

EGE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA

PROJE KESİN RAPORU

EGE UNIVERSITY SCIENTIFIC
RESEARCH PROJECT REPORT

PROJE NO: 2013-TIP-089

(Araştırma)

**Thioridazine/Docetaxel Kombinasyonunun Meme Kanseri Kök Hücre ve Meme
Kanseri Hücre Kültürlerindeki Sitotoksik, Apoptotik ve Epitelyal Mezenkimal Geçiş
Olaylarındaki Etkilerinin Araştırılması**

PROJE YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Rüçhan USLU

ARAŞTIRMACILAR

Doç. Dr. Burçak KARACA

Yüksek Lisans Öğrencisi Özge ÖZER

Doktora Öğrencisi Aslı KISIM

Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD

School of Medicine

Department of Internal Medicine

Bornova-İZMİR

2016

ÖNSÖZ

Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonuna projemize verdikleri destek nedeniyle teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL DİZİNİ	iv
KISALTMA VE SEMBOLLER DİZİNİ	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM	6
3.1. İnsan Meme Kanseri Hücre Hatlarının Laboratuvar Ortamına Adaptasyonu ve Çoğaltımı	6
3.2. Thioridazine'in Stok Solüsyonunun Hazırlanması	6
3.3. Meme Kanseri Hücrelerinin Sayımı	6
3.4. Akım Sitometrisi	7
3.5. Thioridazine'in Antiproliferatif Etkilerinin Belirlenmesi	7
3.6. Sitotoksik Etkilerin Hangi Yollarla Gerçekleştiğine Dair Hipotezlerin Test Edilmesi	8
3.6.1. Dopamin 2 Reseptör Miktarının Ölçülmesi	8
3.6.2 Dopamin Aktivatör Transporterların İnhibe Edilmesi	8
3.7. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	8
3.7.1. Thioridazine Molekülünün Anti-Apoptotik Etkilerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi	8
3.7.2. Anneksin V Yöntemi	9
3.8. Otofajinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	9
3.8.1. Western Blot	9
3.8.2. Chloroquine diphosphate salt İnhibitörü Deneyleri ile Otofajinin Doğrulanması	10
3.8.3. Monodansylcadaverine (MDC) Boyama Yöntemi ile Otofajik Vakuollerin Görüntülenmesi	10
3.9. Epitelyal-Mezenkimal Geçişin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	11
3.9.1. İnvazyon Deneyi/Scratch Deneyi	11
3.9.2. Migrasyon Deneyi	11
3.9.3. Immunositokimya	11

3.10. İstatistiksel Analiz	12
4. BULGULAR	13
4.1. Meme Kanseri ve Kök Hücre Kültürlerinde Thioridazine'in Hücre Canlılığına Etkileri	13
4.2. Çalışılan Hücre Kültürlerinde Dopamin 2 Reseptör Miktarı	13
4.3. Dopamin Aktivatör Taşıyıcıların İnhibe Edildiğinde Thioridazine'in Gösterdiği Sitotoksik Etkiler	14
4.4. Sitotoksik Etkinin Neden Olduğu Hücre Ölüm Çeşitleri	15
4.4.1. Apoptotik Etkiler	15
4.4.2. Otofajik Etkiler	16
4.4.2.1. Otofaji görülen MDA-MB-231 hücrelerinde, otofajinin inhibitör (Chloroquine) varlığında WB yöntemi ile doğrulanması	16
4.4.2.2. Otofaji görülen MDA-MB-231 hücrelerinde, bu ölüm tipinin EMT ile ilişkisinin ortaya konması (Chloroquine varlığında EMT belirteçlerine bakılması)	17
4.5. Thioridazine'nin Epitelyal Mezenkimal Geçişteki Etkileri	18
4.5.1. İnvazyon Potansiyeli	18
4.5.2. Migrasyon Potansiyeli	18
4.5.3. Epitelyal Mezenkimal Belirteçleri Ekspresyon Durumları	19
4.5.4. Epitelyal-mezenkimal geçişin immunositokimyasal yöntemle doğrulanması (E-cad ve Vimentin belirteçleri ile)	20
5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	22
KAYNAKLAR	24

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Thioridazine ile 24 saat muamele edilmiş CD44+/CD24-, MDA-MB-231, MCF-10A, hücre kültürlerinde sitotoksik etkinin XTT canlılık testi ile ölçülmesi	13
Şekil 2: MDA-MB-231 ve CD44+/CD24- hücre kültürlerinde DRD2'nin bazal ve THZ'nin artan konsantrasyonlarında ekspresyon durumunun belirlenmesi	14
Şekil 3: Dopamin aktivatör transport inhibitörü (Threo-methylphenidate hydrochloride) ile 2 saat ön muamele edilen MDA-MB-231 ve CD44+/CD24- hücrelerinde THZ'nin IC ₅₀ uygulaması sonrası sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	14
Şekil 4: Thioridazine'in apoptotik etkilerinin DNA Fragmentasyonu (ELISA) ve Anneksin V yöntemi ile ölçülerek karşılaştırılması	15
Şekil 5: THZ'nin IC ₅₀ konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattında otofajik belirteçlerin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi.....	16
Şekil 6: Otofaji olduğu gösterilen MDA-MB-231 hücre hattında, otofajik belirteçlerden LC3 ve Beclin-1 ekspresyonunun Chloroquine (CQ=50µM) inhibitörü varlığında doğrulanması.....	17
Şekil 7: THZ'nin IC ₅₀ (9µM) konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattında otofaji inhibitörü, Chloroquine (CQ, 50µM), varlığında epitelyal-mezenkimal belirteçlerden E-cad ve Vimentin ekspresyonunun gösterilmesi.....	17
Şekil 8: THZ'nin IC ₅₀ konsantrasyonlarına maruz bırakılan MDA-MB-231, ve CD44+/CD24- hücrelerinde yüzde invazyon kapasitesinin ölçülmesi	17
Şekil 9: THZ'nin IC ₅₀ konsantrasyonlarına maruz bırakılan MDA-MB-231 ve CD44+/CD24- hücrelerinde migrasyon kapasitesinin ölçülmesi	18
Şekil 10: THZ'nin IC ₅₀ konsantrasyonlarına 24 saat maruz bırakılan MDA-MB-231 ve CD44+/CD24- hücrelerinde epitelyal ve mezenkimal moleküllerdeki değişim oranları.....	19
Şekil 11: E-cad ve Vimentin moleküllerinin Immunositokimya yöntemi ile gösterilmesi.....	20

KISALTMA ve SEMBOLLER DİZİNİ

ATP	: Adenozin trifosfat
Atg5	: Autophagy Related 5/Otofaji ilişkili gen 5
Beclin-1	: Moesin-Like BCL2 Interacting Protein
CK-18	: Sitokeratin 18
CDC25A	: Cell Division Cycle 25A
CQ	: Chloroquine diphosphate salt
DAB	: Diaminobenzidine
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DAT	: Dopamin aktivatör transport
DR2	: Dopamin reseptör 2
DRD2	: Dopamin reseptör dpoamin 2
E-cad	: Epitelyal Kaderin
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	: Enzyme-linked Immunosorbant Assay
EMT	: Epitelyal-mezenkimal geçiş
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-Phosphate
HIF	: Hypoxia-Inducible Factor
HRP	: Horseradish peroxidase
IC	: İnhibitör Konsantrasyon-Inhibitory Concentration
LC-3	: Light Chain 3
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MDC	: Monodansylcadaverine
N-cad	: Nöronal kaderin
PI3K	: Phosphatidylinositol 3-Kinase
p21	: Protein 21
p16	: Protein 16
PBS	: Phosphate-buffered saline
RAS	: Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
STAT	: Signal Transducer And Activator Of Transcription
p62	: Protein 62

TGF-β	: Transforming Growth Factor Beta
THZ	: Thioridazine
VEGF	: Vasküler endotelyal çoğalma faktörü
XTT	: 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5carboxanilide
WB	: Western blot

ÖZET

Thioridazine/Docetaxel Kombinasyonunun Meme Kanseri Kök Hücre ve Meme Kanseri Hücre Kültürlerindeki Sitotoksik, Apoptotik ve Epitelyal Mezenkimal Geçiş Olaylarındaki Etkilerinin Araştırılması

Önerilen bu çalışmanın birincil amacı; antipsikotik olarak kullanılan Thioridazine molekülünün, sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin meme kanseri kök hücre kültürlerinde ve heterojen yapıdaki meme kanseri hücre kültürlerinde karşılaştırmalı olarak belirlenmesidir. İkincil amacı; görülen sitotoksik etkinin hücrelerde hangi tip ölüme yol açığının belirlenmesidir. Üçüncül amacı ise; kanserde sıkça görülen bir sorun olan Epitelyal-mezenkimal geçişte (EMT) bu etkiyi geri döndürücü etkisinin olup olmayacağı ve bu olayda rol oynayan moleküller üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmada kullanılan MDA-MB-231, CD44+/CD24-, kök hücre olmayan kanser hücreleri ve MCF-10A, Thioridazine'in artan konsantrasyonlarıyla (1-30 μ M), 12, 24, 48, 72 saatlik zaman dilimlerinde muamele edildi. XTT tabanlı canlılık testi kullanılarak, sitotoksikite yüzdeleri hesaplandı. Thioridazine'nin hücre içi alımının Dopamin 2 reseptörleri üzerinden gerçekleştiği hipotezi dikkate alınarak, çalışılan hücrelerdeki reseptör miktarı ELISA yöntemi ile belirlendi. Sitotoksik etkinin apoptozis veya nekroza bağlı olup olmadığı ELISA yöntemi ile histon-DNA fragmentasyonu ölçülerek kanıtlandı. EMT'nin araştırılmasında, invazyon, migrasyon ve western blot yöntemlerinden yararlanıldı.

MDA-MB-231 ve CD44+/CD24-, hücrelerinde Thioridazine'in erken dönemde (24. saat) etkili olduğu gösterildi. Bu süreye ait IC50 değerleri sırasıyla, 18.1 μ M ve 9 μ M olarak hesaplandı. Dopamin 2 reseptörünün bazal miktarı, CD44+/CD24- için 868.5 ng/mL, MDA-MB-231 için 1115.4 ng/mL olarak tespit edildi. Thioridazine'in artan konsantrasyonlarına bağlı olarak dopamin 2 reseptör miktarında azalma gözlemlendi.

Antiproliferatif etkinin, MDA-MB-231 hücrelerinde otofajiye yol açarken, CD44+/CD24- hücrelerinde apoptozise yol açtığı belirlendi. Her iki hücre hattında da EMT'yi indükleyen moleküllerde (N-kaderin, Fibronektin, Vimentin) azalma gözlenirken, E-kaderin, CK-18 gibi epitelyal belirteçlerin ekspresyonunun arttığı gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Thioridazine, Meme kanseri, Sitotoksikite, Apoptozis, Otofaji, EMT

ABSTRACT

The cell lines (MDA-MB-231, CD44+/CD24-, non cancer stem cells and MCF-10A) were incubated with increased concentrations of Thioridazine (1-30 μ M) for 12, 24, 48, 72 hours. XTT based viability assay was used to calculate the percentage cytotoxicity. Considering the hypothesis that intracellular uptake of Thioridazine via dopamine 2 receptor, the level of dopamine 2 receptor was determined by ELISA method. Apoptosis and necrosis were confirmed by measuring histon-DNA fragmentation.

Thioridazine was shown to be effective at early time point (24 hours) in MDA-MB-231 and CD44+/CD24- cells. The IC₅₀ values at 24 hours were found 18.1 μ M and 9 μ M in MDA-MB-231, CD44+/CD24-, respectively. The basal amount of dopamine 2 receptor were 868,5 ng/mL and 1115,4 ng/mL in CD44+/CD24- and MDA-MB-231 respectively.

The antiproliferative effect showed autophagy in MDA-MB-231 cells while apoptosis was observed in CD44+/CD24- cells. In both cell lines that molecules which induce EMT (N-cadherin, fibronectin, Vimentin) observed decreasing while E-cadherin, CK-18 and beta-catenin were observed increasing as epithelial markers.

Keywords: Thioridazine, Breast Cancer, Cytotoxicity, Apoptosis, Autophagy, EMT

1. GİRİŞ

Kansere bağılı ölümler arasında, akciğer kanserlerinden sonra kadınların ölümüne en fazla sebep olan meme kanserinin büyük bir bölümü meme epitel kaynaklıdır. Kadınlarda görülen kanserler arasında yaygınlığı en yüksek (% 41) tümördür (Jemal ve ark., 2012). Kanser, heterojen bir hastalık olup, tek bir hücredeki çoklu moleküler işlemlerin etkileşiminden kaynaklanır. Kanser olgusunda, genetik, epigenetik, metabolik, hücre içi ve hücreler arası haberleşme, hücre enerji akışı gibi olayların ve metabolitlerin düzenlenmesinde ve kontrolünde farklılaşmalar meydana gelir. Ayrıca, kanserin oluşumunda tamir edilemeyen DNA hasarlarının kalıcı hale gelmesinin de rolü vardır. Mutasyonların çoğu tamir edilemeyen ve nesilden nesile aktarılan kalıtsal DNA hasarlarıdır. Kanser hücrelerinde oluşan DNA hasarlarının büyük bir oranı, DNA tamir sistemleriyle onarılır ve ya hücre kendini ölüme götürür. Normal dokularda ise hücre çoğalması ile apoptozise bağılı hücre kayıpları arasında uyumlu bir denge vardır. DNA hasarı, tamir edilemez ve hücre kendini ölüme yönlendiremezse, hasarlar kanser için önemli bir zemin oluşturur. Genetik düzlemde, genomda meydana gelen nokta mutasyonları, translokasyonlar, amplifikasyonlar, insersiyonlar, delesyonlar, heterozigote kaybı ve DNA'nın topolojisinde değişiklikler gözlenebilir. Yapılan araştırmalarda bir tümör hücresinde, yaklaşık 140 gen değişimi olduğu ve bunun intragenik mutasyonlara neden olduğu gösterilmiştir. Tümör hücresinin sürekli çoğalmasına yol açan mutasyonlar, hücrelerin yaşamını destekleyen ve genomun sağlıklı bir şekilde idamesinde görev alan MAPK, STAT, TGF- β , RAS, PI3K gibi birçok sinyal yolağıyla ilişkilidir. Bir tümör hücresinde 2 ile 8 tane kanser fenotipini ortaya çıkaran ve devam ettiren mutasyon meydana gelmektedir. Epigenetik düzlemde de, epigenetikle ilgili genlerde meydana gelen mutasyonlar, epigenetik mekanizmaların akışını bozarak, kanser hücrelerine çoğalma avantajı sunmaktadır. Tümörlerde meydana gelen genetik değişimler tümör hücresine spesifik olsa da, tümör hücrelerinin kullandığı ve aktifleştirdiği/inaktifleştirdiği sinyal yolakları ortak olabilmektedir (Vogelstein ve ark., 2013). Genetik ve epigenetik bilgidaki değişiklikler, DNA hasarının onarılıp onarılamaması, kontak inhibisyonun ortadan kalkması, apoptozisden kaçan tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına sebep olur (Raymond ve ark., 2007).

Kanser hücreleri ayrıca normal hücrelerden daha farklı bir metabolik işleyişe sahiptir. 1924'te Otto Warburg, kanser hücrelerinin başlıca özelliklerinden biri olan, kanser hücrelerinin glikozu glikolizis yolu ile metabolize ettiğini keşfetmiştir. Warburg'a göre kanser hücreleri, ATP sentezi için, oksijen yolunu değil, glikolizis yolunu seçer ve bu olay

Warburg etkisi olarak isimlendirilir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise, Warburg etkisinin hangi mekanizmalarla ilişkili olduğu aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu olay; tümör mikroçevresi ve HIF, onkogen aktivasyonu, tümör baskılayıcı moleküllerin inaktivasyonu, mitokondride oluşan fonksiyonel bozukluklar, epigenetik değişiklikler, miRNA'lar, glutamin metabolizması, post-translasyonel modifikasyonlar gibi mekanizmaları etkilemektedir (Mohita ve ark., 2013).

Tümörler köken aldıkları hücelere ve bulundukları organlara göre karakteristik özellik gösterir. Morfolojileri, antijen ekspresyonları, çoğalma oranları, hücre-hücre etkileşimleri, reseptörleri, metastaza yatkınlıkları, kemoterapötik ajanlara hassasiyetleri farklılık göstermektedir. Heterojen bir hastalık olması nedeniyle meme kanseri, her hastada ve hatta hastalığın her evresinde farklı genotipik ve fenotipik özellik gösterir. Meme kanseri günümüzde yüksek moleküler teknolojiler sayesinde alt tiplere sınıflandırılarak, tedaviye yönelik spesifik yaklaşımlar üzerinde araştırmalar devam etmektedir. Özellikle normal hücelere zarar vermeden spesifik olarak tümör hücrelerinin hedeflenmesi, homeostasisin sağlanmasında büyük önem taşımaktadır.

Tümör heterojenitesi, kanser kök hücreleri ile kök hücre olmayan hücrelerin birlikte bulunmasıdır. Kanser etiyolojisini açıklamada, kanser kök hücreleri ve klonal evrim hipotezi yaygın olarak kullanılır (Polyak ve Campbell, 2007). Kanser kök hücreleri, kanser hücrelerinden farklılaşma özelliği ile ayrılır. Kanser kök hücreleri, Wnt/ β -katenin, Notch, Hedgehog gibi farklılaşmada görev alan moleküler sinyal yollarını kullanırlar. Kanser kök hücreleri, normal kök hücreler gibi kendi popülasyonlarını kontrol etme potansiyeline sahip değildir. Bu bilgi, kanser kök hücrelerinin homeostasisinin ve nişlerinin bozulduğunu kanıtlar. Sağlıklı kök hücreler, tekrarlayan mutasyonlara maruz kaldıklarında ve strese girip apoptozise gidemediklerinde kanser kök hücrelerine dönüşebilirler. Bu nedenle kök hücrelerin sahip olduğu nişteki sinyal yollarının sağlıklı bir şekilde kontrol edilip ve düzenlenmesi oldukça önemlidir. Sınırlı bölünme limitlerini kaybeden kök hücreler sınırsız çoğalma potansiyeli kazanırlar (Guy ve ark., 2011).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

1950’li yıllarda geliştirilen Thioridazine molekülünün psikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılması sınırlandırılmayarak molekülün sahip olduğu diğer özelliklerin başka hangi hastalıklarda da işe yarayabileceği araştırılmaya başlanmıştır. Thioridazine molekülünün, antiproliferatif, antimikrobiyal, anti-oksidan özellikler taşıması bu molekülü araştırılmaya değer kılmıştır. Thioridazine (10-[2-(1-methyl-2-piperidyl) ethyl]-2-methylthio-phenothiazine), phenothiazine sınıfından olup, moleküler ağırlığı 407.04 g/mol’dür. Dopamin reseptörlerini inhibe ederek etkisini gösteren bu ajanın şizofreni tedavisinde ve diğer psikiyatrik hastalıklarda kullanımı oldukça yaygındır. Ayrıca, kanser kök hücresi hedefli olan bu ajan normal hücrelere zarar vermezken kanser kök hücrelerinde sitotoksik etki göstermektedir (Strobl ve ark., 1990). Bu ajanın, bir nörotransmitter olan dopamin reseptörünü inhibe etmesi, meme kanseri kök hücrelerindeki dopamin reseptörlerine bağlanarak etkisini göstereceğini düşündürmektedir. Meme kanseri kök hücrelerinin dopamin reseptörleri ekprese ettiği Bhatia ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Yüksek teknolojiler ile test edilen 590 tane ajan arasından sadece Thioridazine’in kanser kök hücrelerine spesifik olarak etki gösterdiği tespit edilmiştir (Sachlos ve ark., 2012).

1999 yılında yapılan bir çalışmada Lialiaris ve Pantazaki, Thioridazine molekülünün doza bağlı olarak DNA’yı etkilediğini jel elektroforezinde nükleik asit bantlarının kaybolduğunu göstererek kanıtlamışlardır. İnterkalator özelliği sayesinde DNA’nın yapısını değiştirerek major oluşuna bağlanıp, replikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarını inhibe etmektedir (Lialiaris ve ark., 1992). Yapısında bulunan aromatik N-dialkil grubu Thioridazine molekülüne bu özelliği kazandırmaktadır (Amaral ve Kristiansen, 2001).

Curti ve ark.’nın 2002 yılındaki çalışmasında ise; Thioridazine’nin sıçan karaciğerinden izole edilen mitokondride antioksidan aktivite göstererek, reaktif oksijen türevlerinin ve sitokrom c’nin salınımına yol açtığını böylece apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (Curti ve ark., 2002).

Thioridazine’nin de içlerinde bulunduğu Phenothiazine sınıfına ait ilaçlarla yapılan bir çalışmada, bu ilaçların hücre canlılığı üzerine etkileri lösemi hücre hatlarında ve normal lenfositlerde karşılaştırılarak çalışılmıştır. Phenothiazine molekülü lösemi hücre hatlarında 0.1–10 μ M dozlarda sitotoksik etki göstermezken, Thioridazine molekülü 5-10 μ M dozlarda sitotoksik etki göstermiştir. Bu sınıfa ait ilaçlardan uygun dozlarda en etkin olanın Thioridazine olduğu ve normal lenfositlerde sitotoksik etki göstermeyerek apoptozisi

uyardığı belirlenmiştir. Thioridazine molekülünün daha düşük dozlarda sitotoksik etki göstermesi yan etkileri tolere etmesi açısından bir avantajdır. Apoptozisin uyarılma mekanizmaları araştırılarak mitokondrial DNA polimeraz enziminin ve ATP üretiminin inhibisyonundan kaynaklandığı tespit edilmiştir (Baba ve ark., 2004).

B16 fare melanom hücre hatlarında ve *in vivo* yapılan çalışmada, Thioridazine'nin melanom hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin diğer Phenothiazine sınıfına ait ilaçlara nazaran daha etkin olduğu ve *in vivo* tümör gelişiminde de inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir (Weizman ve ark., 2006).

Kang ve ark.'nın yumurtalık kanseri hücre hatlarıyla (SKOV-3 ve OVCAR-3) yaptığı çalışmada, Thioridazine'nin phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/Akt sinyal yolağı üzerindeki etkisinin moleküler mekanizmasını araştırmışlardır. (PI3K)/Akt inhibitörleri ve Thioridazine kullanılarak yapılan çalışmada yolaktaki etkiler aydınlatılmıştır. Ayrıca hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi ve apoptoziste rol alan moleküller de araştırılmış, Thioridazine'nin hücreleri hücre döngüsünün G0/G1 fazında tutuklu bıraktığı, hücre döngüsü düzenleyicilerden Siklin-D1, Siklin bağımlı kinaz-4'ün ekspresyonunu düşürdüğü, p21, p16, CDC25A gibi düzenleyicilerin ekspresyonunu ise arttırdığı bulunmuştur. Hücre döngüsü analizleri sonucu, hücrelerin G1 fazında tutuklu kalması, Thioridazine'nin antiproliferatif etkilerinin (PI3K)/Akt yolağının inhibe edilmesi ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür (Kang ve ark., 2012).

2012 yılında Rho ve ark.'nın çalışmasında ise Thioridazine molekülünün anti-anjiyogenik etkilerinin ortaya konması hedeflenmiştir. Çalışmada kullanılan kanser hücre hatlarında (OVCAR-3, MDAH-2774) Thioridazine molekülü sitotoksik etki gösterirken, normal hücreleri temsil eden hücre hatlarında (MCF-10A, BEAS-2B, MRC-5, HOSE-E6E7) herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. Vasküler endotelyal çoğalma faktörü (VEGF)'i baskılayarak, VEGF aracılı proliferasyon ve invazyonu da durdurmuştur. Fokal adezyon molekülünün (FAK) fosforilasyonunu baskılayarak, $\alpha\beta3$ /FAK/mTOR sinyal yolağının moleküler mekanizması araştırılmıştır (Rho ve ark., 2012).

Kanserin tedavisinde kullanılan ajanların kanser hücrelerini programlı hücre ölümüne yönlendirmesi, ajanların kanser hücrelerine spesifik olması yan etkileri azaltacağından tercih sebebidir. Thioridazine'nin toksik olmayan dozlarının güncel kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılması, ilaçların yan etkisini azaltmaya radyasyon ve kemoterapi gibi tedavi seçeneklerinin etkisini güçlendirmeye katkısı olacağı düşünülmektedir. Thioridazine'nin kombine edildiği ajanlarla sinerjistik etki göstermesi daha etkin sonuç alınmasında oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra kanser hastalarının

tedavi sürecinde endişe, depresyon gibi psikolojik sorunlarla baş etmelerinde de yararlı olacağı düşünülmektedir. Akciğer kanseri hastalarına kemoterapi sonrası verilen Thioridazine'nin kemoterapötik ilaçların yol açtığı gece terlemelerini ve kusmayı önlemede yardımcı olduğu gösterilmiştir (Inoue ve ark., 2000).

Sitotoksik özelliklerinin yanı sıra ilaç direncini azaltma, P-glikoprotein ailesini inhibe etme, DNA hasarı, anti-oksidan özellikler taşıması, bu ajanın antikanser ajan olarak moleküler mekanizmalarının araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (Amaral ve ark., 2011). Meme kanseri kök hücrelerinde ve kök hücre olmayan heterojen populasyonda etkileri ve moleküler mekanizmaları ise bilinmemektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. İnsan Meme Kanseri Hücre Hatlarının Laboratuvar Ortamına Adaptasyonu ve Çoğaltımı

Meme kanseri kök hücreleri (CD44+/CD24-), meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231, kök hücre içermeyen populasyon ve normal meme hücre hattı MCF-10A ve 37°C ve %5 CO₂'li nemli inkübatörde (Nuair) stabil L-glutamin içeren RPMI-1640 besiyerine %1 nonesansiyel aminoasitler, %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu, 10 000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek çoğaltıldı. Hücre kültür işlemleri, hava akımlı steril kabinde gerçekleştirildi. Hücre hatlarının günlük bakımları yapılarak çoğaltıldı ve ikilenme süreleri tespit edildi. Ayrıca hücreler, canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta izlendi.

Bu çalışma, Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Hücre kültür işlemleri, steril laminar hava akımlı çalışma kabininde gerçekleştirildi. -80 °C'de saklanan meme kanseri hücreleri, 37 °C su banyosunda çözöldü ve 75 cm²'lik hücre kültür flasklarına aktarıldı. Kültür flasklarına 10 ml besiyeri eklendi ve inkübatöre koyulmadan önce kapakları hafifçe gevşetilerek, CO₂ girişi sağlandı. Hücreler, 37°C, %5 CO₂ içeren nemli inkubatörde (NuAire, ABD) çoğaltıldı. Kültür flasklarının tabanına tutunarak çoğalan hücreler, mikroskop yardımıyla, günlük olarak canlılık, çoğalma ve enfeksiyon yönünden izlendi. Flasklardaki besiyeri 3 günde bir değiştirildi ve ikilenme sürelerine uygun olacak şekilde pasajlama yapıldı.

3.2. Thioridazine'in Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Thioridazine'in stok solüsyonları koşullara uygun şekilde suda çözölererek hazırlandı. Deneyde kullanılacak konsantrasyonlara göre 1 mL distile suda 10 mg çözölererek hazırlanan Thioridazine'in ana stoğu 24.5 mM olarak hesaplandı. Hazırlanan stok solüsyonlar 0.22 µm'lik filtrelerden geçirilerek sterilize edildi ve 15 µl'lik küçük hacimler halinde -20°C'de saklandı. Her deney için yeni stok solüsyon kullanıldı.

3.3. Meme Kanseri Hücrelerinin Sayımı

Meme kanseri ve kök hücrelerinin kültür flasklarının zemininde tutunarak oluşturdukları hücre tabakası (tek katlı tabaka), 4 ml Tripsin/EDTA (% 0.05) ile 5 dakika muamele edilerek hücre tabakasının flask zemininden ayrılması sağlandı. Hücreler zeminden kalkınca, besiyeri ile nötralize edilip, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı.

Santrifüjlenen hücrelerin, işlem sonrasında süpernatantı atılarak dibe çöken hücre pelleti 10 ml besiyeri ile seyreltildi. Pipetajla homojenize edilen hücrelerin süspansiyonundan 50 µl alındı ve 50 µl Tripan mavisi ile 1:1 oranda karıştırıldı. Bu karışımdan alınan örnekler, otomatik sayım cihazının (Cellometer, Nexcelom, ABD) lamına mikropipet yardımıyla aktarıldı. Hücre sayımı otomatik olarak hücre sayım cihazında yapıldı. Canlı hücreler, tripan mavisi boyasını membranlarından içeri almadıkları için parlak, ölü hücreler ise bu boyayı hücre içine aldıkları için koyu mavi renkte görüldü. Membran bütünlüğüne göre sayım yapan tripan mavisi boyası, canlı hücrelerde parlak, ölü hücreler ise bu boyayı hücre içine aldığı için koyu renkte görüldü Mayank vd. (2006).

3.4. Akım Sitometrisi

MDA-MB-231 hücreleri, tripsinizasyon işlemi sonrası, sayıldı ve PBS (phosphate-buffered saline) ile yıkanarak kök hücrelerin izolesi için hazırlandı. Meme kanseri kök hücre, biyobelirteçleri olan CD24 ve CD44 FITC-işaretli antikorlar ile inkübe edilerek, akım sitometrisi yardımıyla izole edildi.

3.5. Thioridazine'in Antiproliferatif Etkilerinin Belirlenmesi

Hücre canlılık ölçüm yöntemlerinden biri olan Tetrazolium tuzları, [XTT:2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5carboxanilide], hücre proliferasyonu, hücrelerin canlılığı ve/veya sitotoksosite analizleri için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntem, metabolik olarak aktif hücreler tarafından tetrazolyum tuzu olan XTT'nin suda çözünebilen turuncu renkli formazan tuzuna çevrilmesine dayanır. XTT uygulaması gerçekleştirildikten sonra örnekler çok modlu plaka okuyucu tarafından analiz edilerek meydana gelen renk değişimine göre çoğalan hücre miktarları belirlenmektedir. XTT analizi ile MDA-MB-231, meme kanseri kök hücrelerinde (CD44+/CD24-), kök hücre olmayan populasyonda ve MCF-10A hücrelerinde THZ'nin antiproliferatif etkisi ve IC50 konsantrasyonu (hücrelerin %50'sini öldüren ilaç konsantrasyonu) belirlendi. Bu amaçla, 96 kuyucuklu kültür plakalarına (10.000 hücre/kuyucuk) ekilerek hücreler THZ'nin artan konsantrasyonlarıyla 12, 24, 48, 72 saat boyunca muamele edildi. Her kuyucuğa XTT solüsyonundan 100 µl eklenerek, CO2'li inkübatörlerde 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Hücrelerin çoğalma değerleri 490 nm dalga boyunda çok modlu plaka okuyucu ile optik yoğunluğun belirlenmesi ile elde edilen değerlerle aşağıdaki formüle uygun olarak hesaplandı.

$\% \text{ Sitotoksosite} = 1 - [(\text{İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması} / \text{Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması}) \times 100]$

IC₅₀ değerleri CalcuSyn 2.1 (Biosoft, İngiltere) yazılımında belirlendi (Cory, 1991; Cengiz, 2009).

3.6 Sitotoksik Etkilerin Hangi Yollarla Gerçekleştiğine Dair Hipotezlerin Test Edilmesi

3.6.1 Dopamin 2 Reseptör Miktarının Ölçülmesi

THZ molekülünün bağlandığı, dopamin ailesi reseptörlerinden, dopamin 2'nin bazal ve THZ ile muamele sonrası, ekspresyon miktarı DRD2 ELISA Kit (Mybiosource, Amerika) ile ölçüldü. Hücreler kuyucuk başına 10⁵ olacak şekilde 6 kuyucuk içeren plakalara ekildi. Ölçüm, hücrelerin lizat kısmı kullanılarak kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

3.6.2 Dopamin Aktivatör Transporterların İnhibe Edilmesi

Dopamin 2 reseptörü üzerinden etkisini gösteren THZ'nin dopamin aktivatör transportlara (DAT) bağlanarak endositoz ile hedef molekülüne taşındığı bilinmektedir. Bu bilgileri doğrulamak amacıyla, hücrelere dopamin aktivatör transport inhibitörü (Threo-methylphenidate hydrochloride) uygulanarak THZ'nin DR2 yolağını kullanıp kullanmadığı test edildi. Threo-methylphenidate hydrochloride molekülünün en etkin çalıştığı konsantrasyonu belirlemek için öncelikle XTT deneyleri yapıldı. Her iki hücre hattında da 1-100 µM konsantrasyonlarda Threo-methylphenidate hydrochloride inhibitörü 24 saat süresince uygulandı. İnhibitörün en etkin konsantrasyonu (50 µM) belirlendikten sonra, inhibitör ile 2 saat ön muameleye maruz bırakılan hücrelere THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonları uygulanarak XTT deneyleri tekrarlandı. THZ'nin DR2 yolağını kullanıp kullanmadığı, yolda görev alan transporter protein inhibe edilerek doğrulandı.

3.7 Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

3.7.1. Thioridazine Molekülünün Anti-Apoptotik Etkilerinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Antiproliferatif etkinin, apoptozis ya da nekroz kaynaklı olup olmadığı, apoptozis ve nekrozu ayırt edebilen ELISA tabanlı bir kit ile ölçüldü. Nükleozom fragmentasyon miktarının belirlenmesi amacıyla Cell Death Detection ELISA Plus Kit (Roche, Almanya) kullanıldı. THZ ile muamele edilmiş hücrelerden ve ilaç eklenmemiş kontrol hücrelerinden

elde edilen hücre lizatları streptavidin kaplı plakalara eklenerek, histon proteinleri ve nükleozom fragmentlerine karşı (Anti-histon biotin ve Anti-DNA-POD) antikorlar içeren solüsyondan 80 µl eklenerek mikro plaka oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sırasında Anti-histon antikoruna bir taraftan nükleozomlardaki histonlara tutunurken bir taraftan da oluşan immunokompleks streptavidin kaplı plakalara tutunur. Anti-DNA-POD antikoruna ise nükleozomlar arasındaki DNA'lara bağlanır. Bağlanmayan bileşenlerin yıkama basamaklarıyla uzaklaştırılmasından sonra nükleozomların miktarının kalitatif olarak belirlenmesi immunokomplekslere tutunmuş olan POD'ların ölçülmesiyle gerçekleştirildi. POD, ABTS substratı ile 405 nm ve 490 nm referans dalga boyunda çok modlu plaka okuyucuda ölçüldü. Hücre lizatlarında histon ve nükleozom fragmentleri miktarındaki artış, apoptozis miktarındaki artışla doğru orantılı olarak değerlendirildi.

3.7.2. Anneksin V Yöntemi

Altı kuyucuklu plakalara 105 sayıda ekilerek THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonları edilen hücreler, tripsinizasyon işlemi ile toplanarak 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Tripsin uzaklaştırılarak, hücreler pipetajla homojenize edildi. Hücreler PBS'te tekrar çözülerek, 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak hücrelerin üzerine %1 FBS içeren 100 µL besiyeri eklendi ve pipetajla hücre süspansiyonu oluşturuldu. Oda sıcaklığına getirilmiş olan Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonundan her tüpe 100 µL eklenip yavaşça pipetaj yapıldı. Karanlıkta, oda sıcaklığında, 20 dakika inkübe edildi. Muse Hücre Analiz cihazında Muse® Annexin V & Dead Cell Kit protokolüne uygun olarak analizi yapıldı.

3.8. Otofajinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

3.8.1. Western Blot

Meme kanseri ve kök hücre hatları 25 cm²'lik küçük flasklara 4x10⁶ olacak şekilde ekildi. THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonu uygulanan hücreler 24. saatin sonunda protein izolasyonuna tabii tutularak, Western blot işlemi için hazırlandı. Protein izolasyonu "M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent" (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, ABD) solüsyonu ile yapıldı. 14.000xg +4°C 'de 15 dk. santrifüj edilen hücrelerin pelletleri uzaklaştırılarak, supernatantları toplandı. Örneklerdeki protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlendi. Hazırlanan proteinler Laemmli tamponu ile 1:1 oranında karıştırılarak 96°C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dk kaynatıldı. Proteinler ve markır %7.5 ve %15'lik SDS poliakrilamid jellere yüklenerek ve elektroforez işlemi Tris-Glisin

SDS tamponu (BioRad, CA, ABD) içinde önce 40V'ta 20 dk. daha sonra 120V'ta 90dk. sabit akımda yürütüldü. Bu işlem için BioRad Mini Protean elektroforez tankı ve BioRad PowerPac 200 güç kaynağı kullanıldı. Moleküler ağırlıklarına göre jelde ayrılması sağlanan proteinler nitroselüloz (BioRad, CA, ABD) membranlara transfer edilmek üzere sırasıyla; sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı ve süngerden oluşan aktarma sandviçine alınarak, BioRad blotting tankında BioRad PowerPac 200 güç kaynağı kullanılarak 115V'ta sabit akımda 1 saat 15 dk. transfer tampon solüsyonu içinde transfere tabii tutuldu. Transferin gerçekleşip, gerçekleşmediği membranı boyayan ponceau ve jeli boyayan comassie mavisii boyaları ile kontrol edildi. Transfer sonrası membranlar, %5 yağsız süt tozu ve %0.1 Tween 20 içeren TBS ile hazırlanan karışım kullanılarak oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat bloklandı. Ardından membranlar, dilüsyonları üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanan primer antikör ile +4°C'de yaklaşık 16 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. TBST ile 8 defa 5'er dk. yapılan yıkama basamaklarından sonra membranlar, yine üretici firmanın talimatlarına göre dilüe edilen sekonder antikörler ile oda sıcaklığında 1 saat süresince çalkalayıcıda inkübe edildi. TBST ile tekrar yıkama yapılan membranlardaki protein bantları, Immun-Star™ HRP Chemiluminescent Kit (BioRad, CA, ABD) kullanılarak Kodak Gel Logic 1500 (Carestream Molecular Imaging, Newhaven, CT, ABD) görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

3.8.2. Chloroquine diphosphate salt İnhibitörü Deneyleri ile Otofajinin Doğrulanması

Lyofilize olarak satın alınan Chloroquine diphosphate salt (CQ) (Sigma Aldrich, Almanya) otofaji inhibitörü olup, otofagozom-lizozom füzyonunu engelleyerek etkisini göstermektedir. CQ'un artan konsantrasyonları (1-100 μ M) ile 24 saat muamele edilen hücrelerde CQ'nun en uygun konsantrasyonu XTT yöntemi ile belirlendi. İnhibitörün en etkin konsantrasyonu (50 μ M) belirlendikten sonra, inhibitör ile 2 saat ön muameleye maruz bırakılan hücrelere THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonları uygulanarak XTT deneyleri tekrarlandı. Uygun konsantrasyonun belirlenmesinin ardından, Western blot deneyleri CQ inhibitörü varlığında da yapıldı.

3.8.3. Monodansylcadaverine (MDC) Boyama Yöntemi ile Otofajik Vakuollerin Görüntülenmesi

Hücreler 96 kuyucuklu plakalara 1×10^4 sayıda ekilerek THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonu ile 24 saat muamele edildi. İlaç ve besiyeri kuyucuklardan tamamen

uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklar PBS ile yıkandı. Hücreler, 3 mM Monodansylcadaverine (MDC) boyası (Sigma Aldrich, Almanya) ile boyanarak 37°C’de 10 dk. inkübasyona bırakıldı. Otofajik vakuoller floresan mikroskobunda görüntülendi (Leica, λ_{ex} 338 nm, λ_{em} 500 nm).

3.9. Epitelyal-Mezenkimal Geçişin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

3.9.1. İnvazyon Deneyi/Scratch Deneyi

Altı kuyucuklu plakalara 5×10^5 sayıda ekilen hücrelerin, %100 olarak plaka tabanını kaplayıp kaplamadığı mikroskopta kontrol edildi. Plakalardaki besiyerleri dökülerek 200 μ l’lik pipet ucu yardımıyla kuyucuklarda tutunmuş olan hücrelerin ortasından çizim işlemi yapıldı. Çizilen kuyucuklar 500 μ l PBS ile hafifçe yıkandı. Çizim sonrası faz-kontrast mikroskopta görüntüleme yapıldı (0. saat). Daha sonra THZ’nin IC₅₀ konsantrasyonları ile muamele edilen kuyucuklar 24. saat sonunda faz-kontrast mikroskopta tekrar görüntülendi.

3.9.2. Migrasyon Deneyi

Hücreler, kitin özel 24’lük transfer plakalarına (8 μ m size, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA) (iç içe geçmiş üst ve alt kuyucuktan oluşan) 10^5 olacak şekilde ve serum-free besiyeri içinde plakanın üst kuyucuğuna ekildi. Alttaki kuyucuklara da sadece %10 FBS ihtiva eden besiyeri eklendi. 24 saat süresince inkübe edilen hücrelerden alttaki kuyucuğa göç etmemiş olanlar uzaklaştırıldı, göç ederek alttaki kuyucuğa geçmiş olanlar ise boyanarak 560 nm dalga boyunda absorbands değerleri okundu. Her deney üç tekrarlı yapılarak ortalama absorbands değerleri üzerinden analiz edildi.

3.9.3. Immunositokimya

Hücreler beş dk süresince iki defa Fosfat Buffer Salin (PBS) ile yıkandı. PBS ile hazırlanan %4’lük paraformaldehitte 30 dk fikse edildi ve 3 kez 5’er dk PBS ile tekrar yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için distile suyla hazırlanan %3’lük hidrojen peroksitle (Sigma, USA) 10 dk muamele edildi. Üç kez 5’er dk PBS ile yıkandı ve 15 dk Tritonix ile muamele edildi. Üç kez 5’er dk PBS ile yıkandı ve blok solüsyonu (non-immün serum) (Invitrogen, USA) eklenerek 1 saat bekletildi. Serumun fazlası uzaklaştırıldıktan sonra örnekler uygun şekilde dilüe edilmiş primer antikorlarla muamele edilip kapalı ve nemli kutuda 1 gece +4°C’de bekletildi. Üç kez 5’er dk PBS ile yıkandıktan sonra biotinle işaretlenmiş sekonder antikorla (Invitrogen, USA) 30 dk

muamele edildi. Üç kez 5'er dk PBS ile yıkanıp 30 dk streptavidinle işaretli sekonder antikorla (Invitrogen, USA) muamele edildi. Ardından üç kez 5'er dk PBS ile yıkanarak Diaminobenzidine (DAB) (Invitrogen, USA) ile muamele edildiler. Mikroskopta renk değişimi gözleninceye kadar inkübe edildi. Yeterli boyanma görüldüğünde 5 dk PBS ile sonrasında da 15 dk distile su ile yıkandı. Karşıt boyama 1 dk süresince Mayer's hematoksilen ile yapıldı. Mounting medium ile kapatılıp mikroskopta görüntüleme yapıldı.

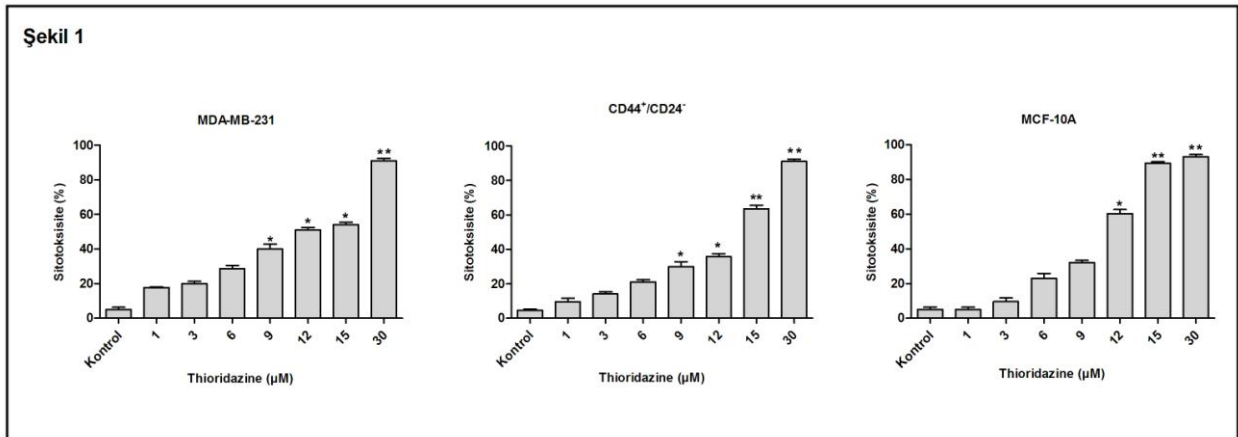
3.10. İstatistiksel Analiz

Deneylerde THZ'nin artan konsantrasyonları üçer kuyucukta test edildi ve her bir deney üç kez tekrarlandı. Her kuyucuğa ait absorbans değerleri, mikropilaka okuyucu tarafından ortalama ve $\pm$ SD değerleri olarak hesaplandı. THZ'nin çeşitli konsantrasyonlarına ait doz cevap eğrileri, Graphpad Prism 6.0 istatistik yazılımında oluşturuldu. Sitotoksik ve apoptotik etki yüzdesi açısından THZ'nin artan konsantrasyonları ile pozitif kontroller (THZ ile muamele edilmemiş hücreler) arasında anlamlı bir farklılığın olup olmadığı tek yönlü ANOVA ve ardından Dunnett's t-test kullanılarak araştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. Meme Kanseri ve Kök Hücre Kültürlerinde Thioridazine'in Hücre Canlılığına Etkileri

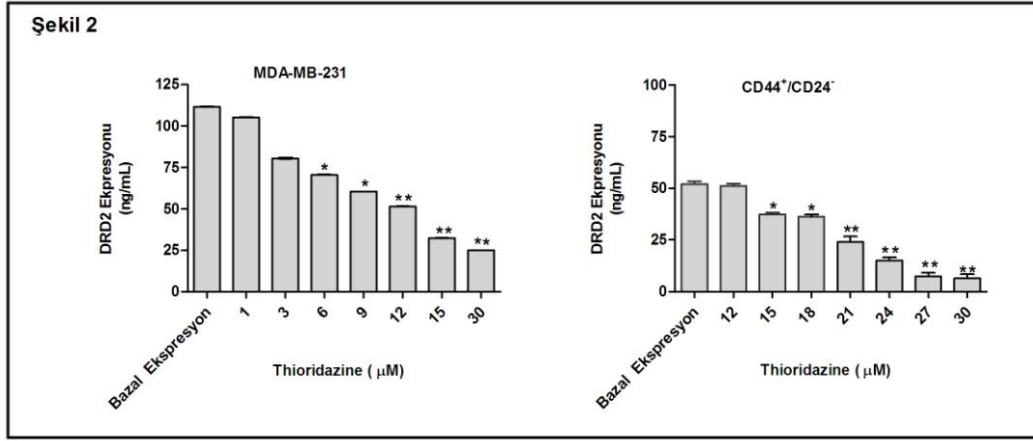
Thioridazine'in hücre canlılığı üzerine etkileri insan normal (MCF-10A), meme kanseri (MDA-MB-231) ve meme kanseri kök hücre (CD44+/CD24-) kültürlerinde, artan konsantrasyon (1-100 μ M) ve zamana (24., 48. ve 72. saat) bağlı olarak ölçüldü. Geniş konsantrasyon aralığında yapılan deneylerin sonuçları değerlendirilerek, konsantrasyon aralığı küçültüldü ve 1-30 μ M'a daraltılarak sitotoksikite deneyleri tekrarlandı. Thioridazine ile muamele edilen hücre kültürlerinde artan zaman aralıklarından istatistiksel olarak anlamlı ve en etkin sonuç 24. saatte elde edildi. MCF-10A, MDA-MB-231 ve CD44+/CD24- hücre kültürlerinde Thioridazine'in 1-30 μ M arasındaki konsantrasyonları çalışıldı (Şekil 1). Thioridazine ile muamele edilen MCF-10A, MDA-MB-231 ve CD44+/CD24- hücre kültürlerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla, 8.5, 9 ve 18 μ M olarak Calcsyn (2.1) programında hesaplandı.



Şekil 1: Thioridazine ile 24 saat muamele edilmiş CD44+/CD24-, MDA-MB-231, MCF-10A, hücre kültürlerinde sitotoksik etkinin XTT canlılık testi ile ölçülmesi (*p<0.05, **p<0.01).

4.2. Çalışılan Hücre Kültürlerinde Dopamin 2 Reseptör Miktarı

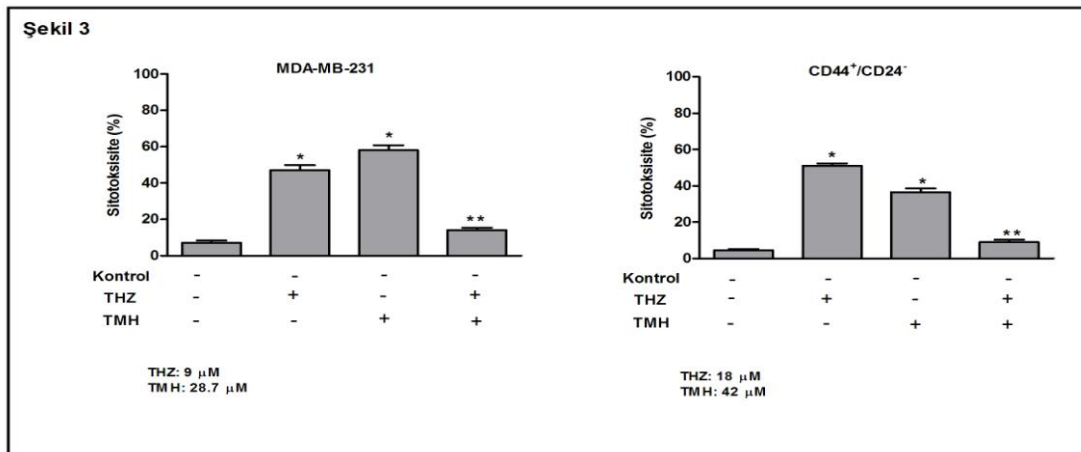
MDA-MB-231, CD44⁺/CD24⁻ hücre kültürlerinde bazal (THZ ile muamele edilmemiş) DRD2 ekspresyonu sırasıyla 111.6 ng/mL, 51.9 ng/mL olarak belirlendi. THZ'nin artan konsantrasyonları ile (1-30 μ M) muamele edilen hücre kültürlerinde DRD2 ekspresyonunun azaldığı gösterildi (Şekil 2).



Şekil 2: MDA-MB-231 ve CD44⁺/CD24⁻ hücre kültürlerinde DRD2'nin bazal ve THZ'nin artan konsantrasyonlarında ekspresyon durumunun belirlenmesi (24.saat)
*p<0.05, **p<0.01

4.3. Dopamin Aktivatör Taşıyıcıların İnhibe Edildiğinde Thioridazine'in Gösterdiği Sitotoksik Etkiler

Dopamin aktivatör taşıyıcı inhibitörü olan, Threo-methylphenidate hydrochloride ile muamele edilen MDA-MB-231 ve CD44⁺/CD24⁻ hücre kültürlerinde inhibitörün en uygun konsantrasyonları sırasıyla 28.7 µM, 42 µM olarak belirlendi. Threo-methylphenidate hydrochloride ile 2 saat önmuamele edilen MDA-MB-231 ve CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinde THZ'nin IC₅₀ uygulaması sonrası sitotoksik etkiler sırasıyla yüzde 14 ve 9 olarak hesaplandı (Şekil 3).



Şekil 3: Dopamin aktivatör transport inhibitörü (Threo-methylphenidate hydrochloride) ile 2 saat ön muamele edilen MDA-MB-231 ve CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinde THZ'nin IC₅₀ uygulaması sonrası sitotoksik etkilerinin belirlenmesi (24. saat).

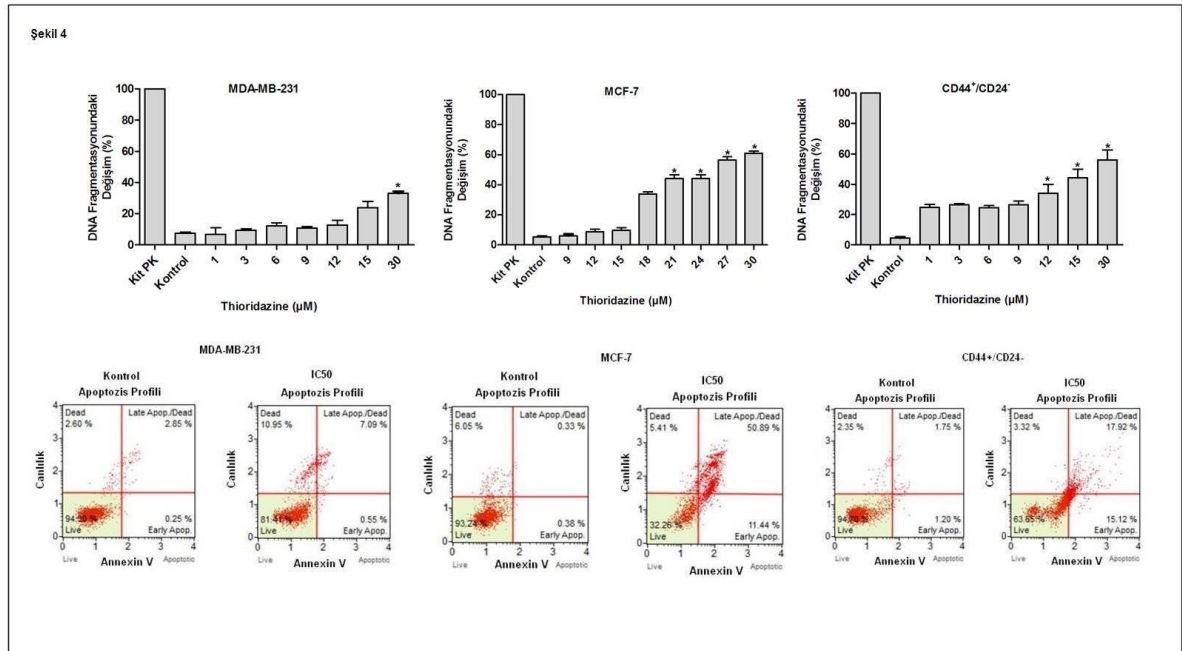
*p<0.05, **p<0.01

4.4. Sitotoksik Etkinin Neden Olduğu Hücre Ölüm Çeşitleri

4.4.1. Apoptotik Etkiler

Thioridazine'in artan konsantrasyonları (1-30 μ M) ile 24 saat süresince muamale edildiğinde DNA fragmentasyonu miktarı CD44+/CD24- hücre kültürlerinde konsantrasyona bağlı artış gösterirken, MDA-MB-231 hücrelerinde aynı etki gözlenmedi. Thioridazine'in 12, 15 ve 30 μ M konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen CD44+/CD24- ve MDA-MB-231 hücre kültürlerinde DNA fragmentasyon yüzdeleri sırasıyla 34.1, 44.2, 56 ve 12.7, 23.8, 33.1 olarak hesaplandı. MDA-MB-231 hücrelerinde ise en yüksek konsantrasyonda (30 μ M) bile gözlenen DNA fragmentasyon yüzdesi 33.1 oldu (Şekil 4).

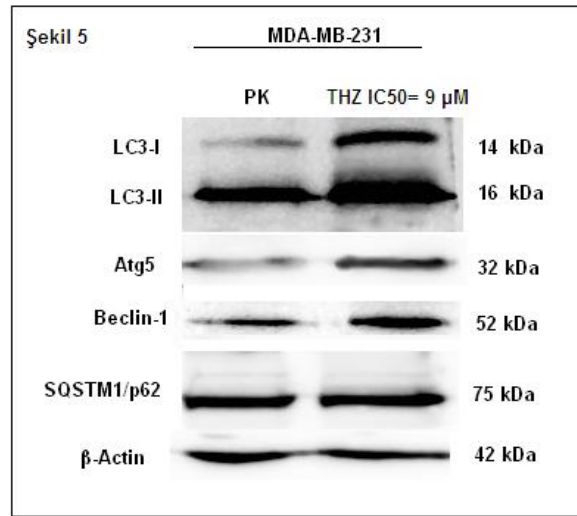
İlacın IC₅₀ konsantrasyonunun uygulandığında görülen apoptotik etkiler, Anneksin V yöntemi ile doğrulandığında ise DNA fragmentasyon sonuçları ile paralel bulgular elde edildi. Tüm kontrol gruplarında canlılık %90'nın üzerinde ölçüldü. CD44+/CD24- hücre kültürlerinde toplam apoptotik hücre yüzdesi 33 bulunurken, MDA-MB-231 hücre kültüründe yüzde 7 olarak belirlendi. Birbirinden bağımsız olan her iki yöntemde de CD44+/CD24- hücre kültürlerinde apoptozis gözlenirken, MDA-MB-231 hücre kültüründe apoptotik etki gözlenmedi.



Şekil 4: Thioridazine'in apoptotik etkilerinin DNA Fragmentasyonu (ELISA) ve Anneksin V yöntemi ile ölçülerek karşılaştırılması.

4.4.2. Otofajik Etkiler

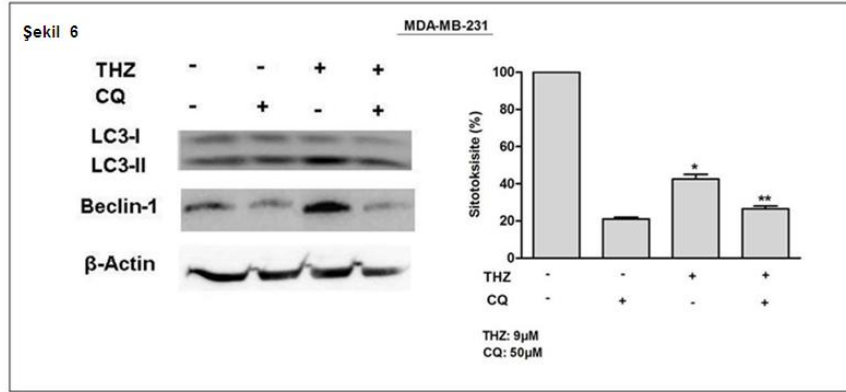
Apoptotik etkinin gözlenmediği MDA-MB-231 hücre kültüründe, otofajinin Western blot yöntemi belirlenmesinde en çok kullanılan otofajik belirteçlerden LC-3 I'ın LC-3 II'ye dönüşümünde, Atg5 ve Beclin-1 proteinlerinde artış gözlenirken, SQSTM1/p62 proteininde değişim gözlenmedi. Otofajik etkinin doğrulanması için LC3 I-II ve Beclin-1 proteinleri otofaji inhibitörü olan CQ'nin 50µM konsantrasyonu (tekli ve THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonu ile kombinasyonunda) ile inhibe edildiğinde, otofajik belirteçlerin etkisinde azalma gözlemlendi.



Şekil 5: THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattında otofajik belirteçlerin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi.

4.4.2.1. Otofaji görülen MDA-MB-231 hücrelerinde, otofajinin inhibitör (Chloroquine) varlığında WB yöntemi ile doğrulanması

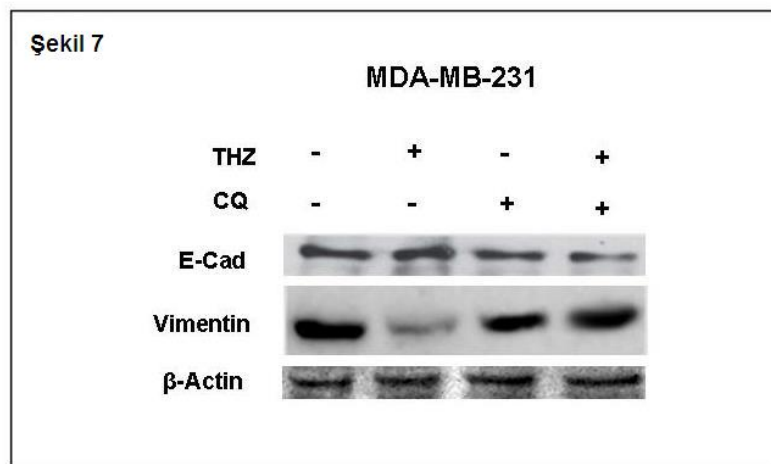
Otofaji olduğu gösterilen MDA-MB-231 hücre hattında, otofaji belirteçlerinden LC3 ve Beclin-1 ekspresyonu, otofajik vakuollere spesifik bir inhibitör olan Chloroquine (CQ, 50µM) varlığında yeniden ölçüldü. Chloroquine inhibitörünün optimum konsantrasyonları XTT canlılık testi ile belirlenerek, en uygun konsantrasyon olan 50µM seçildi. İnhibitör ile 2 saat ön muamele edilen hücrelere daha sonra THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonu uygulandı.



Şekil 6: Otofaji olduğu gösterilen MDA-MB-231 hücre hattında, otofajik belirteçlerden LC3 ve Beclin-1 ekspresyonunun Chloroquine (CQ=50µM) inhibitörü varlığında doğrulanması.

4.4.2.2. Otofaji görülen MDA-MB-231 hücrelerinde, bu ölüm tipinin EMT ile ilişkisinin ortaya konması (Chloroquine varlığında EMT belirteçlerine bakılması)

Hücre ölüm tiplerinden biri olan otofajinin tespit edildiği MDA-MB-231 hücrelerinde bu ölüm tipinin epitelyal belirteçlerle olan ilişkisinin ortaya konması amacıyla, otofajik belirteçleri inhibe ettiğimizde epitelyal belirteçlerde ekspresyon durumu nasıl değişmektedir sorusunun yanıtı arandı. THZ, inhibitör ile beraber uygulandığında, epitelyal belirteçlerden E-cad ekspresyonunun azaldığı, mezenkimal belirteçlerden olan Vimentin ekspresyonunun ise arttığı gözlemlendi. Bu sonuç bize, THZ'nin hücrelerde, epitelyal belirteç ekspresyonlarını arttırdığını göstermiş oldu.



Şekil 7: THZ'nin IC₅₀ (9µM) konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattında otofaji inhibitörü, Chloroquine (CQ, 50µM), varlığında epitelyal-mezenkimal belirteçlerden E-cad ve Vimentin ekspresyonunun gösterilmesi.

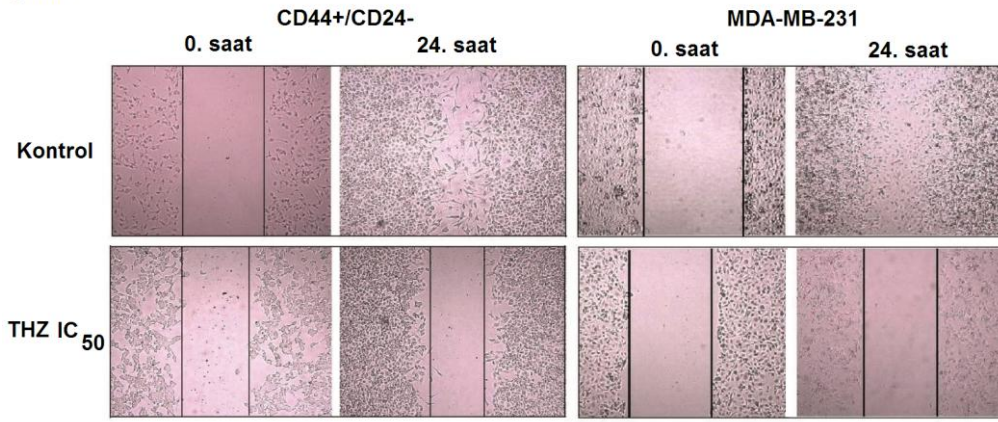
4.5. Thioridazine'nin Epitelyal Mezenkimal Geçişteki Etkileri

Epitelyal mezenkimal geçişteki etkiler invazyon deneyi, migrasyon deneyi ve western blot yöntemiyle araştırıldı.

4.5.1. İnvazyon Potansiyeli

CD44+/CD24- ve MDA-MB-231 hücre hatlarında THZ'nin invazyon potansiyeline olan etkilerini belirlemek için scratch assay gerçekleştirildi (24. saat). Veriler Şekil 9'da sunuldu.

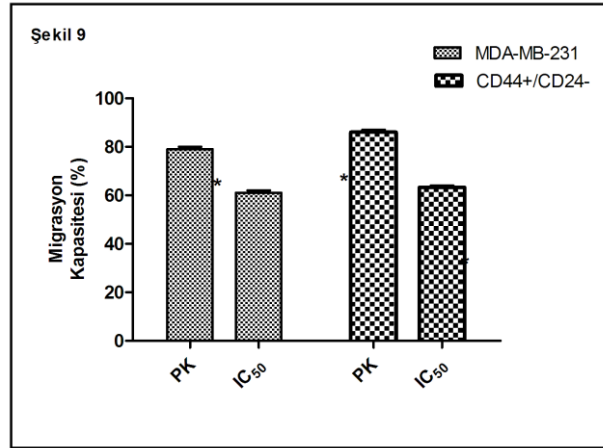
Şekil 8



Şekil 8: THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonlarına maruz bırakılan MDA-MB-231, ve CD44+/CD24- hücrelerinde yüzde invazyon kapasitesinin ölçülmesi (24. saat) **p<0.001

4.5.2. Migrasyon Potansiyeli

İnvazyon kapasitesi ölçülen hücre hatlarında daha sonra, Cell Migration Kit kullanılarak migrasyon kapasitesi ölçüldü (Şekil 10).

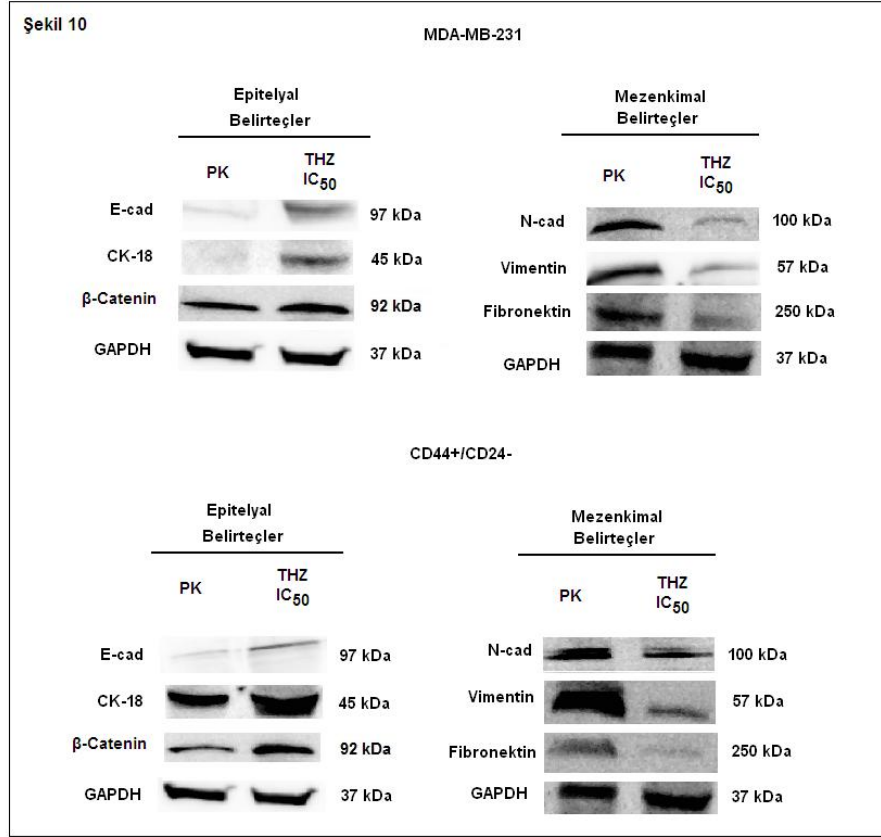


Şekil 9: THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonlarına maruz bırakılan MDA-MB-231 ve CD44+/CD24- hücrelerinde migrasyon kapasitesinin ölçülmesi (24. saat) *p<0.05

4.5.3. Epitelyal Mezenkimal Belirteçleri Ekspresyon Durumları

Epitelyalden mezenkimale geçiş nedenlerinden birisi de E-cad ekspresyonunun azalmasıdır. E-cad bazal ekspresyonu; MCF-7>Kök>MDA-MB-231 şeklinde olup, WB sonuçları, bunu doğrulamaktadır. E-cad ekspresyonu zayıf olan hücre hatlarında, mezenkimale geçiş daha fazla görülmektedir. Tüm hücre hatlarında, THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonunda epitelyalden mezenkimale geçişin azaldığı görüldü.

Epitelyal mezenkimal geçişte en çok kullanılan belirteçlerin ekspresyon durumları Western Blot yöntemiyle belirlendi (Şekil 10).

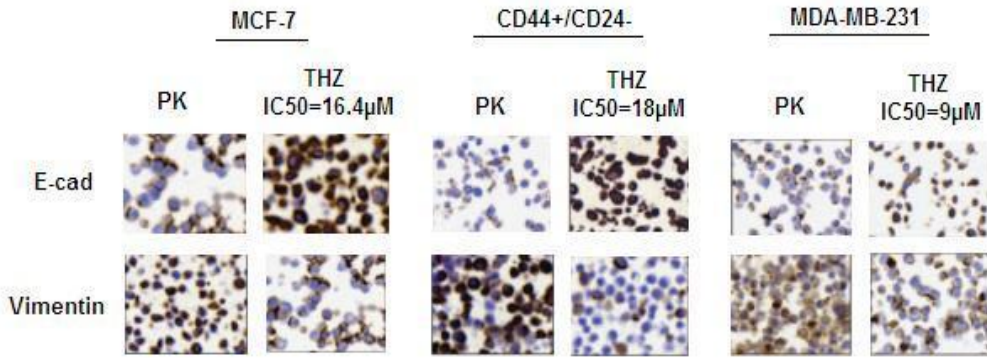


Şekil 10: THZ'nin IC₅₀ konsantrasyonlarına 24 saat maruz bırakılan MDA-MB-231 ve CD44+/CD24- hücrelerinde epitelyal ve mezenkimal moleküllerin ekspresyonları.

4.5.4. Epitelyal-mezenkimal geçişin immunositokimyasal yöntemle doğrulanması (E-cad ve Vimentin belirteçleri ile)

Epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin ekspresyon durumları, Western blot yöntemi ile belirlendikten sonra bağımsız bir yöntem olan immunositokimyasal boyama yöntemi ile doğruladığında sonuçların paralel olduğu gösterildi. E-cad molekülü THZ'nin IC50 konsantrasyonu uygulandığında, her üç hücre kültüründe de artış gösterirken, mezenkimal belirteç olan Vimentin molekülü azalış gösterdi (Şekil 11).

Şekil 11



Şekil 11: E-cad ve Vimentin moleküllerinin Immunositokimya yöntemi ile gösterilmesi.

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Docetaxel ve Thioridazine'in kombinasyonunun meme kanseri ve meme kanseri kök hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kombinasyon çalışmasının sonuçlarından elde edilen veriler bu iki ilacın sinerjistik olmadığını göstermiştir. Bu nedenle çalışmaya Thioridazine ilacı ile devam edilerek, bu ilacın etkileri araştırıldı. THZ'nin sitotoksik, apoptotik ve EMT ile ilgili etkileri çalışılarak, detaylandırıldı. THZ'nin 1-30 μ M konsantrasyonlarda her iki hücre hattında da (MDA-MB-231 ve CD44+/CD24-) sitotoksik etki gösterdi. Meme kanseri kök hücrelerinde IC₅₀ değerinin MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha yüksek olmasının nedeni kanser kök hücrelerinin gösterdiği heterojenite olmasıdır. Bunun bir diğer nedeni ise dopamin 2 reseptör ekspresyon miktarının meme kanseri kök hücrelerinde daha az olmasıdır. Dopamin reseptörü 2 üzerinden çalışılan THZ, daha fazla dopamin 2 reseptörüne sahip olan MDA-MB-231 hücreleri tarafından hücre içine daha çok alınarak etkisini arttırmıştır. THZ'nin gösterdiği sitotoksik etkinin hangi hücre ölüm tipi ile gerçekleştiği araştırıldığında ise; CD44+/CD24- hücrelerinde apoptotik etki gözlenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde otofajik etki gözlemlendi. Bunun nedeni, apoptotik etki görülen hücre hattında hücreyi apoptozise götüren moleküller aktif olurken, otofajik etki görülen hücre hattında ise başlıca otofajik moleküllerin tetiklenmiş olması yatmalıdır. Farklı özelliklere sahip olan, farklı iki hücre hattında iki farklı ölüm tipi görüldü. Apoptoziste, ekstrinsik ya da intrinsik sinyaller sonrası kaspaz adı verilen proteazlar aktive olur. Kaspazlar, intrasellüler proteinleri aspartat birimlerini yıkmak için etki eden spesifik proteazlardır. Meme kanseri kök hücrelerinde bu apoptotik moleküllerin aktif olması belki de daha hızlı reaksiyon göstermesi bu hücrelerde apoptozisi tetiklemiş olabilir. Hücre hatlarına ait genetik özellikler ve bundan kaynaklanan ortam da hücre hatlarında bu seçimi belirlemiş olabilir. Hücrenin apoptozise ya da otofajiye gitme kararında moleküllerin o anda içinde bulundukları koşullar da bu kararın belirlenmesinde kritik rol oynar. Meme kanseri heterojen bir hastalık olması nedeniyle, çalışmamızda farklı karakteristik özellikler taşıyan iki farklı hücre hattı kullanıldı. Geleneksel kemoterapötik ilaçların ve bunlara gelişen direnci azaltmanın yolu yeni ilaçların tedavi seçenekleri arasına kazandırılmasıdır. Thioridazine özellikle K562 gibi lösemi kaynaklı hücre hatlarının kök hücrelerine spesifik etki gösterdiği çalışılmıştır (Sachlos ve ark., 2012). THZ çalışmamızda kullandığımız meme kanseri kök hücrelerine spesifik etki göstermedi. Heterojen yapıda olan kanser kök hücreleri THZ ilacına MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha az duyarlılık gösterdi.

Kanserde başka bir sorun olan EMT olayı, kanser hücrelerinin diğer organlara yayılmasına zemin hazırlamaktadır. EMT'nin azaltılması tümörün belli bir bölgede kalarak, hastalığın tedavisini kolaylaştıracaktır. Bu nedenle THZ'nin EMT üzerindeki etkileri araştırıldığında, epitelyal belirteçler olan E-cad, CK-18 ve β -catenin artış gösterirken, N-cad, Fibronectin, Vimentin gibi mezenkimal belirteçler azalma gösterdi. Epitelyal belirteçlerin ekspresyonlarının artması bu geçişi azalmaktadır. THZ her iki hücre hattında da farklı hücre ölüm tipleri üzerinden etkisini gösterdi. EMT üzerinde de etkili olan bu ilaç tedavi seçenekleri arasında yer alabilcek özelliğe sahiptir. Bu çalışma, THZ'nin meme kanseri kök hücrelerinde ve MDA-MB-231 yapılmış olan ilk çalışma olup, literatüre sunduğu veriler orijinal niteliktedir.

Çalışmanın sonuçlarını toparlarsak;

1- THZ'nin zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak MDA-MB-231 ve CD44+/CD24-hücrelerinde sitotoksik etkisi gözlemlendi.

2- THZ'nin MDA-MB-231 ve CD44+/CD24- hücrelerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla 9 ve 18 μ M olarak bulundu.

3- THZ'nin gösterdiği sitotoksik etki MDA-MB-231 hücrelerinde otofajik etki gösterirken, CD44+/CD24- hücrelerinde apoptotik etki gösterdi.

4- MDA-MB-231 ve CD44+/CD24- hücrelerinde dopamin reseptörü 2 miktarı sırasıyla, 111.6 ng/mL ve 51.9 ng/mL olarak bulundu.

5- THZ'nin DRD2 yolunu kullanıp kullanmadığını belirlemek için dopamin aktivatör taşıyıcılar inhibe edildiğinde THZ'nin sitotoksik etkisinin azaldığı gözlemlendi. Bu sonuç bize THZ'nin DRD2 yolunu kullandığını gösterdi.

6- Kanser başlıca sorunlarından olan metastaza zemin hazırlayan epitelyal mezenkimal geçişin her iki hücre hattında da azaldığı gözlemlendi.

7- Geleneksel kemoterapötik ilaçların yanısıra yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni ilaçların etki mekanizmalarının araştırılarak primer verilerinin literatüre kazandırılması oldukça önemlidir.

6. KAYNAKLAR

1. Raymond, W. Cancer Biology, In: Ruddon, M.D. Oxford University Press, New York: 3-14, New York, 2007.
2. Jemal, A., Tiwari, R.C., Murray, T., Ghafoor, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, E.J., Thun, M.J. Cancer statistics. *Cancer J Clin.* 54-58, 2012.
3. Mohita U, Jasmine S, Manish K, Om V. S., Perumal V. The Warburg effect: Insights from the past decade. *Pharmacology & Therapeutics* 137, 318–330, 2013.
4. Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle.* 2007 Oct 1;6(19):2332-8
5. Sharif Tanveer, Emhemmed Fathi and Fuhrmann Guy (2011). Towards New Anticancer Strategies by Targeting Cancer Stem Cells with Phytochemical Compounds, *Cancer Stem Cells - The Cutting Edge*, Prof. Stanley Shostak (Ed.), ISBN: 978-953-307-580-8.
6. http1: http://www.cancer.med.umich.edu/research/breast_stemcells.shtml, 10.05.2013, 13:16
7. Strobl JS, Kirkwood KL, Lantz TK, Lewine MA, Peterson VA, Worley 3rd JF. Inhibition of human breast cancer cell proliferation in tissue culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine. *Cancer Res* 1990;50:5399–405.
8. Sachlos E, Risueño RM, Laronde S, Shapovalova Z, Lee JH, Russell J, Malig M, McNicol JD, Fiebig-Comyn A, Graham M, Levadoux-Martin M, Lee JB, Giacomelli AO, Hassell JA, Fischer-Russell D, Trus MR, Foley R, Leber B, Xenocostas A, Brown ED, Collins TJ, Bhatia M. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell.* 2012 Jun 8;149(6):1284-97.
9. Amaral, L., Kristiansen, J.E., 2001. Phenothiazines: potential management of Creutzfeldt–Jacob disease and its variants. *Int. J. Antimicrob. Agents* 18, 411–417.
10. Murray S, Briasoulis E, Linardou H, Bafaloukos D, Papadimitriou C. Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat Rev.* 2012 Nov;38(7):890-903.
11. Rodrigues T, Santos AC, Pigoso AA, Mingatto FE, Uyemura SA, Curti C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis--potentially implicated mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2002 May;136(1):136-42.

12. Zhelev Z, Ohba H, Bakalova R, Hadjimitova V, Ishikawa M, Shinohara Y, Baba Y. Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. Phenothiazines and leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004 Mar;53(3):267-75.
13. Gil-Ad I, Shtaf B, Levkovitz Y, Nordenberg J, Taler M, Korov I, Weizman A. Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth. *Oncol Rep.* 2006 Jan;15(1):107-12.
14. Kang S, Dong SM, Kim BR, Park MS, Trink B, Byun HJ, Rho SB. Thioridazine induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in cervical and endometrial cancer cells. *Apoptosis.* 2012 Sep;17(9):989-97
15. Byun HJ, Lee JH, Kim BR, Kang S, Dong SM, Park MS, Lee SH, Park SH, Rho SB. Anti-angiogenic effects of thioridazine involving the FAK-mTOR pathway. *Microvasc Res.* 2012 Nov;84(3):227-34.
16. Inoue, S., Endo, K., Suzuki, H., Endo, K., 2000. Anti-emetic treatment for patients with lung cancer after chemotherapy, and usefulness of prochlorperazine for psychiatric emesis. *Gan To Kagaku Ryoho* 27, 405–411.
17. Lialiaris, T., Pantazaki, A., Sivridis, E., Mourelatos, D., 1992. Chlorpromazine-induced damage on nucleic acids: a combined cytogenetic and biochemical study. *Mutat.Res.* 265, 155–163.
18. S. Murray, E. Briasoulis, H. Linardou, D. Bafaloukos, C. Papadimitriou. Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treatment Reviews.* 38, 890–903, 2012.
19. Maciej Wieczorek, Aleksandra Paczkowska, Piotr Guzenda, Maria Majorek, Andrzej K. Bednarek and Monika Lamparska-Przybysz. Silencing of Wnt-1 by siRNA induces apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* 7:2, 268-274, 2008.
20. Liang You, Biao He, Kazutsugu Uematsu. Inhibition of Wnt-1 Signaling Induces Apoptosis in β -Catenin-Deficient Mesothelioma Cells. *Cancer Research* 64, 3474 – 3478, 2004.
21. Wei Wei, Mei-Sze Chua, Susan Grepper and Samuel K So. Blockade of Wnt-1 signaling leads to anti-tumor effects in hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Cancer*, 8:76, 2009.
22. Desheng Lu and Dennis A. Carson. Inhibition of Wnt signaling and cancer stem cells. *Oncotarget*, August, Vol.2, No 8, 2011.

23. Jin Young Kim, Young Mee Kim, Chang Hee Yang, Somi K. Cho, Jung Weon Lee, Moonjae Cho. Functional regulation of Slug/Snail2 is dependent on GSK-3 β -mediated phosphorylation. *FEBS Journal*. 279, 2929–2939, 2012.
24. David J Drasin, Tyler P Robin, Heide L Ford. Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Research*, 13:226, 2011.
25. Chou, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*. 58:621-681, 2006.
26. Kisim A, Atmaca H, Cakar B, Karabulut B, Sezgin C, Uzunoğlu S, Uslu R, Karaca B. Pretreatment with AT-101 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of breast cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *J of Cancer Res and Clin Oncol*, 138(7):1155-63, 2012.
27. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science* 1546(33): 2013.

7. YAYINLAR

Proje ile ilgili 14. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi’de sunulmuş bir adet poster mevcuttur.

8. DEMİRBAŞ

Proje için herhangi bir demirbaş alınmamıştır.