, $p<0,001$ ve $p<0,001$) (Çizelge 5.2.1. ve Şekil 5.2.4.). Hücre çoğalmasının %50 inhibisyonu (IC-50) Şekil 5.2.5.'de gösterildiği gibi hesaplandı. Buna göre dikumarolün IC-50 değeri Vero hücreleri için 50 μM , MCF-7 hücreleri için 40 μM olarak belirlendi.

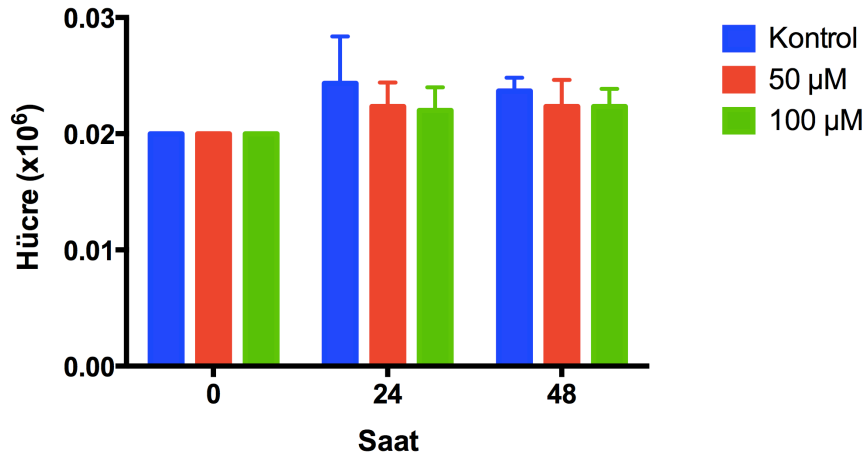
Dikumarol uygulanmayan granüloza hücrelerinin sayısında 24 saatlik kültür sonunda bir artış izlenmezken ($24,3 \pm 4 \times 10^3$), dikumarol uygulanan gruplarda hücre sayısı kontrol grubuna göre azaldı (50 ve 100 μM için sırasıyla $22,3 \pm 2,1 \times 10^3$ ve $22 \pm 2 \times 10^3$). Kontrol grubuyla 50 ve 100 μM dikumarol uygulanan gruplar arasında 24 saatlik kültürün sonunda hücre sayıları açısından anlamlı fark izlenmedi (sırasıyla $p=0,426$ ve $p=0,357$). 48 saatlik kültür boyunca dikumarol uygulanmayan granüloza hücrelerinin sayısında bir değişiklik gözlenmezken ($23,7 \pm 1,2 \times 10^3$), dikumarol uygulanan gruplarda hücre sayısı kontrol grubuna göre azaldı (50 ve 100 μM için sırasıyla $22,3 \pm 2,3 \times 10^3$ ve $22,3 \pm 1,5 \times 10^3$). Kontrol grubuyla 50 ve 100 μM dikumarol uygulanan gruplar arasında 48 saatlik kültürün sonunda hücre sayıları açısından anlamlı fark izlenmedi (sırasıyla $p=0,382$ ve $p=0,382$) (Çizelge 5.2.1. ve Şekil 5.2.6.).



Şekil 5.2.4. MCF-7 Hücresi Sayılarının Dikumarol Dozu ve Zamana Bağlı Değişim Grafiği
24. ve 48. saatte kontrol grubuyla dikumarol uygulanan tüm gruplar arasında hücre sayısı açısından anlamlı fark izlendi. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$



Şekil 5.2.5. Dikumarolün Vero ve MCF-7 Hücreleri İçin IC-50 Değerinin Hesaplanması
Değişen dikumarol dozlarının logaritmik değerlerine karşılık gelen hücre sayılarıyla doğrusal bir grafik oluşturuldu. Buna göre Vero hücreleri için $32,2 \times 10^3$, MCF-7 hücreleri için $30,7 \times 10^3$ hücreye karşılık gelen dikumarol dozlarının logaritmik değerleri sırasıyla 1,564 (50 μM) ve 1,438 (40 μM) olarak hesaplandı.



Şekil 5.2.6. Granuloza Hücreleri Sayılarının Dikumarol Dozu ve Zamana Bağlı Değişim Grafiği
24 ve 48. saatlerde kontrol grubuyla dikumarol uygulanan gruplar arasında hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi.

5.3. Dikumarolün Vero, MCF-7 ve Granuloza Hücrelerinde Mitoza Etkileri

24 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 20.000 hücre ekildi. Vero ve MCF-7 hücrelerine 30. saatte, granuloza hücrelerine 24. saatte 0, 50 veya 100 μM dikumarol uygulandı. Hücreler dikumarol uygulamasını izleyen 24. saatte fiks edildi ve hücre

çekirdekleri 7-AAD'yle işaretlendi. Her bir deney grubundan en az 1000 hücre sayılarak bunların içindeki mitotik hücre sayısı (mitoz indeksi) belirlendi.

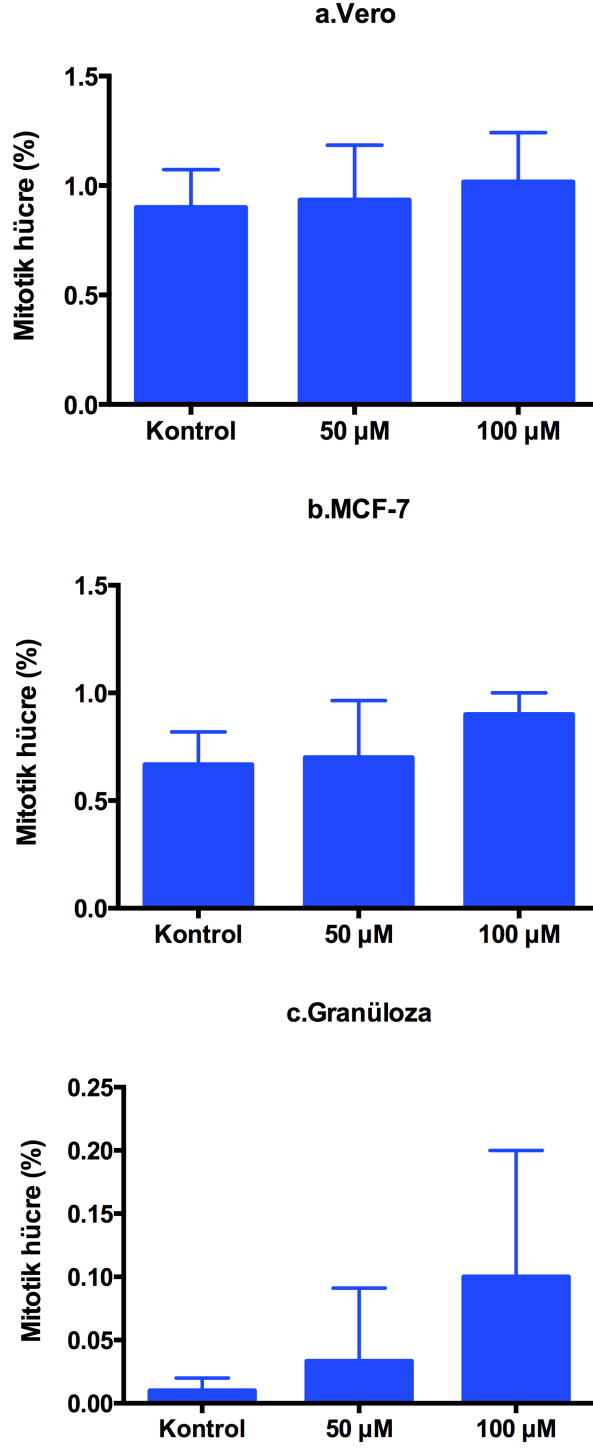
Vero hücrelerinde mitotik hücre sayıları kontrol grubuyla 50 ve 100 μM dikumarol uygulanan gruplar arasında benzerdi (sırasıyla $\%0,9\pm0,17$, $\%0,93\pm0,25$ ve $\%1,02\pm0,23$). Gruplar arasında mitotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi (50 ve 100 μM için sırasıyla $p=0,858$ ve $p=0,539$) (Çizelge 5.3.1. ve Şekil 5.3.1.a.).

Çizelge 5.3.1. Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinin Değişen Dikumarol Dozlarında Mitotik Hücre Sayısı Sonuçları
p değerleri gruplar arasında mitotik hücre sayısı açısından anlamlı farkın olmadığına işaret etmektedir.

Hücre tipi	Kontrol	50 μM	100 μM
Vero (%)	$0,9\pm0,17$	$0,93\pm0,25$ $p=0,858$	$1,02\pm0,23$ $p=0,539$
MCF-7 (%)	$0,66\pm0,15$	$0,7\pm0,26$ $p=0,833$	$0,9\pm0,1$ $p=0,175$
Granüloza (%)	$0,01\pm0,01$	$0,03\pm0,06$ $p=0,604$	$0,07\pm0,12$ $p=0,315$

Dikumarol uygulanan MCF-7 hücrelerinde mitotik hücre sayıları kontrol grubuna yakındı (0, 50 ve 100 μM için sırasıyla $\%0,66\pm0,15$, $\%0,7\pm0,26$ ve $\%0,9\pm0,1$). Gruplar arasında mitotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi (50 ve 100 μM için sırasıyla $p=0,833$ ve $p=0,175$) (Çizelge 5.3.1. ve Şekil 5.3.1.b.).

Granüloza hücrelerinde mitotik hücre sayıları kontrol grubuyla 50 ve 100 μM dikumarol uygulanan gruplar arasında benzerdi (sırasıyla $\%0,01\pm0,01$, $\%0,03\pm0,26$ ve $\%0,07\pm0,1$). Gruplar arasında mitotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi (50 ve 100 μM için sırasıyla $p=0,604$ ve $p=0,315$) (Çizelge 5.3.1. ve Şekil 5.3.1.c.).



Şekil 5.3.1. a.Vero, b.MCF-7 ve c.Granüloza Hücrelerinde Mitotik Hücre Sayılarının Dikumarol Dozuna Bağlı Değişim Grafiği
Kontrol grubuyla dikumarol uygulanan gruplar arasında mitotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi.

5.4. Dikumarolün Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinin Canlılık Oranlarına Etkileri

60 mm kültür kaplarına kültür kabı başına 20.000 hücre ekildi. Vero ve MCF-7 hücrelerine 30. saatte 0, 10, 50 100 veya 200 μ M, granüloza hücrelerine 24. saatte 0, 50 ve 100 μ M dikumarol uygulandı. Hücrelerin canlılık oranları dikumarol uygulamasını izleyen 24 ve 48. saatlerde belirlendi.

Vero hücrelerinde kontrol grubuyla 10 ve 50 μ M dikumarol uygulanan gruplar arasında 24 saatlik kültürün sonunda canlılık oranları açısından fark izlenmezken (sırasıyla %87 $\pm$ 4, %88 $\pm$ 7 ve %82 $\pm$ 4), 100 ve 200 μ M dikumarol uygulanan gruplarda canlılık oranları kontrol grubuna göre doza bağlı olarak azaldı (sırasıyla %67 $\pm$ 10 ve %63 $\pm$ 9). Kontrol grubuyla 100 ve 200 μ M dikumarol uygulanan gruplar arasında 24 saatlik kültürün sonunda canlılık oranları açısından anlamlı fark saptandı ($p=0,016$, $p<0,001$ ve $p<0,001$). Kontrol grubuyla 10 ve 50 μ M dikumarol uygulanan gruplar arasında 48 saatlik kültürün sonunda canlılık oranları açısından fark izlenmezken (sırasıyla %88 $\pm$ 4 ve %79 $\pm$ 4), 100 ve 200 μ M dikumarol uygulanan gruplarda canlılık oranları kontrol grubuna göre doza bağlı olarak azaldı (sırasıyla %61 $\pm$ 12 ve %60 $\pm$ 12). Kontrol grubuyla 100 ve 200 μ M dikumarol uygulanan gruplar arasında 48 saatlik kültürün sonunda canlılık oranları açısından anlamlı fark izlendi (sırasıyla $p=0,003$ ve $p=0,002$) (Çizelge 5.4.1. ve Şekil 5.4.1.).

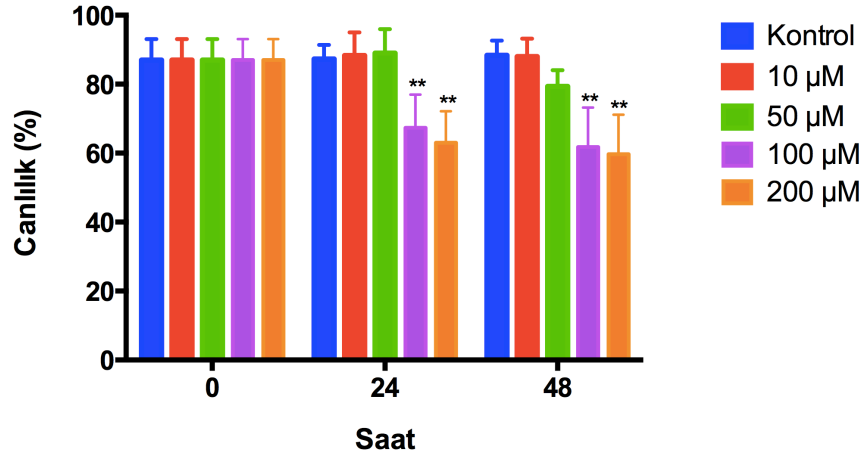
Çizelge 5.4.1. Vero ve MCF-7 Hücrelerinin Değişen Dikumarol Dozlarında Zamana Karşı Canlılık Sonuçları
 $p<0,05$ kontrol grubuna göre canlılık oranları açısından anlamlı farkın olduğuna işaret etmektedir.

Hücre tipi	0. saat	24. saat				
	-	Kontrol	10 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
Vero (%)	87 $\pm$ 6	87 $\pm$ 4	88 $\pm$ 7 $p=0,876$	82 $\pm$ 4 $p=0,407$	67 $\pm$ 10 $p=0,006$	63 $\pm$ 9 $p=0,002$
MCF-7 (%)	91 $\pm$ 1	91 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1 $p=0,740$	87 $\pm$ 2 $p=0,016$	79 $\pm$ 1 $p<0,001$	66 $\pm$ 5 $p<0,001$
Granüloza (%)	81 $\pm$ 18	84 $\pm$ 10	-	80 $\pm$ 17 $p=0,721$	79 $\pm$ 15 $p=0,681$	-

Çizelge 5.4.1. (devam) Vero ve MCF-7 Hücrelerinin Değişen Dikumarol Dozlarında Zamana Karşı Canlılık Sonuçları

p<0,05 kontrol grubuna göre canlılık oranları açısından anlamlı farkın olduğuna işaret etmektedir.

Hücre tipi	48. saat				
	Kontrol	10 µM	50 µM	100 µM	200 µM
Vero (%)	88±4	88±5 p=0,957	79±4 p=0,205	61±12 p=0,003	60±12 p=0,002
MCF-7 (%)	91±1	90±1 p=0,752	86±2 p=0,243	60±9 p<0,001	51±6 p<0,001
Granüloza (%)	76±15	-	75±13 p=0,910	79±14 p=0,843	-



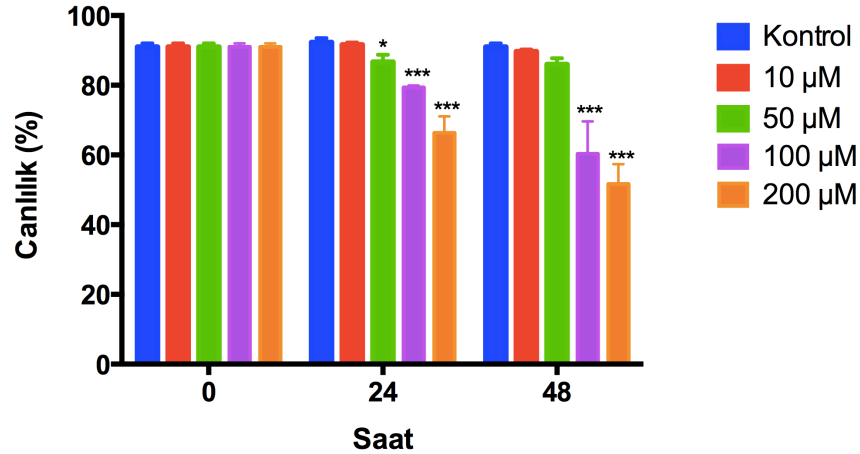
Şekil 5.4.1. Vero Hücrelerinin Canlılık Oranlarının Dikumarol Dozu ve Zamana Bağlı Değişim Grafiği

24. ve 48. saatte kontrol grubuyla 100 ve 200 µM dikumarol uygulanan gruplar arasında canlılık oranları açısından anlamlı fark izlendi.

MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuyla 10 µM dikumarol uygulanan grup arasında 24 saatlik kültürün sonunda canlılık oranları açısından fark izlenmezken (sırasıyla %91±1 ve %92±1), 50, 100 ve 200 µM dikumarol uygulanan gruplarda canlılık oranları kontrol grubuna göre doza bağlı olarak azaldı (sırasıyla %87±2, %79±1 ve %66±5). Kontrol grubuyla 50, 100 ve 200 µM dikumarol uygulanan gruplar arasında 24 saatlik kültürün sonunda canlılık oranları açısından anlamlı fark saptandı (p=0,006 ve p=0,002). Kontrol grubuyla 10 ve 50 µM dikumarol uygulanan gruplar arasında 48 saatlik kültürün sonunda canlılık oranları açısından fark izlenmezken (sırasıyla %91±1, %90±1 ve %86±2), 100 ve 200 µM

dikumarol uygulanan gruplarda canlılık oranları kontrol grubuna göre doza bağlı olarak azaldı (sırasıyla 60 ± 9 ve 51 ± 6). Kontrol grubuyla 100 ve 200 μM dikumarol uygulanan gruplar arasında 48 saatlik kültürün sonunda canlılık oranları açısından anlamlı fark izlendi (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p < 0,001$) (Çizelge 5.4.1. ve Şekil 5.4.2.).

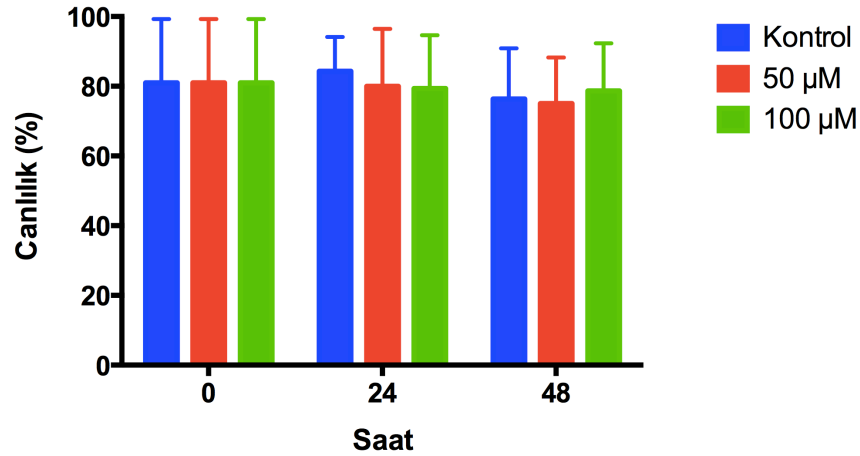
Dikumarol uygulanan granüloza hücrelerinde 24 saatlik kültürün sonunda canlılık oranları kontrol grubuna yakındı (0, 50 ve 100 μM için sırasıyla 84 ± 10 , 80 ± 17 ve 79 ± 15). Gruplar arasında canlılık oranları açısından anlamlı fark izlenmedi (50 ve 100 μM için sırasıyla $p = 0,721$ ve $p = 0,681$). 48 saatlik kültürün sonunda canlılık oranları kontrol grubuyla 50 ve 100 μM dikumarol uygulanan gruplar arasında benzerdi (sırasıyla 76 ± 15 , 76 ± 13 ve 79 ± 14). Gruplar arasında canlılık oranları açısından anlamlı fark izlenmedi (50 ve 100 μM için sırasıyla $p = 0,910$ ve $p = 0,843$) (Çizelge 5.4.1. ve Şekil 5.4.3.).



Şekil 5.4.2. MCF-7 Hücrelerinin Canlılık Oranlarının Dikumarol Dozu ve Zamana Bağlı Değişim Grafiği

24. saatte kontrol grubuyla 50, 100 ve 200 μM dikumarol uygulanan gruplar arasında, 48. saatte kontrol grubuyla 100 ve 200 μM dikumarol uygulanan gruplar arasında canlılık oranları açısından anlamlı fark izlendi.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$



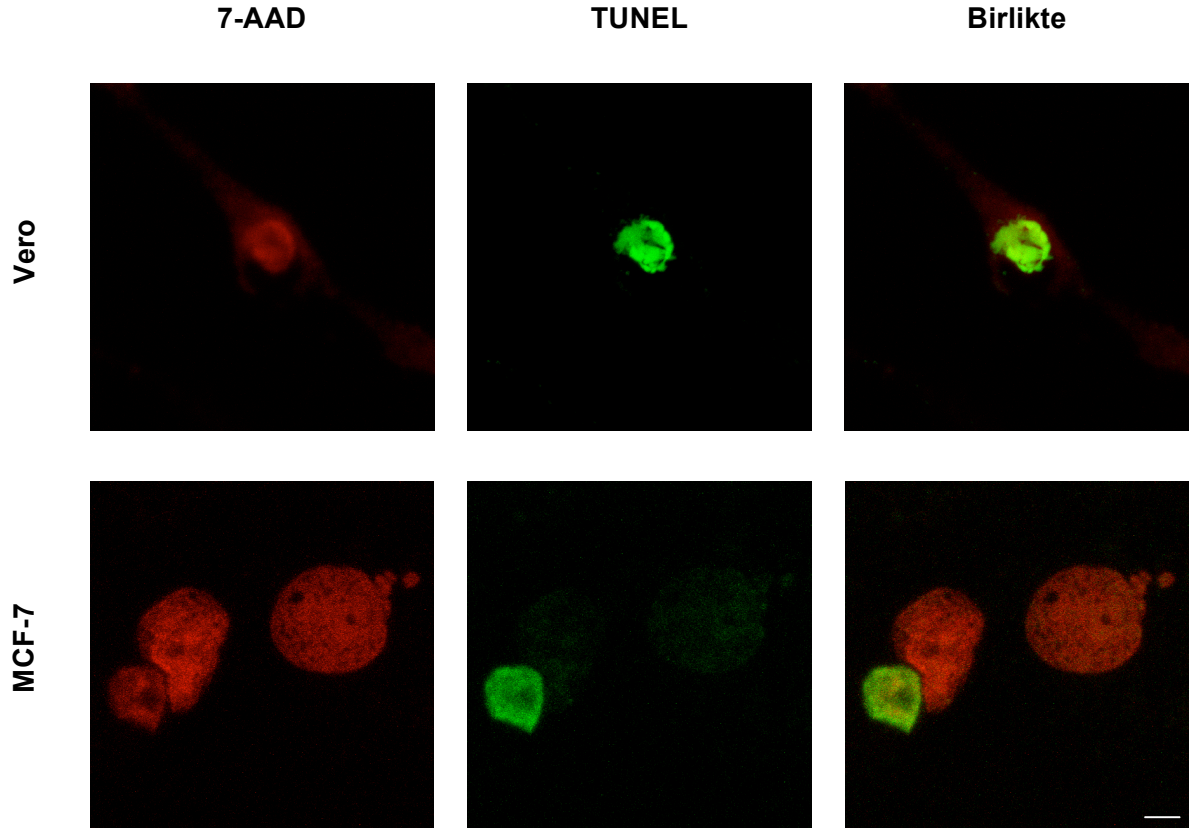
Şekil 5.4.3. Granüloza Hücrelerinin Canlılık Oranlarının Dikumarol Dozu ve Zamana Bağlı Değişim Grafiği

24 ve 48. saatlerde kontrol grubuyla dikumarol uygulanan gruplar arasında canlılık oranları açısından anlamlı fark izlenmedi.

5.5. Dikumarolün Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölümüne Etkileri

24 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 20.000 hücre ekildi. Vero ve MCF-7 hücrelerine 30. saatte, granüloza hücrelerine 24. saatte 50 ve 100 µM dikumarol uygulandı. Hücreler dikumarol uygulamasını takiben 24. saatte fiksle edildi. Apoptotik hücrelerde olması beklenen DNA kırıkları TUNEL yöntemiyle saptandı. Sonuçlar 100 µM dikumarol uygulanan gruplarda farklı bir yöntemle de doğrulandı (Şekil 5.5.1.).

Dikumarol uygulanan Vero hücrelerinde apoptotik hücre sayısı kontrol grubuna göre doza bağlı olarak artmasına karşın (0, 50 ve 100 µM için sırasıyla $1,05 \pm 0,84$, $13,33 \pm 10,96$ ve $18,66 \pm 12,5$), gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi (50 ve 100 µM için sırasıyla $p=0,169$ ve $p=0,066$) (Çizelge 5.5.1., Şekil 5.5.1 ve 5.5.2.a.).



Şekil 5.5.1. Dikumarol Uygulanan Vero ve MCF-7 Hücrelerinde TUNEL İşaretlemleri

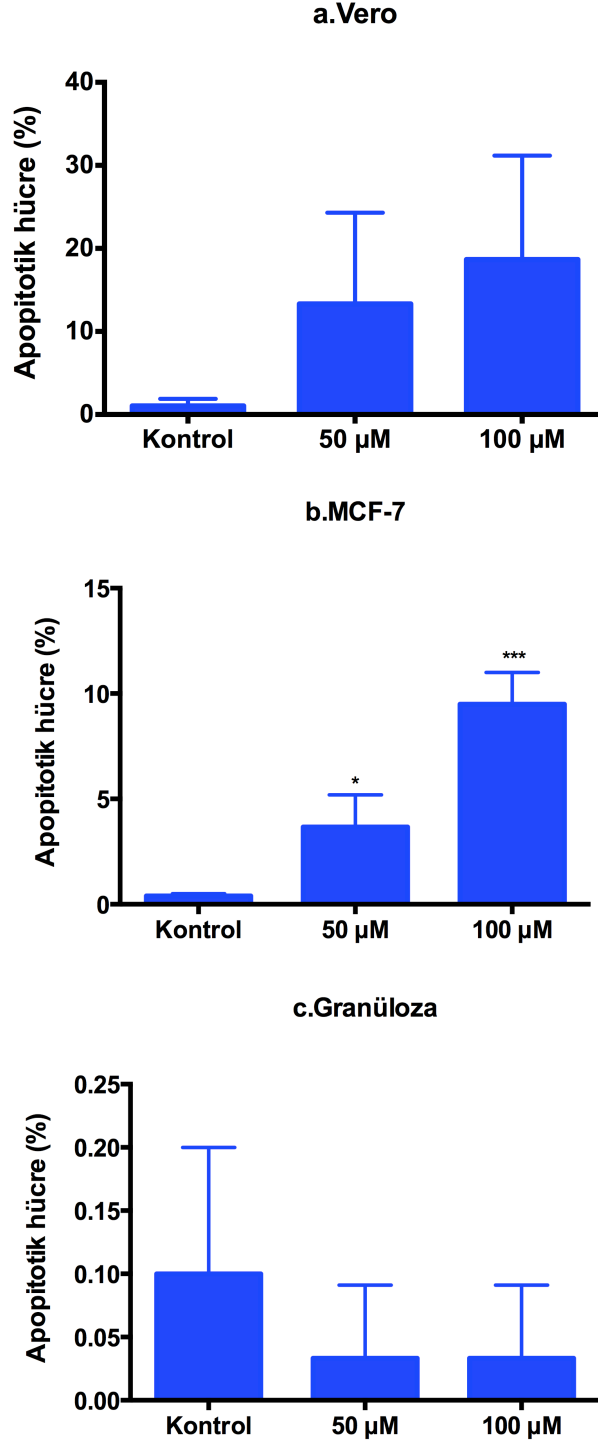
Vero hücrelerinde 100 μ M dikumarol uygulanan grupta hücre çekirdeğinde yoğun miktarda DNA kırığı izlendi. MCF-7 hücrelerinde 50 μ M dikumarol uygulanan grupta sağlıklı çekirdeklerde TUNEL işaretlenmesi izlenmezken, kırık DNA uçları apoptotik hücrelere özgü çekirdek morfolojisiyle uyumlu bir görünüm sergiledi. **Ölçek çubuğu:** 5 μ m

Dikumarol uygulanan MCF-7 hücrelerinde apoptotik hücre sayısı kontrol grubuna göre doza bağlı olarak arttı (0, 50 ve 100 μ M için sırasıyla $0,4 \pm 0,1$, $3,66 \pm 1,52$ ve $9,5 \pm 1,5$). Kontrol grubuyla 50 ve 100 μ M dikumarol uygulanan gruplar arasında apoptotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlendi (sırasıyla $p=0,018$ ve $p<0,001$). (Çizelge 5.5.1., Şekil 5.5.1. ve 5.5.2.b.).

Granüloza hücrelerinde apoptotik hücre sayıları kontrol grubuyla 50 ve 100 μ M dikumarol uygulanan gruplar arasında benzerdi (sırasıyla $0,1 \pm 0,1$, $0,03 \pm 0,01$ ve $0,03 \pm 0,01$). Gruplar arasında apoptotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi (50 ve 100 μ M için sırasıyla $p=0,665$ ve $p=0,665$) (Çizelge 5.5.1. ve Şekil 5.5.2.c.).

Çizelge 5.5.1. Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinin Değişen Dikumarol Dozlarında Apoptotik Hücre Sayısı Sonuçları
 $p<0,05$ kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayısı açısından anlamlı farkın olduğuna işaret etmektedir.

Hücre tipi	Yöntem	Kontrol	50 μ M	100 μ M
Vero (%)	TUNEL	$1,05 \pm 0,84$	$13,33 \pm 10,96$ $p=0,169$	$18,66 \pm 12,5$ $p=0,066$
	Annexin-V	8 ± 1	-	12 ± 1 $p=0,480$
MCF-7 (%)	TUNEL	$0,4 \pm 0,1$	$3,66 \pm 1,52$ $p=0,018$	$9,5 \pm 1,5$ $p<0,001$
	Annexin-V	1 ± 1	-	36 ± 1 $p<0,001$
Granüloza (%)	TUNEL	$0,1 \pm 0,1$	$0,03 \pm 0,01$ $p=0,665$	$0,03 \pm 0,01$ $p=0,665$
	Annexin-V	$0,01 \pm 0,01$	-	$0,1 \pm 0,1$ $p=1,000$



Şekil 5.5.2. a.Vero, b.MCF-7 ve c.Granüloza Hücrelerinde Apoptotik Hücre Sayılarının Dikumarol Dozuna Bağlı Değişim Grafiği (TUNEL)

Vero ve granüloza hücrelerinde kontrol grubuyla dikumarol uygulanan gruplar arasında DNA kırıkları açısından anlamlı fark izlenmezken, MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuyla 50 ve 100 µM dikumarol uygulanan gruplar arasında DNA kırıkları açısından anlamlı fark izlendi.

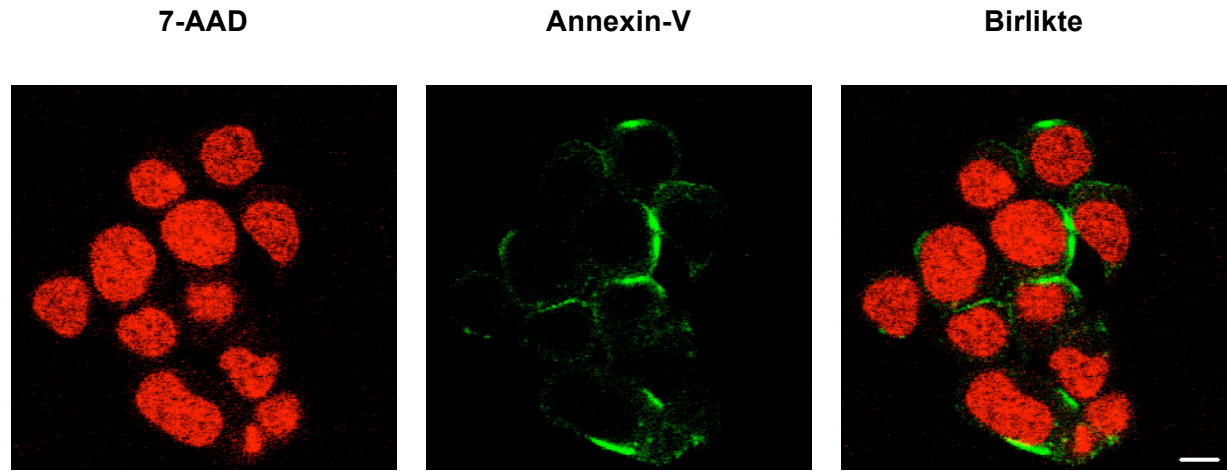
p<0,05, *** p<0,001

Apoptotik hücrelerde hücre zarının iç yüzeyinden dış yüzeyine taşınan ve böylece Annexin-V proteinleri tarafından tanınan PS molekülüleri anti-annexin-V antikoruyla işaretlendi. Her bir deney grubundan en az 1000 hücre sayılarak bunların içindeki apoptotik hücre sayısı belirlendi (Şekil 5.2.2.).

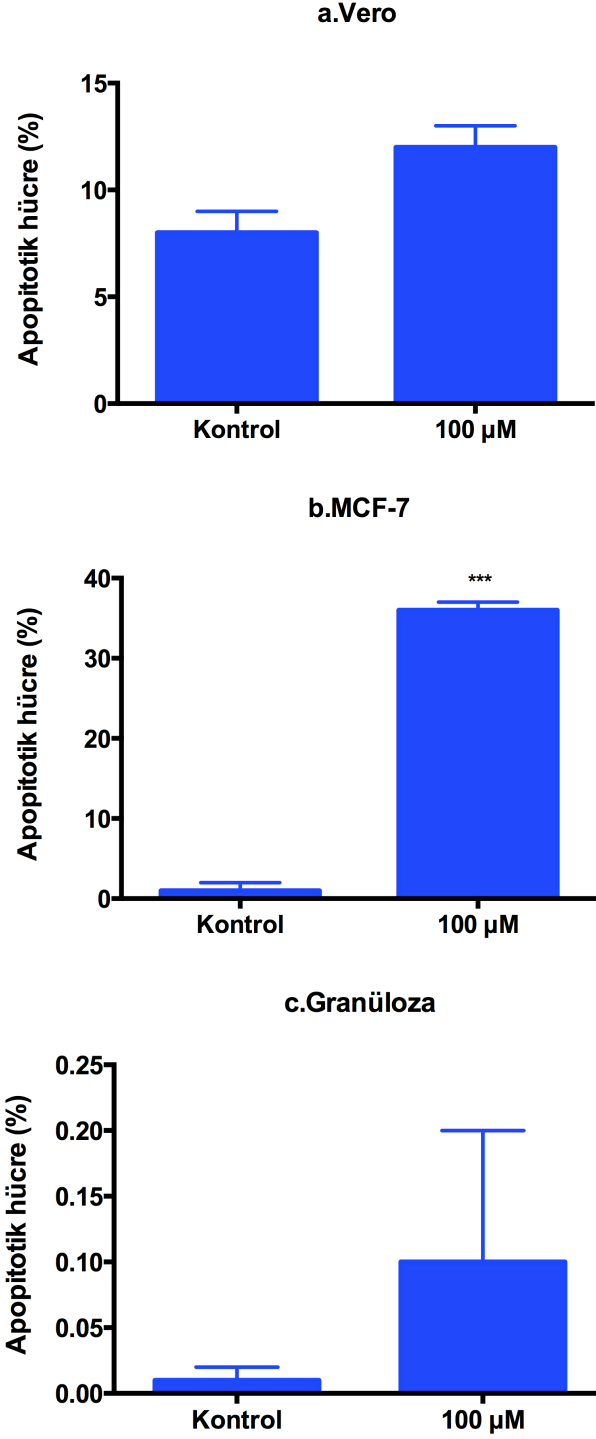
Annexin-V işaretlemelerine göre 100 μ M dikumarol uygulanan Vero hücrelerinde apoptotik hücre sayısı kontrol grubuna göre artmasına karşın (0 ve 100 μ M için sırasıyla 8 ± 1 ve 12 ± 1), gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi ($p=0,480$) (Çizelge 5.5.1. ve Şekil 5.5.4.a.).

100 μ M dikumarol uygulanan MCF-7 hücrelerinde apoptotik hücre sayısı kontrol grubuna göre arttı (0 ve 100 μ M için sırasıyla 1 ± 1 ve 36 ± 1). Bu artışın gruplar arasında anlamlı olduğu saptandı ($p<0,001$) (Çizelge 5.5.1. ve Şekil 5.5.4.b.).

Granüloza hücrelerinde apoptotik hücre sayıları kontrol grubuyla 50 ve 100 μ M dikumarol uygulanan gruplar arasında benzerdi (0 ve 100 μ M için sırasıyla $0,01\pm0,01$ ve $0,1\pm0,1$). Gruplar arasında apoptotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi ($p=1,000$) (Çizelge 5.5.1. ve Şekil 5.5.4.c.).



Şekil 5.5.3. Dikumarol Uygulanan Granüloza Hücrelerinde Annexin-V İşaretlemeleri
Granüloza hücrelerinde 100 μ M dikumarol uygulanan grupta PS molekülüleri anti-Annexin-V antikoruyla işaretlendi. **Ölçek çubuğu:** 5 μ m



Şekil 5.5.4. Dikumarol Uygulanan **a.Vero**, **b.MCF-7** ve **c.Granüloza** Hücrelerinde Apoptotik Hücre Sayılarının Kontrol Grubuna Göre Değişimi (Annexin-V)

Vero ve granüloza hücrelerinde kontrol grubuyla 100 µM dikumarol uygulanan grup arasında Annexin-V işaretlenmesi açısından anlamlı fark izlenmezken, MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuyla 100 µM dikumarol uygulanan grup arasında Annexin-V işaretlenmesi açısından anlamlı fark izlendi.

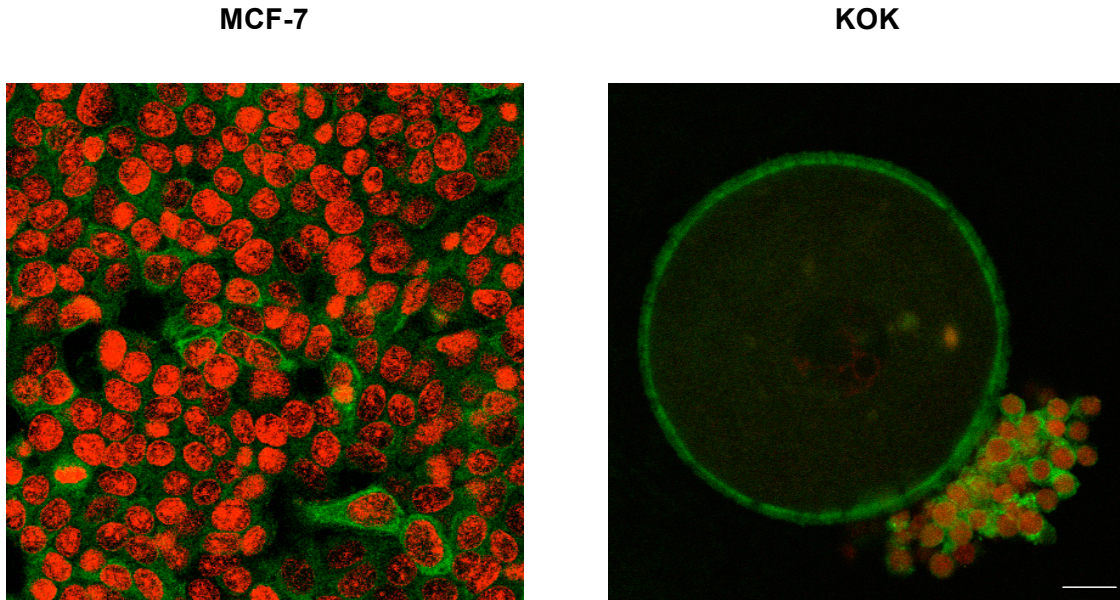
*** p<0,001

5.6. Dikumarolün Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinde NQO1 İfadesine Etkileri

24 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 20.000 hücre ekildi. Vero ve MCF-7 hücrelerine 30. saatte, kumulus-ovosit komplekslerine 24. saatte 0 veya 100 μ M dikumarol uygulandı. Hücreler dikumarol uygulamasını izleyen 24. saatte fikse edildi. Hücreler anti-NQO1 antikoruyla işaretlendi.

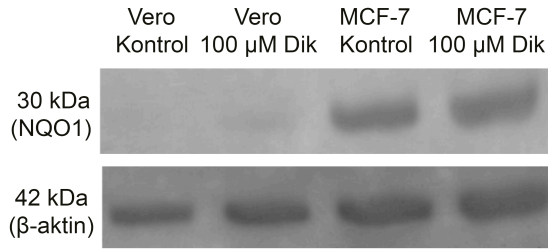
Vero hücrelerinde kontrol grubunda ve 100 μ M dikumarol uygulanan grupta NQO1 ifadesi izlenmedi.

Dikumarol uygulanmayan ve 100 μ M dikumarol uygulanan MCF-7 hücrelerinin büyük çoğunluğunda NQO1 ifadesi saptandı (Şekil 5.6.1.). Western Blot yöntemiyle karşılaştırıldığında gruplar arasında NQO1 proteininin miktarı açısından fark izlenmedi (Şekil 5.6.2.).



Şekil 5.6.1. MCF-7 ve Granüloza Hücrelerinde NQO1 İfadesi

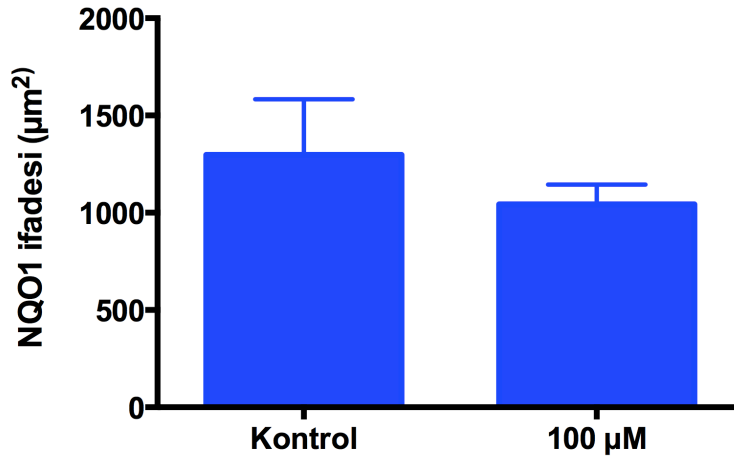
Dikumarol uygulanmayan MCF-7 ve granüloza hücrelerinde NQO1 proteininin sitoplazmada yaygın olarak bulunduğu saptandı. **Yeşil sinyal:** NQO1 proteini, **Kırmızı sinyal:** Çekirdek, **Ölçek çubuğu:** 20 μ m



Şekil 5.6.2. Dikumarol Uygulanan Vero ve MCF-7 Hücrelerinde NQO1 Proteininin Miktarı (Western Blot)

Soldan sağa sırasıyla Vero kontrol, Vero 100 μ M dikumarol, MCF-7 kontrol ve MCF-7 100 μ M dikumarol gruplarında NQO1 (30 kDa) ve β -aktin (42 kDa) proteinleri işaretlendi. Gruplar arasında β -aktin proteinin miktarı eşitti. Vero hücrelerinde NQO1 ifadesi izlenmezken, MCF-7 hücrelerinde gruplar arasında NQO1 proteininin miktarı açısından fark saptanmadı.

Dikumarol uygulanmayan ve 100 μ M dikumarol uygulanan granüloza hücrelerinin büyük çoğunluğunda NQO1 ifadesi saptandı (sırasıyla $1033 \pm 88 \mu\text{m}^2$ ve $1307 \pm 272 \mu\text{m}^2$) (Şekil 5.6.1). Sinyal eşikleme yöntemiyle karşılaştırıldığında (bkz. 4.2.5.7.4.) kontrol grubuyla 100 μ M dikumarol uygulanan grup arasında NQO1 proteininin miktarı açısından anlamlı fark izlenmedi ($p=0,300$). (Şekil 5.6.1. ve 5.6.3.).



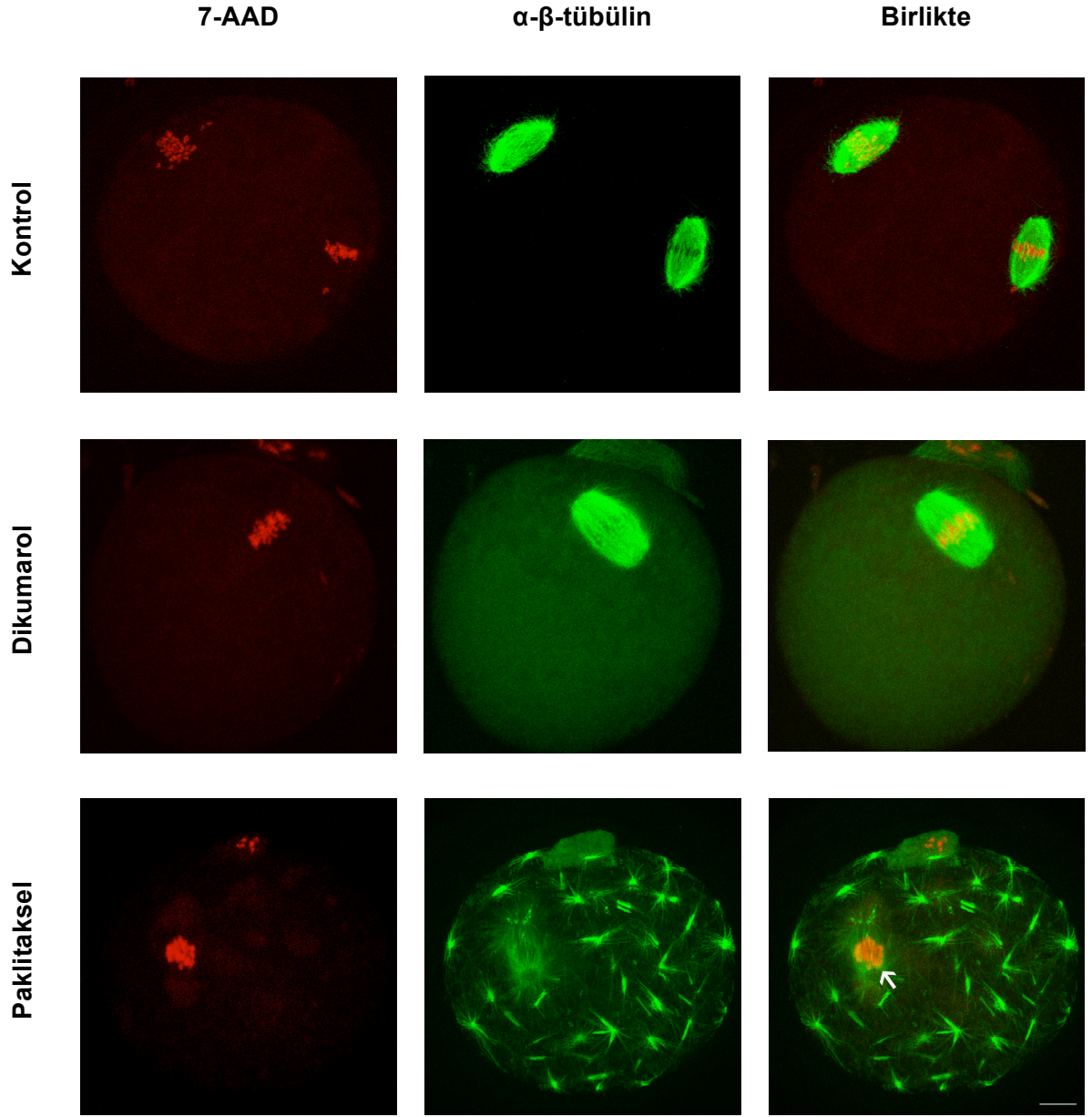
Şekil 5.6.3. Dikumarol Uygulanan Granüloza Hücrelerinde NQO1 İfadesinin Kontrol Grubuna Göre Değişimi

Kontrol grubuyla 100 μ M dikumarol uygulanan grup arasında NQO1 proteininin miktarı açısından anlamlı fark izlenmedi.

5.7. Dikumarolün Ovosit Mayoz Mekiğine Etkileri

MII evresindeki 20 sayıda ovosite 1 saat boyunca 0 veya 100 μ M dikumarol, 20 sayıda ovosite de 1 saat boyunca 0 veya 5 μ M paklitaksel uygulandı. Ovositler dikumarol uygulamasını izleyen 1. saatte fıkse edildi. Mayoz mekiğı α -tübülin ve β -tübülin antikorlarıyla işaretlendi.

100 μ M dikumarol uygulanan ovositlerde mayoz mekiğı kontrol grubuna benzer olarak fıçı görünümünü korurken, kromozomların orta hat boyunca düzensiz dizilimde olduğı izlendi 5 μ M paklitaksel uygulanan ovositlerde mekik yapısı izlenmezken, mikrotübülüslerin sitoplazmaya dağılmış pek çok odak oluşturduğı ve kromozomların orta hattan saptığı belirlendi (Şekil 5.7.1.).



Şekil 5.7.1. Dikumarol ve Paklitaksel Uygulamalarının Mayoz Mekiğine Etkileri

Dikumarol uygulanmayan ve 100 μ M dikumarol uygulanan gruplarda mayoz mekiği fiçı görünümünde ve kromozomlar orta hat boyunca düzenli dizilimdeydi. 5 μ M paklitaksel uygulanan grupta sitoplazmada çok sayıda mikrotübülüs odağı gözlenirken, kromozomların orta hattan saptığı dikkat çekti ($\rightarrow$). **Ölçek çubuğu:** 10 μ m

5.8. Dikumarolün Ovosit Matürasyonuna Etkileri

GV evresindeki 20 sayıda ovosite kültür ortamı içinde, 20 sayıda ovosite de mikroenjeksiyon yoluyla 0 veya 100 μ M dikumarol uygulandı. Ovositler dikumarol uygulamasını izleyen 18. saatte matürasyon aşamalarına göre değerlendirildi. Her bir deney grubu için 20 ovosit kullanıldı.

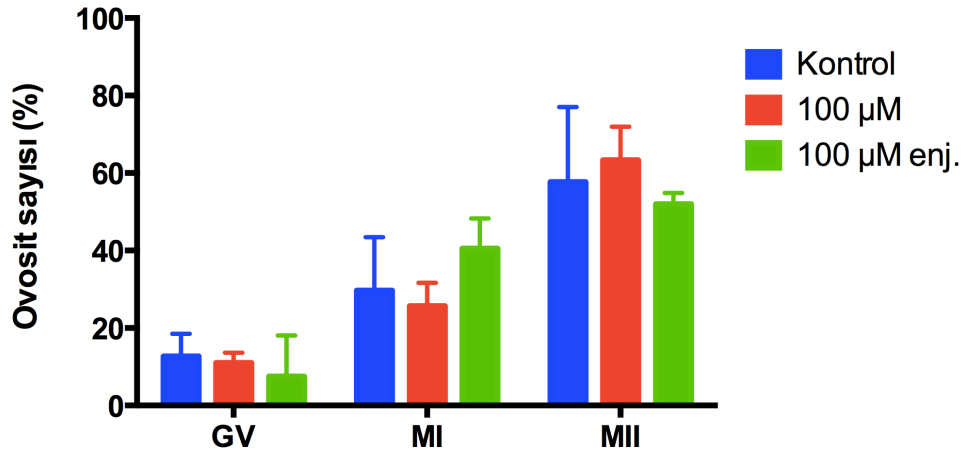
18 saatlik kültürün sonunda GV evresindeki ovosit sayısı kontrol grubuyla 100 μ M dikumarol uygulanan gruplar arasında benzerdi (sırasıyla %12,7 $\pm$ 5,9, %11 $\pm$ 2,6 ve %7,5 $\pm$ 10,6). Gruplar arasında GV evresindeki ovosit sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi (kültür ortamı ve mikroenjeksiyon grupları için sırasıyla p=0,624 ve p=0,295) (Çizelge 5.8.1. ve Şekil 5.8.1.).

Çizelge 5.8.1. Farklı Yöntemlerle Dikumarol Uygulanan Ovositlerde Matürasyon Sonuçları
p değerleri gruplar arasında ovosit sayısı açısından anlamlı farkın olmadığına işaret etmektedir.

Deney grubu	GV (%)	MI (%)	MII (%)
Kontrol	12,7 $\pm$ 5,9	29,7 $\pm$ 13,8	57,7 $\pm$ 19,4
Kültür ortamı	11 $\pm$ 2,6 p=0,624	25,7 $\pm$ 6 p=0,540	63,3 $\pm$ 8,6 p=0,538
Mikroenjeksiyon	7,5 $\pm$ 10,6 p=0,295	40,5 $\pm$ 7,8 p=0,500	52 $\pm$ 2,8 p=0,548

Tüm gruplarda MI evresine ulaşan ovosit sayısı benzerdi (kontrol, kültür ortamı ve mikroenjeksiyon grupları için sırasıyla %29,7 $\pm$ 13,8, %25,7 $\pm$ 6 ve %40,5 $\pm$ 7,8). Kontrol grubuyla 100 μ M dikumarol uygulanan gruplar arasında MI evresine ulaşan ovosit sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi (sırasıyla p=0,540 ve p=0,500) (Çizelge 5.8.1. ve Şekil 5.8.1.).

MII evresindeki ovosit sayısı kontrol grubuyla 100 μ M dikumarol uygulanan gruplar arasında benzerdi (sırasıyla %57,7 $\pm$ 19,4, %63,3 $\pm$ 8,6 ve %52 $\pm$ 2,8). Gruplar arasında MII evresindeki ovosit sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi (kültür ortamı ve mikroenjeksiyon grupları için sırasıyla p=0,538 ve p=0,548) (Çizelge 5.8.1. ve Şekil 5.8.1.).



Şekil 5.8.1. Farklı Yöntemlerle Dikumarol Uygulanan Ovositlerin Matürasyon Oranları
Kontrol grubuyla 100 µM dikumarol uygulanan gruplar arasında GV, MI ve MII evrelerindeki ovosit sayıları açısından anlamlı fark izlenmedi.

21 günlük dişi BALB/c farelere intraperitoneal olarak 0 veya 32 mg/kg dikumarol uygulandı. Ovaryumlardan biri parçalanarak GV evresindeki ovositler izole edildi. Ovositler 18 saat boyunca gamet kültür ortamında inkübe edilerek matürasyon aşamalarına göre değerlendirildi.

Elde edilen GV evresindeki ovosit sayısı kontrol grubuyla 32 mg/kg dikumarol uygulanan grup arasında benzerdi (sırasıyla %14±4,2 ve %13±4,2).

18 saatlik kültürün GV evresindeki ovosit sayısı kontrol grubuyla 32 mg/kg dikumarol uygulanan gruplar arasında benzerdi (sırasıyla %21±9,9 ve %22,5±10,6). Gruplar arasında GV evresindeki ovosit sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi (p=0,205) (Çizelge 5.8.2. ve Şekil 5.8.2.).

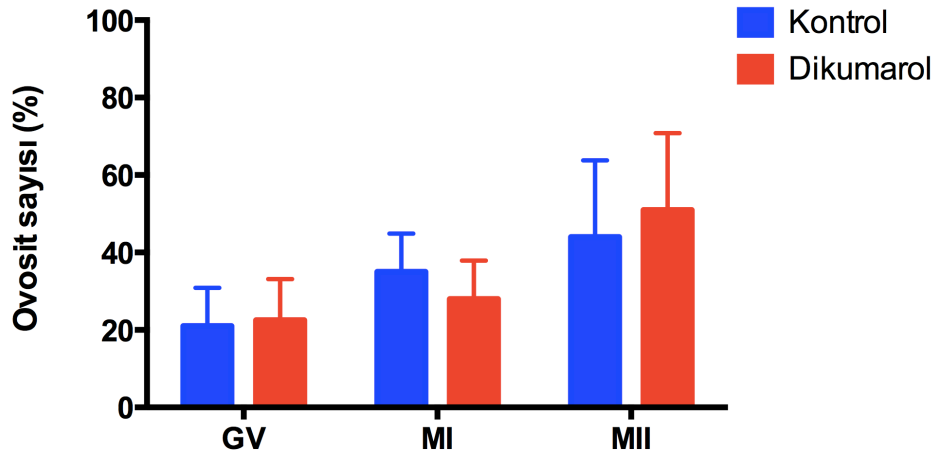
Çizelge 5.8.2. Dikumarol Uygulanan Farelerde Ovosit Matürasyonu Sonuçları
p değerleri gruplar arasında ovosit sayısı açısından anlamlı farkın olmadığına işaret etmektedir.

Deney grubu	GV (%)	MI (%)	MI
Kontrol	21±9,9	35±8,9	44±20
Dikumarol	22,5±10,6 p=0,200	28±10 p=0,070	51±19,8 p=0,205

Tüm gruplarda MI evresine ulaşan ovosit sayısı benzerdi (sırasıyla %35±9,9 ve %28±9,9). Kontrol grubuyla 32 mg/kg dikumarol uygulanan grup arasında MI evresine ulaşan ovosit sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi ($p=0,070$) (Çizelge 5.8.2. ve Şekil 5.8.2.).

MII evresindeki ovosit sayısı kontrol grubuyla 32 mg/kg dikumarol uygulanan grup arasında benzerdi (sırasıyla %44±19,8 ve %51±19,8). Gruplar arasında MII evresindeki ovosit sayısı açısından anlamlı fark izlenmedi ($p=0,205$) (Çizelge 5.8.2. ve Şekil 5.8.2.).

Tüm gruplarda mayoz mekiğinin fiçı görünümünde olduğu ve kromozomların orta hatta düzenli dizildiği izlendi (Şekil 5.7.1./Kontrol).



Şekil 5.8.2. Dikumarol Uygulanan Farelerde Ovosit Matürasyonu Oranları

Kontrol grubuyla 32 mg/kg dikumarol uygulanan gruplar arasında GV, MI ve MII evrelerindeki ovosit sayıları açısından anlamlı fark izlenmedi.

5.9. Dikumarolün Ovaryum Dokusunda Apoptotik Hücre Ölümüne Etkileri

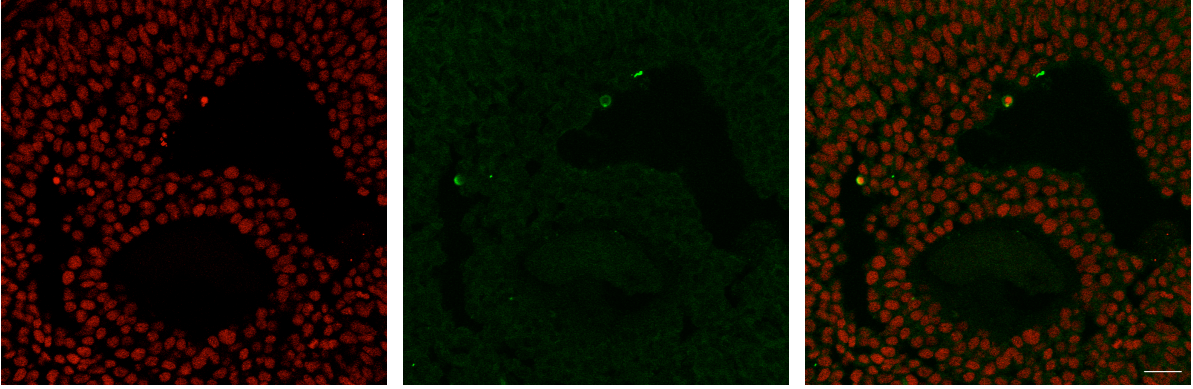
21 günlük dişi BALB/c farelere intraperitoneal olarak 0 veya 32 mg/kg dikumarol uygulandı. Ovaryumlardan biri fikse edilerek DNA kırıkları TUNEL yöntemiyle saptandı. Her bir doku kesitinden en az 1000 hücre sayılarak bunların içindeki apoptotik hücre sayısı belirlendi.

Aynı doku kesitinde bazı foliküllerde apoptotik hücreler izlenirken bazı foliküllerde apoptotik hücreye rastlanmadı. Kontrol grubuyla 32 mg/kg dikumarol uygulanan grup arasında apoptotik hücre sayısı açısından fark izlenmedi ($p=0,230$) (Şekil 5.9.1.).

7-AAD

TUNEL

Birlikte



Şekil 5.9.1. Dikumarol Uygulanan Farelerin Ovaryum Dokusunda TUNEL İşaretlemleri
32 mg/kg dikumarol uygulanan farelerin ovaryum dokusunda DNA kırıkları TUNEL yöntemiyle işaretlendi. **Ölçek çubuğu:** 20 μ m

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. Dikumarolün Vero, MCF-7 ve Granüloza Hücreleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Çeşitli kanser hücre hatlarında bazı kumarin türevlerinin hücre çoğalmasını baskıladığı bilinmektedir (65-68). Bir kumarin türevi olan dikumarolün hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisi birçok çalışmada ele alınmıştır. Cullen ve ark. (69) 4 saat boyunca 100 veya 250 μ M dikumarol uygulamasının insan pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını baskıladığını bildirmiştir. Bir başka çalışmada 24, 48 veya 72 saat boyunca 50, 100 veya 250 μ M dikumarol uygulanan insan pankreas kanseri hücrelerinin çoğalması artan dikumarol dozu ve inkübasyon süresine paralel olarak azalmıştır (70). Dikumarolün benzer etkileri farklı hücre hatlarında da saptanmıştır. Tek seferlik 100 μ M dikumarol uygulaması insan ürogenital kanser hücrelerinin (71), 4 veya 24 saat boyunca 50 μ M dikumarol uygulaması insan meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını baskılamaktadır (54). Bu bulgularla uyumlu olarak BALB/c farelerin meme dokusunda oluşturulan tümörlere tek seferlik 32 mg/kg dikumarol uygulamasının 1,5 mM mitomisin-C'nin hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisini arttırdığı bildirilmiştir (72). İnsan melanoma hücreleriyle yapılan bir çalışmada 48 saat boyunca 25, 50, 100 veya 250 μ M dikumarol uygulamasının hücre çoğalmasının düzenleyicilerinden nükleer faktör- κ B (NF- κ B) aktivasyonunu azalttığı bildirilmiştir (73). Aynı çalışmada hücre çoğalması artan dikumarol dozuna paralel olarak azalmıştır. Çalışmamızda dikumarolün Vero, MCF-7 ve granüloza hücrelerinin çoğalma özelliklerine etkileri incelenmiştir. 24 veya 48 saat boyunca 10, 50, 100 veya 200 μ M dikumarol uygulanan Vero ve MCF-7 hücrelerinin çoğalması artan dikumarol dozu ve inkübasyon süresine paralel olarak azalmıştır (Şekil 5.2.3. ve 5.2.4.). Vero hücrelerinin çoğalmasını anlamlı olarak baskılayan en düşük dikumarol dozu 24 saatlik kültürün sonunda 200 μ M, 48 saatlik kültürün sonunda 100 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 5.2.3.). MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını anlamlı olarak baskılayan en düşük dikumarol dozu 24 ve 48 saatlik kültürlerin sonunda 10 μ M olarak saptanmıştır (Şekil 5.2.4.). Bulgularımız Çizelge 6.1.1.'de literatürle karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir. Brar ve ark. (74) sıçan solunum yolu miyositlerinde dikumarolün hücre çoğalmasına bir etkisi olmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda granüloza hücrelerinde kontrol grubuyla dikumarol uygulanan gruplar

arasında hücre çoğalması açısından anlamlı fark izlenmemiştir (Şekil 5.2.6.). Bulgularımız literatürle uyumlu olarak dikumarolün hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisinin hücre tipine göre değiştiğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda Vero ve MCF-7 hücreleri kültür koşullarında hızlı çoğalan, granüloza hücreleri ise yavaş çoğalan hücreler olarak tanımlanmıştır. **Buna göre dikumarolün hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisi hücrelerin çoğalma hızlarıyla ilişkili olabilir.**

Dikumarolün çeşitli kanser hücre hatlarında bazı antikanser ajanlarının sitotoksik etkilerini değiştirdiği gösterilmiştir. 100 μ M dikumarol uygulaması karaciğer kanseri hücrelerinde 10 μ M gemsitabinin (52), üroepitelyal kanser hücrelerinde 1 mM doksorubisinin apoptozu uyarıcı etkisini arttırmaktadır (53). Watanabe ve ark. (71) 60 μ M sisplatinin 10 μ M dikumarolle birlikte uygulandığında ürogenital kanser hücrelerinde apoptozu uyardığını bildirmiştir. Aynı çalışmada tek başına sisplatin veya dikumarol uygulamasının ürogenital kanser hücrelerinde apoptozu uyarmadığı gözlenmiştir. Çalışmamızda dikumarolün Vero, MCF-7 ve granüloza hücrelerine sitotoksik etkileri incelenmiştir. Watanabe ve ark.'ın (71) bulgularına karşın Vero hücrelerinin canlılık oranlarının 24 ve 48 saatlik kültürlerin sonunda 100 μ M ve üzeri dozlarda anlamlı olarak düştüğü belirlenmiştir (Şekil 5.4.1.). MCF-7 hücrelerinin canlılık oranlarının 24 saatlik kültürün sonunda 50 μ M ve üzeri dozlarda, 48 saatlik kültürün sonunda 100 μ M ve üzeri dozlarda anlamlı olarak düştüğü saptanmıştır (Şekil 5.4.2.). Her iki hücre hattında apoptotik hücre sayısı artan dikumarol dozuna paralel olarak artmıştır (Şekil 5.5.2.a., 5.5.2.b., 5.5.4.a. ve 5.5.4.b). Bu artış yalnız MCF-7 hücrelerinde anlamlı olarak saptanmıştır. Lewis ve ark. (70) bulgularımıza paralel olarak 48 veya 72 saat boyunca 50, 100 veya 250 μ M dikumarol uygulamasının insan pankreas kanseri hücrelerinde artan dikumarol dozu ve inkübasyon süresine paralel olarak apoptozu arttırdığını ortaya koymuştur. Bir başka çalışmada 4 saat boyunca 100 veya 250 μ M dikumarol uygulanan insan pankreas kanseri hücrelerinin canlılık oranları artan dikumarol dozuna paralel olarak azalmıştır (69). Çalışmamızda granüloza hücrelerinde kontrol grubuyla dikumarol uygulanan gruplar arasında canlılık oranları veya apoptotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmemiştir (Şekil 5.4.3, 5.5.5 ve 5.5.8). Bu bulgular dikumarolün hücre çoğalmasını baskılayıcı etkileriyle uyumludur (Çizelge 6.1.1). **Buna göre dikumarolün sitotoksik etkileri hücre tipine göre değişmektedir ve bu etkilerde hücrelerin çoğalma hızları belirleyici rol oynuyor olabilir.**

Çizelge 6.1.1. Dikumarolün Mitotik Hücreler Üzerine Etkilerinin Literatürle Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi

Hücre hattı/tümör dokusu	Doz	Süre
3 aylık BALB/c farelerde oluşturulan meme dokusu tümörleri	32 mg/kg (IP)	Mitomisin-C uygulamasından 24 saat önce
Erişkin Sprague-Dawley sıçanlardan izole edilen solunum yolu miyositleri	250 µM	48 saat
M1619 insan melanoma hücreleri	25, 50,100 veya 250 µM	48 saat
MIAPaca-2 insan pankreas kanseri hücreleri	50, 100 veya 250 µM	4 saat
MIAPaca-2 insan pankreas kanseri hücreleri	50, 100 veya 250 µM	24, 48 veya 72 saat
MDA-MB-468 insan meme kanseri hücreleri	50 µM	4 veya 24 saat
RT112 insan üroepitelyal kanser hücreleri LNCap insan prostat kanseri hücreleri	100 µM	Sisplatinle birlikte 24 saat
Chang insan karaciğer kanseri hücreleri	0.1-10 µM	Gemsitabin uygulamasından önce 4 saat boyunca
RT112 insan üroepitelyal kanser hücreleri	100 µM	Sisplatinle birlikte 24 saat
Vero <i>Afrika yeşil maymunu</i> böbrek epitel hücreleri	10, 50, 100 veya 200 µM	24 veya 48 saat
MCF-7 insan meme kanseri hücreleri		
21 günlük BALB/c farelerden izole edilen granüloza hücreleri		

Çizelge 6.1.1. (devam) Dikumarolün Mitotik Hücreler Üzerine Etkilerinin Literatürle Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi

Eşlik eden ajan	Etkisi	Yayın	Yılı
1.5 µM mitomisin-C	Mitomisin-C'nin hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisinde artış	(72)	1985
-	Hücre çoğalmasında fark yok	(74)	1999
-	NF-κB aktivasyonu ve hücre çoğalmasında doz bağımlı azalma	(73)	2001
-	Hücre çoğalmasında doz bağımlı azalma (100 ve 25 µM), hücre ölümünde doz bağımlı artış (50 ve 100 µM)	(69)	2003
-	Hücre çoğalmasında doz ve süre bağımlı azalma, apopitozda doz ve süre bağımlı artış (48 ve 72. saatler)	(70)	2004
-	Hücre çoğalmasında azalma	(54)	2006
60 µM sisplatin	Hücre çoğalmasında azalma, apopitozda fark yok (yalnız dikumarol), apopitozda artış (dikumarol ve sisplatin)	(71)	2006
10 µM gemsitabin	Gemsitabinin apopitozu uyarıcı etkisinde artış	(52)	2010
1 mM doksorubisin	Doksorubisinin apopitozu uyarıcı etkisinde artış	(53)	2010
-	Hücre çoğalmasında ve canlılık oranlarında doz ve süre bağımlı azalma, apopitozda doz ve süre bağımlı artış	Aras ve ark., yayınlanmamış veri	
-	Hücre çoğalmasında, canlılık oranlarında ve apopitozda fark yok		

Literatürde dikumarolün hücre çoğalmasını baskılayıcı ve/veya sitotoksik etkileri farklı mekanizmalarla açıklanmıştır. Brar ve ark. dikumarolün antikanser etkilerini K vitamini antagonisti özelliğinden bağımsız olarak ortaya koyduğunu göstermiştir (73). Dikumarol hücre içi bir oksidoredüktaz olan NQO1 proteininin inhibitörlerindendir (50, 51). NQO1 ROS'un redüksiyonundan ve p53 proteininin stabilizasyonundan sorumludur (46-49). Dikumarolün normal dokuya göre yüksek düzeyde NQO1 ifade eden pankreas kanseri hücrelerinde ROS düzeylerini arttırdığı izlenmiştir (70). Karaciğer kanseri hücreleriyle yapılan bir çalışmada dikumarolün NQO1 ifade eden hücrelerde ROS düzeyini arttırdığı, NQO1 ifade etmeyen hücrelerdeyse ROS düzeyini değiştirmedeği saptanmıştır (52). Matsui ve ark. (53) dikumarol uygulanan NQO1 pozitif üroepitelyal kanser hücrelerinde p53 ifadesinin azaldığını ve PARP aktivasyonunun arttığını bildirmiştir. Bu bulgular ışığında araştırmacılar dikumarolün sitotoksik etkilerini NQO1 proteininin inhibisyonu yoluyla ortaya koyduğunu öne sürmüştür (52, 53, 70). Çalışmamızda dikumarolün Vero, MCF-7 ve granüloza hücrelerinde NQO1 ifadesine etkileri incelenmiştir. MCF-7 ve granüloza hücrelerinde kontrol grubuyla dikumarol uygulanan gruplar arasında NQO1 proteininin miktarı açısından anlamlı fark izlenmezken, Vero hücrelerinde hiçbir grupta NQO1 ifadesi saptanmamıştır (Şekil 5.6.1., 5.6.2. ve 5.6.3.). Du ve ark. (54) bulgularımıza paralel olarak NQO1 ifade eden ve etmeyen meme kanseri hücrelerinde dikumarolün sitotoksik etkilerinin benzer olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada dikumarolün ROS düzeyini NQO1 ifadesinden bağımsız olarak arttırdığı gösterilmiştir. Bu bulgular dikumarolün hücre çoğalmasını baskılayıcı ve sitotoksik etkileriyle çelişmektedir. **Buna göre dikumarol hücre çoğalmasını baskılayıcı ve sitotoksik etkilerini NQO1 varlığından bağımsız olarak ortaya koymaktadır.**

Madari ve ark. (20) 10 µM dikumarolün deniz kestanesi embriyolarının ilk mitoz bölünmesini %50 oranında durdurduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada dikumarolün in vitro koşullarda tübüline bağlanabildiği gösterilmiştir. Jacobs ve ark. (21) dikumarolün in vitro koşullarda mikrotübülüs depolimerizasyonunu geciktirdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular ışığında araştırmacılar dikumarolün hücre çoğalmasını mikrotübülüs stabilizasyonu yoluyla baskılıyor olabileceğini öne sürmüştür (20, 21). Paklitaksel gibi bazı antikanser ajanlarının mikrotübülüs stabilizasyonu bağımlı yollar üzerinden apoptozu uyardığı gösterilmiştir (75). Jacobs ve ark. (5, 21) buradan yola çıkarak dikumarolün sitotoksik etkilerinin

mikrotübülüs stabilizasyonu özelliğiyle ilişkili olabileceğini belirtmiştir. Çalışmamızda dikumarolün Vero, MCF-7 ve granüloza hücrelerinde mitoz etkileri incelenmiştir. Hiçbir hücre tipinde kontrol grubuyla dikumarol uygulanan gruplar arasında mitotik hücre sayısı açısından anlamlı fark izlenmemiştir (Şekil 5.3.1.a., 5.3.1.b. ve 5.3.1.c.). **Buna göre dikumarol Vero, MCF-7 ve granüloza hücrelerinde mikrotübülüs stabilizasyonu özelliği göstermemektedir.**

6.2. Dikumarolün Ovositler ve Ovaryum Dokusu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bazı antikanser ajanlarının gonad yetmezliğine neden olduğu bilinmektedir (5-7, 55). Literatürde dikumarolün ovositler veya ovaryum dokusu üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışma yoktur. Çalışmamızda dikumarolün bir antikanser ajanı olarak ovositler üzerine etkileri incelenmiştir. Kontrol grubunda ve in vivo veya in vitro dikumarol uygulanan gruplarda GV evresindeki ovositlerin büyük çoğunluğu MII evresine ulaşmıştır. Tüm gruplarda mayoz mekiğinin fıçı görünümünde olduğu ve kromozomların orta hatta düzenli dizildiği izlenmiştir. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada sisplatin ve paklitakselin tek başına veya birlikte kullanımının primordiyal folikül kaybını arttırdığı gösterilmiştir (56). Çalışmamızda paklitaksel uygulanan ovositlerde mikrotübülüslerin sitoplazmaya dağılmış pek çok odak oluşturduğu ve kromozomların orta hattan saptığı belirlenmiştir. **Buna göre dikumarol mayoz bölünmeyi engellememektedir ve ovositler üzerinde paklitaksele benzer sitotoksik bir etki göstermemektedir.** Brachet ve ark. (57) çocukluk çağı kanserlerinin prokarbazin ve bösülfan kombinasyonu ile tedavisinde erken menopoza belirtilerinin geri dönüşümsüz olarak arttığını bildirmiştir. Bir başka çalışmada çocukluk çağı kanserlerinde rokarbazin, klorambusil, vinblastin veya prednizolon tedavisinin gonad fonksiyonlarının kaybına neden olduğu gösterilmiştir (58). Koyama ve ark. (59) lenfomanın siklofosfamidle tedavisinin kanda FSH düzeylerini değiştirdiğini ve amenoreye neden olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada tedavi sonrası alınan over biyopsilerinde folikül veya ovosite rastlanmamıştır. Çalışmamızda in vivo dikumarol uygulamasının fare ovaryumunda apoptotik hücre ölümünü uyarmadığı gösterilmiştir. Bu bulgu dikumarolün dişi üreme sistemi hücrelerinden granüloza hücrelerine etkileriyle uyumludur. **Buna göre dişi üreme sistemi hücrelerinde**

dikumarolün hücre çoğalmasını baskılayıcı/sitotoksik etkilerini göstermediği söylenebilir.

6.3. Sonuç

1) Çalışmamızda dikumarolün Vero ve MCF-7 hücrelerinde hücre çoğalmasını baskıladığı, canlılık oranlarını düşürdüğü ve apoptotik hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir. Doz ve süre bağımlı bu etkiler dikumarol uygulanan granüloza hücrelerinde izlenmemiştir.

2) Fare ovositleriyle yaptığımız çalışmalar in vivo veya in vitro dikumarol uygulamasının ovosit matürasyonunu engellemediğini ortaya koymuştur. Dikumarol uygulanan MII evresindeki ovositlerde mayoz mekiği ve kromozom morfolojileri normal görünümünde izlenmiştir.

3) İn vivo dikumarol uygulanan farelerin ovaryumlarında apoptotik hücre ölümünde bir artışa rastlanmamıştır.

Dikumarolün dişi üreme sistemi hücrelerine hücre çoğalmasını baskılayıcı ve sitotoksik etkilerinin olmaması kanser tedavilerinde doğurganlığın korunması yönünden önemlidir ve klinik uygulamalarda bir boşluğu kapatacak niteliktedir.

Elde ettiğimiz bulgular dikumarolün ideal bir antikanser ajanı olduğunu ortaya koymaktadır.

Literatürde dikumarolün antikanser etkileri farklı hipotezlerle açıklanmıştır. Bunlardan ilki dikumarolün apoptotik hücre ölümünü NQO1'in inhibisyonu yoluyla uyardığını öne sürmektedir (52, 53, 70). İkinci hipoteze göre dikumarol hücre çoğalmasını mikrotübülüs stabilizasyonu yoluyla baskılamaktadır (20, 21). Çalışmamızda her iki hipotez de şu gerekçelerle reddedilmiştir:

1) Dikumarolün apoptotik hücre ölümünü arttırmış olduğu Vero hücrelerinde NQO1 ifadesi izlenmemiştir.

2) Dikumarolün hücre çoğalmasını baskıladığı Vero ve MCF-7 hücrelerinde mitotik hücre sayısında kontrol grubuna göre bir artış saptanmamıştır.

3) Dikumarol uygulanan GV evresindeki ovositler kontrol grubuna benzer olarak mikrotübülüslerin polimerizasyon ve depolimerizasyon dinamiklerinin sürekliliğini gerektiren 1. mayoz bölünmeyi tamamlamış ve 2. mayozun metafaz evresine ulaşmıştır.

Buna karşın çalışmamızda dikumarolün hücre çoğalmasını baskılayıcı ve sitotoksik etkilerinin hücrelerin çoğalma özellikleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.

İlerleyen çalışmalarda bu ilişkiyi düzenleyen moleküler mekanizmaların aydınlatılması literatüre önemli katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2008;**58**(2):71-96.
- 2 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2013;**63**(1):11-30.
- 3 dos Santos Guimarães I, Daltoé RD, Herlinger AL, et al. Conventional Cancer Treatment. 2013.
- 4 Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. Annual Review of Medicine. 2002;**53**(1):615-27.
- 5 Oktay K, Sonmezer M. Ovarian tissue banking for cancer patients Fertility preservation, not just ovarian cryopreservation. Human Reproduction. 2004;**19**(3):477-80.
- 6 Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. Human Reproduction Update. 2004;**10**(3):251-66.
- 7 Sönmezer M, Özkavukçu S. Fertility preservation in females with malignant disease-1: causes, clinical needs and indications. Turkish Journal of Hematology. 2009;**26**(3):106-13.
- 8 Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar: Veri Medikal Yayıncılık; 2008.
- 9 Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri: Güneş Tıp Kitabevleri; 2008.
- 10 Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş: Palme Yayıncılık; 2006.
- 11 Gosden R, Lee B. Portrait of an oocyte: our obscure origin. The Journal of clinical investigation. 2010;**120**(4):973.
- 12 Adams JU. Essentials of Cell Biology. In: O'Connor C, editor.: Nature Education; 2014.
- 13 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Roberts K, Raff M, Walter P. Molecular Biology of the Cell: Garland Science; 2008.
- 14 Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. Trends in biochemical sciences. 1993;**18**(6):195-7.
- 15 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology. 2007;**35**(4):495-516.
- 16 Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2008;**9**(3):231-41.
- 17 Legewie S, Blüthgen N, Herzog H. Mathematical modeling identifies inhibitors of apoptosis as mediators of positive feedback and bistability. PLoS computational biology. 2006;**2**(9):e120.
- 18 Fan T-J, Han L-H, Cong R-S, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. Acta biochimica et biophysica Sinica. 2005;**37**(11):719-27.
- 19 Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. Nature Reviews Cancer. 2004 Apr;**4**(4):253-65.
- 20 Madari H, Panda D, Wilson L, Jacobs RS. Dicoumarol A Unique Microtubule Stabilizing Natural Product that Is Synergistic with Taxol. Cancer research. 2003;**63**(6):1214-20.
- 21 Jacobs RS, Wilson L, Madari H, inventors; Coumarin compounds as microtubule stabilizing agents and therapeutic uses thereof. 2003.

- 22 Na GC, Timasheff SN. Interaction of vinblastine with calf brain tubulin: multiple equilibria. *Biochemistry*. 1986;**25**(20):6214-22.
- 23 Lobert S, Correia JJ. Energetics of vinca alkaloid interactions with tubulin. *Methods in enzymology*. 1999;**323**:77-103.
- 24 Duflos A, Kruczynski A, Barret J-M. Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2002;**2**(1):55-70.
- 25 Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab. *Drugs*. 2003;**63**(8):803-43.
- 26 Sandler AB. Chemotherapy for small cell lung cancer. *Seminars in oncology*; 2003: Elsevier; 2003. p. 9-25.
- 27 Jassem J, Kosmidis P, Ramlau R, et al. Oral vinorelbine in combination with cisplatin: a novel active regimen in advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology*. 2003;**14**(11):1634-9.
- 28 Seidman AD. Monotherapy options in the management of metastatic breast cancer. *Seminars in oncology*; 2003: Elsevier; 2003. p. 6-10.
- 29 Okouneva T, Hill BT, Wilson L, Jordan MA. The Effects of Vinflunine, Vinorelbine, and Vinblastine on Centromere Dynamics1. *Molecular cancer therapeutics*. 2003;**2**(5):427-36.
- 30 Kerksiek K, Mejillano MR, Schwartz RE, Georg GI, Himes RH. Interaction of cryptophycin 1 with tubulin and microtubules. *FEBS letters*. 1995;**377**(1):59-61.
- 31 Panda D, Ananthnarayan V, Larson G, Shih C, Jordan MA, Wilson L. Interaction of the antitumor compound cryptophycin-52 with tubulin. *Biochemistry*. 2000;**39**(46):14121-7.
- 32 Hoffman J, Vaughn K. Mitotic disrupter herbicides act by a single mechanism but vary in efficacy. *Protoplasma*. 1994;**179**(1-2):16-25.
- 33 Bai R, Durso NA, Sackett DL, Hamel E. Interactions of the sponge-derived antimitotic tripeptide hemiasterlin with tubulin: comparison with dolastatin 10 and cryptophycin 1. *Biochemistry*. 1999;**38**(43):14302-10.
- 34 Loganzo F, Discafani CM, Annable T, et al. HTI-286, a synthetic analogue of the tripeptide hemiasterlin, is a potent antimicrotubule agent that circumvents P-glycoprotein-mediated resistance in vitro and in vivo. *Cancer research*. 2003;**63**(8):1838-45.
- 35 Lakhani NJ, Sarkar MA, Venitz J, Figg WD. 2 - Methoxyestradiol, a Promising Anticancer Agent. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2003;**23**(2):165-72.
- 36 Mabjeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer cell*. 2003;**3**(4):363-75.
- 37 Yoshimatsu K, Yamaguchi A, Yoshino H, Koyanagi N, Kitoh K. Mechanism of action of E7010, an orally active sulfonamide antitumor agent: inhibition of mitosis by binding to the colchicine site of tubulin. *Cancer research*. 1997;**57**(15):3208-13.
- 38 Manfredi JJ, Parness J, Horwitz SB. Taxol binds to cellular microtubules. *The Journal of cell biology*. 1982;**94**(3):688-96.
- 39 Parness J, Horwitz SB. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *The Journal of cell biology*. 1981;**91**(2):479-87.
- 40 Belani CP, Langer C. First-line chemotherapy for NSCLC: an overview of relevant trials. *Lung Cancer*. 2002;**38**:13-9.
- 41 Bollag DM, McQueney PA, Zhu J, et al. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Research*. 1995;**55**(11):2325-33.

- 42 Kamath K, Jordan MA. Suppression of microtubule dynamics by epothilone B is associated with mitotic arrest. *Cancer research*. 2003;**63**(18):6026-31.
- 43 Hung DT, Chen J, Schreiber SL. (+)-Discodermolide binds to microtubules in stoichiometric ratio to tubulin dimers, blocks taxol binding and results in mitotic arrest. *Chemistry & biology*. 1996;**3**(4):287-93.
- 44 ter Haar E, Kowalski RJ, Hamel E, et al. Discodermolide, a cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than taxol. *Biochemistry*. 1996;**35**(1):243-50.
- 45 Panda D, Miller HP, Islam K, Wilson L. Stabilization of microtubule dynamics by estramustine by binding to a novel site in tubulin: a possible mechanistic basis for its antitumor action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;**94**(20):10560-4.
- 46 Anwar A, Dehn D, Siegel D, et al. Interaction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) with the tumor suppressor protein p53 in cells and cell-free systems. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Mar 21;**278**(12):10368-73.
- 47 Begleiter A, Fourie J. Induction of NQO1 in cancer cells. *Methods in enzymology*. 2004;**382**:320-51.
- 48 Lewis AM, Ough M, Hinkhouse MM, Tsao MS, Oberley LW, Cullen JJ. Targeting NAD (P) H: quinone oxidoreductase (NQO1) in pancreatic cancer. *Molecular carcinogenesis*. 2005;**43**(4):215-24.
- 49 Asher G, Lotem J, Kama R, Sachs L, Shaul Y. NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;**99**(5):3099-104.
- 50 Scott KA. Analogues of Dicoumarol as Inhibitors of NQO1: The University of Manchester; 2010.
- 51 Scott KA, Barnes J, Whitehead RC, Stratford IJ, Nolan KA. Inhibitors of NQO1: Identification of compounds more potent than dicoumarol without associated off-target effects. *Biochemical pharmacology*. 2011;**81**(3):355-63.
- 52 Buranrat B, Prawan A, Kukongviriyapan U, Kongpetch S, Kukongviriyapan V. Dicoumarol enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in high NQO1-expressing cholangiocarcinoma cells. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2010;**16**(19):2362.
- 53 Matsui Y, Watanabe J, Ding S, et al. Dicoumarol enhances doxorubicin - induced cytotoxicity in p53 wild - type urothelial cancer cells through p38 activation. *BJU international*. 2010;**105**(4):558-64.
- 54 Du J, Daniels DH, Asbury C, et al. Mitochondrial production of reactive oxygen species mediate dicoumarol-induced cytotoxicity in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;**281**(49):37416-26.
- 55 Loren AW, Mangu PB, Beck LN, et al. Fertility Preservation for Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2013.
- 56 Türkyılmaz Ç, Özçelik B, Özgün MT, et al. Effects of Paclitaxel and Cisplatin on Ovarian Reserves in Rats. *Erciyes Medical Journal/Erciyes Tıp Dergisi*. 2008;**30**(1).
- 57 Brachet C, Heinrichs C, Tenoutasse S, Devalck C, Azzi N, Ferster A. Children with sickle cell disease: growth and gonadal function after hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2007;**29**(7):445-50.
- 58 Mackie E, Radford M, Shalet SM. Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's disease. *Medical and pediatric oncology*. 1996;**27**(2):74-8.
- 59 Koyama H, Wada T, Nishizawa Y, et al. Cyclophosphamide - induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. *Cancer*. 1977;**39**(4):1403-9.

- 60 Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *The Lancet*. 1986;**327**(8486):884-6.
- 61 Tucker M, Morton P, Liebermann J. Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2004;**113**:S24-S7.
- 62 Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertility and sterility*. 1997;**68**(4):724-6.
- 63 Cha K, Hong S, Chung H, Choi D, Ko J, Yoon T. Pregnancy and implantation from vitrified oocytes following in vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVC). *Fertil Steril*. 1999;**72**(Suppl 1):S2-S3.
- 64 Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive biomedicine online*. 2005;**11**(3):300-8.
- 65 Marshall M, Mohler J, Edmonds K, et al. An updated review of the clinical development of coumarin (1, 2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1994;**120**(1):S39-S42.
- 66 Moran E, Prosser E, O'Kennedy R, Thornes R. The effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin on the growth of human tumour cells lines. *Journal of Irish colleges of physicians and surgeons*. 1993;**22**:41-7.
- 67 Siegers C-P, Bostelmann H. Effect of coumarin on cell proliferation in human tumour cell lines. *Journal of Irish colleges of physicians and surgeons*. 1993;**22**:41-7.
- 68 Finn G, Creaven B, Egan D. Study of the in vitro cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines. *Melanoma research*. 2001;**11**(5):461-7.
- 69 Cullen JJ, Hinkhouse MM, Grady M, et al. Dicumarol inhibition of NADPH: quinone oxidoreductase induces growth inhibition of pancreatic cancer via a superoxide-mediated mechanism. *Cancer research*. 2003;**63**(17):5513-20.
- 70 Lewis A, Ough M, Li L, et al. Treatment of pancreatic cancer cells with dicumarol induces cytotoxicity and oxidative stress. *Clinical cancer research*. 2004;**10**(13):4550-8.
- 71 Watanabe J, Nishiyama H, Matsui Y, et al. Dicoumarol potentiates cisplatin-induced apoptosis mediated by c-Jun N-terminal kinase in p53 wild-type urogenital cancer cell lines. *Oncogene*. 2006;**25**(17):2500-8.
- 72 Keyes SR, Rockwell S, Sartorelli AC. Enhancement of mitomycin C cytotoxicity to hypoxic tumor cells by dicoumarol in vivo and in vitro. *Cancer research*. 1985;**45**(1):213-6.
- 73 Brar SS, Kennedy TP, Whorton AR, et al. Reactive oxygen species from NAD (P) H: quinone oxidoreductase constitutively activate NF- κ B in malignant melanoma cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2001;**280**(3):C659-C76.
- 74 Brar SS, Kennedy TP, Whorton AR, Murphy TM, Chitano P, Hoidal JR. Requirement for reactive oxygen species in serum-induced and platelet-derived growth factor-induced growth of airway smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;**274**(28):20017-26.
- 75 Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1999;**44**(5):355-61.

EKLER

Ek1: Etik Kurul Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :24/07/2013
TOPLANTI NO :2013-14
DOSYA NO :2013-84
KARAR NO :2013-14-98

Yürüttüğü Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Alp Can'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Doç.Dr.Özgür Çınar, Uzm.Dr.Sinan Özkavukcu ve Uzm.Bio.Duru Aras'ın katıldığı "Dikumarolün bir anti-kanser ajanı olarak mitotik ve mayotik hücreler üzerine etkileri" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıdaki kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare
Hayvan Sayısı : 45
Geçerlilik Süresi : 24/07/2013 - 24/07/2014

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Duru Aras

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 16.04.1985

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce, Fransızca

Eğitim Durumu

Lise: ODTÜ Geliştirme Vakfı Özel Lisesi

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

İş Tecrübesi

Kurumu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD.

Görevi: “Fertil ve İnfertil Hastaların Spermatozoonlarında Fosfolipaz C-zeta İçeriğinin Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi” başlıklı ve SBAG213S019 kodlu TÜBİTAK destekli projede asistan

Yılları: 2014-devam ediyor

Kurumu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD.

Görevi: “Akrilamidin Ovaryum ve Ovosit Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı ve kodlu 13B330012 Ankara Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi destekli projede araştırmacı

Yılları: 2013-devam ediyor

Kurumu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD.

Görevi: “Ovosit Kriyoprezervasyonunda Mikrotübülüs Stabilizasyonunun Mayoz Mekiği Üzerine Koruyucu Etkisinin Araştırılması” başlıklı ve SBAG109S415 kodlu TÜBİTAK destekli projede asistan

Yılları: 2010-2012

Kurumu: Korpus Biyoteknoloji A.Ş.

Görevi: “Doğurganlığı Korumaya Yönelik Yumurtalık Dokusu Dondurma ve Taşıma Çözümlerinin Tasarımı ve Üretilmesi” başlıklı KOSGEB destekli projede Ar-Ge Sorumlusu

Yılları: 2010-2012

Kurumu: Ankara Güven Hastanesi **Görevi:** Embriyolog **Yılları:** 2008-2009

Kurumu: Ankara Güven Hastanesi **Görevi:** Stajyer embriyolog **Yılları:** 2006-2008

Yayınlar

Kitap Bölümleri

1. Delilbaşı L, **Aras D.** Embriyo Seçim Kriterleri. Ed: Çelik Ö. Yardımla Üreme Teknikleri: Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. 2011:703-711, Adana.
2. Melil-Şengezer S, **Aras D.** Embriyoner Gelişim Anomalisi: Fragmentasyon. Ed: Delilbaşı L. Klinik Embriyoloji Uygulamaları Atlası. 2010:236-290, Ankara.

Kitap Bölümü Çevirileri

1. Delilbaşı L, **Aras D.** Embriyo ve Ovosit Kriyoprezervasyonu. Çev. ed: Gürkan T. Infertilite ve Yardımla Üreme Teknikleri. 2011:456-457, Ankara.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. **Aras D,** Ozkavukcu S, Cinar O, Boz B, Can A. Dicoumarol maintains meiotic spindle integrity of mouse oocytes after cold exposure. 9th Biennial Conference of Alpha Scientists in Reproductive Medicine. 27-29 April 2012, London, United Kingdom.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. Özkavukcu S, **Aras D**, Çınar Ö, Çakar Z, Can A. Annexin-V kullanılarak manyetik olarak ayrıştırılan spermatozoonlarda DNA fragmantasyon oranları anlamlı biçimde azalmaktadır. IV. Üreme Tıbbı Derneği Kongresi, 26-29 Eylül 2013, Antalya.
2. **Aras D**, Çakar Z, Can A, Özkavukcu S, Çınar Ö. Bir mikrotübülüs inhibitörü olan dikumarolün antiproliferatif/proapoptotik etkinliği hücrenin türüne göre değişmektedir. *(Sözlü sunum)* XXI. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 28-31 Mayıs 2013, Mersin.
3. **Aras D**, Hatiboğlu T, Erdoğan D, Göktaş G. Sıçan midesinde yaşa bağlı değişimlerin immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi. XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 16-19 Mayıs 2012, Antalya.
4. Çınar Ö, Özkavukcu S, **Aras D**, Boz B, Koçancı G, Can A. Soğukun ovosit mayoz mekiği üzerine etkilerinin incelenmesi. III. Üreme Tıbbı Derneği Kongresi, 5-9 Ekim 2011, Antalya.
5. Koçancı G, Boz B, **Aras D**, Özkavukcu S, Çınar Ö, Can A. İnsan ovositlerinin taramalı elektron mikroskobu takibinde HMDS'yle kurutulması sonuçları. XX. Elektron Mikroskopi Kongresi, 25-28 Ekim 2011, Antalya.
6. Özbek S, **Aras D**. Ultrasonografi rehberliğinde ve ultrasonografi kullanılmaksızın yapılan embriyo transferlerinde gebelik oranlarının karşılaştırılması. II. Üreme Tıbbı Derneği Kongresi, 1-4 Ekim 2009, Antalya.

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

1. **Aras D**, Çakar Z, Can A, Özkavukcu S, Çınar Ö. Bir mikrotübülüs inhibitörü olan dikumarolün antiproliferatif/proapoptotik etkinliği hücrenin türüne göre değişmektedir. *(Sözlü sunum)* XXI. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 28-31 Mayıs 2013, Mersin.
2. **Aras D**, Ozkavukcu S, Cinar O, Boz B, Can A. Dicoumarol maintains meiotic spindle integrity of mouse oocytes after cold exposure. 9th Biennial Conference of Alpha Scientists in Reproductive Medicine. 27-29 April 2012, London, United Kingdom.
3. Çınar Ö, Özkavukcu S, **Aras D**, Boz B, Koçancı G, Can A. Soğukun ovosit mayoz mekiği üzerine etkilerinin incelenmesi. III. Üreme Tıbbı Derneği Kongresi, 5-9 Ekim 2011, Antalya.