

**YENİ SİGMA-1 RESEPTÖR ANTAGONİSTİ SİRA
(E-52862)'NİN VE RİMKAZOL'ÜN
U87MG GLİOBLASTOMA
HÜCRELERİNDE SFİNGOSİN KİNAZ SİNYAL YOLAĞI
ÜZERİNDEN ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Gökhan GÖKHANER

Eskişehir 2018

**YENİ SİGMA-1 RESEPTÖR ANTAGONİSTİ SİRA (E-52862)'NİN VE
RİMKAZOL'ÜN U87MG GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE SFİNGOSİN
KİNAZ SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN ANTİKANSER ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Gökhan GÖKHANER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Farmakoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Miriş DİKMEN**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Ocak 2018**

JURİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gökhan Gökhaner'in "Yeni Sigma-1 Reseptör Antagonisti S1RA (E-52862)'nın ve Rimkazol'ün U87MG Glioblastoma Hücrelerinde Sfingosin Kinaz Sinyal Yolağı Üzerinden Antikanser Etkisinin Araştırılması" başlıklı tezi, 02.01.2018 tarihinde aşağıdaki juri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Ünvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Miriş DİKMEN	
Üye	: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK	
Üye	: Prof. Dr. Kevser EROL	

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Müdür



ÖZET

YENİ SİGMA-1 RESEPTÖR ANTAGONİSTİ S1RA (E-52862)'NİN VE RİMKAZOL'ÜN U87MG GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE SFİNGOSİN KİNAZ SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Gökhan GÖKHANER

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2018

Danışman: Doç. Dr. Miriş DİKMEN

Kemoterapötik tedavinin zor olduğu beyin tümörleri arasında yüksek mortalitesi ve heterojenitesi sebebiyle glioblastoma multiforme önemli bir grubu oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında, yeni selektif sigma-1 reseptör antagonisti S1RA (E-52862) ile non-selektif sigma reseptör antagonisti rimkazolün U87MG glioblastoma hücrelerinde antikanser etkileri karşılaştırılmalı olarak çalışılmış ve özellikle apoptotik etkide sfingosin kinaz yolağının etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Antiproliferatif ve apoptotik etkiler sırasıyla MTT, koloni formasyonu, RT-CA DP, Annexin-V/PI ve kaspaz-3 aktivasyon yöntemi ile, hücre içi sitozolik Ca^{+2} düzeyi de Fluo-3 akım sitometride çalışılmıştır. S1RA ve rimkazolün, sfingosin kinaz mRNA ekspresyonları üzerindeki etkileri de RT-PCR analizi ile araştırılmıştır.

Sonuç olarak, S1RA ve rimkazolün U87MG hücrelerinde, 24. saatte antiproliferatif ve apoptotik etkileri konsantrasyon artışına bağlı olarak artmış, koloni formasyonu ise konsantrasyon arttıkça inhibe olmuştur. S1RA'ya ait geç apoptotik ve rimkazole ait erken apoptotik hücre oranlarının daha yüksek olduğu görülmüştür. S1RA'nın hücrelerde belirgin bir kaspaz-3 aktivasyonu yaptığı belirlenmiştir. S1RA ve rimkazolün IC_{25} konsantrasyonlarında, sitozolik kalsiyumun artmış olduğu görülmüştür. Özellikle S1RA'nın IC_{50} konsantrasyonunda apoptotik etkiye paralel olarak, sfingosin kinaz-1 ve sfingosin kinaz-2 mRNA ekspresyonları azalmıştır. Bu çalışma ile sigma reseptör antagonistlerinin glioblastomada antikanser etkilerinin belirlenmiş olması, kemoterapide yeni etki mekanizmalarına ve yeni etkili bileşiklerin araştırılmasına ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Sigma reseptörü, Rimkazol, S1RA, Glioblastoma

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE ANTICANCER EFFECT OF NEW SIGMA-1 RECEPTOR ANTAGONIST S1RA (E-52862) AND RIMCAZOLE ON THE SPHINGOSINE KINASE SIGNAL PATHWAY IN U87MG GLIOBLASTOMA CELLS

Gökhan GÖKHANER

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate Institute of Health Sciences, January 2018

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Brain tumors are one of the dangerous and non-responsive solid tumours due to high invasiveness in the body. The aim of the study was to investigate the anticancer and antiproliferative effects of new selective sigma-1 receptor antagonist S1RA and sigma receptor antagonist rimcazole in a way as carrying out followings; MTT and RT-CA DP assays, caspase-3 activation, Fluo-3 and Annexin-V/PI staining assays in flow cytometry and colony formation assay on Glioblastoma Multiforme cells (U87MG) that are highly metastatic, heterogenous and mortal. In addition to other assays mentioned above, RT-PCR (Real time polimerase chain reaction) measurements were carried out to evaluate the effects of S1RA ve rimcazole on sphingosine kinase pathway.

According to the results, S1RA and rimkazol both caused antiproliferative and apoptotic effects at 24th hour in depending increasing concentrations that gave rise to inhibition of colony formation. S1RA was found more effective in % late apoptotic cell percentages whereas rimcazole was found more effective in early apoptotic cell percentages. S1RA caused significant caspase-3 activation in comparing with rimcazole. Both drugs' IC₂₅ values have been shown to cause apparent increasing at intracellular cytosolic calcium levels. As to RT-PCR results, given the apoptotic effects, S1RA's IC₅₀ concentration particularly caused downregulation on the target/reference ratios of mRNA expression of sphingosine kinase-1 and -2. In relation with carrying out this study, the evaluation of sigma receptor antagonists on glioblastoma will lead to new indicative pathways and new effective drugs in chemotherapy.

Keywords: Apoptosis, Sigma receptor, Rimcazole, S1RA, Glioblastoma

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin boyunca yardımlarını maddi ve manevi olarak esirgemedi bana her daim yol gösteren, tezimin doğru bir şekilde yönlendirilmesinde deneyimlerinden ve bilgisinden yararlandığım, hayata dair fikirlerine her zaman önem verdiğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Miriş DİKMEN'e,

Yüksek lisans çalışmalarımda, tezimle ilgili konularda bana maddi ve manevi destek olan, deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Yard. Doç. Dr. Zerrin KAHRAMAN CANTÜRK'e

Lisansüstü eğitimim boyunca akademik konularda bana destek olan Farmakoloji Ana bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e

Yüksek lisans öğrenim dönemim süresince maddi ve manevi desteğini benden hiç esirgemeyen, bana fikirleri ve tecrübeleriyle yol gösteren, sevgili babam Selahattin GÖKHANER'e, sevgili annem Fatma GÖKHANER'e ve sevgili ablam Güneş GÖKHANER'e ve hayatımdaki zor anlarımda bana yardımcı olan ve sabırla beni dinleyen sevgili İlknur LOĞOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gökhan GÖKHANER, 2018

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Gökhan GÖKHANER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. ALANYAZIN	2
2.1. Kanser	2
2.1.1. Beyin tümörleri	3
2.1.1.1. <i>Beyin tümör tipleri</i>	5
2.1.1.1.1. <i>Glioblastoma multiforme</i>	7
2.1.1.1.2. <i>U87MG Hücre Hattı</i>	8
2.1.2. Apoptoz	8
2.1.2.1. <i>Apoptozda kaspazlar</i>	10
2.1.2.1.1. <i>Başlatıcı kaspazlar</i>	11
2.1.2.1.2. <i>Sonlandırıcı kaspazlar</i>	11
2.1.2.1.3. <i>İnflamatuvar kaspazlar</i>	11

	<u>Sayfa</u>
2.1.2.2. Apoptoz yolakları	12
2.1.2.2.1. Ekstrinsik yolak	13
2.1.2.2.2. İntrinsik yolak	13
Kalsiyum ve IP ₃ (İnositol trifosfat)	14
Fosfolipaz C	16
2.1.2.3. Endoplazmik retikulumun apoptozdaki rolü	18
2.1.3. Sfingolipidler ve kanser ilişkisi	21
2.1.3.1 Seramid, sfingosin-1 fosfat ve sfingosin kinazlar	22
2.1.4. Sigma reseptörleri ve kanser	25
2.1.4.1. Rimkazol	29
2.1.4.2. S1RA (E-52862)	30
3. GEREÇLER	32
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, İlaçlar ve Malzemeler	32
3.2. Kullanılan Cihazlar	33
4. YÖNTEMLER	35
4.1. Deneylerde Kullanılan U87MG Hücre Hattı ve Özellikleri	35
4.2. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması	35
4.2.1. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu	35
4.2.2. S1RA ve rimkazolun konsantrasyonlarının hazırlanması	35
4.2.3. Stoktan hücre çıkartma	35
4.2.4. Hücre sayımları	36
4.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	36
4.3.1 Yöntemin uygulanması	37
4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA-DP)	
Antiproliferatif Etkinin Belirlenmesi	38

4.4.1. Yöntemin uygulanması	38
4.5. Koloni Formasyon Deneyi	39
4.5.1. Yöntemin uygulanması	40
4.6. Akım Sitometri ile Yapılan Deneyler	41
4.6.1. Annexin-V/PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi	42
4.6.1.1. Yöntemin uygulanması	42
4.6.2. Kaspaz-3 aktivasyon yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi	43
4.6.2.1. Yöntemin uygulanması	43
4.6.3. Fluo-3 yöntemi ile hücre içi kalsiyum analizi	44
4.6.3.1. Yöntemin uygulanması	45
4.7. Real-Time PCR Yöntemi ile Sfingosin Kinaz-1 ve Sfingosin Kinaz-2 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	45
4.7.1. Yöntemin uygulanması	47
4.7.1.1. Total RNA izolasyonu	47
4.7.1.2. cDNA sentezi	47
4.7.1.3. mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi	48
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	49
5.1. S1RA ve Rimkazolün U87MG Hücrelerinde Sitotoksik Etkilerinin MTT Yöntemi ile Değerlendirilmesi	49
5.2. S1RA ve Rimkazolün U87MG Hücrelerinde Antiproliferatif Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile Değerlendirilmesi	51
5.3. S1RA ve Rimkazolün U87MG Hücrelerindeki Koloni Formasyon Üzerine Etkileri	54

5.4. Akım Sitometride Annexin-V/PI Yöntemi İle Apoptotik	
Etkinin Değerlendirilmesi	61
5.5. Akım Sitometride Kaspaz-3 Aktivasyon Yöntemi ile Apoptotik	
Etkinin Değerlendirilmesi	64
5.6. Akım Sitometride Fluo-3 Yöntemi ile Hücre İçi Kalsiyum Düzeyinin	
Değerlendirilmesi	67
5.7. Real Time PCR Yöntemi ile mRNA Ekspresyonunun	
Değerlendirilmesi	70
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	80
KAYNAKÇA	82
ÖZGEÇMİŞ	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Primer beyin tümörlerinde genetik ve çevresel risk faktörleri	4
Çizelge 5.1. S1RA ve rimkazolün U87MG glioblastoma hücreleri üzerindeki 24.saatteki % hücre canlılık oranları	51
Çizelge 5.2. S1RA ve rimkazolün IC ₅₀ ve IC ₂₅ konsantrasyonları	52
Çizelge 5.3. S1RA uygulanan kolonilerin Texas Red kanalında yapılan analiz sonucunda belirlenen fiziksel özellikleri	60
Çizelge 5.4. Rimkazol uygulanan kolonilerin Texas Red kanalında yapılan analiz sonucunda belirlenen fiziksel özellikleri	60
Çizelge 5.5. Kontrol (% 0,1 DMSO), S1RA IC ₅₀ (326 µM) ve IC ₂₅ (200 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerine 24. saatteki % apoptotik hücre oranlarının karşılaştırılması	62
Çizelge 5.6. DMSO (% 0,1) kontrol, Rimkazol IC ₅₀ (25 µM) ve IC ₂₅ (12,5 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerine 24. saatteki % apoptotik hücre oranlarının karşılaştırılması	63
Çizelge 5.7. S1RA ve rimkazolün IC ₅₀ ve IC ₂₅ konsantrasyonlarının U87MG hücrelerinde 24.saatteki % kaspaz-3 aktif hücre oranları	67
Çizelge 5.8. RT-PCR sonuçlarına göre S1RA ve rimkazolün IC ₅₀ ve IC ₂₅ değerleri ile 24 saat inkübe edilmiş U87MG hücrelerine ait SK ₁ geninin hedef/referans ve normalize kantitatif oranları	72
Çizelge 5.9. RT-PCR sonuçlarına göre S1RA ve rimkazolün IC ₅₀ ve IC ₂₅ değerleri ile 24 inkübe edilmiş U87MG hücrelerine ait SK ₂ geninin hedef/referans ve normalize kantitatif oranları	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Benign ve malign beyin tümörünün manyetik rezonans taraması sonuçları	5
Şekil 2.2. Prolifere olmuş Glioblastoma Multiforme hücreleri	7
Şekil 2.3. Apoptotik ve nekrotik ölümünün hücre morfolojisine ve fizyolojisine etkisi	9
Şekil 2.4. Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik (mitokondriyel) yolları ve kaspazların rolü	12
Şekil 2.5. IP ₃ reseptörlerinin apoptozdaki rolü	16
Şekil 2.6. G-protein aracılı fosfolipaz C aktivasyonuna bağlı fosfoinositol 4,5-bifosfonattan IP ₃ ve DAG (Diaçilgliserol) oluşumu ve IP ₃ aracılı kanaldan Ca ⁺² salınımının şematik görünümü	17
Şekil 2.7. UPR'yi aktive eden sigma-1 proteini ve ER stresinin 3 sinyal yolu	18
Şekil 2.8. ER-stres oluşumuna bağlı sinyal iletimi	19
Şekil 2.9. UPR sinyal yolu	20
Şekil 2.10. Sfingolipid metabolizması ve homeostaz	23
Şekil 2.11. S1P aracılı kalsiyum düzenlenmesi	25
Şekil 2.12. Sigma reseptör aktivasyonu sonucu gerçekleşen sinyal iletim yolları ...	26
Şekil 2.13. ER stresinde sigma-1 reseptör agonistlerinin olası bir mekanizması ...	28
Şekil 4.1. MTT yönteminin şematik bir akış planı	37
Şekil 4.2. RTCA DP cihazı, elektrotlarının yerleştiği 3 plaka yuvası ve elektrotların tabanlarına yapışan hücre sayısına göre değişen empedans değeri arasındaki ilişkisi	38

Şekil 4.3. Koloni formasyon deneyinin akışının şematik olarak gösterimi	40
Şekil 4.4. Akım sitometri cihazının çalışma prensibinin şematik görünümü	41
Şekil 5.1. U87MG hücrelerinde S1RA'nın 24.saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları	49
Şekil 5.2. U87MG hücrelerinde rimkazolün 24.saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları	50
Şekil 5.3. S1RA konsantrasyonlarının (400, 300, 200 μ M) U87MG hücrelerinde 24 saatlik normalize hücre indeks değerlerine göre gerçek zamanlı proliferasyon eğrileri	52
Şekil 5.4. S1RA konsantrasyonlarının (400, 300, 200 μ M) U87MG hücrelerinde 24 saatlik normalize hücre indeksi değerlerine göre RTCA DP analiz sistemi ile çizilen nonlinear regresyon eğrisi	53
Şekil 5.5. Rimkazol konsantrasyonlarının (50, 25, 12,5 μ M) U87MG hücrelerinde 24 saatlik normalize hücre indeks değerlerine göre gerçek zamanlı proliferasyon eğrileri	53
Şekil 5.6. Rimkazol konsantrasyonlarının (50, 25, 12,5 μ M) U87MG hücrelerinde 24 saatlik normalize hücre indeksi değerlerine göre RTCA DP analiz sistemi ile çizilen nonlinear regresyon eğrisi	54
Şekil 5.7. S1RA konsantrasyonlarıyla inkübe edilen U87MG hücrelerinin 21. günde koloni formasyon görüntüleri	55
Şekil 5.8. Rimkazol konsantrasyonlarıyla inkübe edilen U87MG hücrelerinin 21. günde koloni formasyon görüntüleri	56
Şekil 5.9. S1RA uygulanan U87MG hücrelerine ait kolonilerden elde edilen 21.gün görüntüleri	58
Şekil 5.10. Rimkazol uygulanan U87MG hücrelerine ait kolonilerden elde edilen 21. gün görüntüleri.....	59
Şekil 5.11. Kontrol (% 0,1 DMSO), S1RA IC ₅₀ (326 μ M) ve IC ₂₅ (200 μ M) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerine 24. saatteki % apoptotik hücre oranları ve analiz grafikleri	62

Şekil 5.12. Kontrol (% 0,1 DMSO), Rimkazol IC ₅₀ (25 µM) ve IC ₂₅ (12,5 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerine 24. saatteki % apoptotik hücre oranları ve grafikleri	63
Şekil 5.13. S1RA IC ₅₀ (326 µM) ve IC ₂₅ (200 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerinde 24 saatte kaspaz-3 aktivasyonunun akım sitometri analizleri	65
Şekil 5.14. Rimkazol IC ₅₀ (25 µM) ve IC ₂₅ (12,5 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerinde 24 saatte kaspaz-3 aktivasyonunun akım sitometri analizleri	66
Şekil 5.15. S1RA ve rimkazolün (A) IC ₂₅ (sırasıyla 200 µM ve 12,5 µM) ve (B) IC ₅₀ (sırasıyla 326 µM ve 25 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerinde uygulanmasını takiben 24 saat sonra ölçülen hücre içi kalsiyuma bağlanan Fluo-3'den elde edilen piklerin Fluo-3 kontrol ve boyasız kontrol grubuna göre karşılaştırılması	68
Şekil 5.16. Kontrol (%0,1 DMSO) grubuna ait U87MG hücrelerinde hücre içi kalsiyumuna bağlanan Fluo-3'ün floresans ışıma görüntüsü ..	69
Şekil 5.17. S1RA ve rimkazolün IC ₅₀ (sırasıyla 326, 25 µM) ve IC ₂₅ (sırasıyla 200, 12,5 µM) konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen U87MG hücrelerinde SK ₁ ve GAPDH genlerinin amplifikasyon döngü eğrileri	70
Şekil 5.18. S1RA ve rimkazolün IC ₅₀ (sırasıyla 326, 25 µM) ve IC ₂₅ (sırasıyla 200, 12,5 µM) konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen U87MG hücrelerinde SK ₂ ve GAPDH genlerinin amplifikasyon döngü eğrileri	71

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
A	: Adenine (Adenin)
APAF1	: Apoptotic Protease Activating Factor-1 (Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1)
ACS	: American Cancer Society (Amerikan Kanser Birliği)
ATPaz	: Adenosine Triphosphatase
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BID	: Bcl-2 proteini
BiP	: Binding Immunoglobulin Protein (Bağlayıcı İmmünoglobülin Proteini)
C	: Cytosine (Sitozin)
cDNA	: Complementer Deoxyriboucleic acid (Komplementer Deoksiribonükleik asit)
CD95	: Fas/Apo1 reseptörü
DED	: Death Effector Domain (Ölüm Efektör Domaini)
DAG	: Diacylglycerol (Diaçilgliserol)
DISC	: Death Initiating Signal Complex (Ölüm Başlatıcı Sinyal Kompleksi)
dNTP	: Deoxynucleotid (Deoksinükleotid)
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide (Dimetil Sülfoksit)
DNA	: Deoxyriboucleic acid (Deoksiribonükleik asit)
DTT	: Dithiothreitol (Ditiyotretiol)
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EMEM	: Minimum Essential Medium Eagle
ER	: Endoplazmik Retikulum

FSC	: Forward Scatter Channel (İleri Saçılım Kanalı)
FADD	: Fas Adaptor Death Domain (Fas Adaptör Ölüm Domaini)
FBS	: Fetal Bovine Serum (Fötal Sığır Serumu)
G	: Guanine (Guanin)
GAPDH	: Gliseraldehid-3-fosfat-dehidrogenaz
GBM	: Glioblastoma Multiforme
GFP	: Green Florescence Protein (Yeşil Floresans Proteini)
IP ₃	: Inocytol Triphosphate (İnositol Trifosfat)
IRE1	: Serine/threonine-protein kinase (Serin/Treonin Protein Kinaz)
MR	: Magnetic Resonance (Manyetik Rezonans)
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NLEB	: National Laboratuary of Enteric Pathogens (Ulusal Enterik Patojen Laboratuvarı)
PERK	: Protein Kinase R ER Kinase (Protein Kinaz R benzeri ER Kinaz)
PIP2	: Phosphodyinocytol 4,5-Bisphosphate
PLC	: Phospholipase C (Fosfolipaz C)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI	: Propidium Iodide (Propidyum İyodid)
RTCA DP	: Real-Time Cell Analysis (Gerçek Zamanlı Hücre Analizi)
RT PCR	: Real-Time Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
S1P	: Sfingosin-1-Fosfat
SK ₁	: Sfingosin Kinaz-1
SK ₂	: Sfingosin Kinaz-2
SSC	: Side Scatter Channel (Yanal Saçılım Kanalı)
T	: Timine (Timin)
TGF-β	: Transforme Growth Factor (Transforme Büyüme Faktörü)

TNF- α	: Tumor Necrosis Factor- α (Tümör Nekroz Faktör- α)
TNP	: Tekli Nükleotid Polimorfizmleri
TRADD	: TNF Reseptör Aracılı Ölüm Domaini
UPR	: Unfolded Protein Response (Katlanmayan Protein Yanıtı)
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

1. GİRİŞ

Sağlıklı hücreler vücut ihtiyaç duyduğunda çoğalır, yaşlandıkları veya hasarlandıklarında ise ölürlür. Kanseri geliştiğinde, yaşlanan veya hasarlanan hücreler yaşamaya devam eder ve yeni hücreler ihtiyaç olmaksızın üretilmeye devam eder. Durmaksızın çoğalırlar ve tümör denilen yapıları meydana getirirler. (Wrensch vd., 2002, s. 278).

Çoğu kanser hücresi, solid tümörler meydana getirmektedir. Lösemi gibi kanserler ise solid tümörler oluşturmazlar. Kanseri tümörler malign özelliktedir, yakın dokulara metastaz ve invazyon yapma özellikleri vardır. Ayrıca bu tümörlerin yeteri kadar büyüdüklerinde vücudun uzak bölgelerine lenf ve kan yoluyla taşınabilme özellikleri de vardır. Metastaz yapabilen önemli solid tümörlerin başında beyin tümörleri gelmektedir (Siegel vd., 2016, s. 7).

Amerikan Kanser Birliği'nin verilerine göre; beyin tümörleri, kanser ilişkili ölümler kategorisinde 10. sırada yer almaktadır (American Cancer Society, 2017). Beyin tümörleri arasında glial hücrelerden köken alanlara glioma adı verilmektedir. En yaygın çocukluk dönemi beyin tümörlerini oluşturmaktadır (Bauchet vd., 2009, s. 87). Gliomalar: astrositoma, oligodendroglioma, ependimoma olarak üçe ayrılırlar. Astrositomalar, hem çocuklar hem yetişkinlerde en çok görülen glioma türüdür. Glial bir tümör olan Glioblastoma Multiforme (GBM) (Astrositoma Evre 4) ise astrositoma türünde bir tümör olup, DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) verilerine göre yetişkinlerde en yaygın görülen ve yüksek derecede malign olan beyin tümörüdür. GBM'lar tüm glioma türlerinin % 50–60 kadarını teşkil etmektedir (Onishi vd., 2013, s. 755).

GBM, birtakım genetik mutasyonları içermektedir. Bu mutasyonlar, onların daha hızlı büyümesine ve tedaviye direnç geliştirmelerine sebep olurlar. Yaşlı hastalardaki başarısız sonuçlar, bu tümörün olağanüstü dirençli olmasından kaynaklanır (Kleihues vd., 2002). Beş yıllık sağkalım oranları göz önüne alındığında 20-44, 45-54, 55-64 yaş aralıkları için, sağkalım oranları sırasıyla % 19, % 8, % 5 olarak belirtilmiştir. Bu oranlarla glioblastomanın sağkalım oranı, diğer tüm beyin tümörlerinin 5 yıllık sağkalım oranlarından çok daha düşük olarak bulunmuştur (Ostrom vd., 2016, s. 1; Ostrom vd., 2013, s. 1).

GBM, dirençli ve agresif olması yanında ayrıca hastaların sağkalım oranlarının çok düşük olması sebepleriyle, bilim adamlarını yeni tedavi arayışlarına yöneltmiştir.

Farklı reseptör türleri ve bunlar üzerinden antikanser etki gösteren ilaçlar, moleküler seviyede araştırılmaktadırlar. Sigma reseptörleri bunlardan biridir. Kanser ve sigma reseptörleri arasında ilişki olduğu daha önce gösterilmiştir (Aydar vd., 2004).

Bu çalışmanın yapılma amacı ise sigma reseptör antagonistlerinden S1RA ve rimkazolün GBM üzerindeki antikanser etkisinin araştırılmasıdır. Şu ana kadar sadece nöropatik ağrı için etkisi kanıtlanan, sigma-1 reseptör antagonisti S1RA (E-52862) ve daha önceki çalışmada bazı lösemi türlerinde (HL60, K562, OPM) antiproliferatif özelliği gösterilen sigma reseptör antagonisti rimkazolün, sigma reseptörleri üzerinden U87MG (Glioblastoma Multiforme, GBM) hücreleri üzerindeki apoptotik etkinlikleri bu çalışma ile araştırılmıştır. Bunun yanı sıra bu ilaçların, proliferatif etkili enzim proteinlerinden, Sfingosin Kinaz-1 ve Sfingosin Kinaz-2'nin mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri de U87MG kanser hücrelerinde araştırılmıştır.

2. ALANYAZIN

2.1. Kanser

Kanser, vücut hücrelerinin durmaksızın kontrolsüz olarak bölünmeye başlaması ve etraftaki dokulara yayılması şeklinde tanımlanabilir. Kanser trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunun hemen hemen her yerinde başlayabilir. Kanser hücrelerinin birçoğu, solid tümörler meydana getirmektedir. Lösemi gibi kan kanserleri ise solid tümörler oluşturmazlar. Süspanse olarak kanda çoğalırlar. Kanserli tümörler malign özelliktedir, çevre dokulara metastaz ve invazyon yapma özellikleri vardır. Bu malign tümörler, yeteri kadar büyüdüklerinde vücudun uzak bölgelerine lenf ve kan yoluyla taşınarak orada çoğalmaya devam ederler (Siegel vd., 2016, s. 7).

DSÖ'nün 2015 yılı sonu verilerine göre, kanser, bütün koroner kalp hastalıkları ve felçlerden daha çok ölüme sebebiyet vererek dünyada ölüme sebebiyet veren hastalıklar listesinde ilk sırada yer almaktadır. 2015 verilerine göre dünya genelinde en yaygın tanısı konmuş kanser türleri sırasıyla, akciğer kanseri, karaciğer kanseri, kolon kanseri, mide kanseri ve meme kanseridir. Amerikan Kanser Birliği'nin son verilerine göre ise beyin tümörleri bu listede 10. sırada yer almaktadır (World Health Organisation, Şubat, 2017, American Society of Clinical Oncology, 2016).

Kanserde hücre büyümesi kontrol altına alınamadığından hücre ölümü çok daha önemli bir noktadır. Hücre ölümü direkt olarak, hücre proliferasyonu ve yaşamıyla

ilgilidir. Programlı hücre ölümü antikanser savunma mekanizması olarak bilinmektedir; bu yüzden, ilişkili yollardaki herhangi bir değişiklik, kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve onkojeneze sebep olmaktadır. Apoptoz en önemli ve en çok çalışılan hücre ölüm mekanizmasıdır; yetişkin bir insanın günde yaklaşık olarak 10 milyon hücresi apoptotik süreçlerden geçmektedir (Curtin ve Cotter, 2003, s. 1; Galluzzi vd., 2015, s. 58).

2.1.1. Beyin tümörleri

Beyin ve omurilik merkezi sinir sistemini oluşturmaktadır. Bu karmaşık sistem yaptığımız her şeyden sorumludur. Beyin, yumuşak ve süngerimsi yapıda olup sinir hücreleri ve destek dokulardan oluşmuştur. Beyin serebrum, serebellum ve beyin sapı olmak üzere üç ana bölümden oluşur. İki tane serebral yarım küreye ayrılan serebrum, beynin en geniş bölümüdür ve üç loba ayrılmaktadır. Beyin sapı, omurilikle olan iletişimden ve hayati faaliyetleri düzenleyen istemsiz hareketlerden sorumludur (Srinivasan vd., 2011, s. 468). Genetik yatkınlık ve çevre şartlarıyla (Çizelge 2.1) beynin destek dokusunda ve sinir hücrelerinde kontrolsüz çoğalan mitojenik hücreler aşırı proliferasyon ile karsinoma dönüşmektedir.

Beyin tümörlerinin insidansı dünya genelinde yaklaşık olarak her yıl her 100,000 kişiden 7 kişi olup, beyin tümör vakaları tüm kanser vakalarının % 2 sini oluşturmaktadır ve 70 yaşından önce kanserden hayatını kaybedenlerin % 7'sini beyin tümürlü hastalar oluşturmaktadır. Tümörler DSÖ konsensusuna göre malign özelliklerine bakılarak 1 – 4 safha arasında derecelendirilmiştir. Birinci evre tümörler biyolojik olarak benign (iyi huylu) olup, cerrahi işlemle tedavi edilebilirler; ikinci evre tümörler düşük malign özellikler gösterip, uzun klinik tedavi yolları gerektirirler, ancak çevre beyin dokularına erken diffüz infiltrasyon sonucu cerrahi olarak tedavi edilemez olurlar. Üçüncü evre tümörler, ikincilere göre artmış anaplazi ve proliferasyon gösterirler. Dördüncü evre tümörler vasküler proliferasyon ve nekroz dahil çok daha ileri malign özelliktedirler. Malign beyin tümörleri kökenlerine göre glial ve glial olmayan (metastatik) olarak temelde ikiye ayrılmaktadır (Louis vd., 2007, s. 97; Furnari vd., 2007, s. 2683; http-3).

Çizelge 2.1. Primer beyin tümörlerinde genetik ve çevresel risk faktörleri (Fisher vd., 2006, s.54)

Çevresel		Genetik
Kanıtlanmış	Kanıtlanmamış	
Yüksek doz iyonize radyasyon	Alkol kullanımı	Li-Fraumeni sendromu
	Kimyasal ajanlar (örnek, saç boyaları, çözücüler, Pestisitler)	(P53 mutasyonu)
	Çok düşük frekanslı elektromanyetik alanlar	Multiple endokrin neoplazisi tip 1
	Kafa travması	Neurofibromatosis 1 ve 2
	Enfeksiyonlar (örnek, virüsler, <i>Toxoplasma gondii</i> , in utero <i>influenza</i> , <i>varicella</i> vb)	Nevoid basal hücre karsinomu sendromu
	Nitrözamin, nitrözamide, nitrit, Sigara tüketimi, nitrat	Tuberöz skleroz
		Turcot's sendromu
		Von Hippel-Lindau hastalığı

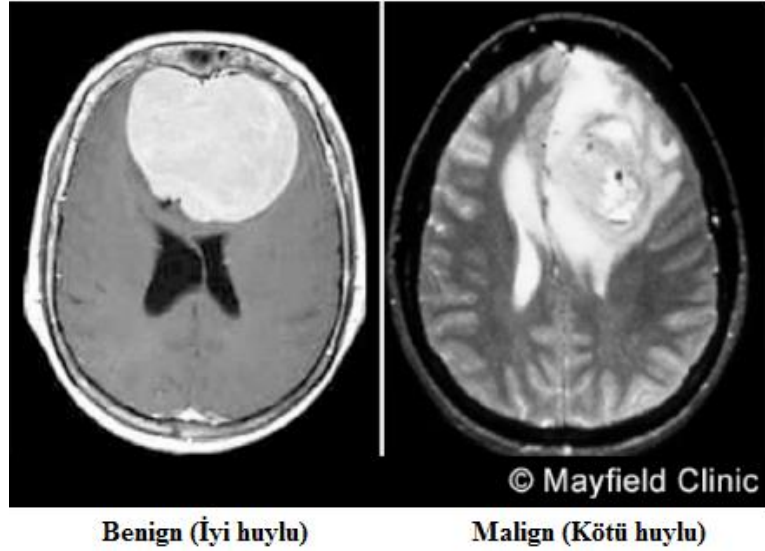
Glial kökenli beyin tümörleri, işlevsiz sinir hücresi olarak da bilinen homeostazı sağlayan glial hücrelerinden köken alırlar. En sık görülen tümörlerdir. Çevresel ve genetik risk faktörleri bulunmakla birlikte, çevresel faktörler arasında bulunan yüksek doz radyasyonun, kansere neden olduğu kanıtlanmıştır (Çizelge 2.1). Astrositoma, oligodendrogloma ve ependimoma olarak üçe ayrılırlar.

Glial olmayan beyin tümörleri ise, bir tümörün vücudun başka yerinden, beyne metastaz yapmasıyla gelen tümörlerdir. Bazı tümörler belirli bir olgunluğa erişmedikçe semptomlar belirginleşmemektedir (Şekil 2.1). Diğerleri ise yavaş seyreden semptomlar göstermektedir. Semptomlar tümörün büyüklüğüne, yerine, sıçradığı yere uzaklığına ve beyinde şişme olup olmadığına göre farklılıklar göstermekle birlikte en sık görülen semptomlar şunlardır (Collins, 2004, s. 2; http-2).

- Kişinin mental fonksiyonunda değişiklikler
- Baş ağrıları
- Nöbetler (özellikle daha yaşlı yetişkinlerde)
- Vücudun belirli bölümlerinde zayıflıklar

Beyin tümörlerinden kaynaklı baş ağrıları; (Snyder vd., 1993, s. 253)

- Sabahları uyandığında daha kötü olabilir ama birkaç saate normalleşir
- Uyku esnasında olabilir
- Kusma, konfüzyon, çift görme, zayıflık veya uyuşukluk eşliğinde meydana gelir
- Öksürme ve egzersizle veya vücut pozisyonu değiştiğinde daha kötüye gider



Şekil 2.1. Benign ve malign beyin tümörünün manyetik rezonans taraması sonuçları (Warnick, 2016).

2.1.1.1. Beyin tümör tipleri

DSÖ sınıflandırma sistemine göre tanımlanan, merkezi sinir sistemini etkileyen 7 ana tipte tümör bilinmektedir. Bunlar nöroepitel doku tümörleri, kraniyel ve paraspinal sinir tümörleri, meninks (beyin zarı) tümörü, lenfomalar ve hematopoietik neoplazmalar, eşey hücresi tümörleri, sella turcica tümörleri ve metastatik tümörlerdir (Strong vd., 2015, s. 102).

Merkezi sinir sistemi (MSS)'nin ana kompartımanı omuriliğin içindeki tümörler (intramedüller), daha nadir görülmekte, bütün MSS tümörlerinin % 4–10 kadarını

oluşturmaktadır. Glial ve ependimal (silli hücreler) hücrelerden köken alabilmektedirler. Glial kökenli intramedüller omurilik tümörleri en sık karşılaşılan tiptir.

Beyin tümörlerinden en sık karşılaşılan gliomalardır. Malign beyin tümörlerinin % 80'inden fazlasını kapsayan, glial hücrelerden köken alan gliomalar, önemli mortalite oranlarıyla kendini göstermektedir. Gliomalar yavaş büyüyen, (örnek; diffüz astrositoma); daha agresif veya aşırı agresif (örnek; glioblastoma) olarak sınıflandırılmaktadır. Gliomaların alt türleri arasında yer alan astrositoma (serebrumda astrosit hücreleri) ve oligodendrogliomalar (Myelin üreten oligodendrosit hücreleri) tek patolojik tür olarak sınıflandırılmış olup, histolojileri ve moleküler etiyolojilerinde farklılıklar göstermektedir. Diffüz astrositomalar (DSÖ Evre 2) 0-14 yaş çocuklardaki tüm tümörlerin yaklaşık % 5'ini oluşturur. Anaplastik astrositomalar (DSÖ Evre 3 ve 4 ise aşırı agresif olup yetişkinlerde yaygın olarak görülmektedir (Ranjit vd., 2015, s. 153; Nagaishi vd., 2013, s. 267).

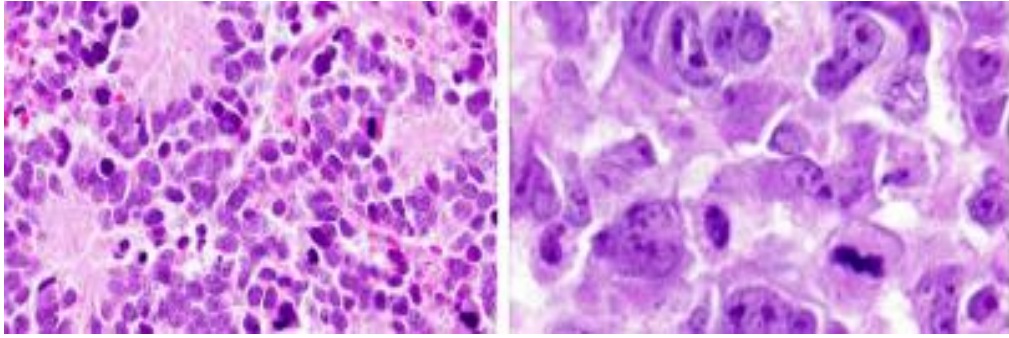
Yetişkinlerin serebral yarım kürelerini etkileyen yaygın gliomalar, beyin parankimi boyunca, erkenden geniş bir alanda difüze olabilme eğilimlerinden, “diffüz” gliomalar olarak adlandırılırlar. Bu gliomalar; astrositomalar, oligodendrogliomalar olarak sınıflandırılırlar veya hem astrositler hem de oligodendrositlerin morfolojik özelliklerini gösteren tümörler olarak, oligoastrositomalar şeklinde de isimlendirilirler (Kleihues vd., 2002, s. 215; Furnari vd., 2007, s. 2683).

Bir astrositoma türü olan GBM yetişkinlerde en çok görülen beyin tümörlerinden biridir. GBM'lar tüm glioma türlerinin % 50–60 kadarını teşkil etmektedir (Onishi vd., 2013, s. 755). DSÖ sınıflandırmasına göre 4. Evre sınıfına girmektedir. 5 yıllık sağkalım oranları 20-44, 45-54, 55-64 yaş aralıkları için sırasıyla % 19, % 8, % 5 olarak belirtilmiştir (Nagaishi, 2013, s. 267; Ostrom vd., 2016, s. 1).

2.1.1.1.1. Glioblastoma multiforme

Bir astrositoma olan GBM (DSÖ Evre 4) çocuklarda nadir görülürken yetişkinlerde en yaygın görülen beyin tümörüdür. Sıkı ilaç tedavisine rağmen, prognoz oldukça kötü seyreder ve teşhisten sonra ortalama ömür 15 ay kadardır (Dolecek vd., 2009, s. 1). GBM kompleks genetik anomalileri olan oldukça heterojen tümörlerdir. Bu tümörlerin moleküler genetiğini aydınlatan çalışmalar hız kazanırken, başlangıç hücre tipi hala bilinmemekte ve hastalık agresifliğinin moleküler parametreleri tam olarak

anlaşıl原因amamıştır (Phillips vd., 2006, s. 157). Gliomaların içerisinde, GBM % 60-70'lik kısmı oluşturmakta, anaplastik astrositomalar (DSÖ-Evre 3) % 10-15'lik kısmı oluşturmakta, anaplastik oligodendrogliomalar (DSÖ-Evre 2) ve anaplastik oligoastrositomalar (DSÖ-Evre 3) birlikte % 10'luk kısmı oluşturmaktadır. En son kalan % 5-20'lik kısmı ise anaplastik ependimomalar ve anaplastik gangliogliomalar gibi tümörleri içeren olan daha az görülen tümör tipleri oluşturmaktadır (Wen ve Kesari, 2008, s. 492). Bu hastalığa yakalanan hastaların yaşam sürelerinde, tümör dokunun damarlanma yapısı ve ak madde boyunca glioma hücre invazyonunun glioma gelişiminde önemli bir rol oynadığı açıklanmıştır (Onishi vd., 2013, s. 755).



Şekil 2.2. *Prolifere olmuş Glioblastoma Multiforme hücreleri (Louis vd., 2016, s. 803).*

GBM, insanda görülen, en ölümcül ve tedavisi olmayan, nükleer atipi, mitotik aktivite, yüksek mikrovasküler proliferasyonu ve nekroz ile karakterize bir kanserdir (Şekil 2.2). Güncel olarak uygulanan tedavi, temozolomid tedavisi ve radyoterapisini takiben tümör dokudan güvenli şekilde parça almadır. Bazı hastaların (% 2-5) 3 yıldan fazla yaşadıkları görülmüştür, ancak hastaların çoğunda, radyoterapi ve temozolomid tedavisine rağmen ortalama yaşam süresi 14,6 ay kadar olup prognoz kötüdür. Yeterli tedaviye rağmen, çoğunlukta hastalık 2 yıl içerisinde nüks etmektedir. Radyosensitizasyon ilaçları, radyoterapi doz artırımı, uygulama aralıklarının değişimi hastalığın tedavi şansını artırmada yetersiz kalmıştır (Khosla, 2015, s. 54; Krex vd., 2007, s. 2596).

GBM, mutasyon insidansı genelde diğer solid tümörlerden daha düşüktür. İstisnai bir durum olarak, alkilleyici ilaçlarla tedavinin ardından tekrarlayan glioblastomalarda bulunan hipermutatör fenotipinde mutasyon insidansı diğerlerinden

yüksektir. Bu durum, DNA tamir eden enzimlerin mutasyonel inaktivasyonu ile ilişkilidir (Bleeker vd., 2012, s. 11).

Glioma hastalarının aile üyelerinin glioma ve diğer kanserlere yatkınlıklarının daha fazla olması genetik orjinin olduğunu göstermektedir. En yaygın tipteki genetik varyasyon, tekli nükleotit polimorfizmleri (TNP) tarafından şekillenir. TNP'ler, glioblastomalara olan genetik yatkınlıkla bağlantılıdır. Özellikle, alerjiler ve astımın glioblastomayla ilişkisi, farklı polimorfizm bağlantılı çalışmalarla gösterilmiştir (Scheurer vd., 2007, s. 2491).

2.1.1.1.2. U87MG Hücre Hattı

U87MG yaygın olarak çalışılan, yaklaşık 40 yıldır 1700'ün üzerinde yayında araştırılan, 4. Evre astrositoma tipi glioma hücre hattıdır. U-87 MG (ATTC® HTB-14™), Uppsala 87 malign gliomanın kısaltmasıdır. Bu, hücrelerin % 44'ünde görülen, tipik 44 kromozomlu bir hipodiploid insan hücresi hattıdır. Epitel morfolojisi vardır ve dördüncü evre kanser hastası bir erkekten elde edilmiştir. Adhere hücre olma özelliğine sahiptir. İkiye katlanma süresi yaklaşık olarak 24 saattir (http-4, Clark vd., 2010, s. 10).

2.1.2. Apoptoz

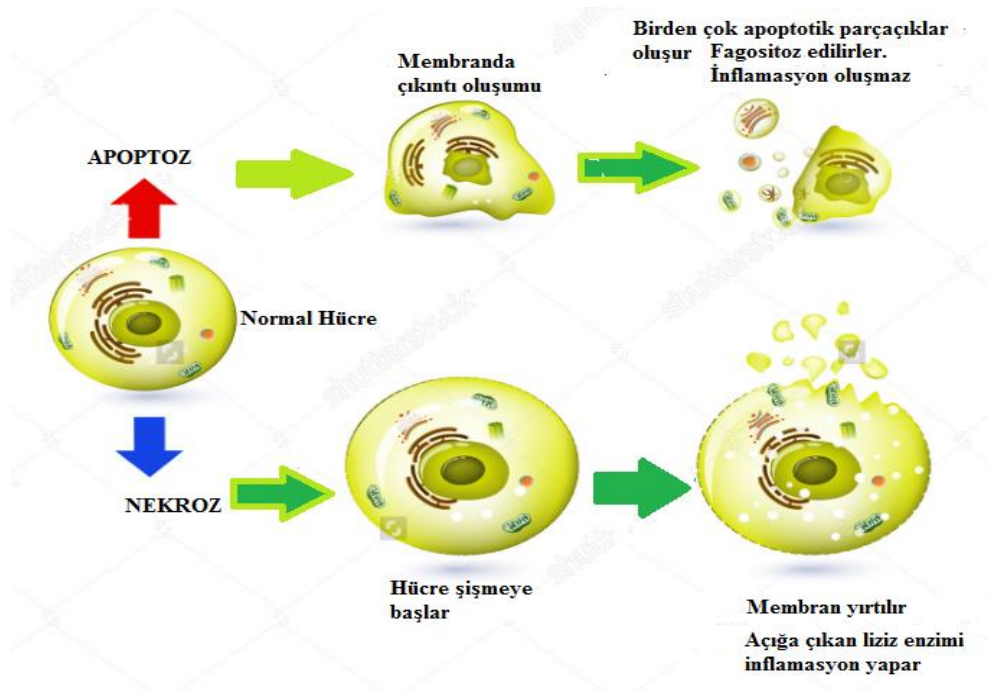
Programlı hücre ölümü, apoptoz, birçok biyolojik ve patolojik durumdaki rolünün aydınlığa kavuşmasından sonra, araştırmalara yoğun bir şekilde konu olmuştur. Akut (Kimyasal ve mekanik olarak) yaralanmaya bağlı hücrelerin kazara ölmeleri anlamına gelen nekrozdan farklı olarak, apoptoz terimi ilk defa 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Kerr vd., 1972, s. 239).

Apoptozun, normal gelişim ve hücre sel süreçlerde merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir. Apoptotik yolların kaybı ve işlevini yitirmesi, kanser proliferasyonunda ve otoimmün hastalıkların ortaya çıkışında artışa neden olabilmekte, bununla birlikte yüksek oranda apoptoz, nörodejeneratif hastalıklar ve bağışıklık yetmezliği durumlarına neden olan mekanizmaları tetiklemektedir (Shah, 1998).

Apoptotik süreçteki bilgilerin çoğuna, model bir organizma olan, nematodun, *Caenorhabditis elegans* çalışmalarıyla ulaşılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda, özellikle iki genin, ced-3 ve ced-4'ün, normal fonksiyonlu apoptotik yolların faaliyetinde önemli olduğu gösterilmiştir (Hengartner ve Horwitz, 1994, s. 581).

Apoptozda, hücrede yapısal değişiklikler iki ayrı evrede gerçekleşmektedir. Birincide, çekirdek ve sitoplazma kümeleşmesi görülür ve hücre membrana bağlı şekilde, yapısal olarak iyi korunan, bir dizi fragmente parçalanır. İkinci evrede, bu apoptotik fragmentler epitel yüzeyinden ayrılırlar, burada fagozomlardaki *in vitro* otolize benzeyen birtakım değişiklikler geçiren hücreler, fagositoz edici hücrelere doğru itilirler ve lizozomal enzimler tarafından parçalanırlar (Kerr vd., 1972, s. 239).

Apoptoz, hücredeki sağlıklı işlemesi gereken normal bir süreç iken, nekroz ise öngörülemeyen, programlanmamış bir hücre ölüm yoludur. Hücre ölümü dış faktörler veya hastalıklar sebebiyle olmaktadır. Apoptoz bir savunma mekanizması olarak belirtilirken, nekroz, anormal ve zararlı bir süreçtir. Nekrozda, inflamasyon tetiklenebilir. Apoptoz ve nekroza ek olarak, otofajik hücre ölümü, programlanmış nekroz, tip üç hücre ölümü, nekroptosis gibi karışık mekanizmalı hücre ölümleri de tanımlanmıştır (Şekil 2.3) (Kroemer vd., 2009, s. 3; Wu, 2014, s.43).



Şekil 2.3. Apoptotik ve nekrotik ölümünün hücre morfolojisine ve fizyolojisine etkisi (<http-5>)

2.1.2.1. Apoptozda kaspazlar

Kaspazlar (sistenil aspartat-spesifik proteinazlar) aktif bölgelerinde sistein içeren proteaz grubu enzimlerdir. Kaspazlar, memeli interlökin 1 β -dönüştürücü enzim (ICE/kaspaz- 1) ve nematod apoptotik gen ürünü olan ced-3 ile ilişkilidir (Salvesen ve Dixit, 1997, s. 443).

Kaspazlar hücrel yaşam fonksiyonlarını düzenleyen, hücre ölümü ve inflamasyon süreçlerinde rol alan endoproteaz enzimleridir. İnaktif zimojen olarak sentezlenirler. Hücrel sinyallerle, dimerlerine veya makromoleküler komplekslerine dönüşürler ve katalitik aktivite kazanırlar. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2,8,9,10) sonlandırıcı kaspazları (kaspaz-3,6,7) aktive eder, onların aktivitelerini önemli yapısal proteinlerin yıkılımı sırasında kontrol eder ve bunda gerekli diğer enzimleri aktive ederler. Sonlandırıcı kaspazların aktivitelerinin ardından, apoptozun morfolojik belirteci DNA fragmentasyonu ve membran yüzeyindeki çıkıntılardır (Shi, 2004, s. 1979).

2.1.2.1.1. Başlatıcı kaspazlar

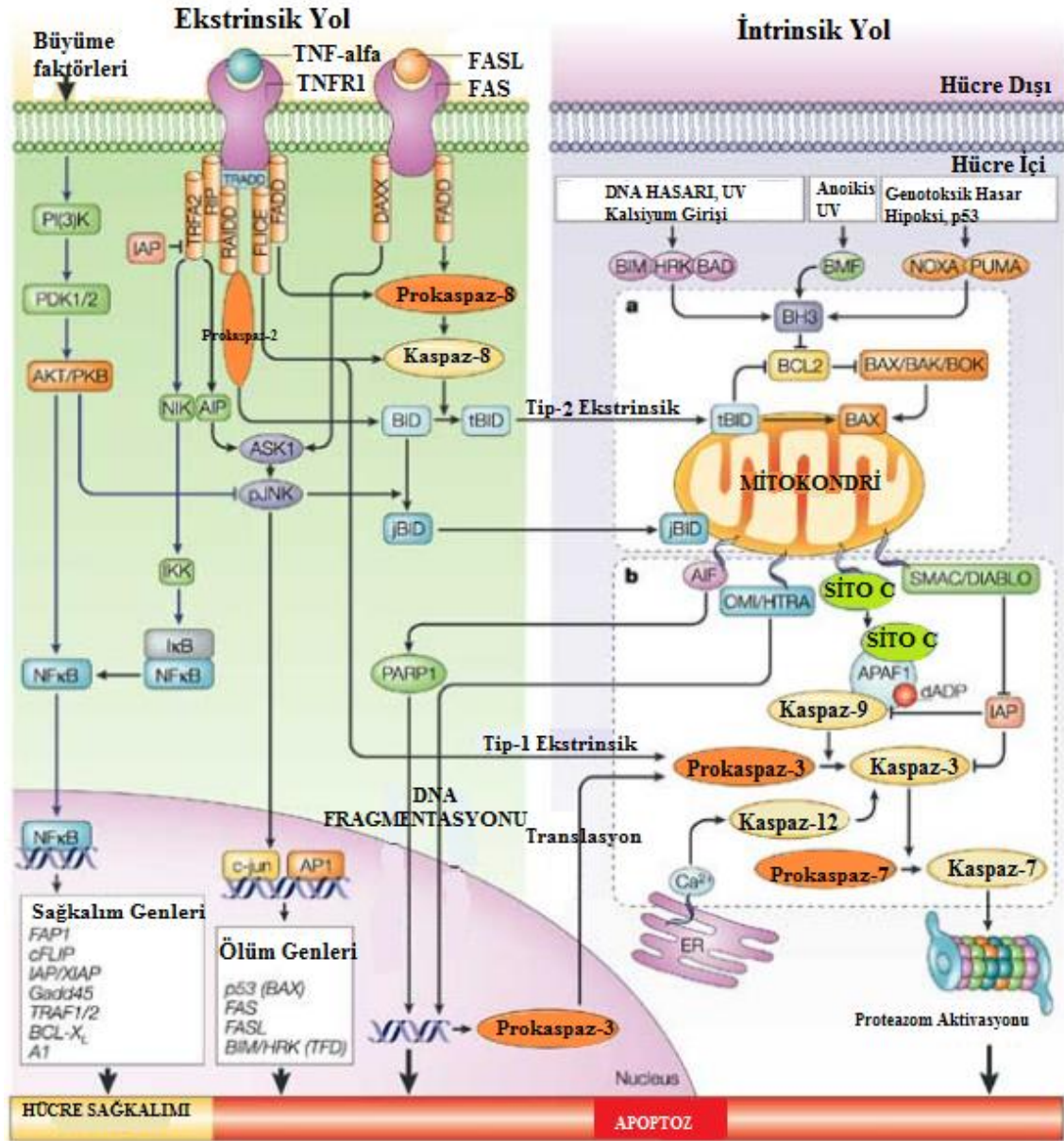
Dört tane (kaspaz-2,8,9,10) apoptozu başlatıcı kaspazlardandır. Başlatıcı kaspazlardan kaspaz-8 ve 9 normalde inaktif prokaspaz (zimojen) monomeri olarak bulunmaktadır. Bunlar parçalanma ile değil dimerizasyonla aktive olurlar. Bu süreçte, başlatıcı kaspaz zimojenlerinin kümelenmesinden sonra, ilk proteolitik sinyal üretilir, sinyal iletimi, kaspaz dimerizasyonu ve aktivasyonunu sağlar (Shalini vd., 2015, s. 526).

2.1.2.1.2. Sonlandırıcı kaspazlar

Kaspaz-3, 6 ve 7 sonlandırıcı kaspazlardır. Sonlandırıcı kaspazlar-3, 6, ve 7 inaktif prokaspaz dimerleri şeklinde üretilerek, uygun olmayan aktivasyonlarının önüne geçilmiş olur. Küçük ve büyük alt birimler arasındaki bu bağlanma, sonlandırıcı kaspazların dimer yapısının iki aktif bölgesinin bir araya gelmesine yardım eden yapısal bir değişikliğe sebep olur ve fonksiyonel, olgunlaşmış bir proteaz enzimi oluşur. Bir kere aktive edildiğinde, tek bir sonlandırıcı kaspaz diğer sonlandırıcı kaspazları da aktive eder ve böylece bir döngü şeklinde kaspaz aktivasyonu kaskadı gerçekleşir (Riedl ve Shi 2004; McIlwain vd., 2013, s. 3).

2.1.2.1.3. *İnflamatuvar kaspazlar*

Bazı kaspazlar, proapoptotik faktör olmaktan çok, doğal bağışıklık yanıtının önemli araçları olarak görev yaparlar. Kaspaz 1, 4, 5, ve 12 insandaki infalamatuvar alt kümeyi oluşturmaktadır (Martinon vd., 2002, s. 417). İnflamasyon kaspazları şimdiye kadar sadece vertebralarda bulunmuştur. Kaspaz-12'nin genetik mutasyonları bulunmaktadır ve bu yüzden farklı varyantları olan bir kaspazdır. Kaspaz-12 genelde, enfeksiyonlarla indüklenen inflamasyon sürecinin negatif düzenleyicisi olarak görülür. Çünkü inflamazom komplekslerinde kaspaz-1 aktivasyonunu inhibe eder, böylece enfeksiyon varlığında oluşan sepsise yanıt olarak verilen IL-1 β ve IL-18 proinflamatuvar sitokinlerin üretimini engeller. Buna karşın, kaspaz-4 enfeksiyon durumlarındaki inflamasyon yanıt süreçlerinde pozitif etkili olan bir kaspazdır. Kaspaz-4 ve kaspaz-12' nin ER stres ve inflamasyon yanıtlarında birbiriyle ilişki içinde olduğu gösterilmiştir (García de la Cadena ve Massieu, 2016, s. 763).



Şekil 2.4. Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik (mitokondriyel) yolları ve kaspazların rolü. (FADD: Fas aracılı ölüm domainin adaptör protein, APAF1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör, BID: proapoptotik bcl-2 proteini, tbid: trunkat formu) (Benn ve Woolf, 2004, s. 686).

2.1.2.2. Apoptoz yolları

Farklı başlatıcı kaspazların ve adaptör proteinlerin rol aldığı farklı apoptoz yolları tanımlanmıştır. Apoptotik süreç genelde, ekstrinsik ve intrinsik olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Apoptozu tetikleyenler arasında, Tümör Nekroz Faktör α (TNF- α), Fas ligandı (FasL), transforme büyüme faktörü β (TGF β), Bax (ve diğer proapoptotik Bcl-2 üyeleri) ve glukokortikoidler bulunmaktadır.

2.1.2.2.1. Ekstrinsik yolak

Başlatıcı kaspazların aktive edildiği iki mekanizma vardır; ilk mekanizmada hücre yüzey reseptörleri uyarılır (Kaspaz-8 için), ikincisinde ise hücre içi strese bağlı uyarılma vardır (Kaspaz-9 için). Ekstrinsik apoptoz yolu, ölüm reseptörlerine bağlanan ligandların yapısındaki ekstrasellüler belirteçlere bağlı olarak tetiklenir. Kaspaz-8 aktivasyonu, hem hücre membran reseptörü (ölüm reseptörü) olan CD95 (Fas/Apo1) aracılığı ile aktifleşebilir hem de aktif ligandı FasL veya TNF- α 'ya bağlanan, kenetlenme proteinlerinden olan Fas-aracılı ölüm domaini (FADD) veya TNF reseptör aracılı ölüm domaini (TRADD) ile kompleksleşen, CD120 (tümör nekroz faktör [TNF] reseptör ailesi üyesi) aracılığı ile aktive edilebilir (Gavrilescu ve Denkers, 2003, s. 6109) (Şekil 2.4).

Ligandın bağlanması reseptörün kompleksleşmesini başlatır ve bu bazı proteinlerin reseptörle sitoplazmik kısımda bir kompleks oluşturmaya neden olur. Buna, ölüm başlatıcı sinyal kompleksi (DISC) denilmektedir. DISC protein oluşumları, birbirlerine ve CD95'e (Fas/Apo1) bir dizi homolog domain ile bağlıdır. CD95'in C-ucu ölüm domaini (DD) denilen, bir benzeri FADD'nin C ucunda bulunan, bir aminoasit sekansı içermektedir. Diğer taraftan, FADD'ın yapısında, ölüm efektör domaini (DED) olarak bilinen N-terminal domaini bulunmaktadır. FADD, kaspaz-8'e direkt bağlanan ve kaspaz-8'i aktifleştirebilen, iki tane DED içermektedir. TRADD'de DED bulunmamaktadır ancak önce FADD'ye bağlanarak kaspaz-8'i aktifleştirebilir. Bazı çalışmalarda, Fas aracılı apoptozda kaspaz-8'in önemli olduğu gösterilmiştir (Benn ve Woolf, 2004) (Şekil 2.4).

2.1.2.2.2. İntrinsik yolak

İntrinsik apoptoz, mitokondrial apoptoz olarak da bilinmektedir. Çünkü süreç, mitokondriden sitoplazmaya salgılanan faktörlere de bağlıdır. Bu yolak, büyüme faktörü azalması, sitoskelet bozulması, DNA hasarı, katlanmayan proteinlerin birikimi, hipoksi ve diğerleri gibi geniş bir dizi hücre stres faktörleriyle aktive olur. Ayrıca hormonlar da apoptotik sinyallerin aktivasyon işleminden sorumludur (Brenner ve Mak, 2009, s. 871).

İntrinsik apoptoz yolağı, sorumlu başlatıcı kaspaz olan kaspaz-9, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF1) proteinine bağlanma ve dimerizasyon ile aktive olur. Kaspaz-9 aktivasyonu mitkondrinin membran potansiyelinde değişiklikler meydana getirir, sonuçta, mitokondrial membrandan sitozole sitokrom c translokasyonu gerçekleşir. Sitoplazmik sitokrom c, APAF-1'e bağlanır ve APAF'ta yapısal değişiklikler oluşur. Sitokrom c, APAF1, ve kaspaz-9'u içeren kompleks, apoptozom olarak isimlendirilir. Apoptozom ve aktive olan APAF-1, prokaspaz 9'a bağlanarak inaktif kaspaz-9'u, aktif kaspaz-9'a dönüştürür (Gavrilescu ve Denkers, 2003, s. 6109).

Kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivasyonu arasındaki etkileşim de Bid (küçük 23-kDa proapoptotik Bcl-2 üyesi)'in keşfiyle ortaya çıkmıştır. Kaspaz-8'in aktifleşmesi ekstrasellüler hücre ölüm sinyali üreten tBid'e bağlıdır. tBid, bu süreçte, 15-kDa'lık fragmentine parçalanır ve mitokondriyel membrana transloke olur. Bax ile etkileşimi sonucunda ise, mitokondriyel membran depolarizasyonu ve sitoplazmaya sitokrom c salımı meydana gelir ve kaspaz-9 aktifleşir (Wang vd., 1996, s. 2859; Yin, 2000, s. 203).

Kalsiyum ve IP₃ (İnositol Trifosfat)

Kalsiyum insan vücudunda, en çok bulunan mineraldir, kalsiyumun çoğunluğu kemik ve dişlerde depolanır. Sadece az bir miktarı (örneğin, % 1) fizyolojik olarak aktiftir, biyolojik sistemlerde önemli roller oynamaktadır ve evrensel bir sinyal molekülü olarak düşünülmektedir. Ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında, dinlenme koşullarında 100 nM Ca⁺² bulunmaktadır. Ekstrasellüler Ca⁺² konsantrasyonu ise 1–2 mM'dir ve önemli bir depo kompartımanı olan, endoplazmik retikulumda, yaklaşık olarak, 0,1–1,0 mM aralığında kalsiyum olduğu bildirilmiştir (Putney ve Tomita 2012, s. 152).

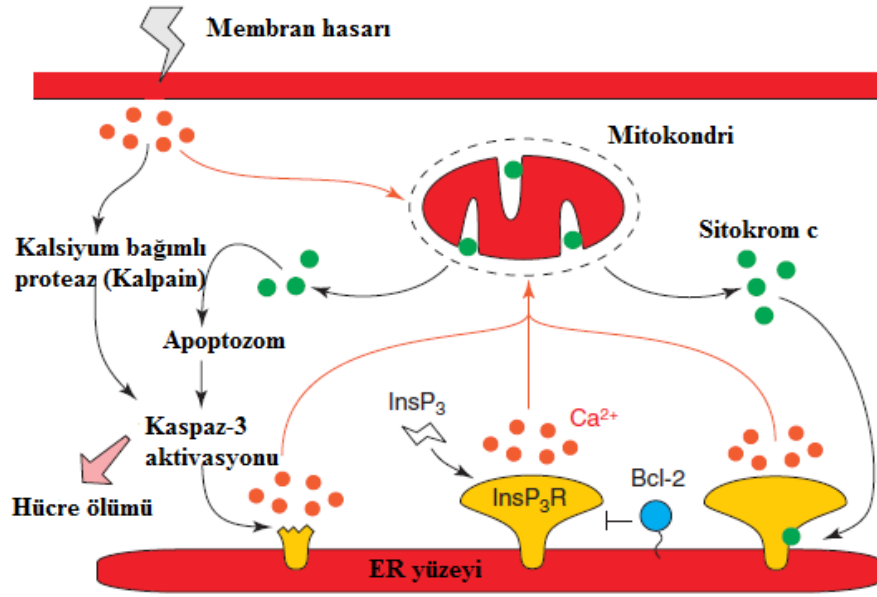
Kanser hücrelerinin normal hücrelerle karşılaştırıldığında göreceli olarak daha düşük miktarda kalsiyum içerdikleri 90'lı yıllarla yapılan bir çalışmada açıklanmış olup, bu çalışma, tümör oluşumuyla iyon arasındaki bağlantıyı vurgulayan ilk çalışmalardan biridir (Kadio vd., 2016, s. 391).

Kalsiyum iyonunun hem programlı hücre ölümünde hem de toksik hücre ölümünde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Birkaç farklı deneysel sistemde, hücre

içi kalsiyum homeostazındaki bozukluğun, artan kalsiyum influksu veya kalsiyumun dışarıya pompalanmasının inhibisyonu sonucu olduğu gösterilmiştir. Bu da hücre hasarının ilk belirtilerindendir. Hücre içi kalsiyum seviyesindeki uzun süreli artışlar, sitotoksik mekanizmaları aktive etmektedir. Örneğin, kalsiyuma bağımlı proteazların aşırı stimülasyonu (kalpain gibi) hücre iskelet yapısında bozulmaya ve hücre membranında çıkıntı oluşumuna neden olmaktadır. Ca^{+2} bağımlı fosfolipaz C aktivasyonu, mitokondriyel bozukluğa neden olmakta ve ATP sentezi durdurmakta ve membran potansiyelinin bozulmasına neden olmaktadır (Orrenius vd., 1992, s. 357).

Nörotransmitterler, hormonlar ve büyüme faktörleri gibi uyarılara yanıt olarak, plazma membranındaki fosfatidilinositol 4,5 bisfosfat (PIP2), fosfolipaz C (PLC) tarafından, inositol 1,4,5-trisfosfat (IP_3) ve diasilgliserol'e (DAG) hidroliz edilir. IP_3 de sekonder mesajcı bir molekül olarak kalsiyumun hücre içi depolardan sitozole salgılanmasında önemli bir rol oynar. DAG, protein kinaz C'yi aktive eder. IP_3 hücre içi kalsiyum depolarının yüzeyindeki reseptörlere bağlanır. IP_3 reseptörü aynı zamanda luminal Ca^{+2} için bir salgı kanalıdır. Bu sebeple, IP_3 reseptörü, dış etkenlere bağlı IP_3 sinyallerini, hücre içi kalsiyum sinyallerine dönüştürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu reseptörler, ER'den mitokondriye kalsiyum transferini mitokondride bulunan transport proteini aracılığı ile düzenlerler (Yoshida ve Imai, 1997, s. 125).

Moleküler klonlama çalışmaları farklı genler tarafından kodlanan en az üç tip (tip 1,2,3) memeli IP_3 -reseptör alt ünitesini keşfetmiştir (Bosanac vd., 2002, s. 696). IP_3 reseptörleri kalsiyum sinyalini kontrol ederek hücre yaşamını, adaptasyon ve ölüm süreçlerini düzenlerler. ER stresi ile kalsiyum arasındaki bağlantı, IP_3 reseptörü ile düzenlenir. Bu reseptör aracılığı farklı dış sinyallere bağlı olarak, ER depolarından kalsiyum çıkışı sağlanır, ayrıca bu reseptörler Bcl-2 ailesinden gibi proteinlerle de etkileşim gösterirler. Bcl-2, bu reseptörlere bağlanarak IP_3 bağımlı kalsiyum akışını inhibe eder (Singh vd., 2014).



Şekil 2.5. IP_3 reseptörlerinin apoptozdaki rolü (Hanson vd., 2004, s. 933).

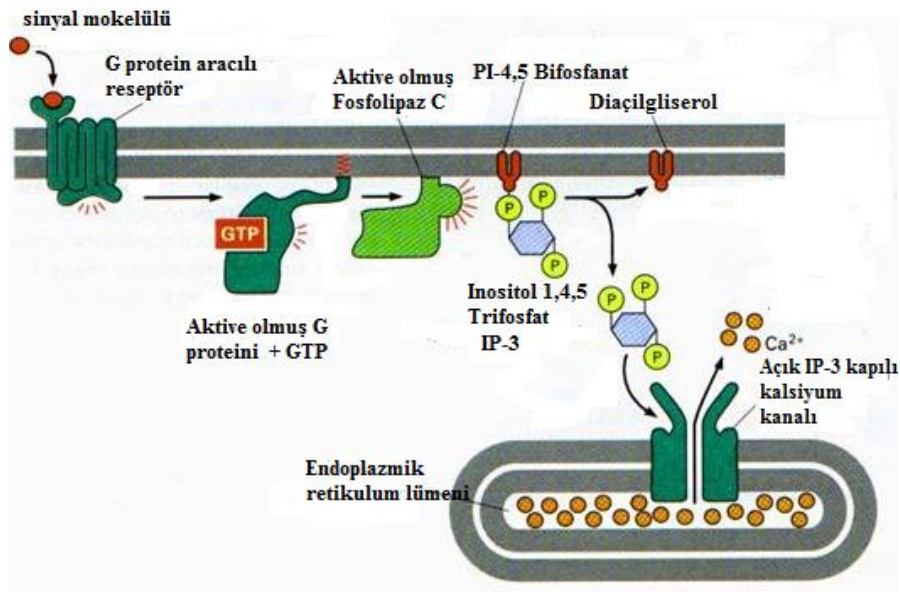
IP_3 reseptör aracılı kalsiyum salınımı ve mitokondri arasındaki pozitif feedback, hücre ölüm oranlarını artıran kalsiyum sinyallerinin üretimini artırır. Mitokondri, kalsiyumları 'uniporter' aracılığı ile tutar. Mitokondriyel kalsiyum, mitokondri metabolizmasını ayarlar ancak mitokondriyel patolojiyi de tetikleyebilir. IP_3 reseptörleri ve mitokondri arasındaki apoptozu indükleyen kalsiyum döngüsü membranın hasarını takiben kalsiyum girişi gibi birden farklı mekanizma ile başlayabilir. Yakınlarda yapılan çalışmalar, göstermiştir ki IP_3 reseptörleri IP_3 üretiminden bağımsız olarak da apoptoz sırasında aktive edilirler. Tip -1 alt ünitesinde olduğu gibi kaspaz-3 tarafından kesilen IP_3 reseptörü de kalsiyum akışı gerçekleştirmiştir (Şekil 2.5) (Hanson vd., 2004, s. 933).

Fosfolipaz C

Fosfolipaz C (PLC), fosfolipidleri fosfat gruplarından hemen önce ayıran membran aracılı bir enzimdir. İnsanda bulunan homologlarının, ökaryotik hücre fizyolojisinde özellikle sinyal iletim mekanizmalarında önemli bir rolü vardır. Memelilerde 13 tipte fosfolipaz C bulunmaktadır. Yapılarına göre 6 izotipe ayrılırlar (β , γ , δ , ϵ , ζ , η). Her PLC'nin aktivatörü değişiklik göstermekle birlikte, tipik olarak

heterotrimerik G protein alt üniteleri, protein tirozin kinazlar, G proteinleri, Ca^{+2} ve fosfolipidlerini içermektedir (Ganesh ve Ross, 2013, s. 127; Suh vd., 2008, s. 415).

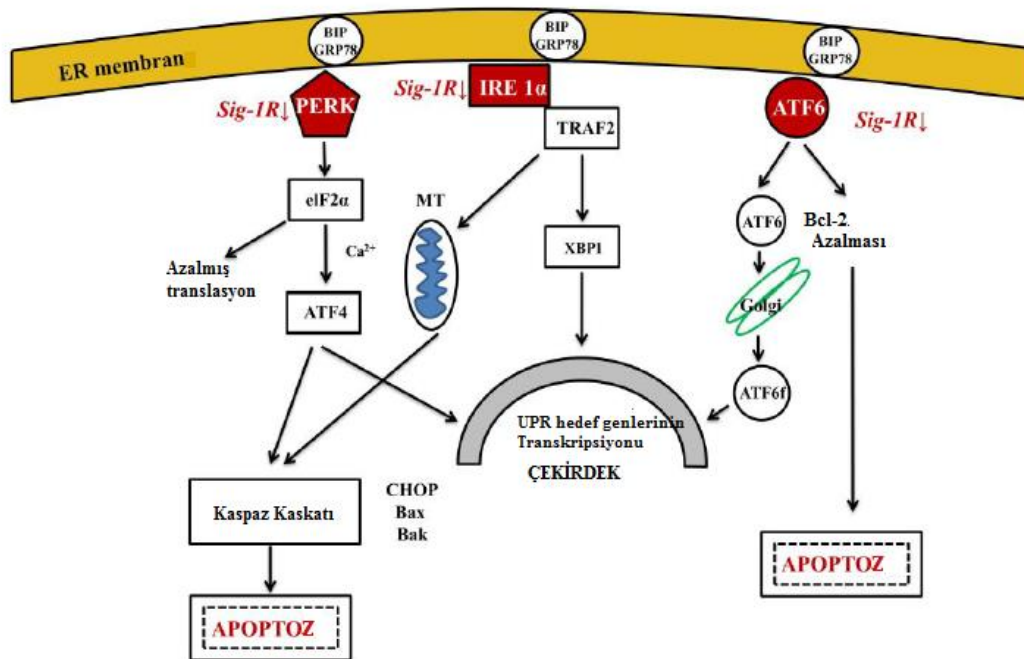
PLC ve hücre için Ca^{+2} depoları, önemli sekonder mesajıcılardan IP_3 ve DAG'nin rol oynadığı birtakım hücresel fonksiyonlarda rol alırlar. Hücre dışı sinyal molekülünün varlığı veya G proteinini aktive eden bir membran reseptörünün uyarılması sonucunda aktive olurlar. Bu G proteininin alfa alt ünitesi, membrandaki fosfolipide etki edecek olan PLC'yi aktive eder. PLC'nin membrandaki fosfolipide etkisinin sonucunda, küçük polar bir molekül olan IP_3 membrandan ayrılır. 2 yağ asidi ve 1 gliserolden oluşan DAG açığa çıkar (Şekil 2.6). IP_3 , kalsiyumu depolayan endoplazmik retikuluma yönelir. IP_3 kendi reseptörüne bağlanır ve kalsiyumun çeşitli olayları organize ettiği sitozole geçişine izin veren ligand kapılı iyon kanalını açar (Şekil 2.6) (http 6; Marrero ve Deniz, 2004, s. 85).



Şekil 2.6. *G-protein aracılı fosfolipaz C aktivasyonuna bağlı fosfoinositol 4,5-bifosfonattan IP_3 ve DAG oluşumu ve IP_3 aracılı kanaldan Ca^{+2} salınımının şematik görünümü (Marrero ve Deniz, 2004, s. 85)*

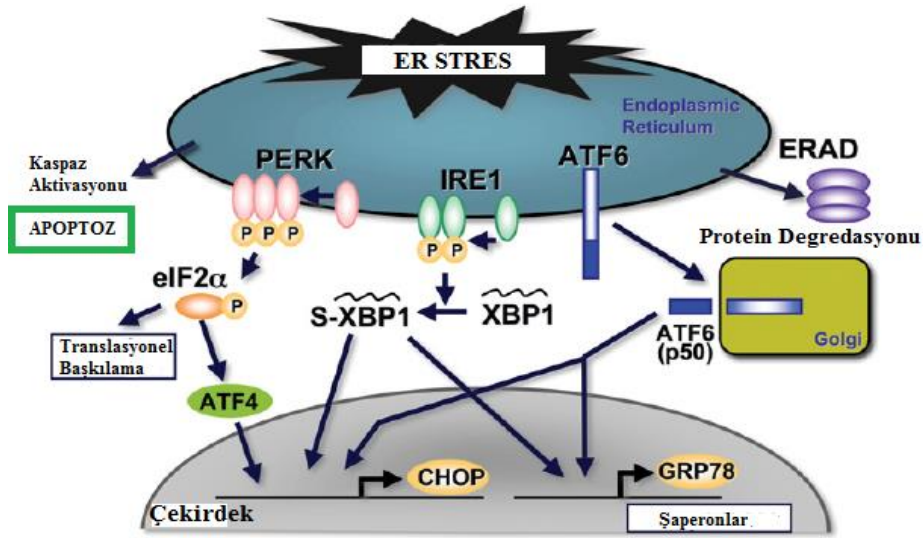
2.1.2.3. Endoplazmik retikulumun (ER) apoptozdaki rolü

ER ökaryotik canlılardaki, sisterna, veziküller ve tübüllerden oluşan, protein translasyonu, protein katlanması, hücre membranında kullanılan veya hücreden salınan proteinlerin iletimi gibi pek çok hücresel fonksiyondan sorumlu olan bir organeldir. ER hem önemli bir hücre içi kalsiyum deposu hem de proteinlerin sentezlendiği, katlandığı, düzenlendiği ve hücre içi-dışına yönlendirildiği bir organeldir (Schwab, 2011, s. 16483). ER'nin lümeni, kalsiyum ATPaz'ları tarafından kalsiyum iyonlarının aktif transportunun olduğu, bu sebeple de kalsiyum konsantrasyonunun en yoğun bulunduğu yerdir. Oksidatif bir ortama sahip olan ER lümeni, protein katlanma yolunda ve protein stabilizasyonunda önemli rolü olan disülfid bağlarının düzgün çalışması ve hücre yüzeyinde bulunan proteinlerin düzgün katlanabilmesi açısından oldukça önemlidir. Proteinlerin katlanma ve transportundaki rolünden ötürü, ER aynı zamanda protein katlamayı stabilize eden sigma reseptör proteinleri, GRP78, GRP94 ve kalretikulin gibi Ca^{+2} bağımlı moleküler şaperonlar açısından zengindir (Şekil 2.7) (Rizzuto vd., 2004; Schroder ve Kaufman, 2005, s. 9).



Şekil 2.7. UPR'yi aktive eden sigma-1 proteini ve ER stresinin 3 sinyal yolu (Penke vd., 2017).

ER fonksiyonundaki bozukluklar, (ER stresi) hücre içi sinyal iletimi reaksiyonlarının protein homeostazını sağlamak üzere düzenli bir şekilde çalışan sistemi aksatıp, katlanmayan protein yanıtını (UPR) tetikler (Gardner ve Walter, 2011, s. 1891). ER'deki yanlış katlanan ve katlanmayan proteinlerin sayısı arttığında, UPR aktive edilir ve buna bağlı olarak ER'deki moleküler şaperonlar, disülfid izomerazlar, oksidoredüktazlar, asetilazlar ve glikozilaz gibi ER'de bulunan proteinlerin sentezi ER tarafından baskılanır. ER stresinin, mitokondri ve ER arasında karşılıklı gerçekleşen ilettime bağlı olarak, kaspaz 12 aktivasyonu ve/veya kaspaz 9 aktivasyonuna neden olan mitokondriden sitokrom c salınımı gibi farklı apoptotik yolları indüklediği de gösterilmiştir (Waldron vd., 2015, s. 3; Zuppini vd., 2004, s. 2591).

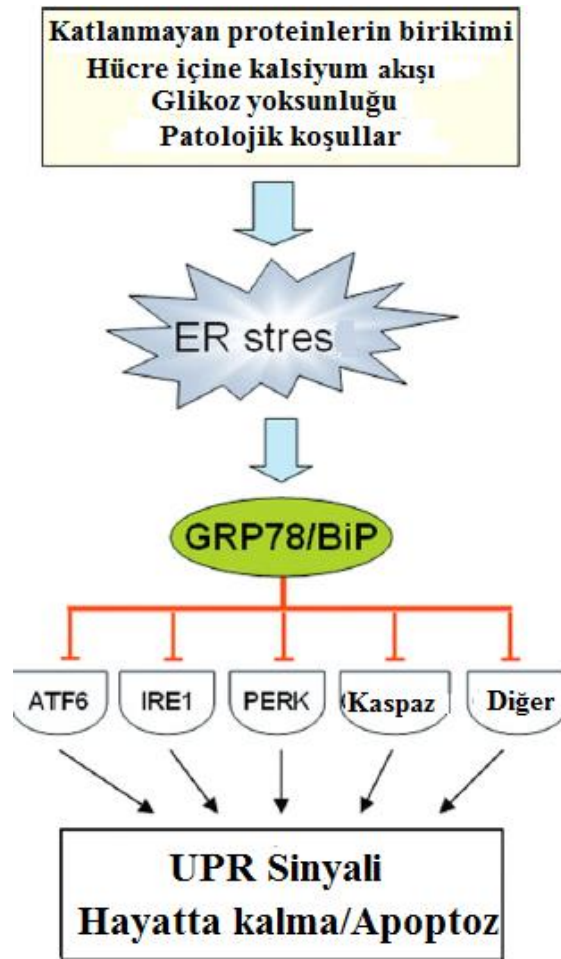


Şekil 2.8. ER-stres oluşumuna bağlı sinyal iletimi (Hosoi ve Ozawa, 2009, s. 19)

GRP78, protein katlanması için ATP kullanan ve ER'de protein agregasyonunu engelleyen bir ER şaperon proteinidir. UPR, glukoza bağlı protein (GRP78) olan ER şaperon proteinini (BiP) ve üç ER transmembran proteini, Protein Kinaz R-benzeri ER kinaz (PERK), IRE1 (tip 1 transmembran serin/treonin reseptör) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) tarafından kontrol edilip düzenlenir. Aktive olan PERK, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 subunit-a'yı (eIF2-a) fosforile ederek genel protein sentezini bloke eder. IRE1 de X-box bağlama proteinini, S-X-box bağlama proteinini aktive eder. UPR her üç koldan proapoptotik bir transkripsiyon

faktörü olan CHOP (c/EBP homoloji proteini)'un transkripsiyonunu indüklemek için birlikte hareket eder (Oyadomari ve Mori 2004, s. 381; Park vd., 2010, s. 7274). CHOP ve GRP78 aktivasyonu sonucunda protein katlanması düzenlenir (Şekil 2.8) (Bertolotti vd., 2000, s. 326).

UPR'nin üç amacı vardır: protein translasyonunu durdurarak hücrenin normal fonksiyonuna dönmesi, yanlış katlanmış proteinlerin yıkımı ve protein katlanmasından sorumlu moleküler şaperonların üretimini hızlandıracak sinyal iletim yollarının aktive edilmesi. Eğer bu önlemler belirli bir zaman aralığında gerçekleştirilemezse veya sorun büyük çapta ise, UPR hücreyi apoptoza götürme eğilimi gösterir (Hosoi ve Ozawa, 2009, s. 19).



Şekil 2.9. UPR sinyal yolu (Lee, 2005, s. 373).

GRP78, ER stress iletiminin ve canlı kalabilmenin temel düzenleyicisidir. Stres altında olmayan hücrelerde, ER-stres aktarıcıları ATF6, IRE1 ve PERK, GRP78 ile etkileşim halinde olduklarından inaktif durumda tutulurlar. ER stresi sonrası veya ER’de yanlış katlanmış proteinlerin olması durumunda, GRP78, stres aktarıcılarını aktifleştirir.

Aktive olmuş IRE1, XBP1 (X-box-binding protein 1) mRNA’sının belirli bir intronunu keserek aktifleştirmesini indükler. Bu intronu kesilen mRNA’dan translate olan XBP1 proteini de GPR78 geni gibi ER stres aracılı genlere özel transkripsiyon faktörü olarak görev yapar (Calfon vd., 2002, s. 92).

PERK aktive olduğunda, eIF2 (ökaryotik translasyon faktörü 2)’nin alfa alt ünitesini fosforile eder ve eIF2 aktivitesini azaltır. Sonuç olarak translasyon baskılanır. Buna karşın, CHOP promotörü aktive edilir. PERK aktivasyonu başlangıçta koruyucudur ve orta düzey stres sırasında sağkalım için oldukça önemlidir. Bununla birlikte, PERK aktivasyonu, aynı zamanda, sağkalım sinyalinin ölüm sinyaline geçişi kontrol eden CHOP (Bcl-2 downregulator)’un indüklenmesini de sağlar (Şekil 2.9) (Szegezdi vd., 2006, s. 880).

Diğer taraftan, ER stresi sonucu ER’den golgiye transfer olduktan sonra düzenlenmiş hücre içi membran proteolizi (Golgi cisimciğindeki serin 1 proteaz ve serin 2 proteazlar tarafından) geçiren ATF6 aktive olur. ATF6’nın golgi cisimciğinde parçalanmış sitoplazmik domainleri çekirdeğe girer ve GRP78, CHOP and XBP1 gibi UPR hedeflerinin gen transkripsiyonlarını düzenler (Brown vd., 2000, s. 391; Ye vd., 2000, s. 1355).

2.1.3. Sfingolipidler ve kanser ilişkisi

Sfingolipidler, lipid ailesinden olan, lipid tabakasının özellikle lipid yığınlarının akışkanlığından sorumlu olup ve alt domainlerdeki önemli yapısal rolleriyle bilinen temel sfingoid yapısına sahip, sphingomyelin, seramid, sfingosin ve sfingosin-1 fosfat (S1P)’dan oluşmaktadır. Sfingolipid metabolizmasının ve fonksiyonlarının üzerine son zamanlarda gerçekleştirilen biyokimyasal ve moleküler çalışmalar, bu sfingolipidlerin aynı zamanda efektör moleküller olarak fonksiyon göstermekle birlikte, agonistler aracılı sinyal iletimi ve inflamasyon, hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez ve transformasyon gibi pek çok hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli roller aldığını göstermiştir (Furuya vd., 2011, s. 567; Ryland vd., 2011, s. 138).

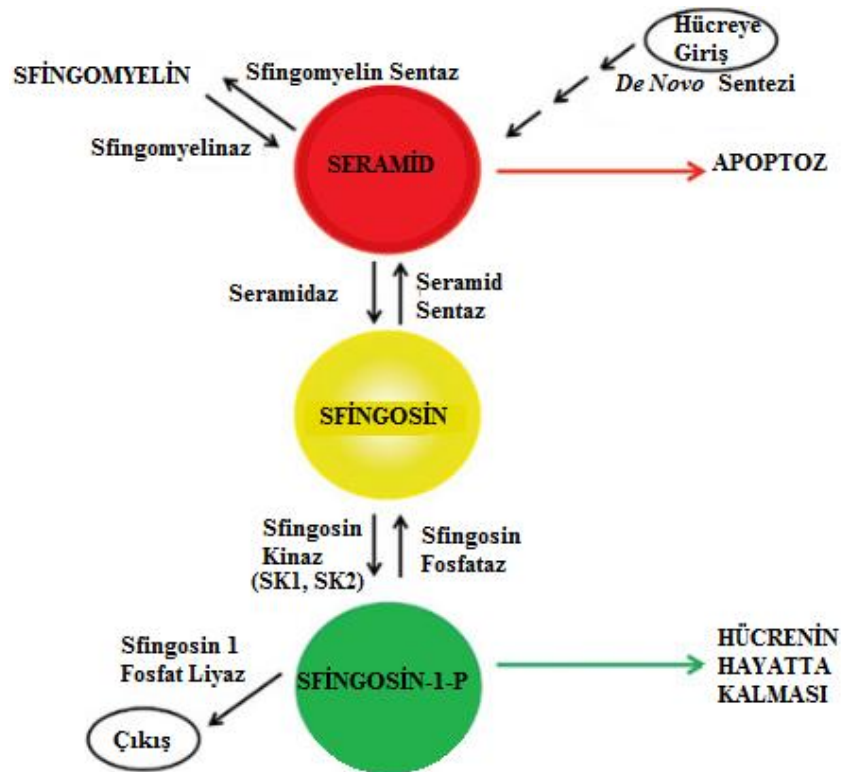
Sfingolipidler, seramidazlar, seramid sentazlar, sfingosin kinazlar (SK) ve sfingosin-1 fosfatazlar gibi enzimlerin fonksiyonları ile metabolik olarak ilişkilidir. Normal hücresel fonksiyonlarda ve hastalıklarda önemli olan ve metabolik olarak birbiriyle ilişkili biyoaktif lipid mediyatörler ağını oluştururlar (Ogretmen ve Hannun 2004, s. 604).

2.1.3.1. Seramid, sfingosin-1 fosfat ve sfingosin kinazlar

Hücre farklılaşması ve hücre ölümündeki rollerinden ötürü, seramid kanserde en çok çalışılan, sfingolipid yolağındaki merkezde olan biyoaktif bir lipiddir. Seramid, sfingosin ve bir yağ asidinden (*De novo* sentezi) meydana gelmektedir. Bir kere üretildiğinde, seramid hücrede birikim gösterebilir. Seramid, daha az toksik formlarına da metabolize edilebilir. Seramidden, sfingomiyelin sentaz ile sfingomyelin elde edilir. Diğer yandan nötral veya asit seramidaz ile deasitilasyon sonucu sfingosin oluşabilir. Bu da SK'lar tarafından sfingosin-1 fosfata (S1P) fosforilize edilebilir (Şekil 2.10) (Reynolds vd., 2004, s. 169; Ryland vd. 2011, s. 138).

Son yıllarda, sfingolipid metabolitlerinden biri olan S1P'nin çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir (Spiegel ve Merrill 1996, s. 1388).

S1P, seramid metabolizmasının bir ürünüdür. Kanserli hücrelerin çoğalmasında etkili olduğu ve hücresel apoptozu engellediği gösterilmiştir. S1P, sfingosinin sfingosin kinaz 1 ve 2 (SK₁ ve SK₂) tarafından fosforilasyonu ile meydana gelir. Birçok çalışmada, SK₁ / S1P'nin tümör artırıcı etkili moleküller olduğu gösterilmiş ve farklı kanser ve tümör dokularında bu moleküllerin artmış düzeyde olduğu gösterilmiştir. S1P üretiminden sorumlu enzim olan SK₁'in, solid tümörlü hastada (örnek; glioma gibi) aşırı eksprese olduğu açıklanmıştır (Waarde vd., 2010, s. 3519).



Şekil 2.10. *Sfingolipid metabolizması ve homeostaz (http-8).*

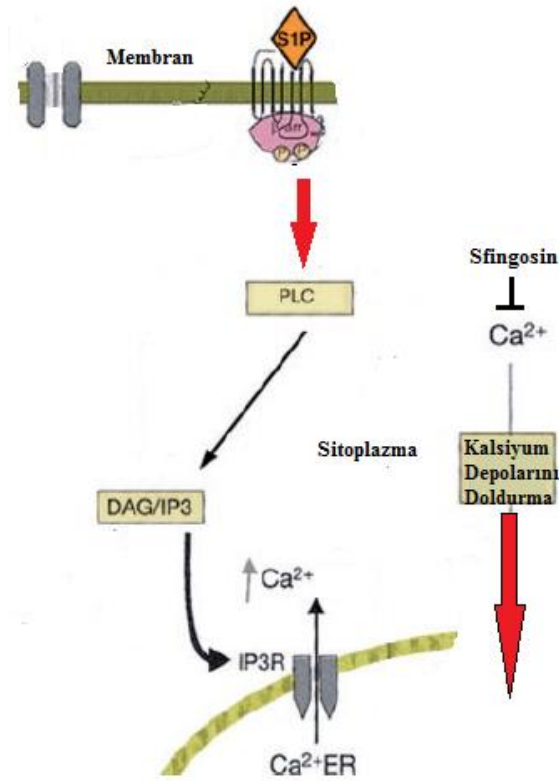
Sfingolipid ailesinden (D-eritro-sfingosin, sfingamin) gelen endojen aminler, sigma-1 reseptörüne mikromolar altı konsantrasyonlarda afinite ile bağlanır, ancak sigma-2 reseptör proteinine bağlanmazlar. Bu gibi bileşiklerin fosforile biçimi olan S1P'nin her iki sigma reseptörü (sigma-1 ve sigma-2) alt tipi için de önemsiz afiniteye sahip olduğu açıklanmıştır (Waarde vd., 2010, s. 3522).

Birçok agonist büyüme faktörleri, hormonlar, pro-inflamatuar sitokinler, lipopolisakkarid, IgE ve IgG reseptörlerinin aktivasyonu ve birçok G proteini aracılı reseptör ligandı da dahil olmak üzere SK₁'i aktive eder. SK₁, esas olarak sitozoliktir ve hücrenin sağkalımında aracılık eder. Oysa SK₂ büyümeyi inhibe edici özellikte olup, SK₂'nin apoptozu arttırdığı gösterilmiştir. Nükleer lokalizasyon sinyaliyle uyumlu olarak, çekirdekte SK₂, S1P üreterek gen transkripsiyonunu düzenler. Kanser hücre hatları, artmış SK₁ ekspresyonu gösterir ve sağkalım, büyüme için SK₁'e bağımlıdır. Örneğin, mide kanseri, akciğer, beyin, kolon, böbrek ve meme kanseri ve non-Hodgkin

lenfomalarda SK₁ mRNA transkript ve SK₁ proteininin gen ifadesi artış göstermiştir (Hait, 2009, s. 1254; Anelli vd., 2008, s. 3365; Pyne vd., 2012, s. 94).

S1P ile uyarılan Ca⁺² mobilizasyonu bilimsel çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, S1P'nin dolaylı olarak hücre içi Ca⁺² havuzuna etki ettiği ve bunun sonucunda IP₃ ve PLC'yi etkileyerek Ca⁺² mobilizasyonunun gözlemlendiği bildirilmiştir. Swiss albino 3T3 fibroblastlarında S1P'nin, sitozolik serbest kalsiyumu arttırdığı gösterilmiştir. Hücre içi serbest kalsiyumdaki bir miktar artışın, çeşitli büyüme faktörlerine yanıt olarak mitojenezin indüksiyonu için önemli olduğu gösterilmiştir. S1P'nin kalsiyum mobilize edici etkileri genellikle G-protein bağlı reseptörler (GPCR) ile aracılıdır ve S1P'nin S1PR₁₋₅ olarak bilinen beş hücre yüzeyi reseptörünün doğal ligandı olduğu bildirilmiştir (Mattie vd., 1994, s. 3181; Itagaki ve Hauser, 2003, s. 27540).

S1P'nin G protein aracılı reseptörlere bağlanmasını takiben PLC aktivasyonu ve IP₃/DAG oluşumu, sonrasında ER'deki IP₃ bağımlı kalsiyum reseptörlerinden salgılanan sitozolik kalsiyum seviyesinde artış gözlenir ve buna bağlı olarak S1P ye dönüşen sfingosinlerin sayısında azalma gözlenir. Kalsiyum depolarını tekrar dolduran sfingosininin azalmasına bağlı ortaya çıkan negatif feedback etkisi gözlenir ve kalsiyum homeostazı sağlanır (Şekil 2.11) (Spiegel ve Milstiens 2002, s. 25851; Liu, vd., 2000, s. 951).



Şekil 2.11. S1P aracılı kalsiyum düzenlenmesi (Spiegel ve Milstiens 2002, s. 25851).

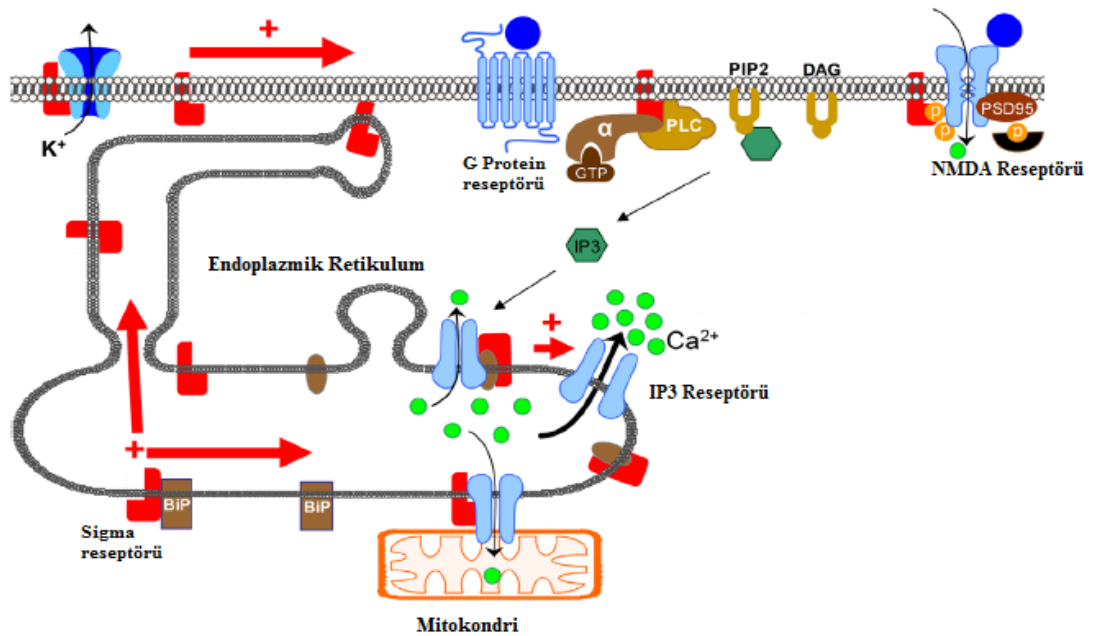
2.1.4. Sigma reseptörleri ve kanser

Sigma reseptörleri, ER'nin lipid zar tabakasına gömülü halde bulunan, mitokondri ilişkili ER membran domaini ile mitokondriyle etkileşime giren bir şaperon proteinidir. GRP78 / BiP (bir ER şaperonu) ile kompleks oluşturur. Sigma reseptörü ilk olarak bir opioid reseptörü olarak tanımlanmış ancak daha sonra çeşitli ilaçları bağlama yeteneği ile tanındığı için ayrı bir farmakolojik yapı olarak tanımlanmıştır. Sigma reseptörünün sigma-1 ve sigma-2 olarak adlandırılan iki alt tipi vardır ve üçüncü bir alt tipi olduğu da belirlenmiştir (Booth vd., 1999, s. 95; Ruscher ve Vieloch, 2015, s. 30).

Sigma-1 reseptörleri, 1996'da (kobay karaciğeri, insan plasental kanseri, sıçan beyni ve fare böbreği, gen isimleri: SIGMAR1 veya OPRS1) klonlanmıştır ve genin lokasyonu 9p13'te yer almaktadır. Buna karşı, sigma-2 reseptörü proteini için yüksek afiniteli ligand bulunmadığından, sigma-2 reseptör geni klonlanamamıştır. Sigma-1 reseptörlerinin moleküler ağırlığı 25 kDa, bununla birlikte, sigma-2 reseptörlerinin ise moleküler ağırlığı >21,5 kDa'dır. Endoplazmik retikulumda diğer bilinen memeli

proteinleri ile hiçbir benzerliği olmayan bir şekilde bağlanmış haldedir ve klasik bir reseptör ailesiyle herhangi bir benzerliği bulunmamaktadır. Sigma reseptörleri, hücre zarı, endoplazmik retikulum, mitokondriyel membran, nükleer zarf ve lizozomlarda yer alırlar (Zeng vd., 2007, s. 6708; Wheeler vd., 2000, s. 1223).

Sigma-1 reseptörlerinin transmembran proteinler olduğu ve translokasyon yapabildikleri gösterilmiştir. Endoplazmik retikulumun üzerindeki sfingosin açısından zengin lipidlerin içine lokalizedir. Sigma-1 reseptörlerinin ER'den plazma membranına translokasyonu olduğu bildirilmiştir (Mavlyutov ve Ruoho, 2007, s. 3).



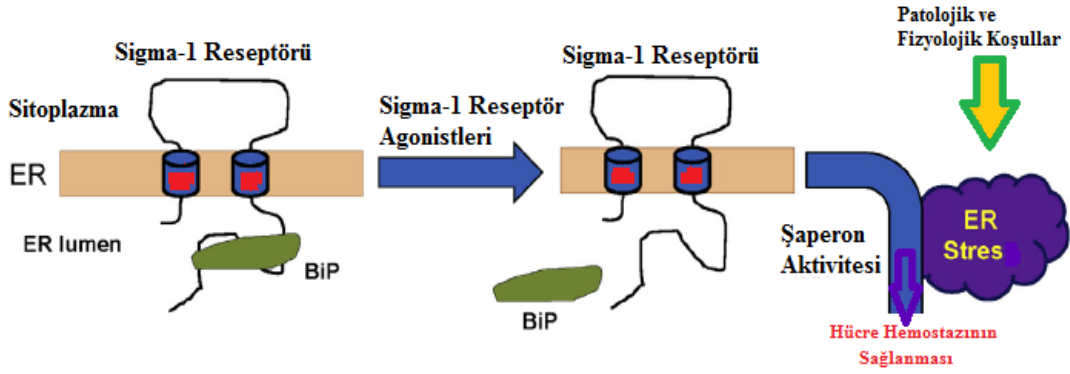
Şekil 2.12. Sigma reseptör aktivasyonu sonucu gerçekleşen sinyal iletim yolları (Zamanillo vd 2013, s. 78).

Sigma reseptörleri, meme, akciğer ve prostat kanseri hücrelerinde yüksek yoğunlukta bulunmuştur ve bu bulgular bu reseptörlerin tümör büyümesinden sorumlu olduğunu açıklamıştır. Ayrıca, sigma reseptör ekspresyon derecesi ile tümör agresifliği arasında bir bağlantı olduğu, yüksek metastatik potansiyeli olan kanser hücrelerinde sigma reseptörlerinin fazla olduğu bildirilmiştir. Merkezi sinir sisteminde nöronda hem de gliada eksprese olan sigma reseptörleri, özellikle sigma-1 reseptör alt tipi, kansere bağlı birçok biyolojik mekanizmayı modüle edebilen, hücre içi proteinlerin bir sınıfıdır (Rui vd., 2016, s. 649).

Sigma-1 reseptörünün en göze çarpan etkisi, Ca^{+2} , K^{+} , Na^{+} , Cl^{-} ve IP_3 reseptörleri de dahil olmak üzere, voltaj duyarlı ve ligand kapılı iyon kanallarının düzenlenmesinde rol oynamasıdır. Dahası, sigma-1 reseptörü, immünoglobülin proteini/78 kDa Glikoz-bağlı protein (BiP/GRP78) gibi ER’de bulunan şaperonlar ile etkileşime girerek, katlanmayan proteinlerin aşırı birikiminin neden olduğu ER-stresinin sensörü olarak görev yapmaktadır (Şekil 2.12) (Rossi vd., 2011, s. 6210).

Bir ER şaperonu olan BiP’in sigma-1 şaperon proteini ile birleşmesi, sigma-1 reseptörünün şaperon aktivitesini düzenlemektedir. BiP ile kompleks oluşturan sigma-1 reseptörü etkisiz durumundayken, BiP’den ayrılmış haldeki serbest sigma-1 reseptörü maksimum şaperon aktivitesi göstermektedir (Hayashi ve Su, 2007, s. 596). Ayrıca, hücre membranında bulunan voltaj kapılı kalsiyum iyon kanalları ile sigma reseptörleri arasındaki ilişkiler gösterilmiştir. Buna göre, sigma reseptörlerinin aktivasyonu ile yüksek voltaj kapılı kanalları bloke olmakta ve kalsiyum influksu baskılanmaktadır. Sigma reseptörlerini antagonize eden bir ligand kullanıldığında ise, voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının blokaj etkisi ortadan kalkar ve kalsiyum iyonlarının hücreye girişi potansiyelize edilmektedir (Şekil 2.13) (Mueller vd., 2013, s. 21).

Sigma reseptörleri ligandları ayrıca, ligand kapılı bir iyon kanalı olan NMDA reseptörlerini aktive ederek, kalsiyumun sitoplazmaya geçişini potansiyelize edebilirler.



Şekil 2.13. ER stresinde sigma-1 reseptör agonistlerinin olası bir mekanizması (Hashimoto, 2015, s. 6)

Şekil 2.13’de görüldüğü üzere oksidatif stres, inflamasyon, Ca^{+2} homeostazındaki bozukluklar, yanlış katlanmış proteinler, ve katlanmamış proteinlerin birikimi gibi fizyolojik ve patolojik koşullar ER stresine neden olurlar.

Sigma reseptörlerinin sinyal iletim mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Beyinde ve kalpte sigma-1 reseptörünün hücre içi kalsiyum modülatör proteini gibi işlevi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sigma-1 reseptör ligandlarının (haloperidol, progesteron), bilinmeyen mekanizmalar yoluyla MCF-7 hücreleri, melanoma, kolon kanseri ve glioma hücre hatları dahil olmak üzere neoplastik tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Wang vd., 2004, s. 205). İlaça bağlı olarak, hücre içi kalsiyum $[Ca^{+2}]$ artışı gözlenir ve apoptoz sonucu hücresel proliferasyon da azalır. Hücre bu etkilerin, kanser hücrelerinde sitotoksik etkiler yaptığı ve kaspaz bağımlı apoptotik etki yapabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca bu mekanizmalar, hücre döngüsünün bozulmasını (özellikle G1 fazında durdurmak), kalsiyum homeostazındaki değişiklikleri ve sfingolipid sinyal yolundaki etkileri de içerir (Crawford vd., 2002, s. 207; Azzariti vd., 2006, s. 1807). Bir başka çalışmada, kanser hücrelerinde, sigma-1 reseptör antagonistlerinin, ER stresi uyandırdığı gösterilmiştir. Hücrelerde, sigma antagonistleri, PLC aktivasyonuna aracılık eden sitosolik kalsiyumda hızlı bir artış sonucu IP_3 reseptör aracılı kalsiyum kanal aktivasyonuna neden olduğu açıklanmıştır (Spruce vd., 2004, s. 4882).

Sigma-1 reseptörleri, çeşitli tipte farmakolojik bileşiklere bağlanır. Sigma reseptörlerine olan ilk ilgi, antipsikotik ilaçların potansiyel rollerinden kaynaklanmaktadır. Bunun temel nedeninin, sigma-1 reseptörlerinin haloperidol gibi

tipik nöroleptiklerden çoğuna, kokain ve metamfetamin gibi psikotomimetik aktiviteye neden olduğu bilinen bileşimlere olan yüksek afinitelerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca sigma-1 reseptörleri, D-L-pentazosin, D-L-SKF-10,047 gibi benzomorfanları ve endojen nörosteroidleri ve sfingolipidleri kendine bağlarken, sigma-2 reseptörleri bu bileşikler için düşük afiniteye sahiptir (Bowen, 2000, s. 231).

Sigma-1 reseptörleri, sitoprotektif veya sitotoksik etkiler ortaya çıkarmaktadır. Sigma-1 reseptör agonistleri iskemi, şeker hastalığı, inflamasyon sonucu meydana gelen oksidatif stresin önlenmesinde ve hücrenin sağkalımında etkili olurken sigma-1 reseptör antagonistleri tümör hücrelerinin sağkalımını engelleyerek hücre ölümünü indüklemektedir. Sigma reseptörlerini etkileyen ilaçlar tarafından tetiklenen bazı morfolojik değişiklikler, hücre ölümünün nekrotik bir mekanizmasından ziyade apoptotik olduğuna işaret etmektedir. Sigma ligandlarının (pregnenolon, testosteron, D-eritro-sfingosin, sfingamin, 3H-pentazosin) güçlü antikanser özelliklerine sahip oldukları, kanserli olmayan dokular üzerinde sadece küçük etkiler yaptıkları gösterilmiştir. Fibroblastlar, epitel hücreleri ve hatta reseptör açısından zengin nöronlar gibi birkaç normal hücre tipi, sigma antagonistlerinin apoptotik etkilerine karşı dirençli olmasına rağmen, lens epiteli ve mikrovasküler endotel hücreleri gibi otokrin sağkalım yolunu kullanan hücreler, sigma antagonistlerine karşı tümör hücreleri kadar duyarlıdır. Uzun ikiye katlanma sürelerine (örneğin, 32 saat) sahip olan hücre hatlarının, sigma ligandları ile tedavide, daha kısa ikiye katlanan hücrelere (örneğin, 15 saat) göre daha dirençli oldukları gösterilmiştir (Narayanan vd., 2011, s. 79; Waarde vd., 2010, s. 3525).

2.1.4.1. Rimkazol

Rimkazol sigma reseptör antagonist fonksiyonu olan bir karbazol türevidir. Bileşik, gelişmiş bir yan etki profili ile yeni bir antipsikotik olarak 1980'li yıllarında keşfedildi. Bununla birlikte, daha sonraki klinik araştırmalar, şizofreni hastalarında rimkazolün etkinlikten yoksun olduğunu ortaya koydu. Bir sigma reseptör antagonisti olmasına ek olarak, rimkazol, dopamin, NMDA, serotonin ve opioid reseptörleri için zayıf da olsa bir bağlanma afinitesine sahiptir. Rimkazol, periferik organ deneylerinde hem agonist hem de antagonist olarak kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada, rimkazolün, antagonist etkilerinin düşük konsantrasyonda ($\leq 10 \mu\text{M}$) gözleendiği, buna karşın yüksek

konsanrasyonlarda ise daha çok agonist etkili olduğu gösterilmiştir (Happy vd., 2015, s. 683; Gilmore vd., 2004, s. 1).

Bir çalışmada, sigma-1 antagonisti olan rimkazol ile kombinasyon halinde kullanılan tümör baskılayıcı adenovirüs p53'ün meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği açıklanmıştır. Tümör baskılayıcı p53, normal hücrelere veya dokulara zarar vermeden farklı kanser hücrelerinde apoptozu indükleme yeteneğine sahiptir. Yapılan başka bir çalışmada ise rimkazolün A375M human melanoma hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur (Happy vd., 2015, s. 683; Rybczynska vd., 2013, s. 3).

Bazı çalışmalarda, minimal yan etkiler ile kanser hücrelerini öldürmek için sigma ligandlarının potansiyelleri vurgulanmıştır. Rimkazol ile yapılan bir başka çalışmada C6 sıçan glioma hücresi de dahil olmak üzere birçok hücre hattında, sigma-1 reseptör antagonisti veya sigma-2 reseptör agonisti yüksek konsantrasyonlarda (20-100 uM) uygulandıktan sonra hücre ölümlerinin olduğu gözlenmiştir. Hücre kültüründeki C6 glioma hücrelerine sigma antagonistlerinden rimkazol (IC₅₀, 86 µM), haloperidol (IC₅₀, 215 µM) veya AC915 (IC₅₀, 110 µM) uygulandığında, 24 saat sonra konsantrasyona bağımlı inhibisyonlar belirlenmiştir. Ancak, düşük konsantrasyonlarda, hücresel proliferasyonlarında önemli bir azalma meydana gelmemiştir (Rybczynska vd., 2008, s. 2049).

Hematolojik malign tümörlerin tedavisinde sigma reseptör antagonistinin etkisini araştırmak için rimkazol kullanılmıştır Malign hemopoetik hücre (HL60, K562 ve OPM) hatlarında, rimkazol, konsantrasyon bağımlı hücre ölümüne yol açmıştır. Rimkazolün indüklediği hücre ölümünün, apoptotik olduğu gösterilmiştir. Rimkazol aynı zamanda standart bir koloni formasyon deneyinde HL60 ve K562 hücre hatları ile koloni oluşumunu konsantrasyon bağımlı bir şekilde inhibe etmiştir (Upadhye vd., 2005, s. 2486).

2.1.4.2. S1RA (E-52862)

Yapısal formülü 4-[2-[[5-metil-1-(2-naftalenil)-1H-pirazol-3-il]oksi]etil] morfolin olan S1RA, oral yoldan kullanım için aktif bir bileşiktir. Şu anda nöropatik ağrı için faz II klinik araştırmalarına giren seçici bir sigma-1 reseptör antagonistidir ve potansiyel olarak birinci sınıf bir analjezik adaydır. Sigma-1 reseptör antagonisti

S1RA, sigma-1 reseptörlerine göre karşı yüksek afiniteye ve mükemmel sigma-1 reseptörü/sigma-2 reseptörü seçicilik oranına (>550) sahiptir. Diğer reseptörler, taşıyıcılar ve iyon kanalları için başka önemli bir etkileşme göstermez ve kan-beyin bariyerini geçerek merkezi sinir sisteminde etkili bir şekilde sigma-1 reseptörlerine bağlanır (Romero vd., 2012, s. 2289). Bütün bu özellikler, sigma-1 reseptörlerinin ağrı üzerinde oynadığı rolü araştırmak için S1RA'yı uygun bir farmakolojik ajan olarak göstermektedir. S1RA'nın birçok hayvan ağrı modellerinde etkili olduğunu göstermiştir (Vidal-Torres vd., 2014, s. 484).

Klinik öncesi çalışmalarında, S1RA'nın doza bağımlı olarak formaline bağlı nosisepsiyon, kapsaisin kaynaklı mekanik aşırı duyarlılık ve sinir hasarına bağlı mekanik ve termal aşırı duyarlılığı inhibe ettiği de gösterilmiştir. Klinik öncesi bulgular hem sefalik (trigeminal) hem de ekstra-sefalik nöropatik ağrının kronik tedavisi için sigma-1 reseptör antagonistlerinin (örnek; S1RA) potansiyel kullanımını desteklemektedir (Romero vd., 2012, s. 2289; Gris vd., 2016).

Farmakolojik etkilerinden, sigma reseptörlerinin bloke edebildiğinde antikanser etkili olabileceği muhtemel olup bu konuda daha önce S1RA'nın antikanser etkisi ile ilişkili bir çalışma yapılmamıştır (Happy vd., 2015, s. 683).

Bu tez çalışmasında, sigma reseptörleri antagonistleri (S1RA ve Rimkazol) kullanılarak U87MG kanser hücrelerinde antiproliferatif ve apoptotik etkiler araştırılmıştır. Kurulan hipoteze göre, şaperon aktiviteli olan sigma reseptörleri bloke olacağı için katlanmayan proteinlerin sayısı artacak ve UPR yanıtında aksamalar olacak, böylece stres yanıtı tam anlamıyla oluşturulamamış olacaktır. Yine sigma reseptörleri bloke olduğu için, IP₃ reseptörleri aracılı kalsiyum homeostazı bozularak hücre içi sitozolik kalsiyum artmış olacak ve mitokondriden sitokrom salgılanacaktır. Ortamda artmaya başlayan kalsiyum iyonları, antiapoptotik Bcl-2 ekspresyonunun sigma reseptör blokajına bağlı olarak azalmasından ve sfingosinin sitozolde artmasından daha da artacak ve hücre ölüm sürecine girmiş olacaktır. Kurulan bu hipotez, bu tez çalışmasında deneysel ve istatistiksel yöntemlerle araştırılmış ve bulgular tartışılarak sunulmuştur.

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, İlaçlar ve Malzemeler

U87MG hücre hattı (ATCC®, Amerika Birleşik Devletleri)

Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Penisilin/Streptomisin (Gibco, Amerika Birleşik Devletleri)

12 kanallı otomatik pipet (Axygen, İngiltere)

Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya)

Tripan mavisi (Roche, Almanya)

Fluo-3 Suitable For Fluorescence, %70 (Sigma-Aldrich, Almanya)

Pluronic F-127 (ThermoFisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)

Kryotüp (2 mL) (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)

Phosphate Buffer Saline (PBS) (Invitrogen, Almanya)

MTT (Sigma-Aldrich, Almanya)

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, Almanya)

xCELLigence E-plate 16 (Roche, Almanya)

0,2 mL'lik PZR tüpü (Greiner bio-one, Amerika)

LightCycler® 480 SYBR Green I Master, (Roche, İsviçre)

10, 100, 1000 ve 5000 µL'lik otomatik pipetör (Eppendorf, Kanada)

10, 200, 1000 µL'lik mikropipet ucu (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)

12 kanallı otomatik pipet (Axygen, İngiltere)

Kristal Viyole (Merck, Amerika Birleşik Devletleri)

BD Cytofix/Cytoperm™ (BD, Amerika Birleşik Devletleri)

15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya)

25 cm²-75 cm²'lik hücre kültür flaskı (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)

2 mL'lik Eppendorf tüp (Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri)

6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre)
Annexin V Fitc Apoptosis Detection Kit 100 test, cat no:556547 (BD Biosciences, Amerika Birleşik Devletleri)
Cedex Smart Slide (Roche, Almanya)
Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya)
Lamel (Isolab, Almanya)
L-glutamin (Sigma-Aldrich, Almanya)
S1RA-E52862 (Cayman Chemical, Item No: 16279, Amerika Birleşik Devletleri)
Rimkazol dihidroklorid (Tocris Bioscience, İngiltere)
Trypsin-EDTA 10X (Pan, Biotch, Almanya)

3.2 Kullanılan Cihazlar

Cedex (Innovatis, Amerika Birleşik Devletleri)
Derin dondurucu (Altus, Türkiye)
DNA-RNA çalışma kabini HEPA/UV PZR (UVP, Amerika Birleşik Devletleri)
Akım sitometri cihazı (BD. Acuri C6, Amerika Birleşik Devletleri)
Hassas terazi (Ohaus, Amerika Birleşik Devletleri)
Laminar Flow Kabin (Heal Force, Çin)
Light Cycler 480® (Roche, İsviçre)
MagNA Lyser (Roche, İsviçre)
MagNA Pure Compact (Roche, İsviçre)
Masaüstü soğutmalı santrifüj (Eppendorf, Almanya)
Mikro santrifüj (Hettich, Almanya)
HERAcell 150 Steril CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
NanoDrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)

PCR Thermal Cyclers (Gradient PCR) (Takara, Japonya)

Su banyosu (Nuve, Türkiye)

Vorteks (Daihan, Güney Kore)

Leica DM 300 Inverted mikroskop (Leica, Almanya)

Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek, Amerika Birleşik Devletleri)

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) (Roche, İsviçre)

4. YÖNTEMLER

4.1. Deneylerde Kullanılan U87MG Hücre Hattı ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan U87MG (glioblastoma; astrocytoma) hücre hattı, HTB-14™ kodu ile ATCC (American Type Cell Culture, Amerika Birleşik Devletleri) Hücre Bankasından temin edilmiştir. İnsan U87MG hücre hattı, astrositoma hücre kaynaklı, epitel kökenli bir glioblastomadır. 4. evre özelliğinde olup malign karakterdedir. U87MG hücreleri, % 10 fetal sığır serumu, % 1 penisilin-streptomisin, % 1 L-glutamin, Eagle's Minimum Essential Medium içeren özel besiyerinde % 5 CO₂'li etüvde 37°C'de kültür ortamında çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı, proje çalışmasının sonraki deneylerinde kullanılmak üzere stoklanmıştır (Dikmen, 2017, s. 156).

4.2. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

4.2.1. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmalarda kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı şekilde sterilizatörde kuru ısı ile 180°C'de 2 saat, sıvı solüsyonlar ise otoklavda 121°C, 1,5 atm/Hg'de 20 dakika steril edilmiştir.

4.2.2. S1RA ve rimkazolün konsantrasyonlarının hazırlanması

Toz halindeki moleküler ağırlıkları bilinen S1RA ve rimkazolün belirli hacimlerde dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek 100 mM konsantrasyonda ana stokları hazırlanmıştır ve -20° C'de saklanmıştır. Çalışma sırasında uygun oranlarda dilüe edilerek, en yüksek ilaç konsantrasyonu DMSO oranı % 0,1 olacak şekilde farklı çalışma konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hücrelere medyum içinde % 0,1 oranında DMSO (çözücü) kontrol uygulanmıştır.

4.2.3. Stoktan hücre çıkarma

U87MG hücreleri stoktan çıkartılıp, Minimum Essential Medium Eagle (EMEM) (% 10 Fetal Sığır Serum, % 1 Penisilin-Streptomisin, % 1 L-glutamin) besiyerinde süspanse edildikten sonra, sanrifüj edilmiştir. Uzaklaştırılan süpernatanttan

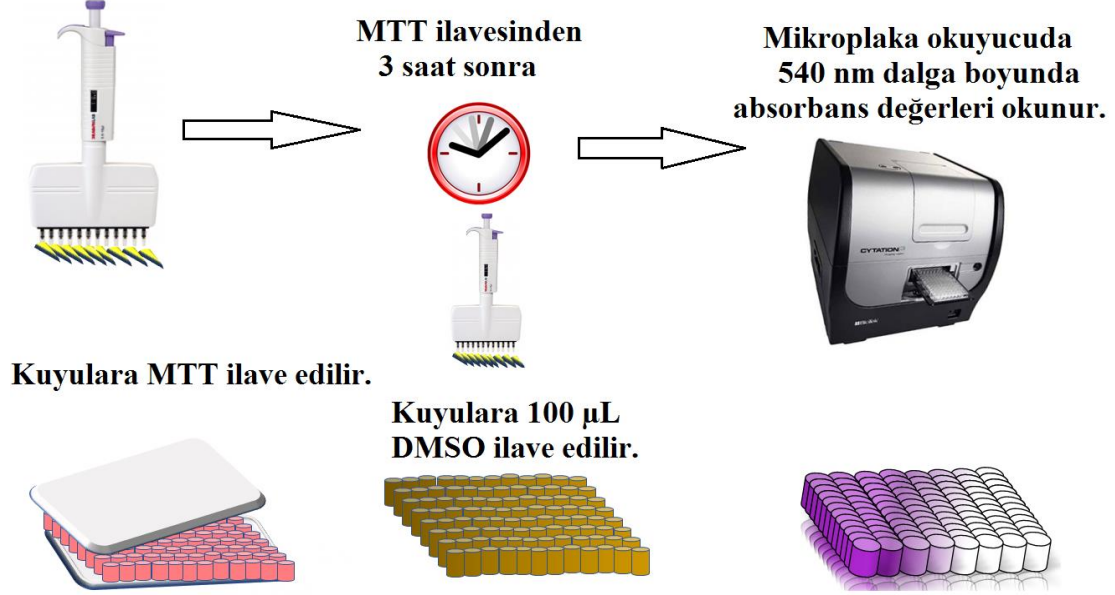
sonra besiyeri ile tekrar resüspande edilen hücreler flasklarda, % 5 CO₂ ve % 95 bağıl nemli inkübatörde 37 °C de kültüre edilmiştir.

4.2.4. Hücre sayımları

Deneylerde kullanılacak olan U87MG hücreleri, tripsin-EDTA yardımıyla kaldırıldı (Tokiwa vd., 1979, s. 1). 5 mL besiyerinde süspande edildikten sonra da 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında ise, uzaklaştırılan süpernatantın ardından 1 mL besiyeri eklenmiş tripan mavisi yardımıyla Cedex Smart slaytlara aktarılarak Cedex XS (Innovatis) cihazı ile 1 mL'deki hücre sayısı hesaplanmıştır.

4.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür) yöntemi, mitokondriyel aktiviteyi belirleyen MTT'nin canlı hücreler tarafından formazan kristallerine dönüştürülmesine dayanır. Çoğu hücre popülasyonu için total mitokondriyel etkinlik, canlı hücrelerin sayısı ile ilişkili olduğundan, bu yöntem ilaçların hücre hatları veya primer hücreler üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkilerini ölçmek için yaygın olarak kullanılır (Van Meerloo vd, 2011, s. 237). Canlı hücreler mitokondriyel dehidrogenaz enzim aktivitesine sahiptir. Sarı renkli ve suda çözünmeyen tetrazolyum tuzu (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür, MTT), hücrelere aktif olarak absorbe olur ve süksinat dehidrogenaz enzimi aracılığıyla tetrazolium halkası parçalanır, sarı renkli MTT boyası suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan tuzuna indirgenir (Şekil 4.1) (Stockert vd., 2012, s. 785).



Şekil 4.1. MTT yönteminin şematik bir akış planı

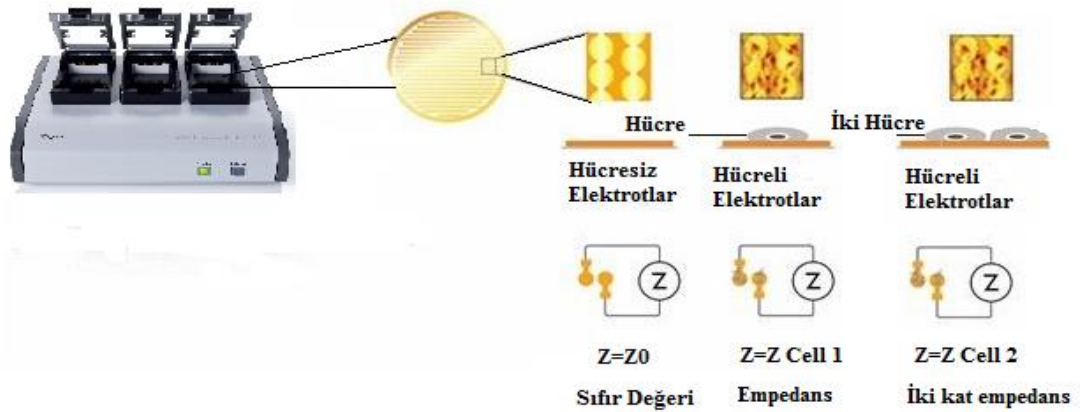
4.3.1. Yöntemin uygulanması

U87MG hücreleri büyüme besiyeri ortamında 37° C' de % 5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğalıp çoğalmadığının ve hücre canlılığının değerlendirilmesinde, sayım yapılarak 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 5x10³ hücre olacak şekilde besiyeri ortamına ekilmiş ve hücreler plakaya yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. DMSO'da çözülerek hazırlanmış olan S1RA ve rimkazolün 100 mM stok solüsyonlarından; S1RA için 400, 300, 200, 100, 50 µM ve rimkazol için 100, 50, 25, 12,5, 6,25 µM olacak şekilde dilüsyonlar yapılmıştır. 24 saat sonra hücrelere konsantrasyonlar uygulanmıştır ve hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çözücü kontrol olarak besiyeri içinde % 0,1'lük DMSO kullanılmıştır.

İnkübasyon sonunda plakanın içindeki besiyeri atılmış ve kuyucuktaki hücrelere 10 µL/100 µL oranında MTT solüsyonu ilave edilerek, hücreler 3 saat inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda MTT içeren besiyerleri atılarak, her kuyucuğa 100 µL DMSO konulmuştur. Plakalar, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader'da 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri alınarak, her bir konsantrasyon için 8 tekrar (8 kuyucuk) olacak şekilde okunmuştur. Kontrol kuyularının absorbans değerleri ortalaması % 100 kabul edilerek ilaç konsantrasyonlarının % hücre canlılık değerlerindeki değişim hesaplanmıştır.

4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA-DP) Antiproliferatif Etkinin Belirlenmesi

RTCA-DP cihazı teknolojisi, hücrelerin e-plaka altındaki altın plakalarda bulunan elektrotlardaki adhezyon miktarlarını ölçen, gerçek zamanlı hücresel bir biyosensördür (Kho vd., 2015, s. 199). RTCA ile hücre çoğalması, sitotoksosite, migrasyon, invazyon ve ko-kültür çalışmaları yapılabilir. Bu cihaz, plakalardaki altın kaplamalı sensör elektrotlarından gelen elektronik empedans okumasına dayanarak işlev görür (Dikmen vd., 2017, s. 4726). Elektronik okumalar, hücreler plaka yüzeyine tutunurken, birbirinden ayrılırken meydana gelen empedans değişikliği matematiksel algoritmalar yoluyla hesaplanarak hücre indeks verileri elde edilir. Zemine tutunan hücrelerin sayısı ile cihazda veri alınması arasında doğrudan bir ilişki vardır. Bu ilişki, hücre etkileşimlerinin kalitesinden ve her bir hücre ile elektrotlar arasındaki yapışma özelliklerinden etkilenebilir (Şekil 4.2) (Moniri vd., 2015, s. 379; Marlina vd., 2015, s. 5).



Şekil 4.2. RTCA DP cihazı, elektrotların yerleştiği 3 plaka yuvası ve elektrotların tabanlarına yapışan hücre sayısına göre değişen empedans değeri arasındaki ilişki (<http-9>.)

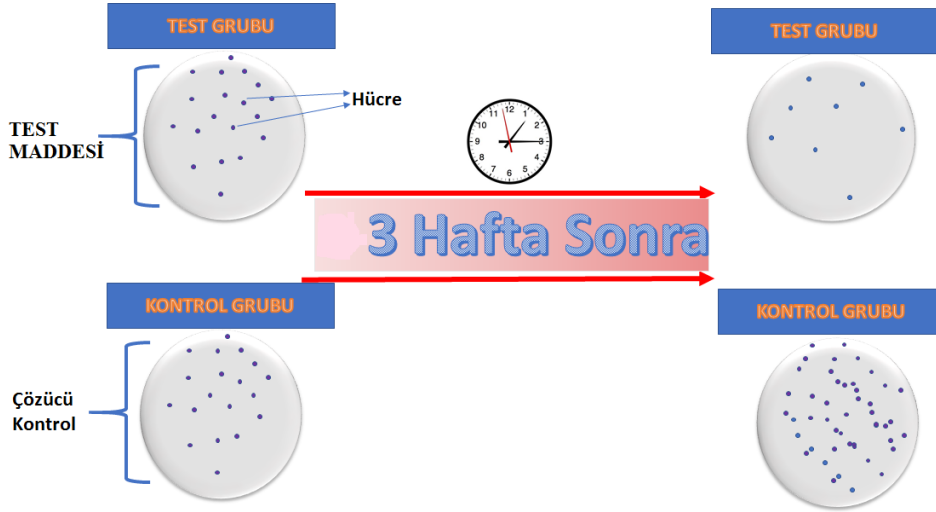
4.4.1. Yöntemin uygulanması

Çalışmada kullanılacak e-plakalara, % 1 FBS ve % 1 penisilin/streptomisin içeren 100 μ L EMEM besiyeri eklenmiş ve cihazda 1 dakikalık ilk okuma alındıktan sonra, hücre ekim işlemine geçilmiştir. Öncesinde hücre sayısı ve canlılığının belirlenebilmesi için U87MG hücreleri Cedex XS cihazında sayılmıştır. Her bir kuyuya

100 µL besiyeri içerisinde 1×10^4 hücre olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Sonrasında plaklar cihaza yerleştirilmiş ve cihaz çalıştırılmıştır. 24 saat sonra hücreler belirli bir hücre indeksine ulaştıktan sonra, cihaz durdurulmuş, MTT sonuçlarına göre belirlediğimiz S1RA ve rimkazolün belirli konsantrasyonları (S1RA için; 400, 300, 200 µM ve rimkazol için; 50, 25, 12,5 µM) glioblastoma hücreleri üzerine uygulanmıştır (n=6). Sonrasında plakalar tekrar cihaza yerleştirilmiş ve program kaldığı yerden devam ettirilmiştir. Proliferasyon eğrisi sonraki birkaç gün izlenmiştir. Sonra da bu logaritmik eğrilerdeki bulunan noktaların regresyon analizleriyle her iki ilacın da IC₅₀ ve IC₂₅ değerleri cihazın analiz programı kullanılarak hesaplanmıştır.

4.5. Koloni Formasyon Deneyi

Klonojenik (veya koloni formasyon) analiz 50 yıldan fazla süredir kullanılmaktadır. Tekniği tanımlayan orjinal makale 1956'da yayınlanmıştır (Nicolaas vd., 2006). Koloni formasyon deneyi çoğunlukla, sitotoksik ajanların ve diğer antikanser terapötiklerin etkilerinin farklı hücre hatları üzerindeki koloni oluşturabilme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Adhere olabilen hücre hatlarıyla çalışılan klonojenik bu modelde, üç farklı aşama vardır. Sırasıyla, hücre süspansiyonunun hazırlanması ve plakalara düşük yoğunlukta ekimleri, hücrelerin sitotoksik ajanlarla belirli bir süre muamele edilmesi ve sonra da belirli bir süre (3 hafta) inkübe edilen hücrelerin görüntüleme işlemi için fiksasyon işleminin ardından tercihen boyama yardımıyla hücrelerin görüntülenmesi aşamalarıdır (Şekil 4.3) (Rafehi vd., 2011).



Şekil 4.3. Koloni formasyon deneyinin akışının şematik olarak gösterimi

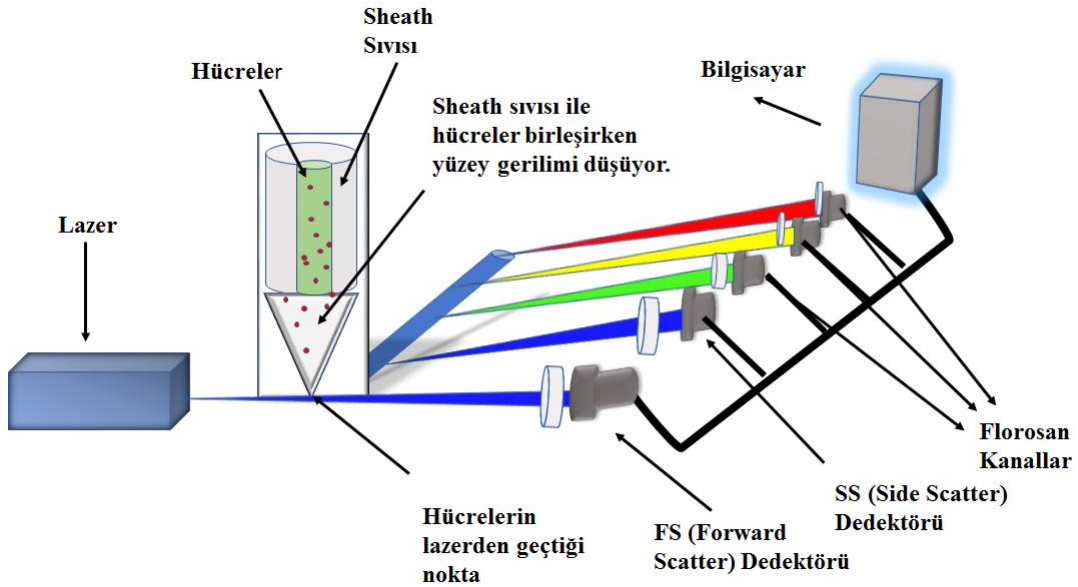
4.5.1. Yöntemin uygulanması

Çalışmada U87MG hücreleri, EMEM besiyerinde çoğaltılıp, Cedex cihazında sayıldıktan sonra, 96'lı plakalara her plakada 250 hücre/100µL olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin yapışması için 24 saat beklenildikten sonra, S1RA ve rimkazolün azalan konsantrasyonları (S1RA için; 400, 300, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 µM ve rimkazol için 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 µM) şeklinde hazırlanmıştır. Konsantrasyonlar MTT yöntemine göre hazırlanmıştır. Besiyeri, hücreleri kaldırmadan dikkatlice çekildikten sonra, taze besiyeri ile hazırlanan konsantrasyonlar plakadaki kuyucuklara eklenmiştir. İnkübatör % 5 CO₂ içermekte olup, bağıl nem % 95 oranında tutulmuştur. Çünkü inkübasyona 3 hafta süreyle bırakılan hücrelerin besiyerlerinin buharlaşmaması oldukça önemlidir. İnkübasyon süresinin ardından, oluşan kolonileri görüntülemek için invert bir ışık mikroskop kullanılmıştır. 2x ve 4x mikroskop büyütmesi ile görüntüleme işlemi yapılmıştır. Fotoğraflanan hücre kolonileri için tercihen boyama işlemi de uygulanabilir. Bunun için 25 µL kristal viyole (592-638 nm) içine % 50 metanol ve % 50 distile su olacak şekilde bir karışım hazırlanmış, 15 dakika boya karışımında tutulan hücreler, su ile yavaşça yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır (Munshi vd., 2005, s. 21; Franken vd., 2016, s. 2315).

4.6. Akım Sitometri ile Yapılan Deneyler

Akım sitometrisi, bir ışık kaynağının önünde hücreleri (veya başka parçacıkları) tek tek akarken hücrelerden gelen, sinyalleri saptayan ve bunları birbiriyle ilişkilendiren bir araçtır. Saçılım dedektörlerinden ön ve yan saçılım kanalları (FSC ve SSC), sırasıyla hücrelerin büyüklükleri ve granüle olabilme yetenekleri açısından dağılımlarını ayarlar ve analiz ederler (Gupta vd., 2011, s. 179). Hücrelere veya parçacıklara, dalga boylarına göre emisyonlarını göstermelerine yardımcı olan diğer sarı, kırmızı ve yeşil dalga boylarındaki ışınmaları kaydeden 3 adet floresans kanal vardır. Sonuçta, akım sitometrisi hücrelerin kendilerine has olan pek çok karakteristik özelliğinden elde edilen verileri ve floresans özellikteki kanalları kullanarak, analiz eder (Şekil 4.4) (Wilkerson, 2012, s. 53).

Hücreler, akım sitometri analizi için hücre süspansiyonları olarak hazırlanır. Bu durum, lazer ışınının önünden geçen hücrelerin tek tek analiz edilmesini sağlar. Hücrelerin tek tek, doğru ve kesintisiz olarak akışını sağlamak için yüzey gerilimini düşürücü özellikte olan sheath sıvısı ile hücreler tankta muamele edildikten sonra ışığın önünden geçerler (Jaroszeski ve Radcliff, 1999, s. 37).



Şekil 4.4. Akım sitometri cihazının çalışma prensibinin şematik görünümü

4.6.1. Annexin-V/PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Yöntemin temelinde sağlıklı hücre zarlarının iç kısmında bulunan fosfatidilserinin apoptotik hücrelerde hücre zarının parçalanması ile birlikte hücrenin dış kısmına çıkması ve bir işaretleyici ile floresans boya yardımıyla görüntülenmesi vardır. Hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin bulunmaktadır. Apoptoz başladığında, normalde iç yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar (Cummings vd., 2012). Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. 36-kDa'luk kalsiyum bağlama proteini olan Anneksin V, hücrenin dış yüzüne yerleşerek fosfatidilserine bağlanabilir ve floresans bir madde (örneğin, FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilmektedir (Crowley vd., 2016).

Propidyum iyodid (PI) ise, DNA'ya bağlandığından, membranı tamamen bozulmuş apoptotik ve nekrotik hücrelerin tespitinde kullanılmaktadır (Rieger vd., 2011, s. 2597). FITC ve Annexin-V'in hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı, akım sitometri ile ölçülebilmektedir. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve nekrotik çekirdek boya olan propidyum iyodid (PI) (red fluorescence) ile aynı zamanda boyanan hücreler, sırasıyla; canlı hücreler (Annexin-V-/PI-), erken apoptotik hücreler (AnnexinV+/PI), geç apoptotik hücreler (Annexin-V+/PI+) ve nekrotik hücreler (Annexin-V- /PI +) şeklinde birbirinden ayrılır (Dikmen vd., 2011, s. 749).

4.6.1.1. Yöntemin uygulanması

Çalışmada, Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit (Katolog no: 556547, BD) protokolü uygulanmıştır. U87MG hücreleri % 10'luk FBS ve % 1 Penisilin-Streptomisin ve L-glutaimn içeren EMEM besiyeri ortamında, 37°C' de % 5 CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğalması beklendikten sonra hücre sayımı yapılmıştır. 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 15x10⁴ hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, önceden belirlemiş olduğumuz rimkazol ve S1RA IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonları hücreler üzerine uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücrelere de % 0,1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. İlaç uygulamasını takiben plakalar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 6'lık

kuyucuktaki hücreler kaldırılarak 1200 rpm’de 5 dakika sentrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre kaybı olmamasına özen gösterilmiştir. 100 µL soğuk PBS ile süspanse edilen hücreler, 5 µL Annexin-V ve 5 µL PI boyası içeren viallere aktarılmıştır. 15 dakika sonra ise 400 µL bağlama tamponu ile ilave edilmiştir. Daha sonra akım sitometri cihazında apoptotik etkileri değerlendirmek üzere analiz yapılmıştır.

4.6.2. Kaspaz-3 aktivasyon yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Kaspazlar, hücre ölüm mediatörleri içerisinde yer alan apoptozdan sorumlu proteinlerdir. Kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ile etkileşim halindedir. Kaspaz-3, bir ölüm proteaz enzimidir ve pek çok proteinin spesifik yıkılımından sorumludur. Kaspazların apoptozdaki rolleri tüm ayrıntılarıyla hala aydınlatılamamıştır. Kaspaz-3 aktivasyonunun neden olan yollar, kaspaz-9 fonksiyonundan ve mitokondriyel sitokrom c salınımından bağımlı ya da bağımsız olmaları açısından ikiye ayrılabilir (Porter ve Jaenick 1999, s. 99) (Engür ve Dikmen, 2017, s. 391).

Kaspaz-3 aktivasyonu apoptoz yollarının en önemlilerinden biridir ve bütün hücre tiplerinde apoptotik kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonuna neden olur. Hücrelerdeki kaspaz-3 aktivitesi immünohistokimya, akım sitometri ve Western-blot yöntemleri ile belirlenebilmektedir. Bu çalışmada kaspaz-3 aktivitesi akım sitometri yöntemi ile değerlendirilmiştir (Slee vd., 2001, s. 7320).

4.6.2.1. Yöntemin uygulanması

Analiz için “BD Pharmingen™ PE Active Caspase-3 Apoptosis kiti (550914)” kullanılmıştır. U87MG glioblastoma hücreleri 6’lı plakalara her kuyuda 15×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat inkübasyon süresinin ardından, hücrelere SIRA ve rimkazolün IC_{50} ve IC_{25} konsantrasyonları uygulanmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda, kaspaz-3 aktivasyon yöntemi kit prosedürüne göre; hücreler soğuk PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Ardından 20-25 dakika soğuk buz banyosunda donmasına izin vermeyecek biçimde, kaspaz-3 antikorunun hücrelere girebilmesi için, hücreler BD™ Cytoperm/Cytofix solüsyonu ile permeabilize edildikten sonra, hücreler BD™ Perm Wash yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkanmıştır. Sonrasında, $20 \mu L/10^6$ hücre olacak

şekilde kaspaz-3 antikoru içeren 100 µL perm wash solüsyonu içersinde hücreler 30 dakika oda sıcaklığında yıkanmış ve bekletilmiştir. Sonrasında hücreler yine perm wash ile 2 kez yıkanmış ve akım sitometri cihazında kaspaz-3 aktivasyonu ölçümleri yapılmıştır.

4.6.3. Fluo-3 yöntemi ile hücre içi kalsiyum analizi

Kalsiyum sinyal iletimi, kompleks bir süreç olup hücre sağkalımı ve hücre ölümü ile ilişkilidir. Endoplazmik retikulum hücre içi kalsiyumun ana deposudur. Kalsiyumun sitoplazmaya salınımı ER membranında lokalize olan IP₃ reseptörleri tarafından kontrol edilir. Ca⁺² sinyal iletiminin, hücre ölümünün başlatılması ve gerçekleşmesinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca, erken dönem nekrozda ve apoptotik süreçlere neden olan temel mekanizmalarda, hücre içi bozulan kalsiyum homeostazının önemli etkisi vardır (Orrenius vd., 2003, s. 552).

Apoptotik süreç dahilinde bazı mediyatörler (IP₃, PLC, sitokrom c) aracılığı ile gerçekleşen ER-Mitokondri-Sitoplazma arası kalsiyum kaskatının başlatıcı etkilerden biri olan hücre içi sitozolik kalsiyum miktarının artmasında, sigma-1 reseptör antagonistleri ve sigma-2 reseptör agonistleriyle ilişkili çalışmalar yapılmıştır (Spruce vd., 2004, s. 4875; Hanson vd., 2004, s. 933). Bu çalışmada ise, sigma-1 reseptör antagonistlerinden S1RA ve rimkazolün U87MG hücre hattında, apoptotik süreçleri tetiklemede etkenlerden biri olan hücre içi sitozolik kalsiyum miktarına etkileri araştırılmıştır (Merritt vd., 1990, s. 513).

Fluo-3 ve Fluo-3/AM, hücre içi kalsiyumun (Ca⁺²) floresans bir indikatörü olarak kullanılır. Fluo-3 (506-526 nm), görünür ışık uyarımını (488 nm'de çalışan argon lazer kaynakları ile uyumlu) kullanarak konfokal lazer tarama mikroskopisi ve akım sitometri için kullanılabilir. Fluo-3 ve Fluo-3 AM'nin hücrelere uygulanma prosedürleri farklılık göstermektedir. Ayrıca pH ve sıcaklık da bu süreci etkilemektedir (Tretyn vd., 1997, s. 41). Bu çalışmada, hücrede serbest kalsiyumlara bağlanabilen ve kalsiyuma bağlandığında parlaklığı yaklaşık 40 kat artan bir floresans boya olan Fluo-3'ün % 70 saflıktaki tuz formu kullanılmıştır. Bu çalışmada, U87MG hücrelerindeki sitoplazmik kalsiyumun S1RA ve rimkazolün farklı konsantrasyonlarına bağlı kalsiyum değişimleri akım sitometri cihazında belirlenmiştir.

4.6.3.1. Yöntemin uygulanması

U87MG hücreleri 6'lı plakaya ikiye katlanma sayıları göz önüne alınarak, her kuyuda 15×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat inkübasyon sonunda, hücrelere S1RA ve rimkazolün IC_{50} ve IC_{25} konsantrasyonları uygulanmıştır. 24 saat sonra hücre içi salınan Fluo-3 miktarlarını ölçmek üzere, hücreler kaldırılarak santrifüj edilmiş ve ardından hücreler 1 mL soğuk PBS ile yıkanmıştır. Ardından Fluo-3'ün hücrelere kolay difüze olması için 500 μ L/mL BD Cytoperm/Cytofix® ile 25 dakika 0-4 °C'de inkübe edilerek geçirgenliği arttırılmıştır. Sonra 500 μ L/ml PermWash® ile yıkama yapılmıştır. Yıkama ardından hücrelere Fluo-3 ve Pluronic F-127 (Fluo-3'ün sitozolde kalıcılığını arttıran ajan), PBS içerisinde sırasıyla 3 μ M/mL ve % 0,001 konsantrasyonda olacak şekilde uygulanmıştır. Boyanın hücrelere difüze olması için hücreler 45 dakika 0-8°C'de inkübe edilmiştir. Ardından PBS ile yıkanan hücreler, zaman kaybetmeden 500 μ L PBS içerisinde süspande edilip, buz banyosu içerisinde taşınarak akım sitometri cihazında zamana karşı okunmuştur. Ardından, Fluo-3'ün hücre içindeki sitozolik kalsiyumlarla verdiği yeşil floresans ışımlar Citation 3 Imaging Reader cihazında görüntülenmiş ve GFP (Green Florescent Protein, 500-525 nm) kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir.

4.7. Real-Time PCR Yöntemi ile Sfingosin Kinaz-1 ve Sfingosin Kinaz-2 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilen bir yöntem olan Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı PZR; Polimeraz Zincir Reaksiyonu) herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılması için kullanılan bir yöntemdir (Bustin, 2000, s. 169). PZR, DNA polimerazın, kalıp DNA iplikçisini tamamlayıcı yeni DNA iplikçikleri sentezleme kabiliyetini kullanma temeline dayanır. DNA polimeraz, mevcut bir 3'-OH grubuna bir nükleotid ekleyebildiğinden, ilk nükleotidi ekleyebileceği bir primere (Forward) ihtiyaç duyar. Sekansı tamamlayabilmek için de ikinci bir primere (5' P primeri, Reverse) ihtiyaç duyar. PZR reaksiyonunun sonunda, spesifik sekans milyarlarca kopya halinde sentezlenmiş olur (National Laboratory of Enteric Pathogens, 1991, s. 89).

Gerçek zamanlı PZR tekniği, floresans boyalar kullanılarak gerçek zamanlı olarak DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi tekniğidir. Floresans sinyali

PZR ürün miktarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır. Gerçek Zamanlı PZR'ın avantajları, miktar ölçme kolaylığı, daha yüksek hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve kesinlik, hızlı analiz, sürecin kalitesinde daha iyi kontrol ve daha düşük kontaminasyon riski içermesidir (Valones vd., 2009, s. 1).

Gerçek Zamanlı PZR, floresansı yakalamak için bir optik sistemli bir termal döngüleyici ve verileri yakalayabilen, reaksiyonun analizini yapabilen yazılım destekli bir bilgisayar gerektirir. Floresans değerleri, her döngü sırasında kaydedilir ve amplifiye edilmiş ürünün (DNA sekansı vb.) miktarını temsil eder. Kullanılan floresans kompozitler SYBR® Green ve TaqMan®'dır (Kubista vd., 2006, s. 95). SYBR Green, gerçek zamanlı PZR'de en çok kullanılan çift zincirli DNA'ya bağlanan özel bir boyadır. Floresansı, çift zincirli DNA'ya bağlı olmadığında saptanamaz. DNA'ya bağlanma afinitesi, geleneksel PZR'de en sık kullanılan etidyum bromide göre 100 kat daha fazladır (Velones vd., 2009).

Gerçek zamanlı PZR için geliştirilen ilk floresans prob, TaqMan adı ile bilinen bir 5' nükleazdır. TaqMan probu, bir 5' terminal floroforu ile 3' terminal bağlayıcı (quencher) içeren kısa bir oligonükleotiddir. İşlem görmemiş proplar, floresans özellik göstermezler çünkü bağlıdırlar. Bir floresans sinyali üretmek için iki olay meydana gelmelidir. İlk olarak, prob 60°C'de tamamlayıcı (komplementer) bir DNA zincirine bağlanmalıdır. İkincisi, bu sıcaklıkta, PZR için kullanılan aynı enzim olan Taq polimeraz, floresans boyayı bağlayıcı boyasından ayırarak, 5' terminal TaqMan probunu (5' nükleaz aktivitesi) parçalamalıdır. Bağlayıcı prob, florofor probdan salınır, böylece floresans uyarılmadan sonra, prob floresans ışımaya gösterir (Heid vd., 1996, s. 986).

Kantitatif ölçümle miktarı belirlenmek istenen numuneler, içerdiği cDNA miktarı bilinen standartlarla PZR sonunda karşılaştırılmaktadır. Bu standartlar kullanılarak, her dokuda aynı düzeyde eksprese olduğu bilinen genlerle (housekeeping genler) cDNA'nın amplifikasyonu gerçekleştirilir. Housekeeping genler; organizmanın her hücresi için her zaman sabit düzeylerde eksprese olan genlerdir. Bu standart örneklerin eşik değerine girdikleri döngü PZR cihazı tarafından saptanmaktadır ve miktarı belirlenmek istenen esas örneklerle karşılaştırılmaktadır. Araştırmak istenen DNA sekanslarındaki genlerin housekeeping genlere göre normalizesi alınarak yapılır (Janssens vd., 2004, s. 107).

4.7.1. Yöntemin uygulanması

Bu yöntemde RNA'dan cDNA sentezi ve kalıp cDNA'dan da SK₁ ve SK₂ enzim genlerinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH (gliseraldehid-3-fosfat-dehidrogenaz) kullanılmıştır.

4.7.1.1. Total RNA izolasyonu

Annexin-V/PI bulgularına paralel olarak, S1RA ve rimkazolün U87MG hücrelerindeki SK₁ ve SK₂ mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimleri belirlemek amacıyla, izolasyon robotu (MagNA Pure Compact) kullanılarak hücrelerden RNA izole edilmiştir. Bunun için S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen hücreler, RNA izolasyon kit prosedürüne (Roche® Ürün No: 04802993001) uygun olarak yapılmıştır. Elde edilen RNA verimi 260 nm ve 280 nm optik dansitede, nanodrop (ThermoFisher) cihazında spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Ardından, her bir numunede gerekli cDNA eldesi için RNA, 100 ng/örnek olacak şekilde ayarlanmıştır.

4.7.1.2. cDNA sentezi

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (katolog no:05091284001, Roche) prosedürü uygulanmıştır. İzole edilen RNA örnekleri 1,1 µL hacimde nanodrop cihazında ölçülmüştür. ng/µL cinsinden hesaplanan RNA verimine göre, PZR tüplerine örnek başına 100 ng olacak şekilde total RNA, 1µL Oligo DT 18 primeri (2,5 µM) koyularak toplam hacim distile su ile 11,4 µL'ye tamamlanmıştır. RNA'lar PZR ısı döngüleyicisinde 10 dakika 65°C'de denatüre edilmiştir. İşlemin bitmesine yakın, her tüpe 4 µL Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer (1x ve 8 mM MgCl₂ içerir), 0,5 µL koruyucu RNase inhibitörü (20 U), 2 µL dNTP (Deoksiniükleotid) karışımı, 1 µL DTT (Ditiyotretiol) (5mM) ve 1.1 µL Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (10 U) içeren karışımdan 8,6 µL ilave edilmiş ve toplam hacim 20 µL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüpler PZR Thermal Cycler'da 55°C'de 30 dk, 85°C'de 5dk inkübe edilmiştir ve 4°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Elde edilen cDNA'lar daha sonra Light Cycler® 480 PZR cihazında amplifikasyon için kullanılmıştır

3.7.1.3. mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

RT-PCR yöntemi kullanılarak U87MG hücre hattı üzerinde S1RA ve rimkazol konsantrasyonlarının, SK₁ ve SK₂ mRNA ekspresyon düzeylerine olan etkileri araştırılmıştır.

Elde edilen cDNA'lar, Light Cycler 480 RT-PZR cihazında, SK₁ ve SK₂ genine spesifik primerler (SK₁ geni için; forward primer, 5-CTGGCAGCTTCCTTGAACCAT-3 reverse primer, 5-TGTGCAGAGACAGCAGGTTCA-3 ve SK₂ geni için; forward primer, 5-CCAGTGTTGGAGAGCTGAAGGT-3 reverse primer, 5-GTCCATTCATCTGCTGGTCCTC-3), PZR kiti kullanılarak kit protokolüne göre, cihazda optimize edilerek çoğaltılmıştır. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

Light Cycler® 480 uyumlu 96'lık kuyulu plakalara sırasıyla; örnek başına, 10 µL Cyber Green, primer reverse 0,5 µL, primer forward 0,5 µL, cDNA 5µL, H₂O 4 µL olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Bu işlem gen sayısı kadar tekrar edilir. SK₁ ve SK₂ genlerine ek olarak housekeeping genle toplam 3 gen çalışılacağından her gen için örnekler ayrı ayrı hazırlanmıştır. Plakalara örnekler yüklendikten sonra, 96'lık plaka Light Cycler® 480 RT-PZR cihazına yerleştirilip, uygun amplifikasyon koşullarında örneklerin kantitatif ölçüm miktarları belirlenmiştir.

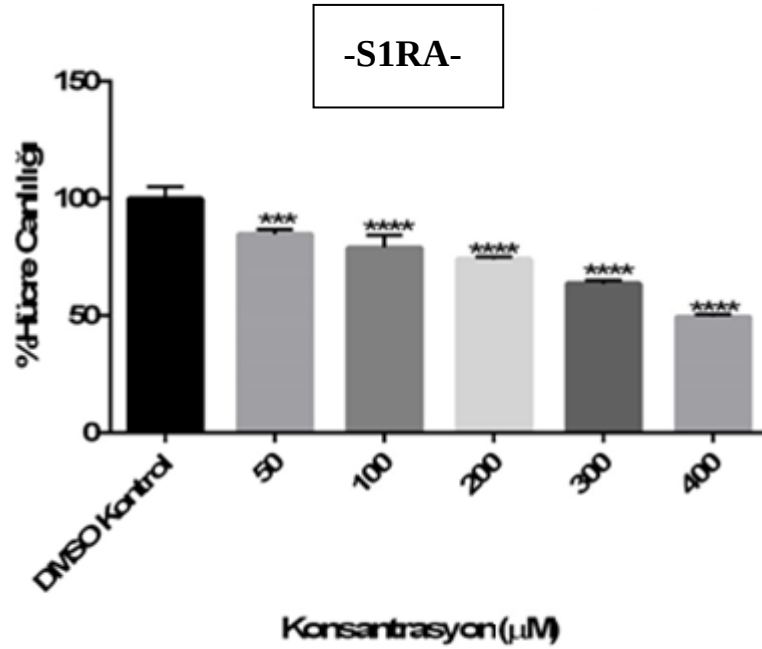
İstatistiksel Analiz

MTT analizi, tek yönlü ANOVA Student t testi ile GraphPad© Prism 6'da analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p > 0,05$ $p < 0,05^*$ $p < 0,01^{**}$ $p < 0,001^{***}$ $p < 0,0001^{****}$ olarak değerlendirilmiştir. Gerçek zamanlı hücre analizinde, logaritmik konsantrasyon / hücre indeksi eğrisi, IC₂₅ ve IC₅₀ değerleri ve hücre indeksi grafikleri xCELLigence® RTCA DP cihaz programı 1.2.1 yazılımı kullanılarak, koloni formasyon analizinde koloni sayısal verileri BioTek© Cytation 3 Imaging Multimode Reader yazılımı kullanılarak elde edilmiştir. Akım sitometrideki analizler BD™ Acuri C6 Flow Cytometry cihaz yazılımı kullanılarak yapılmıştır ve Gerçek Zamanlı PZR kullanılarak yapılan mRNA ekspresyon analizindeki veriler Light Cycler® 480 Instrument II cihazının yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

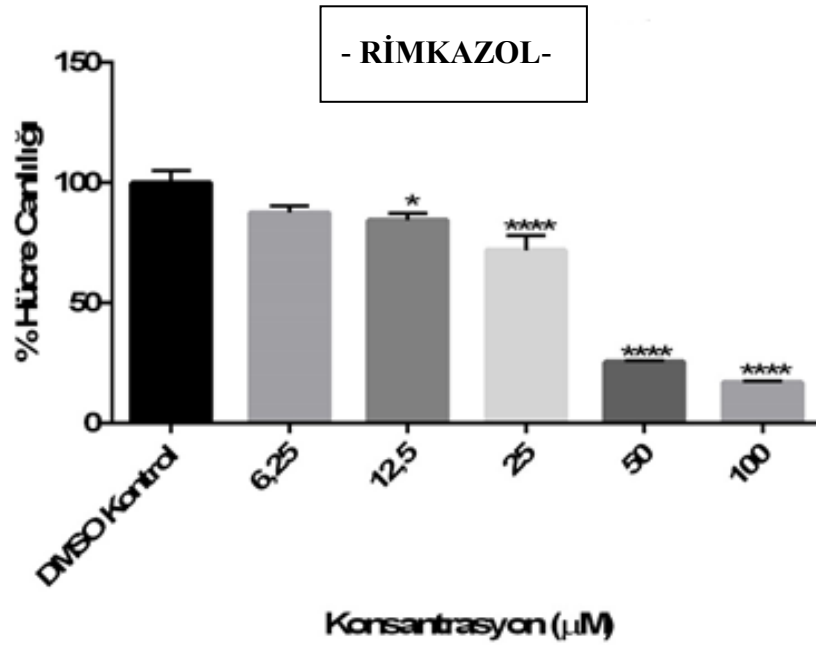
5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. S1RA ve Rimkazolün 24.saatte U87MG Hücrelerinde Sitotoksik Etkilerinin MTT Yöntemi ile Değerlendirilmesi

U87MG hücreleri üzerine uygulanan farklı S1RA ve rimkazol konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat inkübasyonun ardından, MTT reaktifi uygulanan hücrelerin mitokondriyel aktivitelere bağlı oluşan renklenmenin absorbansları mikropilaka okuyucuda 540 nm’de okunmuştur. Deney farklı zamanlarda 3 tekrarlı ve her deneyde kendi içinde de 8 tekrarlı çalışılmıştır. Elde edilen % hücre canlılık değerleri, Şekil 5.1 ve Şekil 5.2’de ve Çizelge 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.1. U87MG hücrelerinde S1RA'nın 24.saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama±Standart sapma, n=8, GraphPad Prism 6'da bulunan p değerleri; ****p<0,0001, ***p<0,001) Deneyler 3 bağımsız çalışma olarak tekrarlanmıştır, DMSO Kontrol: % 0,1 DMSO)



Şekil 5.2. U87MG hücrelerinde rimkazolün 24.saatteki MTT testi sonuçlarına göre % hücre canlılığı oranları (Ortalama±Standart sapma, n=8, GraphPad Prism 6'da bulunan p değerleri; ****p<0,0001, ***p<0,001, *p<0,05) Deneyler 3 bağımsız çalışma olarak tekrarlanmıştır, DMSO Kontrol: % 0,1 DMSO)

Bulgulara göre, SİRA'nın uygulandığı kuyularda 50, 100, 200, 300, 400 µM konsantrasyonlarının % hücre canlılık oranları ise sırasıyla % 84,8, 79,2, 75,3, 67, 50,3 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılık oranları istatistiksel olarak 50 µM SİRA uygulanan grup için p<0,05; 100, 200, 300, 400 µM uygulanan gruplarda p<0,0001 olarak anlamlı bulunmuştur. Rimkazolün uygulandığı kuyularda 6,25, 12,5, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarının % hücre canlılık oranları sırası ile % 87,5, 78,4, 64,9, 25,4 ve 16,9 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılık oranları istatistiksel olarak 12,5 µM rimkazol uygulanan grup için p<0,05; 25, 50, 100 µM uygulanan gruplarda p<0,0001 olarak anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 5.1. S1RA ve rimkazolün U87MG glioblastoma hücreleri üzerindeki 24.saatteki MTT yöntemi ile elde edilen sitotoksik etkilerinin % hücre canlılık oranları

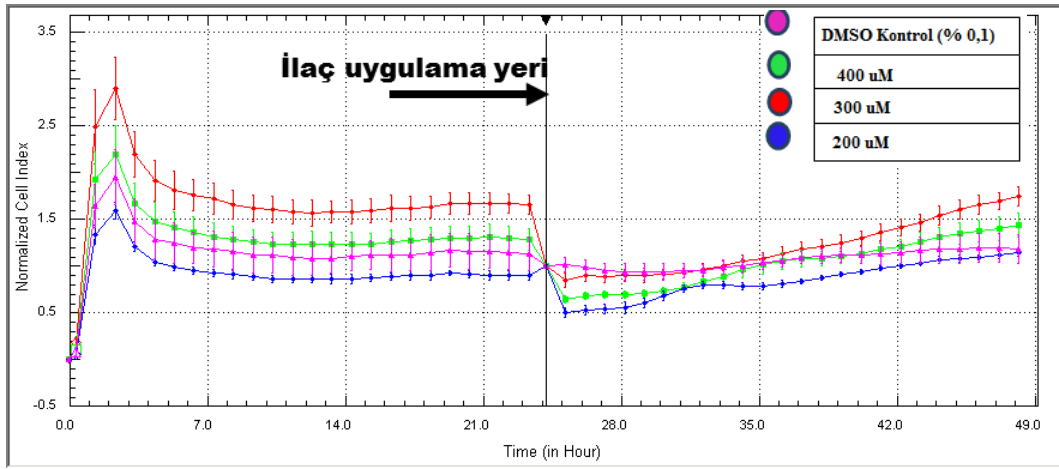
24 Saat İnkübasyon			
S1RA		Rimkazol	
Konsantrasyonlar (μ M)	% Hücre Canlılık Oranı	Konsantrasyonlar (μ M)	% Hücre Canlılık Oranı
50 μ M	84,8	6,25 μ M	87,5
100 μ M	79,2	12,5 μ M	78,4
200 μ M	75,3	25 μ M	64,9
300 μ M	67	50 μ M	25,4
400 μ M	50,3	100 μ M	16,9

5.2. S1RA ve Rimkazolün U87MG Hücrelerinde Antiproliferatif Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile Değerlendirilmesi

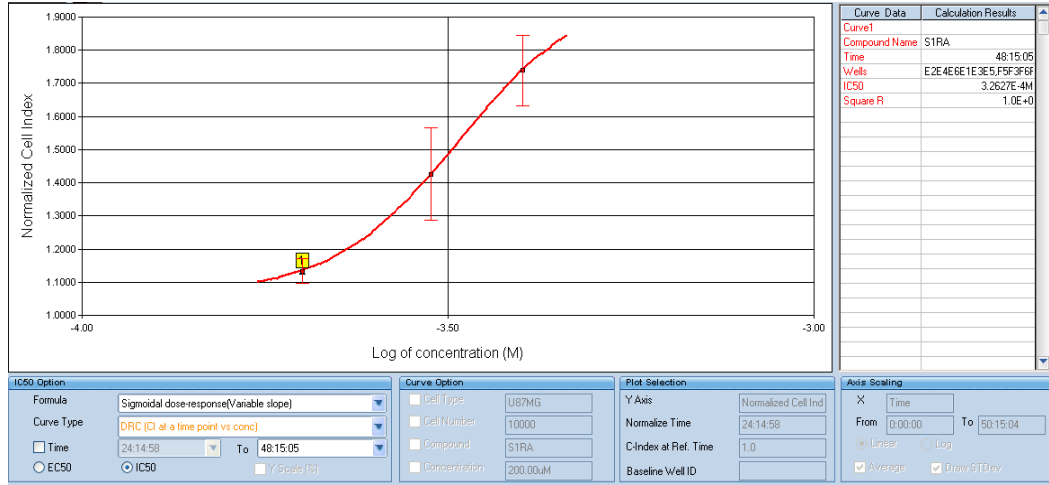
S1RA ve rimkazolün altın kaplı e-plakalarda U87MG hücrelerinde meydana getirdiği antiproliferatif etkiyi gözlemleyebilmek için gerçek zamanlı hücre analizi yapılmıştır. MTT sonuçlarına göre belirlediğimiz S1RA (400, 300, 200 μ M) ve rimkazolün (50, 25, 12,5 μ M) konsantrasyonlarının uygulandığı kuyulardan elde edilen empedans değerleri RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak analiz edildiğinde, hücre indekslerinin 24 saat sonunda azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Yapılan IC₅₀ ve IC₂₅ hesaplama regresyon analizi sonucunda S1RA IC₅₀ konsantrasyonu 326 μ M ve IC₂₅ konsantrasyonu 200 μ M bulunurken, rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonları sırasıyla 25 μ M ve 12,5 μ M olarak bulunmuştur.

Çizelge 5.2. *S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonları*

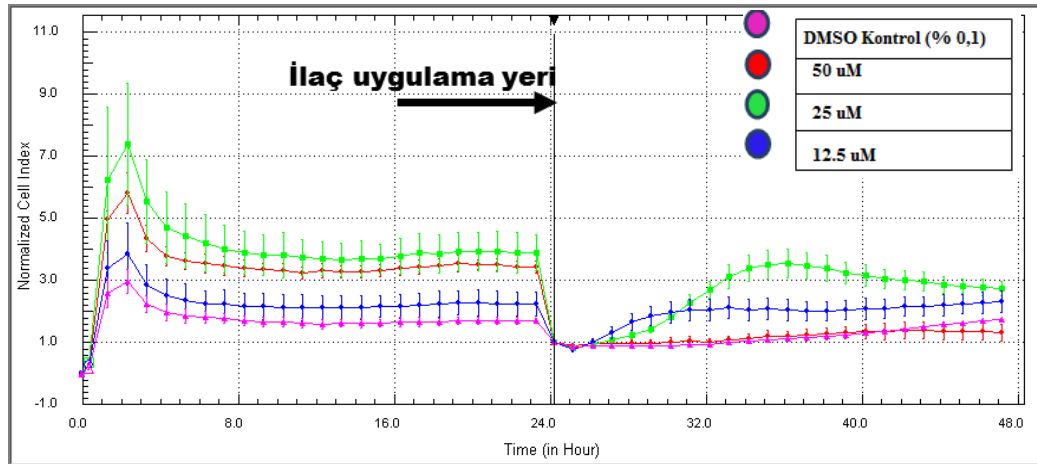
Konsantrasyonlar	S1RA	Rimkazol
IC ₅₀	326 µM	25 µM
IC ₂₅	200 µM	12,5 µM



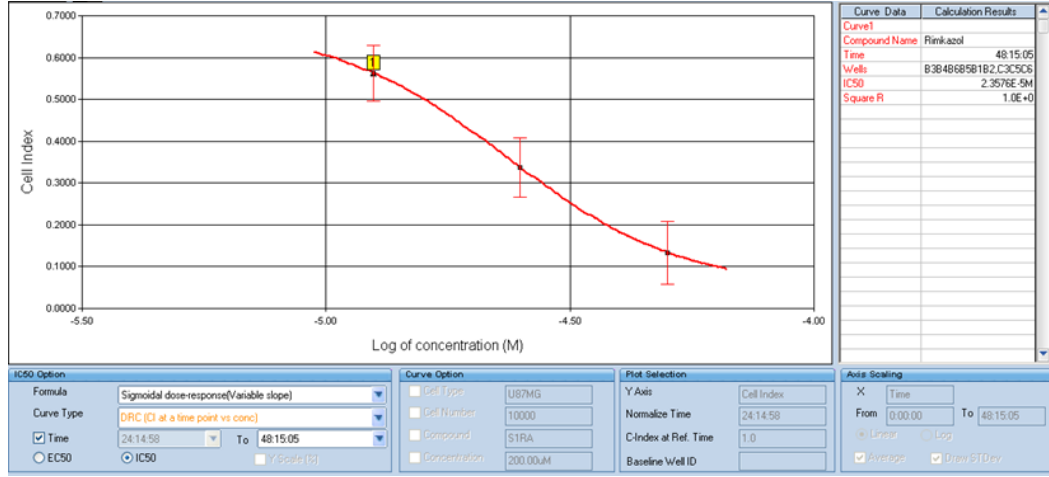
Şekil 5.3. *S1RA konsantrasyonlarının (400, 300, 200 µM) U87MG hücrelerinde 24 saatlik normalize hücre indeks değerlerine göre gerçek zamanlı proliferasyon eğrileri*



Şekil 5.4. SIRA konsantrasyonlarının (400, 300, 200 μ M) U87MG hücrelerinde 24 saatlik normalize hücre indeksi değerlerine göre RTCA DP analiz sistemi ile çizilen nonlineer regresyon eğrisi. (SIRA için 24 saatlik IC_{50} : 326 μ M, IC_{25} : 200 μ M)



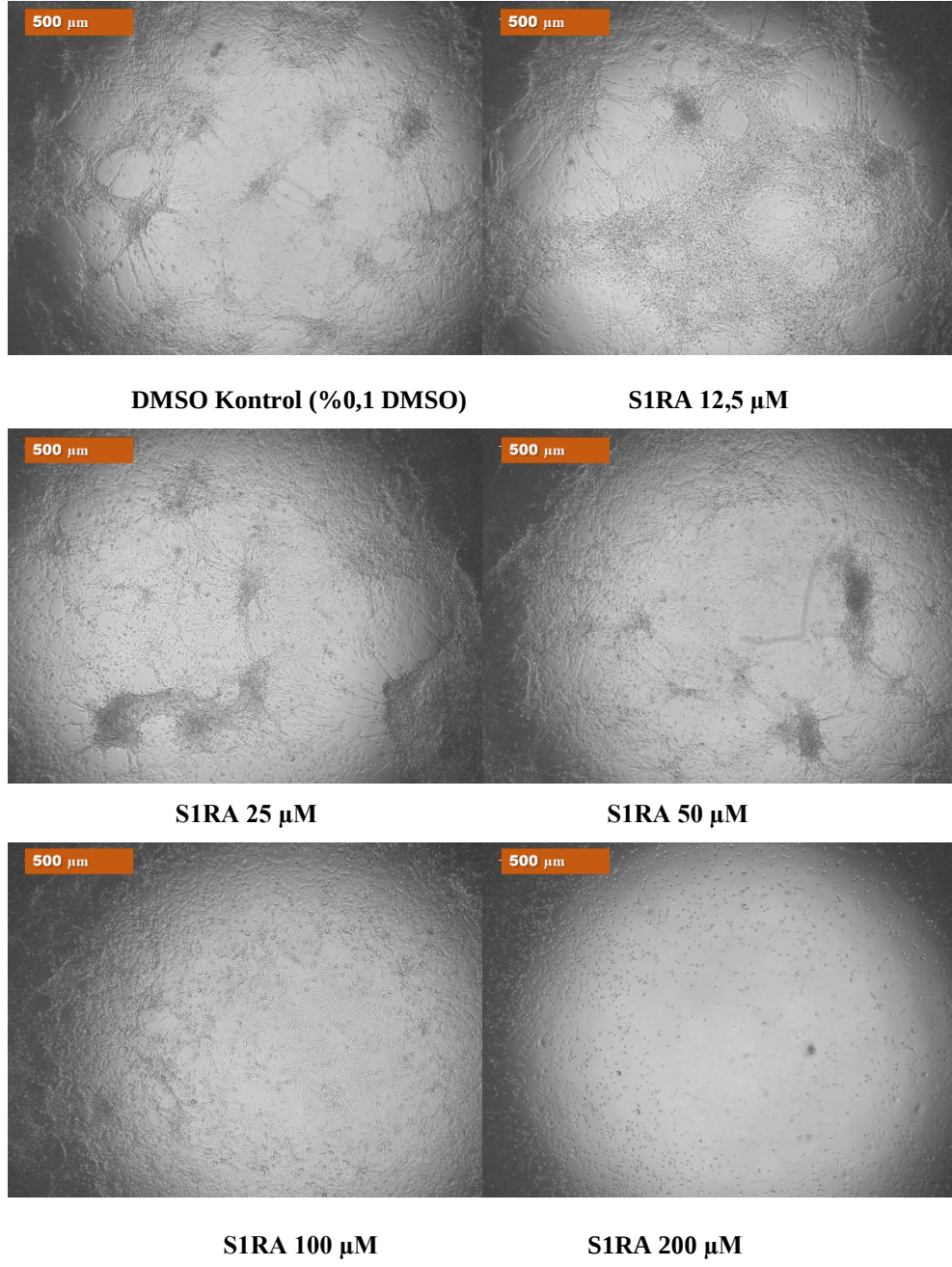
Şekil 5.5. Rimkazol konsantrasyonlarının (50, 25, 12,5 μ M) U87MG hücrelerinde 24 saatlik normalize hücre indeks değerlerine göre gerçek zamanlı proliferasyon eğrileri



Şekil 5.6. Rimkazol konsantrasyonlarının (50, 25, 12,5 μ M) U87MG hücrelerinde 24 saatlik normalize hücre indeksi değerlerine göre RTCA DP analiz sistemi ile çizilen nonlineer regresyon eğrisi (Rimkazol için 24 saatlik IC_{50} : 25 μ M, IC_{25} : 12,5 μ M)

5.3. S1RA ve Rimkazolün U87MG Hücrelerindeki Koloni Formasyon Üzerine Etkileri

Koloni formasyon deneyinde 96'lık plakalara hücreler ekilmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonunda U87MG hücrelerine S1RA (12,5, 25, 50, 100, 200 μ M) ve rimkazolün (1,5, 3, 6,25, 12,5, 25 μ M) belirli konsantrasyonları uygulanmıştır ve hücreler 21 gün inkübasyona bırakılmıştır. Haftada bir kez besiyeri değiştirilmiştir. 21 gün sonra, koloniler % 50 metanol ile fikse edilip % 0,01 kristal viyole ile boyanmıştır. 96'lık plaka çeşme suyuyla yıkanıp, bir hafta boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Koloni özellikleri analizi, sayımı ve görüntüleme işlemi Citation 3 (BioTek) mikropilaka okuyucusunda gerçekleştirilmiştir.

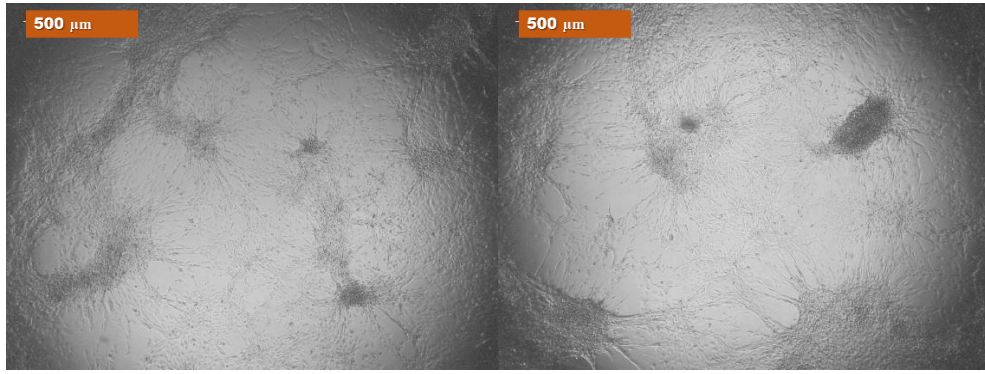


Şekil 5.7. *S1RA konsantrasyonlarıyla inkübe edilen U87MG hücrelerinin 21. günde koloni formasyon görüntüleri (Mikroskop büyütmesi (M.B.): 4x)*



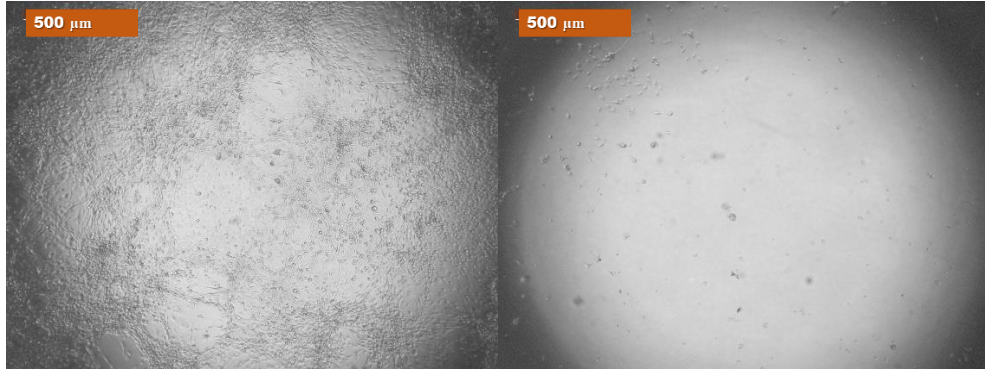
DMSO Kontrol (% 0,1 DMSO)

Rimkazol 1,5 µM



Rimkazol 3 µM

Rimkazol 6,25 µM



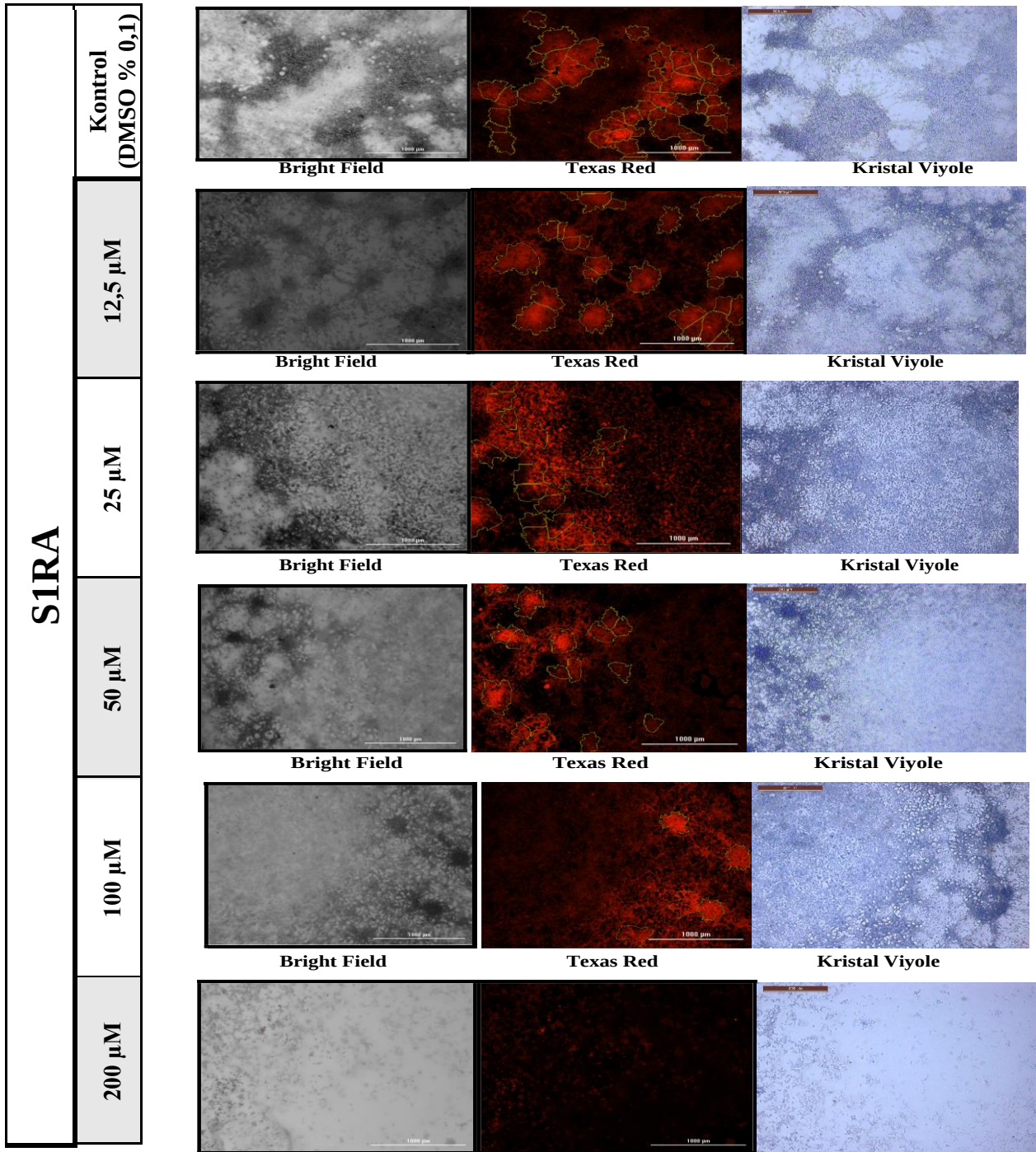
Rimkazol 12,5 µM

Rimkazol 25 µM

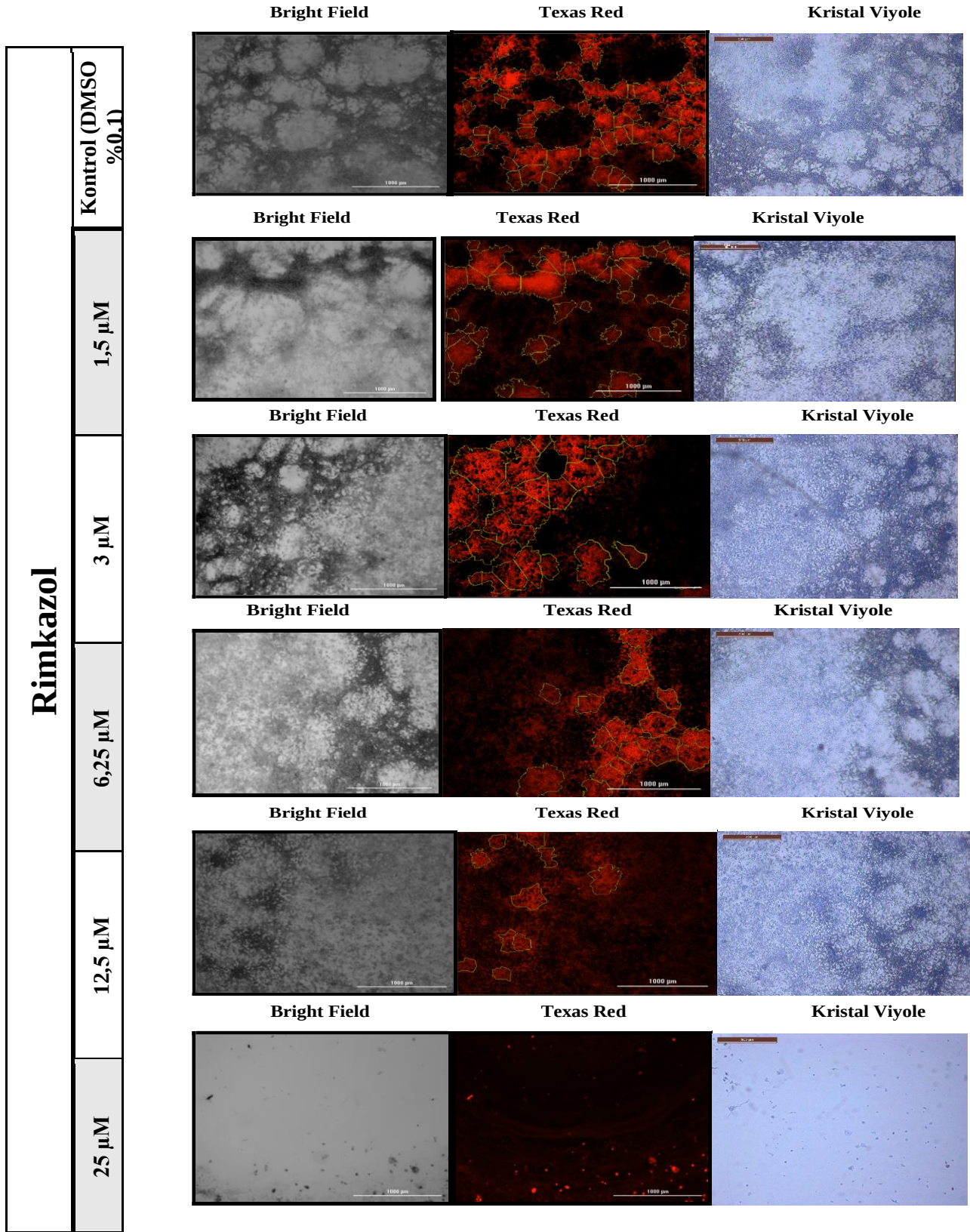
Şekil 5.8. Rimkazol konsantrasyonlarıyla inkübe edilen U87MG hücrelerinin 21. günde koloni formasyon görüntüleri (M.B: 4x)

Elde edilen koloni görüntülerine göre U87MG hücrelerinde S1RA ve rimkazolün koloni büyümesini sınırlandırdıkları görülmüştür. Koloniler hem büyüklük hem de çapları açısından azalmıştır. İlaçların konsantrasyon artışına paralel olarak U87MG hücrelerinin koloni oluşturabilme yetenekleri azalmıştır (Şekil 5.7 ve 5.8).

Koloniler, metanol ile fikse edilip, kristal viyole (592-638 nm) ile boyandıktan sonra Citation 3 mikropilaka okuyucuda Texas Red (586-647 nm) floresans kanalında, koloni fiziksel özelliklerini ve ortalama koloni sayısını belirlemek amacıyla görüntülenmiştir.



Şekil 5.9. S1RA uygulanan U87MG hücrelerine ait kolonilerden elde edilen 21.gün görüntüleri
(M.B.:Bright Field: 2x, Texas Red: 2x, Kristal Viyole:4x)



Şekil 5.10. Rimkazol uygulanan U87MG hücrelerine ait kolonilerden elde edilen 21. gün görüntüleri.
(M.B.:Bright Field: 2x, Texas Red: 2x, Kristal Viyole:4x)

Çizelge 5.3. S1RA uygulanan kolonilerin Texas Red kanalında yapılan analiz sonucunda belirlenen fiziksel özellikleri

Koloni Özelliği	Kontrol (DMSO % 0,1)	S1RA				
		12,5 µM	25 µM	50 µM	100 µM	200 µM
Eşik Değer	8431 (100-500 µm)	8397 (100-500 µm)	9264 (100-500 µm)	10232 (100-500 µm)	8301 (100-500 µm)	17079 (100-500 µm)
Ort. Koloni Sayısı	53	25	21	16	7	0
Ort. Koloni Büyüklüğü	154,3 µm	153,1 µm	149,1 µm	142,6 µm	123,8 µm	0 µm
Ort. Koloni Alanı	2.06E+04	1,98E+04	1,79E+04	3,37E+04	1,17E+04	0
Ort. Koloni Çevre Uzunluğu	638,9 µm	647,6	608,3 µm	816,7 µm	528,3 µm	0 µm
Ort. Koloni Daireselliği	0,531	0,543	0,503	0,405	0,468	0

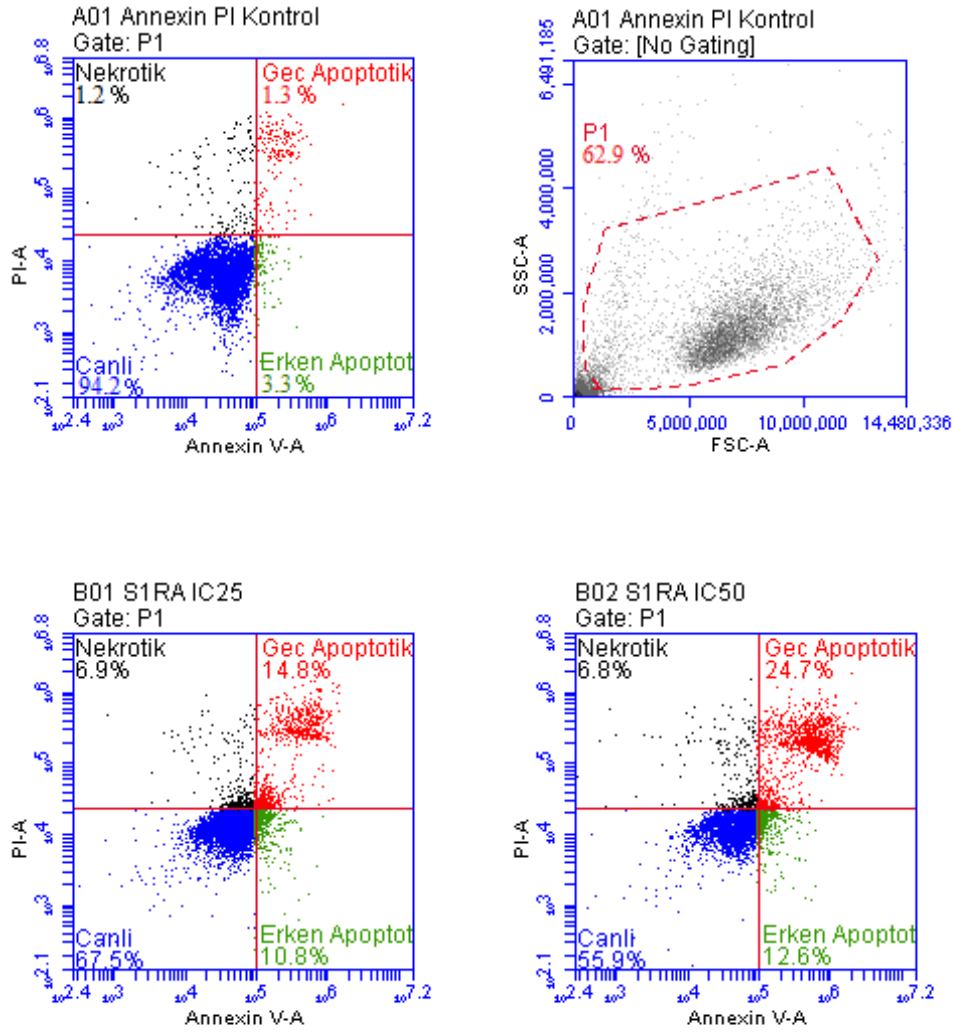
Çizelge 5.4. Rimkazol uygulanan kolonilerin Texas Red kanalında yapılan analiz sonucunda belirlenen fiziksel özellikleri

Koloni Özelliği	Kontrol (DMSO % 0,1)	Rimkazol				
		1,5 µM	3 µM	6,25 µM	12,5 µM	25 µM
Eşik Değer	7434 (100-500 µm)	15749 (100-500 µm)	4116 (100-500 µm)	5076 (100-500 µm)	9557 (100-500 µm)	5098 (100-500 µm)
Ort. Koloni Sayısı	60	47	26	18	10	0
Ort. Koloni Büyüklüğü	153,6 µm	138,1 µm	127,7 µm	114,9 µm	151,4 µm	0 µm
Ort. Koloni Alanı	2,04E+04	1,52E+04	1,16E+04	1,78E+03	1,1E+03	0
Ort. Koloni Çevre Uzunluğu	664,3 µm	602,2 µm	972 µm	463,1 µm	375,8 µm	0 µm
Ort. Koloni Daireselliği	0,452	0,514	0,519	0,507	0,5	0

Koloni formasyon deneyi sonuçlarına göre hem S1RA (12,5, 25, 50, 100, 200 μ M) hem de rimkazol (1,5, 3, 6,25, 12,5, 25 μ M) konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda konsantrasyon arttıkça U87MG hücrelerinin ortalama koloni sayısında, ortalama koloni çevre uzunluğunda ve ortalama koloni büyüklüğünde belirgin azalmalar meydana gelmiştir. S1RA'nın (200 μ M) ve rimkazolün (25 μ M) en yüksek konsantrasyonlarına ait gruplarda hiç koloni oluşmamıştır (Şekil 5.9 ve 5.10) (Çizelge 5.3 ve 5.4).

5.4. Akım Sitometride Annexin-V/PI Yöntemi İle Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

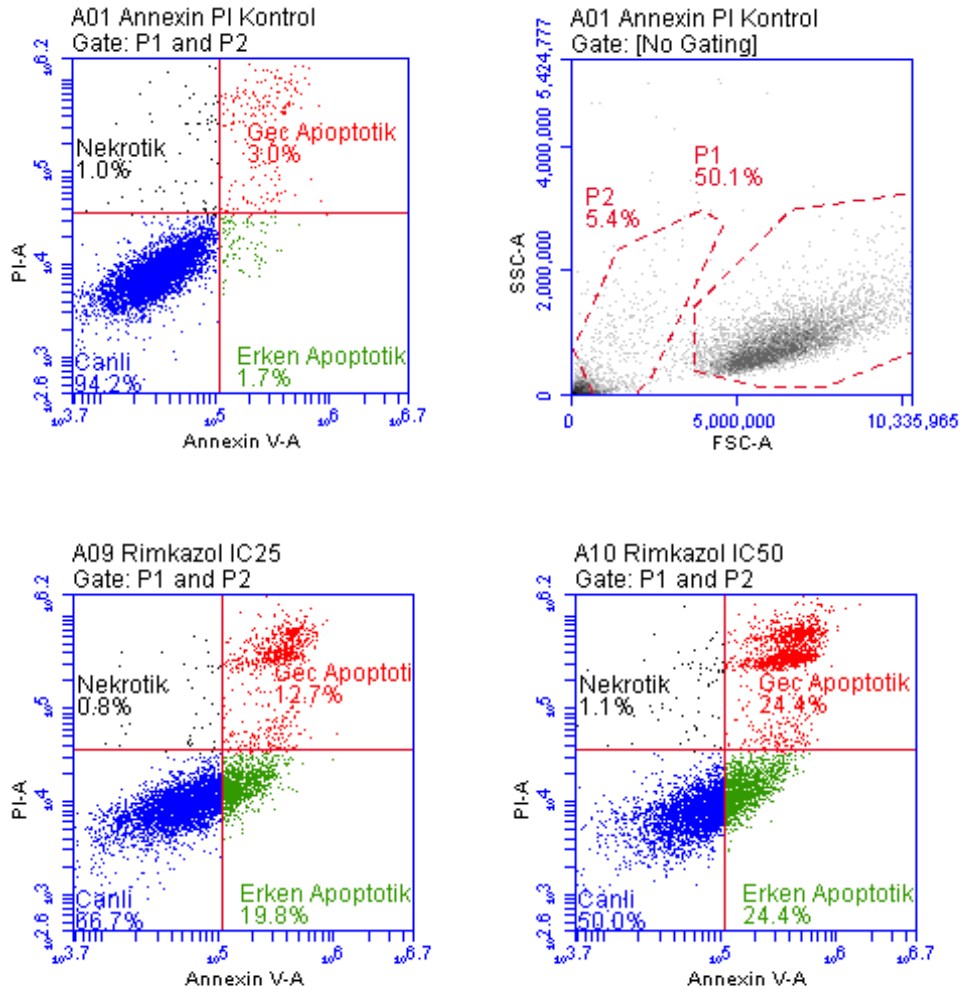
S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonları U87MG hücrelerine uygulandıktan sonra 24 saatteki apoptotik etkileri akım sitometride Annexin-V/PI yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Gerçek zamanlı analiz sisteminde hesaplanan IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonları S1RA için 326 μ M ve 200 μ M, rimkazol için, 25 μ M ve 12,5 μ M olarak uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki, Şekil 5.11 ve Şekil 5.12'de analiz grafikleri ile Çizelge 5.5 ve Çizelge 5.6'da sayısal verilerle gösterilmiştir.



Şekil 5.11. Kontrol (% 0,1 DMSO), S1RA IC₅₀ (326 µM) ve IC₂₅ (200 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerine 24. saatteki % apoptotik hücre oranları ve analiz grafikleri

Çizelge 5.5. Kontrol (% 0,1 DMSO), S1RA IC₅₀ (326 µM) ve IC₂₅ (200 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerine 24. saatteki % apoptotik hücre oranlarının karşılaştırılması

Rimkazol konsantrasyonları	24 Saat			
	% Canlı	% Erken Apoptotik	% Geç Apoptotik	% Nekrotik
(IC ₅₀) 25 µM	50,0	24,4	24,4	1,1
(IC ₂₅) 12,5 µM	66,7	19,8	12,7	0,8
DMSO (% 0,1)	94,2	1,7	3,0	1,0



Şekil 5.12. Kontrol (% 0,1 DMSO), Rimkazol IC₅₀ (25 µM) ve IC₂₅ (12,5 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerine 24. saatteki % apoptotik hücre oranları ve analiz grafikleri

Çizelge 5.6. DMSO (% 0,1) kontrol, Rimkazol IC₅₀ (25 µM) ve IC₂₅ (12,5 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerine 24. saatteki % apoptotik hücre oranlarının karşılaştırılması

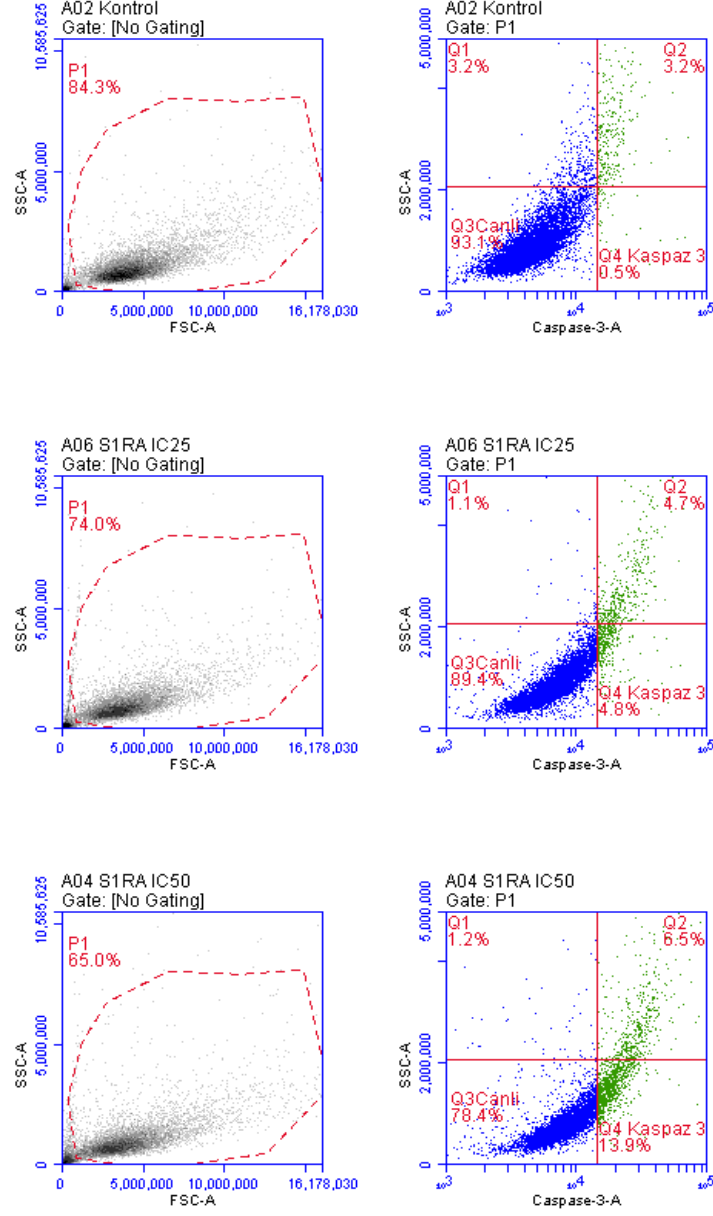
SİRA	24 Saat			
	konsantrasyonları	% Canlı	% Erken Apoptotik	% Geç Apoptotik
				% Nekrotik
	(IC ₅₀) 326 µM	55,9	12,6	24,7
	(IC ₂₅) 200 µM	67,5	10,8	14,8
	DMSO (% 0,1)	94,2	3,3	1,3
				1,2

Grafiklere ve çizelgelere bakıldığında S1RA ve rimkazolün IC₅₀ konsantrasyonlarının U87MG hücreleri üzerinde % erken apoptotik etkileri sırasıyla, % 12,6 ve % 24,4 olarak bulunmuştur. S1RA'nın ve rimkazolün IC₅₀ konsantrasyonlarının % geç apoptotik etkileri ise sırasıyla % 24,7 ve % 24,4 olarak belirlenmiştir. S1RA'nın ve rimkazolün IC₂₅ konsantrasyonlarının % erken apoptotik hücre oranları sırasıyla, % 10,8 ve % 19,8, % geç apoptotik hücre oranları ise sırasıyla % 14,8 ve % 12,7 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.11 ve 5.12). S1RA'nın ve rimkazolün IC₅₀ konsantrasyonlarında % geç apoptotik oranları birbirine çok yakın bulunmuştur. Ancak S1RA konsantrasyonlarında % geç apoptotik hücre oranları ve % geç apoptotik hücre oranları daha yüksek olarak belirlenmiştir. Bu da IC₅₀ ve IC₂₅ değerleri rimkazole göre daha yüksek konsantrasyonda hesaplanmış olan S1RA'nın, rimkazole göre daha az toksik etkili olduğunu açıklamaktadır. Ancak konsantrasyon artışının apoptotik etkiden çok nekrotik etkiye kaymasına neden olabileceğini söyleyebiliriz. Ayrıca bu sonuç, literatür bilgilerine göre de S1RA'nın selektif sigma-1 antagonisti olması, rimkazolün ise nonselektif sigma reseptör antagonisti olmasıyla açıklanabilir (Çizelge 5.5 ve 5.6).

5.5. Akım Sitometride Kaspaz-3 Aktivasyon Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Değerlendirmesi

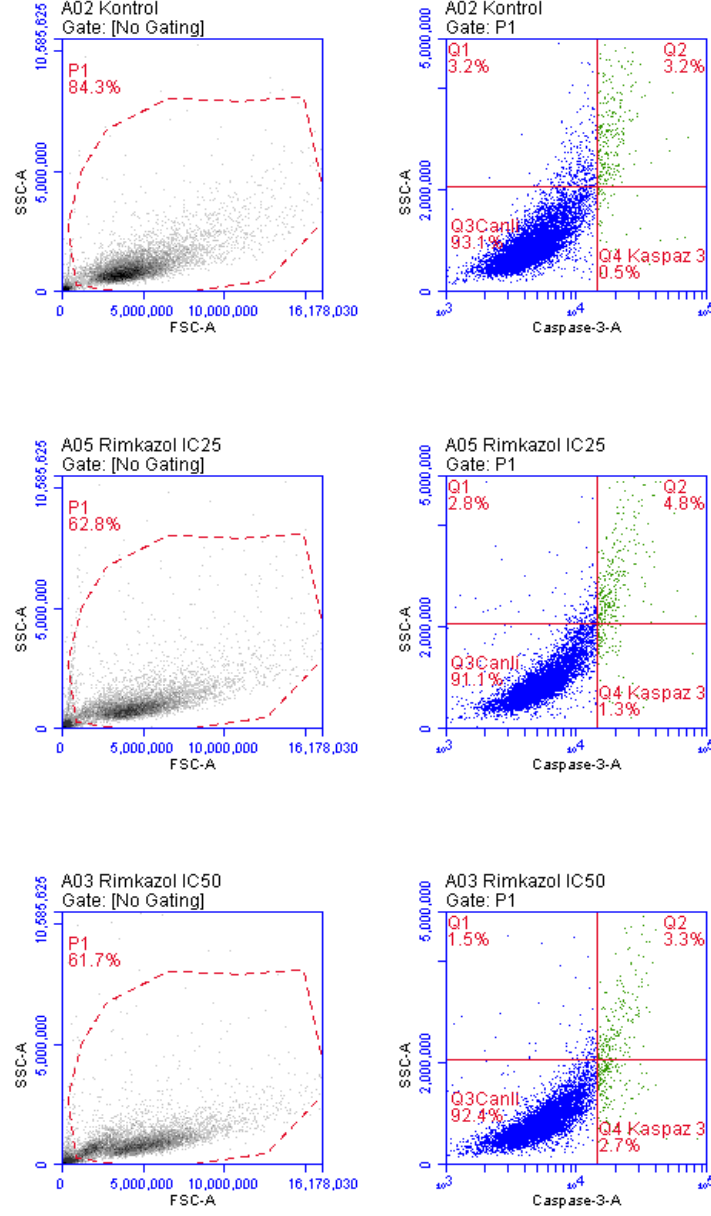
S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonları U87MG hücrelerinde uygulanmıştır. 24 saat inkübasyon süresinin ardından kaspaz-3 aktivasyon yöntemi “BD™ PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit”i prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre; hücreler kaldırılmış ve besiyeri içinde küçük santrifüj tüplerine alınmıştır. Santrifüjün ardından, süpernatant atılmıştır ve soğuk PBS ile iki kez yıkama yapılmıştır. Hücreler permeabilize edilmek üzere Cytofix/Cytoperm solüsyonuyla 25 dakika buz banyosunda bekletilmiş, 1x Perm Wash solüsyonu ile 2 defa yıkanmıştır. Daha sonra, 100 µL Perm Wash ve 20 µL kaspaz-3 antikoruna 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve yıkama çözeltisi ile 2 defa yıkamanın ardından 500 µL perm wash ile resüspanse edildikten sonra numuneler akım sitometride kaspaz-3 aktivasyonu bakımından analiz edilmiştir.

-A-



Şekil 5.13. (A). S1RA IC₅₀ (326 μ M) ve IC₂₅ (200 μ M) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerinde 24 saatte kaspaz-3 aktivasyonunun akım sitometri analizleri.

-B-



Şekil 5.14. (B). Rimkazol IC₅₀ (25 μ M) ve IC₂₅ (12,5 μ M) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerinde 24 saatte kaspaz-3 aktivasyonunun akım sitometri analizleri.

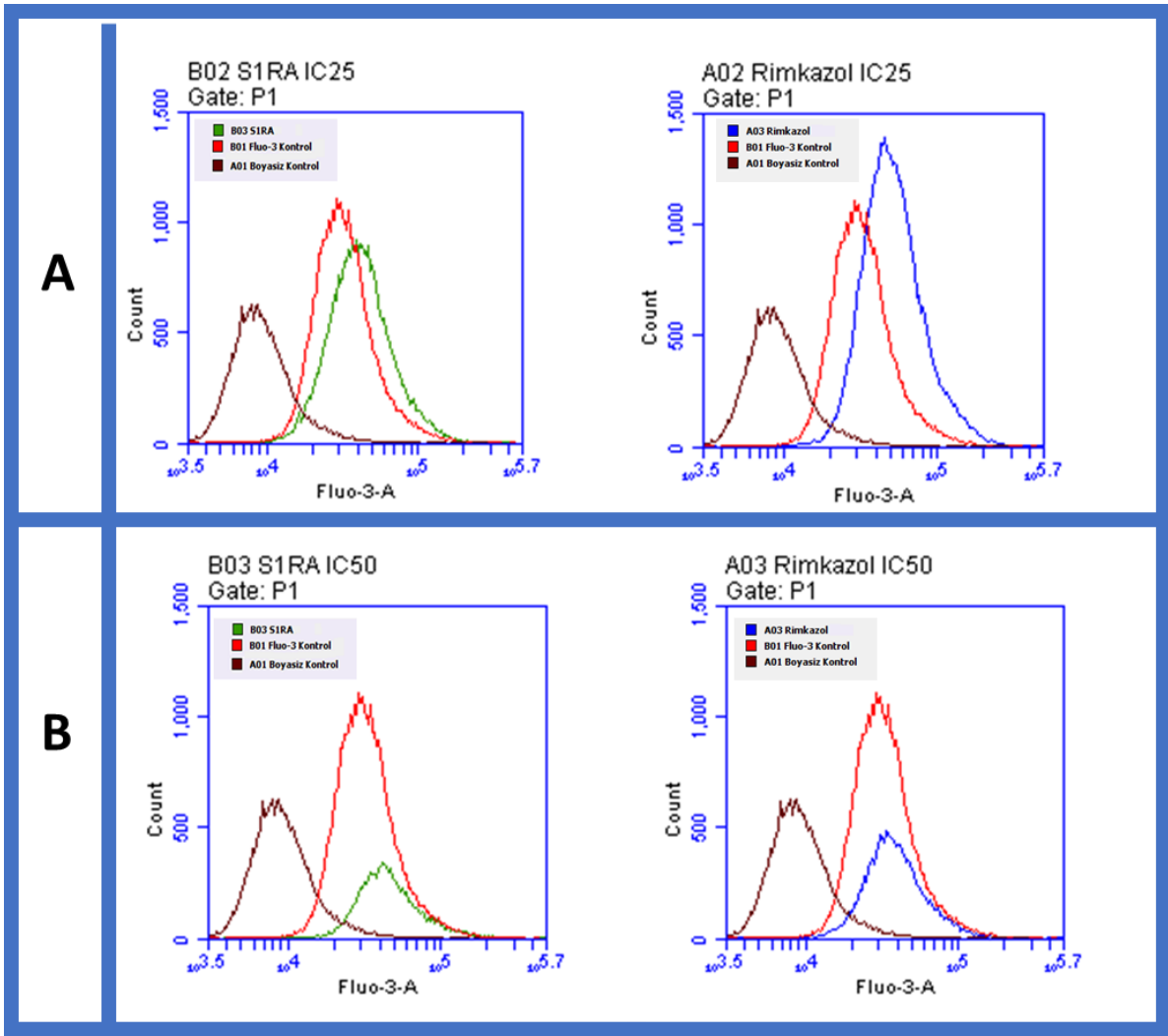
Çizelge 5.7. S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonlarının U87MG hücrelerinde 24.saatteki % kaspaz-3 aktif hücre oranları

Maddeler	24 Saat	
	% Canlı Hücre Oranı	% Kaspaz-3 Pozitif Hücre Oranı
Kontrol (DMSO % 0,1)	96,3	3,7
Rimkazol IC ₂₅ (12,5 µM)	93,9	6,1
Rimkazol IC ₅₀ (25 µM)	93,9	6,0
S1RA IC ₂₅ (200 µM)	90,5	9,5
S1RA IC ₅₀ (326 µM)	79,6	20,4

Kaspaz-3 analiz sonuçlarına göre, kontrol grubuna göre en yüksek kaspaz-3 aktivasyonunun görüldüğü grup S1RA IC₅₀ grubudur. % 20,4 oranında kaspaz-3 pozitiflik belirlenmiştir. S1RA IC₂₅ grubu için ise % 9,5 oranında kaspaz-3 aktivasyonu belirlenmiştir. Kaspaz-3 aktivasyonu rimkazol IC₅₀ grubu için % 6,0 ve rimkazol IC₂₅ grubu için de % 6,1 olarak analiz edilmiştir. Özellikle S1RA gruplarında kontrole göre hücrelerde kaspaz-3 pozitiflik oranlarında sayıca belirgin bir artış olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.7) (Şekil 5.13 ve 5.14).

5.6. Akım Sitometride Fluo-3 Yöntemi ile Hücre İçi Kalsiyumun Düzeyinin Değerlendirilmesi

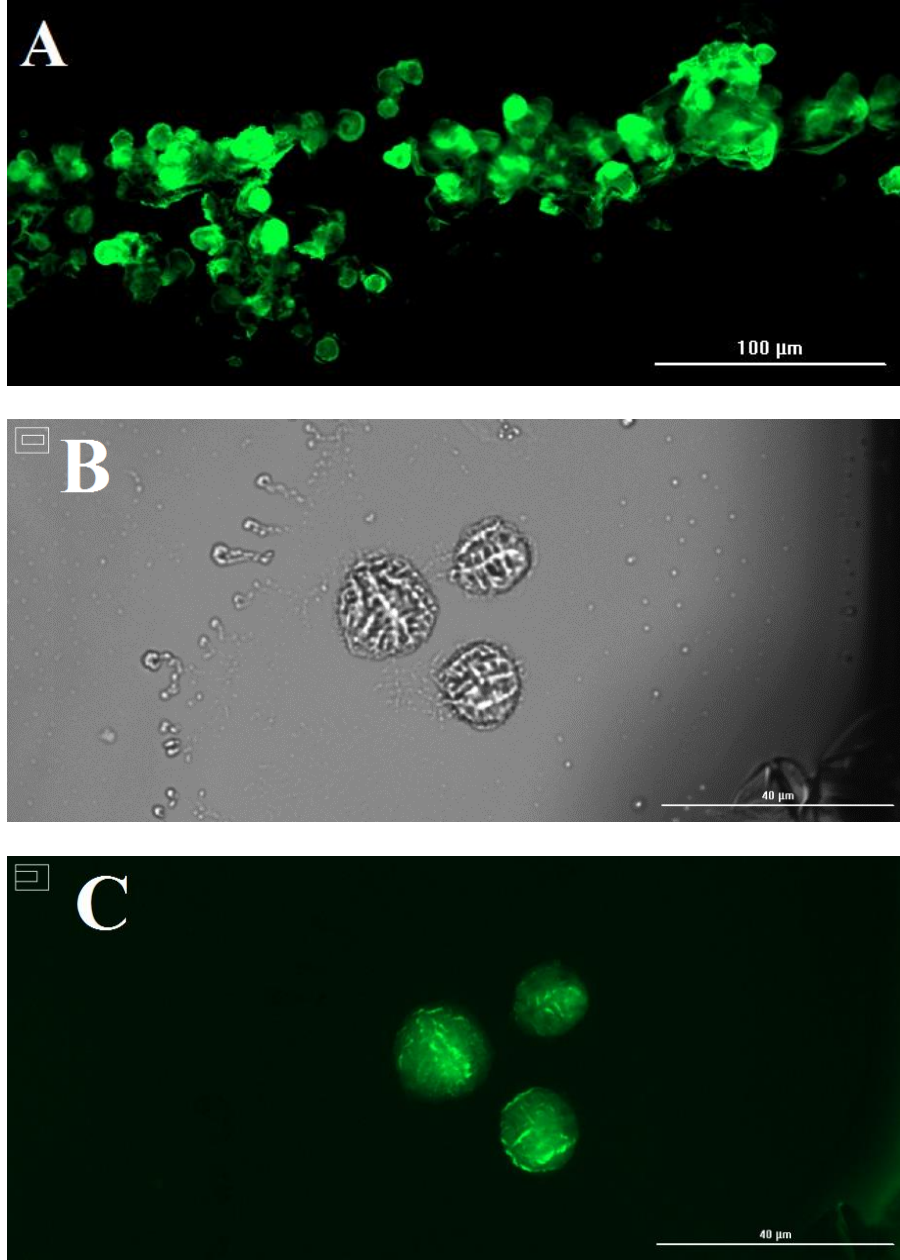
Fluo-3 ile hücre içi sitozolik kalsiyum analizi yapılırken, U87MG hücreleri S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonları ile 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ardından, hücreler BD™ Cytoperm/Cytofix permeabilize edilip, Fluo-3 boyası ile boyanmıştır. Deney soğuk koşullar altında yapılmıştır (0-10°C). Hücre içi Fluo-3 miktarı, dolayısıyla kalsiyum miktarı BD™ Acuri C6 cihazında analiz edilmiştir. Kalsiyuma bağlı Fluo-3 ışımları, analitik düzlemde 10⁴-10⁵ aralığında gözlenmiştir. Bu aralıktaki kaymalara göre (artış veya azalış), S1RA ve rimkazolün U87MG hücrelerinde 24 saatteki kalsiyum analiz sonuçları değerlendirilmiştir.



Şekil 5.15. S1RA ve rimkazolün (A) IC₂₅ (sırasıyla 200 μ M ve 12,5 μ M) ve (B) IC₅₀ (sırasıyla 326 μ M ve 25 μ M) konsantrasyonlarının U87MG hücrelerinde uygulanmasını takiben 24 saat sonra ölçülen hücre içi kalsiyuma bağlanan Fluo-3'den elde edilen piklerin Fluo-3 kontrol ve boyasız kontrol grubuna göre karşılaştırılması (Histogram görüntüleri için BD™ Acuri C6 cihazı analiz programı kullanılmıştır)

Histogram görüntülerine göre; rimkazolün IC₂₅ değeri U87MG hücrelerinde 24 saatte hücre içi kalsiyum düzeyini yükseltirken, IC₅₀ değerinde, hücre içi kalsiyum artışı daha az olmuştur. S1RA için IC₂₅ değeri U87MG hücrelerinde hücre içi kalsiyumu yükseltirken, IC₅₀ değeri ise 24.saatte hücre içi kalsiyum düzeyi kontrole göre biraz artmıştır. Sonuç olarak, kontrole göre S1RA ve rimkazolün IC₂₅ değerlerinde hücre içi kalsiyum düzeylerinde artış görülürken, IC₅₀ değerlerinde etkili bir hücre içi kalsiyum artışı meydana gelmemiştir. Rimkazolün IC₂₅ değeri S1RA'nın IC₂₅ değerine göre hücre içi kalsiyum düzeyini arttırmada daha etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.15).

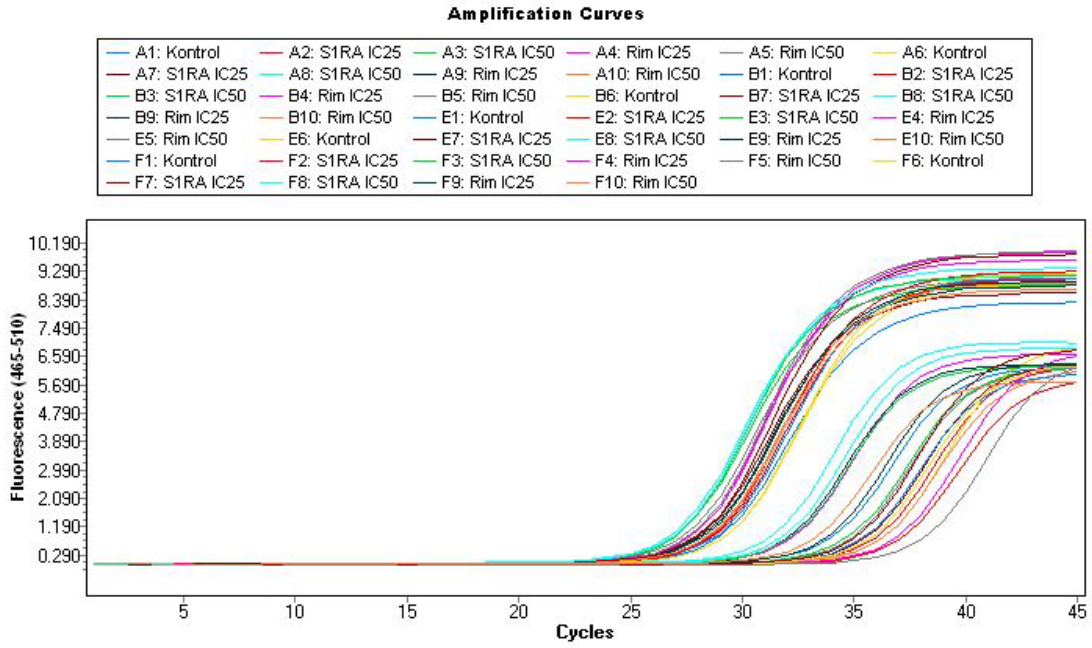
Ayrıca Fluo-3 (506-525 nm) ışımaları yeşil GFP fotonlarıyla (469-525 nm) göstermek üzere, Citation 3 (BioTek) mikropilaka okuyucu kullanılarak, Fluo-3'e bağlanan hücre içi kalsiyumlara ait ışımalar floresans olarak görüntülenmiştir (Şekil 5.16).



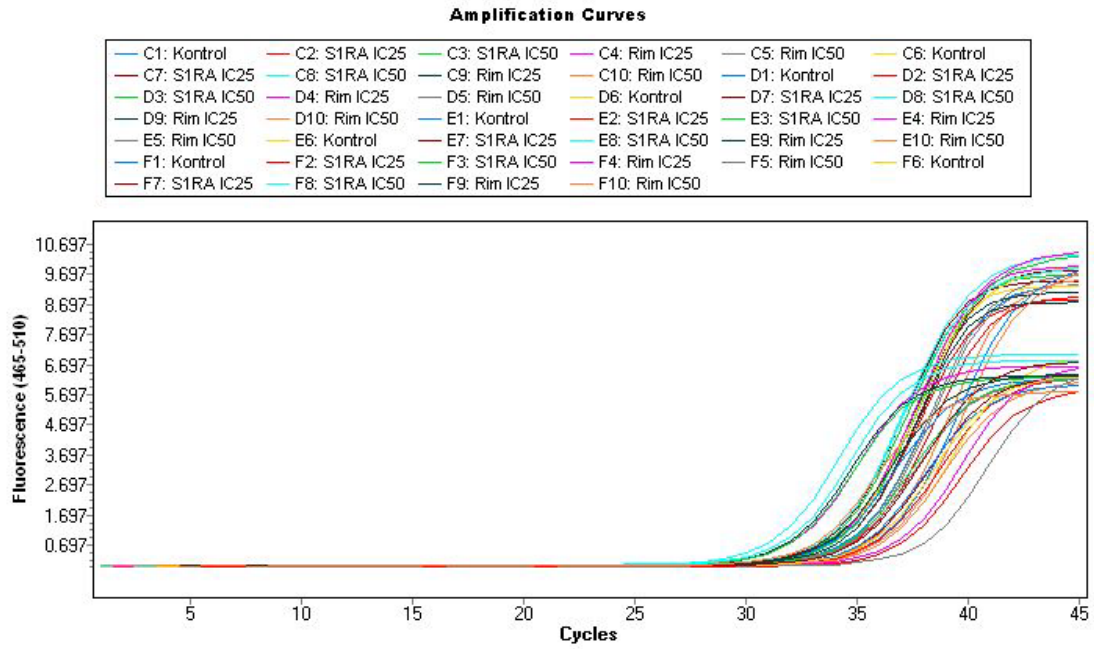
Şekil 5.16. Kontrol (% 0,1 DMSO) grubuna ait U87MG hücrelerinde hücre içi kalsiyuma bağlanan Fluo-3'ün floresans ışımaya görüntüsü (M.B.: A(GFP):20x, B(Bright Field):50x, C(GFP): 50x)

5.7. Real time PCR ile mRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

S1RA ve rimkazolün IC_{50} ve IC_{25} konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonunda uygulanmasını takiben U87MG hücrelerindeki SK_1 (Sfingosin Kinaz-1) ve SK_2 (Sfingosin Kinaz-2) mRNA ekspresyonlarının araştırılması için, Light Cycler 480 cihazında yapılan analiz sonucunda SK_1 ve SK_2 genlerinin eşik değerine girdikleri döngüler gösterilmiştir. Amplifikasyon sonucunda elde edilen hedef/referans değerleri kontrole göre karşılaştırılarak her bir örnek için analiz edilmiştir (Şekil 5.17 ve 5.18).



Şekil 5.17. S1RA ve rimkazolün IC_{50} (sırasıyla 326, 25 μM) ve IC_{25} (sırasıyla 200, 12,5 μM) konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen U87MG hücrelerinde SK_1 ve GAPDH genlerinin amplifikasyon döngü eğrileri ($n=3$)



Şekil 5.18. S1RA ve rimkazolün IC₅₀ (sırasıyla 326, 25 μ M) ve IC₂₅ (sırasıyla 200, 12,5 μ M) konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen U87MG hücrelerinde SK₂ ve GAPDH genlerinin amplifikasyon döngü eğrileri (n=3)

Hedef/referans gen oranları analiz edildiğinde, S1RA'nın IC₂₅ ve rimkazolün IC₅₀ konsantrasyonlarında kontrole göre 2 kat daha fazla SK₁ mRNA ekspresyonunda artış meydana gelmiştir. S1RA'nın IC₅₀ ve rimkazolün IC₂₅ konsantrasyonlarında ise SK₁ mRNA ekspresyonu kontrole göre azalma göstermiştir (Çizelge 5.9).

Hedef/referans gen analiz sonuçlarına göre, S1RA'nın IC₂₅ konsantrasyonunda kontrole göre yaklaşık 1,8 kat SK₂ mRNA ekspresyonunda artış meydana gelmiştir. S1RA'nın IC₅₀, rimkazolün IC₂₅ ve IC₅₀ konsantrasyonlarında ise SK₂ mRNA ekspresyonu kontrole göre azalma göstermiştir. Bu durum S1RA ve rimkazolün her iki gen üzerinde de etkisinin olduğunu göstermiştir (Çizelge 5.10). SK₂ geni için ilaç uygulanan her grup kontrole göre S1RA IC₂₅ grubu hariç mRNA ekspresyonunu azaltırken, SK₁ için S1RA IC₂₅ ve rimkazol IC₅₀ konsantrasyonları mRNA ekspresyonunu artırıcı etki göstermiştir.

Çizelge 5.8. RT-PCR sonuçlarına göre S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ değerleri ile 24 saat inkübe edilmiş U87MG hücrelerindeki SK₁ geninin hedef/referans ve normalize kantitatif oranları

Maddeler	Hedef Gen	Referans Gen	Hedef/Ref. Oranı	Normalize Oranı
DMSO % 0,1	SK ₁	GAPDH	55,7	1,000
S1RA IC ₂₅	SK ₁	GAPDH	129,3	2,317
S1RA IC ₅₀	SK ₁	GAPDH	34,4	0,617
Rimkazol IC ₂₅	SK ₁	GAPDH	37,65	0,674
Rimkazol IC ₅₀	SK ₁	GAPDH	126,9	2,274

Çizelge 5.9. RT-PCR sonuçlarına göre S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ değerleri ile 24 saat inkübe edilmiş U87MG hücrelerindeki SK₂ geninin hedef/referans ve normalize kantitatif oranları

Maddeler	Hedef Gen	Referans Gen	Hedef/Ref. Oranı	Normalize Oranı
DMSO % 0,1	SK ₂	GAPDH	0,974	1,000
S1RA IC ₂₅	SK ₂	GAPDH	1,839	1,887
S1RA IC ₅₀	SK ₂	GAPDH	0,252	0,259
Rimkazol IC ₂₅	SK ₂	GAPDH	0,489	0,502
Rimkazol IC ₅₀	SK ₂	GAPDH	0,690	0,706

Bu tez çalışmasıyla sigma reseptörleri ve kanser arasındaki ilişki, SK₁ ve SK₂ proteini sinyal yolu üzerinden aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla U87MG glioblastoma kanser hücrelerinde sigma reseptör antagonistlerinden henüz faz-2 aşamasında olan, sigma-1 reseptör antagonisti S1RA (E-52862) ve rimkazolün SK₁ ve SK₂ protein sinyal yolu ve apoptoz arasındaki ilişki araştırılmıştır. Tez kapsamında, bu maddeler U87MG glioblastoma hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve antikanser etkileri araştırılmıştır (Gilmore vd., 2004, s. 1; Romero vd., 2012, s. 2289).

S1RA ve rimkazolün farklı konsantrasyonları, U87MG hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri açısından araştırılmıştır. Buna göre, uygulanan S1RA konsantrasyonları (400, 300, 200, 100, 50 μ M) için, 24.saatte % 50 hücre inhibisyonu 400 μ M’da bulunmuştur. Uygulanan rimkazol konsantrasyonlarını (100, 50, 25, 12,5, 6,25 μ M) takiben 24.saatte % 50’den fazla hücre inhibisyonuna sebep olan konsantrasyon aralığının 50-100 μ M aralığında olduğu belirlenmiştir. MTT sonuçlarına göre belirlediğimiz konsantrasyonlarda S1RA ve rimkazolün gerçek zamanlı hücre analiz cihazı kullanılarak hücre proliferasyon analizleri yapılmış, IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonları hesaplanmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonunda IC₅₀ konsantrasyonları rimkazol için 25 μ M, S1RA için 326 μ M; IC₂₅ konsantrasyonları ise sırasıyla 12,5 ve 200 μ M olarak hesaplanmıştır. Antiproliferatif ve sitotoksikite sonuçlarına göre, rimkazolün S1RA’ya göre U87MG hücrelerinde daha sitotoksik olduğu ve dolayısıyla hücre proliferasyonunu daha düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiği görülmüştür. Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde çizilen hücre indeksi eğrilerine göre, rimkazol konsantrasyonlarının (50, 25, 12,5 μ M) uygulanan S1RA konsantrasyonlarına (400, 300, 200 μ M) göre daha fazla antiproliferatif etki yaptığı belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada sigma reseptör antagonisti rimkazolün 10 μ M’ın altındaki konsantrasyonlarda antagonist etkili, daha yüksek konsantrasyonlarda ise agonist etkili olarak etkisinin olabileceği gösterilmiştir (Gilmore vd., 2004, s. 1). Başka bir çalışmada, rimkazolün C6 glioma kanser hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 86 μ M olarak belirlenmiştir (Rybczynska vd., 2008, s. 2049). Ayrıca rimkazolün çeşitli kanser hücrelerinde (HL60, K562) sitotoksik etkileri olduğu rapor edilmiştir (Upadhye vd., 2005, s. 2486).

Yapılan literatür taramasında, S1RA’nın hücre kültüründe *in vitro* sitotoksikite çalışmalarına rastlanılmamış olup, S1RA’nın glioblastoma üzerindeki antikanser etkileri ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında S1RA ve rimkazolün sitotoksikite sonuçlarına göre, etkili olan konsantrasyonlarının U87MG hücrelerinde koloni formasyonu üzerine etkileri çalışılmıştır. S1RA için sırasıyla Kontrol DMSO (% 0,1), 12,5, 25, 50, 100, 200 μ M ve rimkazol için DMSO (% 0,1), 1,5 , 3, 6,25, 12,5 , 25 μ M konsantrasyonları hücrelere uygulanmış olup, sonuçlara göre her iki maddenin konsantrasyonuna bağlı U87MG hücrelerinin koloni sayılarında azalmalar gözlenmiştir. Şekil 5.9 ve Şekil 5.10’da görüldüğü üzere hücreler, S1RA ve rimkazol uygulamalarını

takiben 21.gündeki koloni sayıları kontrol sonucu başta olmak üzere sırasıyla 53, 25, 21, 16, 7, 0 olarak ve 60, 47, 26, 18, 10, 0 olarak belirlenmiştir (Çizelge 5.3 ve 5.4). Uygulanan konsantrasyonlara göre her iki maddenin de koloni formasyon sonuçlarının birbirine yakın olduğu görülmektedir (Şekil 5.7 ve 5.8). Yapılan bazı çalışmalarda rimkazolün lösemi kanser hücrelerinde (HL60 ve K562) ve H1299 akciğer kanserinde koloni formasyonu inhibe ettiği bulunmuş olup, bu sonuçlar tezin sonuçlarıyla paralellik göstermektedir (Spruce vd., 2004, s. 4878; Upadhye vd., 2005, s. 2486). Ancak, selektif sigma-1 antagonisti olan S1RA'nın kanser hücrelerinde koloni formasyonun çalışıldığı herhangi bir literatür mevcut değildir.

Çalışmada S1RA ve rimkazolün IC₅₀ (sırasıyla 326, 25 µM) ve IC₂₅ (200, 12,5 µM) konsantrasyonlarının U87MG hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri Annexin-V/PI yöntemi ile akım sitometride çalışılmıştır. Apoptoz sonuçlarına göre, S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonlarının 24.saatteki U87MG hücrelerinde erken apoptoz oranları sırasıyla S1RA için % 12,6 ve % 10,8; rimkazol için % 24,4 ve % 19,8 olarak bulunmuştur (Şekil 5.11 ve 5.12) (Çizelge 5.5 ve 5.6). Sonuç olarak, kontrole göre hem S1RA hem de rimkazol U87MG hücrelerinde apoptotik etki göstermiş olup, maddelerin IC₅₀ konsantrasyonlarında daha etkili apoptotik etkiler bulunmuştur. Ayrıca, rimkazolün U87MG hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin S1RA'ya göre daha fazla olduğu görülmüştür. Yapılan literatür taraması sonucunda çalışmalarda rimkazolün apoptotik etkisinin saptandığı bir çalışma mevcuttur (Spruce vd., 2004, s. 4884). Ancak, S1RA ile ilgili apoptotik değerlendirmelerin yapıldığı herhangi bir literatür yoktur. Bu nedenle S1RA'nın U87MG hücrelerinde apoptotik etkiler ilk kez bu çalışmada değerlendirilmiştir.

Kaspaz-3 aktivasyon bulgularına göre, S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonlarının U87MG hücreleri üzerinde kaspaz-3 bağımlı apoptoz etkilerinin değerlendirilmesi için kaspaz-3 pozitif hücre oranları akım sitometride araştırılmıştır. Kontrol grubunda kaspaz-3 pozitiflik % 3,7 iken S1RA IC₅₀ konsantrasyonunda hücrelerde oluşan kaspaz-3 pozitif hücre oranı % 20,4, IC₂₅'de % 9,5 olarak bulunmuştur. Rimkazolün ise IC₅₀ ve IC₂₅ değerlerinin U87MG hücreler üzerindeki kaspaz-3 aktivasyon etkisi daha az olup, sırasıyla % 6,1 ve % 6 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.13 ve 5.14). U87MG hücrelerindeki apoptotik etkilerin, S1RA açısından kaspaz-3 bağımlı olduğunu ancak, rimkazol açısından ise kaspaz-3 etkisi olmadığını

söylenebilir (Çizelge 5.7). Rimkazol için elde edilen bu apoptotik veriler, rimkazol ile daha önce yapılan çalışmalardaki sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, rimkazolün kaspaz-3 bağımlı apoptoza neden olmadığı ancak potansiyel edici bir etkisinin söz konusu olabileceği açıklanmıştır (Happy vd., 2015, s. 683). S1RA için önceden yapılmış herhangi bir kaspaz-3 literatür verisi yoktur.

Bu tez çalışması, sigma reseptörlerinin U87MG glioblastoma kanser hücreleri üzerindeki etkisini araştırmış olup, sigma reseptörü antagonistlerinden S1RA ve rimkazolün U87MG hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkiler ile kaspaz-3 aktivasyonları birlikte değerlendirildiğinde, hücre ölüm sebepleri arasında önemli bir mekanizma olan hücre içi kalsiyum düzeylerini de değerlendirmiştir. Sitolitik kalsiyum miktarının ani yükselmesi ve buna bağlı olarak oluşan ER stresi, çeşitli kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda apoptoz ve hücre ölüm sebepleri arasında gösterilmiştir (Orrenius vd., 1992, s. 357). Buna karşın, 3T3 sağlıklı fibroblast hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada hücre sitozolik kalsiyumun bir miktar artmasının mitojenik aktivite ve yaşamsal faaliyetleri arttırabileceği de açıklanmıştır (Mattie vd., 1994). Sigma reseptörlerinin inhibisyonu ve kalsiyum homeostazı ile kaspaz bağımlı olan ya da olmayan hücre ölümü arasındaki esas ilişki ise, sigma reseptör inhibisyonunun gerçekleşmesi, akabinde şaperon aktivitesinin bozulmasına bağlı olarak protein katlanmasının bozulması ya da durdurulması, UPR (Unfolded protein response; katlanmamış protein yanıtı) yanıtının gecikmesi, ER stres elemanlarının aktive olamaması yönündedir (Hosoi ve Ozawa, 2009, s. 19). Bunun sonucunda ER'den sitoplazmaya kalsiyum çıkışında artış veya sitozolden dışarı ya da mitokondriye girişinde bir azalış mekanizması devreye girmektedir (Schroder ve Kaufman 2005, s. 29). Bu temel mekanizma; sitozolik kalsiyum artışı, mitokondriden sitokrom c salınımı, apoptozom oluşumu ve sonrasında kaspaz-3 aktivasyonu süreçlerini içermektedir (Hanson vd., 2004, s. 933). Buna göre; protein katlanmasından sorumlu önemli bir şaperon proteini olan sigma reseptörleri, antagonistler veya endojen ligandlar tarafından bloke edildiklerinde, ER stresi ve hücre içi kalsiyum artışı birbirlerini bir kaskat mekanizması ile indüklemektedir (Rossi vd., 2011, s. 6210; Spruce vd., 2004, s. 4880). Bu kaskatta, kaynak bilgisi bölümünde de söz edilen IP₃, hücre içi kalsiyumun artışı yanıtında temel öneme sahip bir ER elemanıdır. IP₃ reseptörleri, ER'den kalsiyum iyonlarının giriş ve çıkışını sigma reseptörleriyle birlikte regüle etmektedir. ER stresi meydana geldiğinde bu reseptör aracılığı ile ER'den sitozole kalsiyum çıkışı olur

(Hanson vd., 2004, s. 933). Diğer yandan sfingolipid ailesinin bir üyesi olan antiproliferatif sfingosin, proliferatif S1P (sfingosin-1 fosfat) ve bunu sentezleyen enzimlerden SK₁ ve SK₂ (sfingosin kinaz-1, sfingosin kinaz-2) bu kalsiyum giriş ve çıkışındaki düzenlemelerde aktif olarak rol almaktadır. Burada hücre ölümünü hızlandırıcı etkisi olan faktör, SK₁ ve SK₂ enzimlerinin çalışma fonksiyonlarının bozulmasına bağlı olarak S1P ile sfingosinin arasındaki doğal dengenin bozulması ve sitozolik artmış kalsiyumun ER depolarına geri alımındaki feedback etkisidir (Spiegel ve Milstiens, 2002, s. 25851).

Bu tez çalışmasında S1RA ile rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ değerlerinin uygulandığı U87MG glioblastoma hücrelerindeki hücre içi sitozolik kalsiyumun analizi Fluo-3 kalsiyum indikatörü ile akım sitometri cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçlarına göre, elde edilen histogramlar yorumlandığında ve incelendiğinde 24 saatlik inkübasyon sonucunda S1RA IC₂₅ ve rimkazol IC₂₅ değerlerinin hücrelerin sitozolik kalsiyumlarında gözle görülür bir atışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 5.15). Her iki maddenin IC₅₀ değerlerinde kontrole göre hücre içi sitozolik kalsiyumda artışın düşük gözlenmesi, her iki sigma reseptör antagonist maddenin etkilerinin konsantrasyona ve inkübasyona bağlı olabileceğini göstermektedir. Literatürde rimkazol ile yapılan bir çalışmada maddenin yüksek konsantrasyonlarında sigma-2 reseptör agonistlik etkinin görülebileceği de açıklanmıştır (Gilmore vd., 2004, s. 1). Bu açıdan bakıldığında kalsiyum sonuçlarının konsantrasyon bağımlı olması, rimkazol ilişkili literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir.

Buraya kadar açıklanan deney sonuçları ve bulgular değerlendirildiğinde, antikanser etkide SK₁ ve SK₂ protein sinyal yolunun etkilerini de araştırmak için S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonlarının U87MG hücrelerindeki SK₁ ve SK₂ mRNA ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Sigma reseptörleri ile sfingolipidler arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, sfingolipid ailesinden olan, S1P'nin ve dolayısı ile SK₁ ve SK₂ nin kanser büyümesinde ve ilaç direncinde rol oynadığı açıklanmıştır. SK₂ reseptörünün birçok hücrede, hücre çekirdeğine yakın bölgelerde lokalize olduğu, açıklanmıştır (Hait vd., 2009, s. 1254; Hait vd., 2006, s. 2016). Yapılan çalışmalarda meme kanseri, akut lösemi ve prostat kanseri hücrelerinde SK₁ proteinlerinin yüksek oranda eksprese olduğu gösterilmiştir (Sobue vd., 2008, s. 266; Malavaud vd., 2010, s. 3417). Ayrıca çalışmalarda, SK₁ ve S1P nin glioblastoma

dokusunda hücre agresifliğini ve mitojenitesini arttırdığı açıklanmıştır (Pyne vd., 2016, s. 151; Brocklyn vd., 2005, s. 695). Sigma reseptör antagonistleri ve sfingosin kinaz sinyal yolu ilişkisinde proliferatif etkili S1P'nin temel rolü olduğu düşünülmelidir. Çünkü S1P SK₁ ve SK₂ enzimleri tarafından katalizlenerek sentezlenir (Şekil 2.10). Kanseri hücrelerinde yüksek eksprese olan SK₁ mRNA'sının ekspresyonunu azaltmanın antikanser etkinin oluşmasında önemli bir rol oynayacağı rapor edilmiştir (Heffernan-Stroud ve Obeid, 2013, s. 201).

S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonlarının hücrelere uygulanmasını takiben 24 saat sonraki SK₁ mRNA ekspresyonunun normalize değerleri kontrole göre, Çizelge 5.8'de gösterilmiştir. Buna göre; S1RA IC₅₀ değeri ve rimkazolün IC₂₅ konsantrasyonlarında SK₁ ekspresyonları kontrol grubuna göre azalmış olup, sırasıyla normalize değerleri, 0,61 ve 0,67 olarak belirlenmiştir. S1RA IC₂₅ ve rimkazol IC₅₀ konsantrasyonlarında ise mRNA ekspresyonunda kontrole göre artış meydana gelmiş olup, bu oranlar sırasıyla 2,31 ve 2,27'dir. SK₂ mRNA ekspresyon oranları ise kontrole göre; S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ değerleri sırasıyla, 0,25, 1,88 ve 0,70, 0,50 olarak bulunmuştur (Çizelge 5.10). SK₂ mRNA ekspresyonu S1RA IC₂₅'te kontrole göre bir miktar artarken, S1RA IC₅₀, rimkazol IC₅₀ ve IC₂₅ konsantrasyonlarında azalış göstermiştir.

Gerçek zamanlı PZR sonuçları göz önüne alındığında S1RA'nın IC₅₀ ve rimkazolün IC₂₅ değerlerinin SK₁ ve SK₂ gen ekspresyonlarında azalma meydana getirdiği görülmektedir. SK₁ ve SK₂ mRNA ekspresyonlarının S1RA ve rimkazole göre farklı düzeylerde eksprese olmaları bu ilaçların selektivite farklılıklarından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca U87MG hücrelerinde yapılan bir çalışmada, U87MG hücrelerinde SK₂ gen ekspresyonlarının SK₁ gen ekspresyonlarına göre daha az olduğu gösterilmiştir (Brocklyn vd., 2005, s. 695). Antikanser etkide sfingosin kinaz yolunun etkisi değerlendirildiğinde; SK₁ ve SK₂ mRNA ekspresyonlarının gen üzerinde azalmasına bağlı olarak, hücrede S1P oranları azalır ve antiproliferatif bir sfingolipid olan sfingosinlerin oranı artar. S1P'nin azalması ve sfingosinlerin artmasıyla, hücre içi sitozolik kalsiyum miktarı artış gösterebilir (Şekil 2. 11) (Spiegel ve Milstiens 2002, s. 25851). Hücre içi sitozolik kalsiyumun artmasıyla apoptotik mekanizmalar aracılığı ile ER'de kalsiyum artmasına bağlı stres oluşumu, mitokondriden sitokrom c'lerin

sitoplazmaya salınımı, apoptozom oluşumu gözlenir ve kaspaz-3 aktivasyonu ile hücre ölümü gerçekleşir (Hanson vd., 2004, s. 933).

Özet olarak, gerçek zamanlı PZR analizi ile U87MG kanser hücrelerinde yüksek olan SK₁ gen ekspresyonu, sigma-1 reseptör antagonistlerinden S1RA ve rimkazol baskılanmıştır. S1RA, konsantrasyon ve kaspaz-3 bağımlı apoptoz yolu ile kalsiyum artışına bağlı ölüme götürürken, rimkazol kaspaz-3 dışında bir mekanizma ile hücreleri apoptotik ölüme götürmüş olabilir. İlgili genlerde ekspresyonları azaltan rimkazol IC₂₅ değerinin kalsiyum sonuçlarına bakıldığında, S1RA ile kıyaslandığında, U87MG hücrelerinde 24 saat sonra sitozolik kalsiyumu en fazla arttırmış olduğu gözlemlenmiştir. Ancak S1RA'nın IC₂₅ değerinin hücre içi sitozolik kalsiyum arttırıcı etkisininin yüksek olmasına rağmen, SK₁ gen ekspresyonu üzerinde beklenen etkiyi göstermemiştir. S1RA sigma-1 reseptör antagonistinin IC₅₀ konsantrasyonunda U87MG hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozu ve antiproliferasyonu arttırdığı ancak aynı etkiyi hücre içi sitozolik kalsiyum artışında gösteremediği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, sigma antagonistlerinin apoptozu neden olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak sigma-1 antagonistlerinin kaspaz bağımlı apoptozu neden olabileceği, bunun yanında sigma-2 agonistlerinin kaspaz bağımsız apoptozu neden olabilecekleri gösterilmiştir (Crawford ve Bowen, 2002, s. 313). Rimkazolün sigma-1 reseptörlerine, S1RA kadar spesifik olmadığı bilinmektedir. O yüzden sigma-2 reseptörlerine agonist yoldan etki ederek DNA fragmentasyonu yolu ile kaspaz bağımsız apoptozu neden olduğu düşünülmektedir (Gilmore vd., 2004, s. 1).

Sonuçlar değerlendirildiğinde bu çalışmada, S1RA ve rimkazolün U87MG hücreleri üzerindeki 24. saatteki antiproliferatif etkilerinin SK₁ enzim yolu üzerinden sitozolik kalsiyum artışına neden olabileceği bildirilmiştir. ER stresini tetikleyerek apoptotik etkilerini ise etki ettikleri sigma reseptör alt tipine göre kaspaz-3 bağımlı veya kaspaz bağımsız olarak gösterdikleri düşünülmektedir. Çalışma boyunca koloni formasyon ve MTT deneyleri hariç olmak üzere, S1RA ve rimkazolün her ikisi için de iki farklı konsantrasyon (IC₅₀ ve IC₂₅ değerleri) kullanılmıştır ve uygulanan farklı konsantrasyonlara bağlı olarak, apoptoz oranlarında, kaspaz-3 aktivasyon oranlarında, sitozolik kalsiyum artış miktarında ve SK₁-SK₂ mRNA ekspresyon oranlarında farklılıklar belirlenmiştir. Bu etkilerini sfingolipid ailesinin önemli üyeleri olan, sfingosinin S1P'a çevrilmesinden sorumlu SK₁ ve SK₂ mRNA ekspresyonlarında

meydana getirdikleri azalışlarla da desteklemektedir. SK₁ ve SK₂ mRNA ekspresyonları sonuçları Çizelge 5.8 ve Çizelge 5.9’da verilmiş olup, S1RA’nın IC₅₀ ile rimkazolün IC₂₅ konsantrasyonları, U87MG glioblastoma hücrelerinde SK₁ ve SK₂ mRNA ekspresyonlarını, kontrol grubuna göre az da olsa azaltmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında yeni bir sigma-1 reseptör antagonisti olan S1RA ve sigma reseptör antagonisti rimkazolün, U87MG glioblastoma kanser hücrelerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin karşılaştırılmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır. Buna ek olarak bu ilaçların sfingosin kinaz-1 ve sfingosin kinaz-2 mRNA ekspresyonlarındaki etkileri de araştırılmıştır.

Çalışmanın özgün değeri, sigma reseptör antagonistlerinin antikanser etkilerini sfingosin kinaz, S1P ve dolayısıyla sfingolipid metabolizması üzerinden araştırılması ve yeni bir sigma-1 reseptör antagonisti olan S1RA'nın ilk kez bu tez çalışmasında antikanser etkilerinin araştırılmasıdır. Yapılan literatür çalışmalarında, S1RA'nın yalnızca, deney hayvanlarıyla çalışılan ağrı modellerinde; nöropatik ağrılarda ve ağrılı inflamasyon modellerinde klinik ve prelinik olarak analjezik etkileri gözlenmiş ve belirlenmiştir. Ayrıca, S1RA'nın antikanser etkilerin araştırıldığı, bir literatür çalışması yoktur. Bu sebeple, bu tez çalışmasının sonuçları, gelecekte literatüre kaynak olma açısından önemlidir.

Çalışma sonucunda her iki sigma reseptör antagonisti de U87MG glioblastoma hücrelerinde, MTT testi ve gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile antiproliferatif etkili bulunmuştur. S1RA ve rimkazolün IC₅₀ ve IC₂₅ değerleri hesaplanmıştır ve değerler üzerinden apoptotik analizler, kalsiyum analizi, SK₁ ve SK₂ mRNA ekspresyon analizleri yapılmıştır. Koloni formasyon testi ile her iki maddenin de U87MG hücrelerinin koloni oluşturması üzerinde inhibe edici etkileri artan konsantrasyonlara bağlı olarak gözlenmiştir.

Annexin-V/PI yöntemi ile her iki maddenin de U87MG hücreleri üzerinde umut verici apoptotik etkiler yaptığı gösterilmiştir. Bu etkilerin mekanizmasında kaspaz-3 yolunun etkisini daha iyi anlayabilmek adına, kaspaz-3 aktivasyonu araştırıldığında, S1RA'nın kaspaz-3 aktivasyonunda daha etkili olduğu ve hücreleri kaspaz-3 bağımlı mekanizma ile apoptoza götürdüğü, rimkazolün çok daha düşük bir kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduğu görülmüştür.

Fluo-3 hücre içi kalsiyum analiz sonuçlarına göre, S1RA ve rimkazolün IC₂₅ konsantrasyonlarının, IC₅₀ konsantrasyonlarına oranla daha yüksek oranda hücre içi sitozolik kalsiyumu artırdığı gözlemlenmiştir. Kalsiyumun hücre sitozolünde mitokondri işlevinin bozulmasına bağlı olarak patolojik oranda arttırması, ER stresinin

oluşması ve apoptoza giden yolda önemli bir etki göstermesi açısından sigma reseptör antagonistlerinin U87MG hücrelerini ölüme götürürken kalsiyum ve ER stresi eksenine bağımlı bir mekanizma izledikleri öngörülmüştür.

Sfingolipidlerin ailesinden olan, antiproliferatif etkili sfingosinden, S1P'e dönüşümde katalizleyici enzimler olan sfingosin kinazların (SK₁ ve SK₂'nin) yukarıda bahsedilen mekanizmadaki rolü ve S1RA ile rimkazolün bu enzimlerin mRNA ekspresyonlarında yaptıkları değişiklikler de ilk kez bu tez çalışmasında araştırılmıştır.

Özet olarak, sigma reseptör antagonistleri hücelere uygulandıktan sonra, protein katlanmasından sorumlu bir şaperon protein olan sigma reseptörleri bloke olur. Bu yüzden zamanla katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler ER'de birikirler. Sigma reseptörleri bloke olduğundan UPR (katlanmayan protein yanıtı) oluşamaz ve sonuç olarak ER stresi oluşur. Bununla birlikte, sitozolik kalsiyum strese bağlı ER'de çeşitli elemanların (IP₃, PLC) aracılığı ile daha da artarak patolojik seviyeye ulaşır. Sitozoik kalsiyumun hücre içi kalsiyum depolarına geri akışını durduran sfingosin, S1P-sfingosin dönüşümünden sorumlu SK₁ ve SK₂ mRNA ekspresyonlarının azalmasına bağlı olarak hücrede artar ve kalsiyumun hücre içi depolara geri akışı durma noktasına gelir. Devamında, hücrede kaspaz-3 bağımlı bir apoptotik süreç izlenecekse, artmış sitozolik kalsiyum ve mitokondriden sitokrom c salınımının ardından, apoptozom oluşumu ve sonunda kaspaz-3 aktivasyonu ile programlı hücre ölümü gerçekleşir.

Sonuç olarak, S1RA ve rimkazolün U87MG hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri konsantrasyona bağlı olarak birbirinden ayrılmaktadır. S1RA'nın kaspaz bağımlı apoptozla hücreleri ölüme götürmesi geleceğe yönelik sigma reseptörleri ve reseptör antagonistleriyle yapılacak yeni çalışmalara ışık tutması açısından önem taşımaktadır. Farklı kanser hücrelerinde antikanser etkileri çalışılan rimkazolün (Rybczynska vd., 2013, s. 3; Rybczynska vd., 2008, s. 2049) bu tez çalışması ile U87MG glioblastoma hücrelerindeki antikanser etkileri çalışılmıştır. Yapılan apoptotik analizler, koloni formasyon analizi ve kalsiyum analizi göz önüne alındığında bu çalışmanın, nöropatik ağrı için geliştirilen ilaçlardan S1RA'nın (Faz II) antikanser etkilerinin ilk kez belirlenmesinin önemli bir bulgu olması açısından, kendisi gibi klinik faz çalışmalarında olan veya prelinik çalışmalarda olacak yeni sigma reseptör antagonistlerinin etki mekanizmalarına ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- American Cancer Society. (2017). *Cancer Facts and Figures*. Atlanta: Cancer Statistics Center.
- Anelli, V., Gault, C.R., Cheng, A.B., Obeid, L.M. (2008). Sphingosine Kinase 1 Is Up-regulated during Hypoxia in U87MG Glioma Cells. *J Biol Chem*, 283(6), 3365–3375.
- Aydar, E., Palmer, C.P. and Djamgoz, M.B. (2004). Sigma receptors and cancer: possible involvement of ion channels. *Cancer Res*, 1; 64(15):5029-35.
- Azzariti, A., Colabufo, N.A., Berardi, F. (2006). Cyclohexylpiperazine derivative PB28, a sigma-2 agonist and sigma-1 antagonist receptor, inhibits cell growth, modulates P-glycoprotein, and synergizes with anthracyclines in breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 5, 1807–1816.
- Bauchet, L., Rigau, V., Mathieu-Daude, H., Fabbro-Peray, P., Palenzuela, G., Figarella-Branger, D. (2009). Clinical epidemiology for childhood primary central nervous system tumors. *J Neuro Oncol*, 92, 87–98.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332.
- Benn, S.C. and Woolf, J.C. (2004) Adult Neuron Survival strategies: Slamming On The Brakes. *Nature*, 5(9), 686-700.
- Bleeker, F.E., Molenaar, R.J. and Leenstra, S. (2012). Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neuro Oncol*, 108(1), 11-27.
- Booth, R.G., Owens, C.E., Brown, R.L., Bucholtz, E.C., Lawler, C.P., Wyrick, S.D. (1999). Putative sigma (3) sites in mammalian brain have histamine H(1) receptor properties: evidence from ligand binding and distribution studies with the novel H(1) radioligand [(3)H]-(-)-trans-1-phenyl-3 aminotetralin. *Brain Res.* 837, 95–105.
- Bosanac, I., Alattia, J.R., Mal, TK. (2002). "Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand". *Nature*, 420 (6916): 696–700.

- Bowen, W.D. (2000). Sigma receptors: recent advances and new clinical potentials. *Pharm Acta Helv*, 74, 211–218.
- Brenner, D. and Mak, T.W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 871–877.
- Brocklyn, J.R., Jackson, C.A. and Pearl, D.K. (2005). Sphingosine Kinase-1 Expression Correlates With Poor Survival of Patients With Glioblastoma Multiforme: Roles of Sphingosine Kinase Isoforms in Growth of Glioblastoma Cell Lines. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(8), 695–705.
- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, 100, 391–398.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reversetranscription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169–193.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415, 92–96.
- Clark, M.J., Homer, N., O'Connor, B.D. (2010). U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. MS, Horwitz ed. *PLoS Genetic*, 6(1), e1000832.1-16.
- Crawford, K.W. and Bowen, W.D. (2002). Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines. *Cancer Res.*, 62, 313–22.
- Crawford, K.W., Coop, A. and Bowen, W.D. (2002). Sigma (2) receptors regulate changes in sphingolipid levels in breast tumor cells. *Eur J Pharmacol*, 443, 207 – 209.
- Crowley, L.C., Marfell, B.J., Scott, A.P., Waterhouse, N.J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, 1, (11).

- Collins, V. (2004). Brain Tumours: Classification and Genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75(2), 2–11.
- Cummings, B. S., Wills, L. P., and Schnellmann, R. G. (2012). Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. *Curr Protoc Pharmacol*, 12, 12(8) USA: John Wiley and Sons.
- Curtin, J.F. and Cotter, T.G. (2003). Apoptosis: historical perspectives. *Essays Biochem*, 39, 1-10.
- Dikmen, M. (2017). Aprepitantin İnsan Glioblastoma U87MG Hücreleri üzerinde Antiproliferatif ve Apoptotik Etkileri. *Marmara Pharm J*, 21,156-164.
- Dikmen, M., Kaya-Tilki, E., Engür, S., Öztürk Y. (2017) Neuritogenic Activity Of Epigallocatechin Gallate and Curcumin Combination on Rat Adrenal Pheochromocytoma Cells. *Fresenius Envir. Bull* (26)7, 4726-4733.
- Dikmen, M., Cantürk, Z., Öztürk, Y., Tunalı, Y. (2011). *Cancer Biother Radiopharm*, 25(6): 749-755.
- Dolecek, T.A., Propp, J.M., Stroup, N.E., Kruchko, C. (2009). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro Oncol*, 14,1–49.
- Engür, S. and Dikmen, M. (2017). The evaluation of the anti-cancer activity of ixazomib on Caco2 colon solid tumor cells, comparison with bortezomib. *Acta Clin Belg*. 72(6):391-398.
- Fisher, J.L, Schwartzbaum, J.A, Wrensch, M., Berger, M.S. (2006) Evaluation of epidemiologic evidence for primary adult brain tumor risk factors using evidence-based medicine. *Prog Neurol Surg*, 19, 54-79.
- Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat. Protoc*, 1(5) 2315-9.
- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, JM., Stegh, A. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Dev*, 21, 2683–2710.
- Furuya, H., Shimizu, Y. and Kawamori, T. (2011). Sphingolipids in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30, 567–576.

- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M. Adam, D. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*, 22, 58-73.
- Ganesh, K. and Ross, E.M. (2013). "Mammalian Phospholipase C". *Annu. Rev. Physiol*, 75, 127–154.
- García de la Cadena, S. and Massieu, L. (2016). Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12. *Apoptosis* 21(7): 763-777.
- Gardner, B.M. and Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response, *Science*, 333, 1891–1894.
- Gavrilescu, L.C., and Denkers, E.Y. (2003). Apoptosis and the Balance of Homeostatic and Pathologic Responses to Protozoan Infection. *Infect. Immun*, 71(11), 6109–6115.
- Gilmore, D.L, Liu, Y. and Matsumoto, R.R. (2004). Review of the Pharmacological and Clinical Profile of Rimcazole. *CNS Drug Rev*, 10(1), 1–22.
- Gris, G., Portillo-Salido, E., Aubel, B., Darbaky, Y., Deseure, K., Vela, J.M. (2016). The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different aetiology in rats. *Sci. Rep.* 6, 24591.
- Gupta, V., Zhang, Q.J and Liu, Y.Y. (2011). Evaluation of anticancer agents using flow cytometry analysis of cancer stem cells. *Methods Mol Biol*, 716, 179-91.
- Hait, N.C, Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G.M., Harikumar, K.B., Singh, S.K. (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science*. 4, 325 (5945), 1254-7.
- Hait, N.C., Oskeritzian C.A., Paugh, S.W., Milstien, S., Spiegel, S. (2006). Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1758 (12): 2016-2026.
- Hanson, C.J., Bootman, M.D. and Roderick, H.L. (2004). Cell signalling: IP₃ receptors channel calcium into cell death. *Curr Biol*. 9;14(21):R933-5

- Happy, M., Dejoie, J., Zajac, K.C., Cortez, B., Chakraborty, K. (2015). Sigma-1 Receptor antagonist potentiates the anti-cancer effect of p53 by regulating ER stress, ROS production, Bax levels, and caspase-3 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 456, 683–688.
- Hashimoto, K., (2015). Activation of sigma-1 receptor chaperone in the treatment of neuropsychiatric diseases and its clinical implication. *J Pharm Sci*, 127, 6-9.
- Hayashi, T, and Su, T.P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca^{+2} signaling and cell survival. *Cell*, 131(3), 596-610.
- Heffernan-Stroud, L.A., and Obeid, L.M. (2013). Sphingosine Kinase 1 in Cancer. *Adv Cancer Res*, 117, 201–235.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6(10), 986-994.
- Hengartner, M.O. and Horvitz, H.R. (1994). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev*, 4(4), 581-586.
- Hosoi, T. and Ozawa, K. (2009). Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Clin Sci*, 28, 118(1), 19-29.
- Itagaki, K, and Hauser, C.J. (2003). Sphingosine-1 Phosphate, a Diffusible Calcium Influx Factor Mediating Store-operated Calcium Entry. *J Biol Chem*, 278, (30), 27540–27547.
- Jarozeski, M.J. and Radcliff, G. (1999). Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol* 11, (1) 37-53
- Janssens, N., Janicot, M., Perera, T., Bakker, A. (2004). Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Mol Diagn*, 8(2):107-113.
- Kadio, B., Yaya, S., Basak, A., Djè, K., Gomes, J., Mesenge, C. (2016). Calcium role in human carcinogenesis: a comprehensive analysis and critical review of literature. *Cancer Metastasis Rev*, 35(3), 391-411.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257.

- Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C.P., O'Carroll, S.J. (2015). Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors*, 5(2), 199–222.
- Khosla, D. (2016). Concurrent therapy with radiation in glioblastoma. *Ann Transl Med*, 4(3), 54.
- Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(3), 215-225.
- Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M. (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*, 130, 2596–2606.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16, 3–11.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-3), 95-125.
- Lee, A.S. (2005). The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*, 35, 373–381.
- Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C.X. (2000). Edg-1, the G protein coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*, 106, 951-961.
- Louis, D.N., Ohgaki, H. and Wiestler, O.D. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*, 114(2):97-109.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., Deimling, V.A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 131 (6) 803-820.
- Malavaud, B., Pchejetski, D., Mazerolles, C., de Paiva, G.R., Calvet, C., Doumerc, N. (2010). Sphingosine kinase-1 activity and expression in human prostate cancer resection specimens. *Eur J Cancer*. 46(18), 3417-24.

- Mavlyutov, T.A. and Ruoho, A.E. (2007). Ligand-dependent localization and intracellular stability of sigma-1 receptors in CHO-K1 cells. *J Mol Sign*, 2, 1-7.
- Marlina, S., Shu, M.-H., AbuBakar, S., Zandi, K. (2015). Development of a Real-Time Cell Analysing (RTCA) method as a fast and accurate screen for the selection of chikungunya virus replication inhibitors. *Parasit. Vectors*, 8, 579. 1-10.
- Marrero, I. and Déniz, A. (2004). The phospholipase C-InsP3 pathway is involved in calcium mobilization induced by growth hormone in hepatocytes. *Growth Horm Igf Res*, 14(2):85-90.
- Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL β . *Mol Cell*, 10, 417–426.
- Mattie, M., Brooker, G. and Spiegel, S. (1994). Sphingosine-1-phosphate, a Putative Second Messenger, Mobilizes Calcium from Internal Stores via an Inositol Trisphosphate-independent Pathway *J. Biol. Chem.* 269, 3181-3188.
- McIlwain, D.R., Berger, T. and Mak, T.W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5,(4) a008656.1-28.
- Merritt, J.E., McCarthy, S.A. and Davies, M.P.A. (1990). Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca^{2+} in platelets and neutrophils. *Biochem. J.* 269, 513-519.
- Moniri, R., Young, A., Reinheimer, K., Rayat, J., Dai, L.J., Warnock, G. L. (2015). Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology*, 67(2), 379–386.
- Mueller, B.H., Park, Y., Daudt, D.R., Ma, H.Y., Akopova I, Stankowska D.L. (2013). Sigma-1 receptor stimulation attenuates calcium influx through activated L-type Voltage Gated Calcium Channels in purified retinal ganglion cells. *Exp Eye Res.*, 107, 21-31.
- Munshi, A., Hobbs, M. and Meyn, R.E. (2005). Clonogenic Cell Survival Assay *Methods Mol. Med*, 110, 21-28.
- Nagaishi, M., Nobusawa, S., Yokoo, H., Sugiura, Y., Tsuda, K., Tanaka, Y. (2013). Genetic mutations in high grade gliomas of the adult spinal cord. *Brain Tumor Pathol*, 33(4): 267-269.

- Narayanan, S., Bhat, R. and Mesangeau, C. (2011). Early development of sigma receptor ligands. *Future Med. Chem*, 3 (1) 79–94.
- National Laboratory of Enteric Pathogens (NLEB), Bureau of Microbiology. (1991). The polymerase chain reaction: An overview and development of diagnostic PCR protocols at the LCDC. *Can J Infect Dis*, 2(2), 89–91.
- Ogretmen, B., and Hannun, Y. A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev. Can*, 4, 604–616.
- Onishi, M., Kurozumi, K., Ichikawa T., Date, I. (2013). Mechanisms of Tumor Development and Anti-angiogenic Therapy in Glioblastoma Multiforme, *Neurol Med Chir* , 53, 755–763.
- Orrenius, S., McCabe, M.J. and Nicotera, P. (1992). Ca^{2+} -dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett*, 64 (65), 357-64.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B. and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium apoptosis link, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 552–565.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H. and Xu, J. (2016) CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol*, 18 (5):1–75.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Farah, P, Ondracek. A, Chen Y, Wolinsky Y. (2013) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro Oncol*, (2)1-56.
- Oyadomari, S., and Mori. M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 11, 381–389.
- Park, G.B., Kim, Y.S., Lee, H.K., Song, H., Cho, D.H., Lee, W.J., Hur, D.Y. (2010). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of EBV-transformed B cells by cross-linking of CD70 is dependent upon generation of reactive oxygen species and activation of p38 MAPK and JNK pathway. *J Immunol.* 185(12), 7274-84.

- Penke, B., Bogár, F. and Fülöp, L. (2017). Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. *Molecules*, 22, 1692.
- Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9(3), 157-173.
- Porter, A.G. and Jaenick, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6, 99 – 104.
- Putney, J.W. and Tomita, T. (2012). Phospholipase C Signaling and Calcium Influx. *Adv Biol Regul*. 52(1), 152–164.
- Pyne, N.J., McNaughton, M., Boomkamp, S., MacRitchie, N., Evangelisti, C, Martelli, A.M., Jiang, H.R. (2016). Role of sphingosine 1-phosphate receptors, sphingosine kinases and sphingosine in cancer and inflammation. *Adv Biol Regul*, 60, 151-159.
- Pyne, N.J., Tonelli, F., Lim, K.G., Long, J.S., Edwards, J. Pyne, S. (2012). Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer. *Biochem Soc Trans*, 40, (1). 94-100.
- Rafehi, H., Orlowski, C., Georgiadis, G.T., Ververis, K., El-Osta, A., Karagiannis, T.C. (2011). Clonogenic Assay: Adherent Cells. *JoVE*, 49, pii 2575.
- Ranjit, M., Motomura, K., Ohka, F. (2015). Applicable advances in the molecular pathology of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol*, 32, 153.
- Reynolds, P.C., Maurera, B.J. and Kolesnick, R.N. (2004). Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett*, 206 (2), 169–180.
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., Barreda, D. R. (2011). Modified Annexin-V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. Journal of Visualized Experiments. *JoVE*, (50), 2597. (Erişim Tarihi: 4.11.2017).
- Rizzuto, R., Duchen, M.R. and Pozzan, T. (2004). Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Sci. STKE*, 215, pp. re1.
- Romero, L., Zamanillo, D. and Nadal, X. (2012). Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *Br. J. Pharmacol*. 166, 2289–2306.

- Rossi, D., Pedrali, A., Urbano, M., Gaggeri, R., Serra, M., Fernández, L. (2011). Identification of a potent and selective σ_1 receptor agonist potentiating NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Bioorg Med Chem*, 1, 19(21), 6210-24.
- Rui, M., Rossi, D., Marra, A., Paolillo, M., Schinelli, S., Curti, D. (2016). Synthesis and biological evaluation of new aryl-alkyl(alkenyl)-4-benzylpiperidines, novel Sigma Receptor (SR) modulators, as potential anticancer-agents. *Eur J Med Chem*, 29, (124), 649-665.
- Ruscher, K. and Wieloch, T. (2015). The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration. *J Pharm Sci*, 127(2015), 30-35.
- Rybczynska, A.A., Dierckx, R.A., Ishiwata, K., Elsinga, P.H., Waarde, A.V. (2008). Cytotoxicity of s-Receptor Ligands Is Associated with Major Changes of Cellular Metabolism and Complete Occupancy of the s-2 Subpopulation. *J Nucl Med*, 49, 2049-2056.
- Rybczynska, A.A., Bruyn, M., Ramakrishnan, N.K., Jong, J.R., Elsinga, P.H., Helfrich, W. (2013). In Vivo Responses of Human A375M Melanoma to a s Ligand: 18F-FDG PET Imaging. *J Nucl Med*, 54, 1-8.
- Ryland, L.K., Fox, T.E., Liu, X., Loughran, T.P., Kester, M. (2011). Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biol Ther*, 11(2), 138-149.
- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91, 443–446.
- Schwab, M. (2011). Endoplasmic Reticulum Stress. *Encyclopedia of Cancer*, (ed.), Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Scheurer, M.E., Etzel, C.J., Liu, M., El-Zein, R., Airewele, G.E., Malmer, B. (2007). Aggregation of cancer in first-degree relatives of patients with glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16, 2491–2495.
- Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein *Mutat Res*. 6;569 (1-2), 29-63.
- Shah, A.K. (1998). Mitochondrial Role in the Signal Transduction Pathway of Ceramide-Induced Apoptosis, *J Young Invest*.

- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*, 22(4), 526–539.
- Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Sci*, 13(8), 1979–1987.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*, 66(1):7-30
- Slee, E.A., Adrain, C. and Martin, S.J. (2001). Executioner caspases-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276 (10), 7320-7326.
- Snyder, H., Robinson, K., Shah, D., Brennan, R., Handrigan, M. (1993). Signs and symptoms of patients with brain tumors presenting to the emergency department. *J Emerg Med*, 11(3):253-258.
- Sobue, S., Nemoto, S., Murakami, M., Ito, H., Kimura, A., Gao, S., Furuhashi, A. (2008). Implications of sphingosine kinase 1 expression level for the cellular sphingolipid rheostat: relevance as a marker for daunorubicin sensitivity of leukemia cells. *Int J Hematol*, 87(3), 266-275.
- Spiegel, S. and Milstien, S. (2002). Sphingosine 1-Phosphate, a Key Cell Signaling Molecule. *J Biol Chem*, 277(29), 19, 25851–25854.
- Spiegel, S. and Merrill, A.H.J. (1996). Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J*. 10, 1388-1397.
- Spruce, B.A., Campbell, L.A. and McTavish, N. (2004). Small Molecule Antagonists of the sigma-1 Receptor Cause Selective Release of the Death Program in Tumor and Self-Reliant Cells and Inhibit Tumor Growth in Vitro and in Vivo. *Cancer Res*, 64, 4875–4886.
- Srinivasan, R., Manoj L., Kalyani M., Jyothi, K., Bhavani, G., Govardhani, V. (2011). Review Of Brain And Brain Cancer Treatment. *Int J Pharma Bio Sci*, 2(1) 468.
- Strong, M.J., Garces, J., Vera, J.C., Mathkour, M., Emerson, N. (2015). Brain Tumors: Epidemiology and Current Trends in Treatment. *Brain Tumors Neuro Oncol*, 1, 102.

- Stockert, J.C., Blázquez-Castroa, A., Canete, M., Horobinb, R.W., Villanueva, A. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem*, 114, 785–796.
- Suh, P.G., Park, J.I., Manzoli, L., Cocco, L., Peak, J.C., Katan, M. (2008). Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep*, 41, 415–434.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, M.A., Samali, A. (2006). Mediators of ER stress-induced apoptosis. *EMBO Reports*, 7, 880–885.
- Tokiwa, T., Hoshika, T., Shiraishi, M. Sato, J. (1979). Mechanism of cell dissociation with trypsin and EDTA. *Acta Med Okayama*, 33(1), 1-4.
- Tretyn, A., Kado, R.T. and Kendrick, R.E. (1997). Loading and localization of Fluo-3 and Fluo-3/AM calcium indicators in sinapis alba root tissue. *Folia Histochem Cytobiol*, 35(1), 41-51.
- Upadhye, Y., Watt, S., Spruce, B.A., Bowen, T.D. (2005). Rimcazole - A Sigma Receptor Antagonist - As a Potential Novel Therapy for Acute Myeloid Leukemia and Myeloma. *Blood*, 106,(11) 2486.
- Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., de Souza, P. R. E., de Carvalho, A., Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbio*, 40(1), 1–11.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G.J. and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Bio*, 731, 237-245.
- Vidal-Torres, A., Fernández-Pastor, B., Carceller, A., Vela, J.M., Merlos, M., Zamanillo, D. (2014). Effects of the selective sigma-1 receptor antagonist S1RA on formalin-induced pain behavior and neurotransmitter release in the spinal cord in rats. *J. Neurochem*. 129, 484–494.
- Waarde, A.V., Rybczynska, A.A., Ramakrishnan, N.K., Ishiwata, K., Elsinga, P.H. Dierckx, R. (2010). Sigma Receptors in Oncology: Therapeutic and Diagnostic Applications of Sigma Ligands. *Curr Pharm Des*, 16, 3519-3537.

- Waldron, RT., Stephen. P., Aurelia. L., and Guy. G. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response in Exocrine Pancreas Physiology and Pancreatitis. *APA*, 3-12.
- Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*, 10, 2859–2869.
- Wang, B., Rouzier, R., Albarracin, C.T., Sahin, A., Wagner, P. (2004). Expression of sigma-1 receptor in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 87, 205–214.
- Warnick, R. (2016). Brain Tumors: An Introduction, *Mayfield Clinic* (Erişim Tarihi 15.11.2017).
- Wen, P.Y. and Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359, 492-507.
- Wheeler, K.T., Wang, L.M., Wallen, C. A., Childers, S. R., Cline, J. M., Keng, P. C. (2000). Sigma-2 receptors as a biomarker of proliferation in solid tumours. *Bri J Cancer*, 82(6), 1223–1232.
- Wilkerson, M.J. (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 42(1), 53-71.
- World Health Organisation, Media Center, (2017). Cancer, Fact Sheet, Şubat, (Erişim tarihi: 29.11.2017).
- Wrensch, M., Minn, Y. and Chew, T. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature, *Neur-Oncol*, 4(4) 278-299.
- Wu, H., (2014). Cell Death, Mechanism and Disease Wu, H.(ed) s.43 New York,USA: Springer.
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dav'e, U. P., Prywes, R., Brown, M. S. Goldstein, J. L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell*, 6, 1355–1364.
- Yin, X. (2000). Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-RI death receptors in hepatocytes. *J. Mol. Med*, 78, 203–211.