Bazı Binaftol Türevlerinden Hareketle Elde Edilen Metal Komplekslerinin Sağlam ve Kanserli Hücreler Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

R. Beklem Bostancıoğlu

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık 2007

Investigation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Some Metal Complexes, Which are Obtained From Derivatives of Binaftol, on Healthy and Cancer Cells

R. Beklem Bostancıoğlu

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

December 2007

Bazı Binaftol Türevlerinden Hareketle Elde Edilen Metal Komplekslerinin Sağlam ve Kanserli Hücreler Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

R. Beklem Bostancıoğlu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mediha Canbek
Yrd. Doç. Dr. A. Tansu Koparal

Aralık 2007

Rakibe Beklem BOSTANCIOĞLU' nun YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Bazı Binaftol Türevlerinden Hareketle Elde Edilen Metal Komplekslerinin Sağlam ve Kanserli Hücreler Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkisinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mediha CANBEK

Üye : Yrd. Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU

Üye : Doç. Dr. Kadriye BENKLİ

Üye : Dr. Mustafa UYANOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdurrahman KARAMANCIOĞLU

Enstitü Müdürü

Anneme ve babama…

BAZI BİNAFTOL TÜREVLERİNDEN HAREKETLE ELDE EDİLEN METAL KOMPLEKSLERİNİN SAĞLAM VE KANSERLİ HÜCRELER ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

R. BEKLEM BOSTANCIOĞLU

ÖZET

Kanser, çağımızda oldukça yaygın olarak karşılaştığımız ciddi bir problemdir. Bu hastalığın tedavisinde, kemoterapi sıklıkla başvurulan bir yöntemdir. Metal kompleksleri içeren kemoterapotik ilaçların bu hastalığın tedavisinde olumlu sonuçlar verdiği düşünülmektedir.

Bu tezde kullandığımız maddeler bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılabilecek ilaç hammaddeleri olabilir. Bu maddeler bazı binaftol türevlerinden hareketle elde edilmiş metal kompleksleridir. Bunların sağlam ve kanserli hücreler üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisi, in vitro olarak hücre kültürü teknikleriyle araştırılmıştır. Bu amaçla sağlıklı çin hamster akciğer (V79 379 A) ve kanserli insan akciğer hücreleri (A549), $[(CuL)(NO_3)_2]$ ve $[(NiL)(CIO_4)_2]$ maddelerinin belirli dozlarına maruz bırakıldıktan sonra, hücrelerin sitotoksisitesi; mitokondrial aktiviteye dayalı MTT testi ile ölçülmüştür. Sonuçlar her iki maddenin de hücreler üzerinde sitotoksik etki yaptığını göstermiştir.

Bu maddelerin apoptotik etkisi ise DAPI boyama yöntemi ile incelenmiştir. Test maddeleri, özellikle $[(NiL)(CIO_4)_2]$ hücrelerde apoptozise neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Metal kompleksleri, MTT, Apoptozis, DAPI Boyama

INVESTIGATION OF CYTOTOXİC AND APOPTOTİC EFFECTS OF SOME METAL COMPLEXES, WHICH ARE OBTAINED FROM DERIVATIVES OF BINAFTOL, ON HEALTHY AND CANCER CELLS

R. BEKLEM BOSTANCIOĞLU

SUMMARY

Cancer is a serious problem that we quite frequently confronted with for a long tıme. Chemotheraphy is a rather frequently consulted method in cure of this illness. It is thought that, medicines which contain metal complexes affect this illness positively.

The materials that are used in this study are metal complexes, obtained from derivatives of binaftol and we think that these materials can be used as drug materials in curing certain kinds of cancers. In this thesis, cytotoxic and apoptotic effects of these metal complexes were investigated with techniques of cell cultures on healthy and cancer cells as in vitro. Accordingly, at first Chinese hamster lung cell (V79 379 A) and lung cancer cell of human (A549) were exposed to approprite dose of $[(CuL)(NO_3)_2]$ and $[(NiL)(CIO_4)_2]$ materials and, then cell cytotoxicity is measured with MTT test which is accepted as indicator of mitochondrial activity. The results showed that both materials cause cytotoxicity on healthy and cancer cells.

Apoptotic effect of these materials is detected with DAPI staining method. Test materials, especially $[(NiL)(CIO_4)_2]$, cause apoptosis on cells.

Keywords: Metal complexes, MTT, Apoptosis, DAPI staining

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisi ve yardımıyla hep yanımda olan hocam Yrd. Doç. Dr. Mediha CANBEK' e,

Her türlü bilgi, deneyim ve yardımıyla, ayrıca içimi hep ısıtan sevgisiyle yanımda olan, benden desteğini hiç esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL' a,

Tez çalışmalarımda kullandığım maddeleri veren Sayın Doç. Dr. Kadriye BENKLİ' ye ve Yrd. Doç. Dr. Gühergül ULUÇAM'a,

Deneylerim sırasında yardımı, bilgisi ve ilgisiyle beni destekleyen Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE'ye,

Yüksek lisans eğitimimi ve tez çalışmalarımı yürütmem için Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü imkânlarından yararlanmamı sağlayan bütün Anadolu Üniversitesi Biyoloji bölümü hocalarıma ve çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu süreç boyunca yardımları, destekleriyle ve sevgileriyle hep yanımda olan anneme, babama, kardeşim İlkem BOSTANCIOĞLU'na, Emrah ŞEN'e, Devrim GÜZEL' e ve Asist. Hakan ŞENTÜRK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beklem BOSTANCIOĞLU
Aralık 2007

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... İ

ABSTRACT ..... İİ

TEŞEKKÜR ..... İİİ

İÇİNDEKİLER ..... İV

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... Vİİİ

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM) ..... İX

TABLOLAR DİZİNİ X

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... Xİ

1.GİRİŞ 1

1.1. SİTOTOKSİSİTE 2

1.2. KANSER 4

1.3. APOPTOZİS 5

1.3.1. Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan genler 10

1.3.2. Apoptozis sürecine genel bakış 12

1.3.2.1. Tip 1 apoptozis 13

1.3.2.2. Tip 2 apoptozis 13

1.3.3. Apoptozisin özet olarak belli başlı aşamaları 15

1.3.4. Apoptozis belirleme yöntemleri 16

1.3.4.1. Morfolojik değişiklikler 17

a) Elektron mikroskobu 17

b) Işık ve Fluoresan Mikroskobu 17

1.3.4.1. DNA fragmentasyonu 18

a) TUNEL 18

b) ISEL (uç -işaretleme tekniği) 19

c) FIGE (ters alan jel elektroforezi) 19

d) Flow sitometri ve ELISA 20

e) DNA merdivenleşmesi 20

f) DNA fragmentasyon ölçümü 21

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

g) APO ssDNA 21
1.3.4.2. DNA boyama yöntemleri 21
a) Dye exclusion 21
b) DNA'ya bağlanan boyalar 22
c) Annexin V 22
1.3.4.4. Antibadies against target of executioner caspases 23
a) PARP 23
b) MP30 24
c) Flow sitometri 24
1.3.4. Spesifik apoptoz mediatorları 25
1.3.5.1. Plazma membranı 25
a) Fas, FasL, TRAIL-R (DR4, DR5), TNF-α 25
b) Fosfatidilserin 25
c) Seramid 26
1.3.5.2. Mitokondri 26
a) Mitokondrial potansiyel 26
b) Sitokrom C 26
c) SMAC/DIABLO 27
d) Seramid 27
e) Bcl–2 ve ailesi 28
f) Apoptizis indükleyici faktör (AIF) 29
1.3.5.3. Sitozol 29
a) Kaspazlar 29
b) Apoptozom 30
c) Apoptozis İnhibitörleri 30
d) Isı Şok Proteinleri 31
e) NF_KB 31
f) Protozom 32
g) Mikroarray analizleri 33
h) RNA interferens çalışmaları 34
1.3.6. Apoptozisin uyarılması 34
1.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRELERİN ÖZELLİKLERİ 35

1.4.1. A549 hücreleri 35

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

1.4.2. V79 379A (CHL) hücreleri 36
1.5. ÇALIŞMADA KULLANILAN TEST MADDELERİ 37
1.5.1. İlaç hammaddesi olarak bazı ağır metal kompleksleri 37
1.5.1.1. $[CuL](NO_3)_2$ 37
1.5.1.2. $[NiL](ClO_4)_2$ 38
1.6. ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLER 38
1.6.1. Mitokondrial aktiviteye dayalı MTT testi 38
1.6.2. Fluoresan boyama ile morfolojik inceleme (DAPI Boyama) 39
2.MATERYAL VE YÖNTEM 40
2.1. KULLANILAN İLAÇ HAMMADDELERİ 40
2.1.1. L^H Ligantının ve çeşitli metal komplekslerinin sentezi 40
2.1.1.1. ±2,2'-dihidroksi -1,1'-binaftil (109) eldesi (Vogel, 1987) 40
2.1.1.2. L^H ligantının eldesi (Cannon vd., 1967) 41
2.1.1.3. L^H ligantının oluşturduğu kompleksler 42
2.1.2. L^H Ligantının ve çeşitli metal komplekslerinin sentezi 43
2.1.2.1. 2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftil (109) 43
2.1.2.2. L^H LİGANTININ ELDESİ (CANNON VD., 1967) 47
2.1.2.3. L^H ligantının oluşturduğu kompleksler 50
2.2. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER 51
2.3. KULLANILAN SARF MALZEMELER 51
2.4. KULLANILAN ALETLER 51
2.5. KULLANILAN HÜCRELER 52
2.5.1. A549 hücre kültürü 52
2.5.2. V79 379A hücre kültürü 52
2.6. TEST MADDELERİNİN DOZLARININ HAZIRLANMASI 52
2.7. KULLANILAN ARAÇ VE GERECİN HAZIRLANMASI 53
2.8. YÖNTEM 53
2.8.1. Hücre kültürü 53
2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması 53
2.8.3. MTT ölçümü 54
2.8.4. Fluoresan boyama ile morfolojik inceleme 54
2.8.5. Mikroskopi 55
2.8.6. Fotografi 55

2.9. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME 55

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

3.BULGULAR 56

3.1. [CUL]$(NO_3)_2$'NİN A549, V79 379A (CHL) HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ 56

3.1.1. [CuL]$(NO_3)_2$'nin MTT testi sonuçları 56

3.1.2. [CuL] $(NO_3)_2$'nin fluoresan boyama ile incelenmesi 58

3.2. [NiL]$(CLO_4)_2$'NİN A549, V79 379A (CHL) HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ 61

3.3.1. [NiL]$(ClO_4)_2$'nin MTT testi sonuçları 61

3.3.2. [NiL] $(ClO_4)_2$'nin fluoresan boyama ile incelenmesi 63

4.TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER 66

KAYNAKLAR 71

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2.1. ±2,2'-DİHİDROKSİ -1,1'-BİNAFTİL 40

ŞEKİL 2.2. L^H LİGANTININ ELDESİ 41

ŞEKİL 2.3. L^H LİGANTININ OLUŞTURDUĞU KOMPLEKSLER 42

ŞEKİL 2.4. ±2,2'-DİHİDROKSİ–1,1'-BİNAFTİLİN (109) ELDE EDİLME MEKANİZMASI 44

ŞEKİL 2.5. KATALİTİK OLARAK ±2,2'-DİHİDROKSİ–1,1'-BİNAFTİL ELDE ETME YOLLARINDAN BAZILARI 45

ŞEKİL 2.6. ±2,2'-DİHİDROKSİ–1,1'-BİNAFTİLİN (109) IR SPEKTRUMU 46

ŞEKİL 2.7. ±2,2'-DİHİDROKSİ–1,1'-BİNAFTİLİN (109) ^{1}H NMR SPEKTRUMU 46

ŞEKİL 2.8. ±2,2'-DİHİDROKSİ–1,1'-BİNAFTİLİN (109) ^{13}C NMR SPEKTRUMU 47

ŞEKİL 2.9. WİLLİAMSON ETER SENTEZİNİN GENEL MEKANİZMASI 47

ŞEKİL 2.10. L^H LİGANTININ SENTEZİ 48

ŞEKİL 2.11. L^H LİGANTININ ÜÇ BOYUTLU ŞEMATİK GÖSTERİMİ 48

ŞEKİL 2.12. L^H'YA AİT FAB-KÜTLE SPEKTRUMU 49

ŞEKİL 2.13. L^H LİGANTININ KOMPLEKSLERİNİN SENTEZİ 50

ŞEKİL 3.1. [CUL]$(NO_3)_2$'NİN A549 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN MTT TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ 57

ŞEKİL 3.2. [CUL] $(NO_3)_2$'NİN V79 379A HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN MTT TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ 58

ŞEKİL 3.3. [CUL] $(NO_3)_2$'NİN V79 379A HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİSİNİN DAPI BOYAMA İLE İNCELENMESİ 59

ŞEKİL 3.4. [CUL] $(NO_3)_2$'NİN A549 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİSİNİN DAPI BOYAMA İLE İNCELENMESİ 60

ŞEKİL 3.5. [NİL]$(CLO_4)_2$'NİN A549 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN MTT TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ 61

ŞEKİL 3.6. [NİL]$(CLO_4)_2$'NİN V79 379A HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN MTT TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ 62

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

ŞEKİL 3.6. [NİL]$(CLO_4)_2$'NİN V79 379A HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİSİNİN DAPI BOYAMA İLE İNCELENMESİ 64

ŞEKİL 3.6. [NİL]$(CLO_4)_2$'NİN A549 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİSİNİN DAPI BOYAMA İLE İNCELENMESİ 65

TABLOLAR DİZİNİ

TABLO 1.1. NEKROZİS VE APOPTOZİSİN KARŞILAŞTIRILMASI..... 8

TABLO 1.2. APOPTOZİSİN DÜZENLENMESİNDE GÖREV ALAN GENLER..... 10

TABLO 2.1. L^H LİGANTININ KOMPLEKSLERİNİN RENKLERİ VE VERİMLERİ 43

TABLO 2.2. L^H LİGANTININ KOMPLEKSLERİNE AİT IR SPEKTRUM DEĞERLERİ..... 43

TABLO 2.3. $[CUL^H](NO_3)_2$ KOMPLESİNE AİT FAB-KÜTLE (M/Z) SPEKTRUM DEĞERİ 43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA: Etilen-diamin tetra astetik asit

FBS/FCS: Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum

HAM'S: Nutrient Mikture F–12

MTT: 3-(4,5-dimetiliazol–2-yl)-2,5 difenil tetrozolyum bromid

$NaHCO_3$: Sodyum bikarbonat

PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline

1. GİRİŞ

Kanser sağlık sistemi üzerinde önemli sosyal ve ekonomik etkiler ortaya çıkaran ciddi bir klinik problemdir. Moleküler teşhis tekniklerinin gelişmesine ve imajının değişmesine rağmen bu hastalık hala dünyada milyonlarca insanı etkilemektedir (Eisenberg et al., 1998). Bu nedenle ilaç dirençliliğinin üstesinden gelecek yeni maddelere ve farmakoloji profilinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Chen et al., 2006).

Akciğer kanserleri çok sık görülmektedir ve dünyada kanserden ölüm nedenlerinin en önemlisi olarak gösterilmektedir (Milleron and Depierre; 1998; Frijia, 1995: Forest et al., 2005). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin alt grubundan olan adenokarsinomalar Amerika'da ve Japonya'da en yaygın görülen kanser tipidir. Akciğer ve diğer kanser türleri için ameliyat iyi seçilmiş bir tedavi yöntemidir. Fakat genellikle bu hastalık teşhis edildiğinde ileri safhada olduğu için, bu tümörlerin %25'inden daha azına bu yöntem uygulanabilir (Aubier et al., 1996; Israël, 1985: Forest et al., 2005). Bu durumda kemoterapi devreye sokulabilir. Ancak kemoterapi de yaklaşık %30 oranlarında zayıf bir yanıtla sonuçlanmaktadır (Forest et al., 2005).

Kemoterapi birçok kanserin tedavisinde kullanılır ve kanser hücrelerini apoptozisle öldürdüğü bilinmektedir (Tong et al., 2000).

Apoptozisin kanser tedavisinde etkili olduğu düşünülmektedir (Darzynkiewicz et al., 1997: Tong et al., 2000). Apoptozis ya da programlı hücre ölümü, organizmadaki homeostasinin devam ettirilmesine olanak veren, hücre proliferasyonunu dengeleyen, temel, fizyolojik bir süreçtir. Bu aktif oto yıkım mekanizması, morfolojik ve biyokimyasal olarak nekrozisden ayrılır (Ohtani et al., 1999; Mossman, 1983: Tong et al., 2000). Apoptozis; hücrelerde büzülme, nüklear kromatin kondensasyonu ve internükleozomal DNA parçalanması gibi belirli karakteristik morfolojik farklılıklar gösteren fizyolojik hücre ölüm süreci olarak tanımlanır (Bowen, 1990; Hockenbery, 1995.).

Furst (1963) tarafından, en azından bazı kanser tipleriyle, bazı metallerle güçlendirilmiş kimi bileşikler arasında ilişki olduğu öne sürülmüştür. Schubert (1966) ise, metal bileşiklerinin malignansi tedavisinde belirleyici bir rol oynadığını göstermiştir. Örneğin; Ni ve Pd'nin dietildithiofosfat bileşiklerinin, Walker 256 karsinoma testiyle karsinostatik aktivitesi tespit edilmiştir. Livingstone ve ark. (1970) ise, Paladyum ve bazı bakır bileşiklerinin dithiokarbasik asit türevlerinin, bir insan nazofarinks epidermoid karsinoması üzerinde 9KB testinde stostatik aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Bununla birlikte Pd, Cu, ve Zn bileşiklerinin S-metildithiokarbasit türevlerinin, P388 fare lenfoid lösemisine karşı önemli antitümör aktiviteye sahip olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Ayrıca bakır kompleksleri ve bakır iyonlarıyla oluşturulan bazı ligantların DNA parçalanmasına neden olduğu saptanmıştır (Shrivastav et al., 2002).

Bazı metal komplekslerinin, kanser tedavisinde etkili bir yöntem olan kemoterapide kullanılabilecek ilaç ham maddeleri olabileceğinden, çalışmamızda bazı binaftol türevlerinden hareketle elde edilen metal komplekslerinin ($[CuL](NO_3)_2$ ve $[NiL](ClO_4)_2$) sağlıklı hücreler (V79 379A CHO) ve kanserli insan akciğer hücreleri (A549) üzerindeki apoptotik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

1.1. Sitotoksisite

İyi tanımlanmış bir hareket mekanizmasına sahip, gelişen yeni kanser kemoterapi ajanları, hala araştırmacıların hem temel hem de klinik bilimlerde büyük sorunlarla karşı karşıya olduğu onkolojinin önemli bir alanıdır (Dredge et al. 2003; Lee et al., 2003). Günümüzde kullanılan sitotoksik ilaçlar olan kemoteropotik ajanlar malignant hücreleri öldürür ya da onların büyüme yolunu değiştirir (Harvey, 2000).

Birçok sitotoksik anti kanser ilacın tümör hücrelerinde apoptozisi uyardığı gözlenmiştir. (Wu et al., 1999).

In vitro sitotoksisite testleri hızlı ve rasyonel methodlardır (Mathur et al., 2005). *In vitro*da kullanılan methodlar test yapılması gereken hayvan sayısını azaltır ve organ toksisitesini hedef alan çalışmalar için çok değerli bir araçtır (Fattinger ve ark., 2001; Funk ve ark., 2001 a, b: Kemp and Brouwer, 2004).

Toksikolojik deneyler; bir 24 saatlik zaman periyodunun ardından, canlılığın değerlendirilmesinden önce meydana gelen maksimum hücresel hasarın gösterilmesini sağlarlar (Kemp and Brouwer, 2004).

DAPI (4'6-diamidino–2 fenilindol) ve MTT (3-(4,5-dimetiliazol–2-yl)-2,5 difenil tetrozolyum bromid) deneyleri, *in vitro*da rutin olarak canlılığı belirlemek için yapılan toksikolojik çalışmalarda seçilirler. Bu deneyler düşük hata oranlarıyla birçok kez tekrarlanabilir (Kemp and Brouwer, 2004).

MTT deneyi, sıklıkla hücre çoğalmasının dolaylı bir indikatörü olarak kullanılmaktadır (Mosmann, 1983). MTT deneyi, direk ve hızlı bir şekilde dehidrogenazın aktivitesini ölçer. NADH veya NADPH indirgenmesiyle tetrozolyum tuzu bir formazan ürününe dönüşür. NADH dehidrogenazlar; solunum zincirinin enerji üretim reaksiyonları olan glikoliz, TCA siklusu ve oksidatif fosforilasyona katılır. NADPH dehidrogenazlar ise biyosentetik indirgeyici reaksiyonlara katılır. Bu dehidrogenazlar çoğunlukla mitokondride bulunurlar ve bazı hücre tiplerinde az bir kısmı da endoplazmik retikulumda bulunur (Wu et al., 1999).

Elde edilen kanıtlar, mitokondrinin; çeşitli hücre tiplerinde birçok uyarıcı tarafından hücreyi ölüme götürmede önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Yang et al., 1997; Wetzel et al., 1998: Wu et al., 1999).

Mikles Robertson ve arkadaşları (1979) anti tümör ilaçların neden olduğu mitokondrial hasarın aktif olarak çoğalan hücrelerde, durgun hücrelere göre çok daha hassas olduğunu belirtmişlerdir (Wu et al., 1999).

DAPI ise fluorasan boyama ile hücre DNA'sında meydana gelen değişimi gözlemlemekte kullanılan bir boyadır. DAPI, membrandan geçebilir ve hücrelerin membranları arasına girerek DNA'ya bağlanır. DAPI mavi bir fluoresan proteinidir. DAPI, DNA'ya bağlandığında, DAPI'nin fluoresansı 20 kat artar ve bütün hücrelerin çekirdekleri boyanır. Bu deney, tekrarlanabilir, güvenilirdir ve yapılması kolaydır (Kemp and Brouwer; 2004).

1.2. Kanser

Kanser, yakın ve uzak dokuları istila etme ve sonunda hasta dokuyu öldürme yeteneğinde olan tümör içindeki hücrelerin anormal büyümesiyle karakterize edilen bir dizi ölümcül hastalık olarak tanımlanabilir (Harvey, 2000).

Kanser kemoterapisi yaygın olarak çoklu ajanların kombinasyonunu gerektirmektedir. Ancak kombinasyon terapisi sitotoksisiteyi artırdığı için tedavi sonucunun kötüye gitmesine neden olmaktadır. Normal hücrelerde ilaçların toksisitesi ve kemoterapotik ilaçlara direnç, tümör tedavisindeki hatalı sonuçların nedenidir. Bu gibi problemlerin üstesinden gelmek için, tümör hücrelerinde toksik olan kemoteropotik kombinasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır (Suda et al., 1993).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri genellikle radyasyona ve kemoterapiye dirençlidir ve genellikle cerrahi müdahaleden sonraki safhada tekrar ortaya çıkar. Bugüne kadar akciğer kanseri tedavisinde uygulanan tedavi yöntemleri artık yetersiz kalmaktadır. Ortaya atılan yeni tedavilerin ise, akciğerdeki yeni tümör oluşumunu ve artışını engellemesi gerekmektedir (Kim et al., 2003).

1.3. Apoptozis

Kanser; insan sağlık sistemi üzerinde önemli sosyal ve ekonomik etkilere sahip ciddi bir kliniksel problemdir. Teşhis, korunma yöntemleri ve terapilerdeki gelişimlere rağmen bu hastalık hala bütün dünyada milyonlarca hastayı etkilemekte, onların yaşam kalitesini düşürmekte ve dünyadaki ölüm nedenlerinin başını çekmektedir (Cheng et al., 2005).

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü, normal gelişimde önemli bir fizyolojik süreçtir (Hong ve ark., 2003) ve apoptozisin uyarılması; kanserin kontrolü için terapotik bir strateji olarak çok arzu edilen bir yoldur (Koo ve ark., 2002; Thompson, 1995).

Ökaryotik organizmadaki hücreler doğarlar, belirli bir süre yaşarlar ve sonra ölürler (Bowen, 1998). Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Örneğin, barsak hücreleri 3–5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürlerken, derinin epidermal hücreleri 20–25 günlük bir süre sonunda ölmektedirler. Fakat miyokard kası hücreleri veya nöronlar ömür boyu yaşarlar. Buna rağmen miyositlerin veya nöronların kabaca %10-15'i insan yaşamının sonuna doğru ölmektedirler. Nöronların çok sayıda ölmesi ancak sinapsların tam olarak oluşmadığı dönemden önce olur. Bu dönemde, doğumda aşırı sayıda olan nöronların sayısı uygun sinaptik ağın sağlanabilmesi için azalır. Optimum sayıda nöronun, optimum sayıda sinaptik bağlantı içinde olabilmesi için bu nöron kayıpları gereklidir. Bahsedilen bu hücre ölümleri apoptozisle gerçekleşir. Zamanı gelince bu hücreler, daha önceden programlanmış bir şekilde ölürler ("programmed cell death"). Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü "apoptozis" ("physiological cell death") olarak da adlandırılır. Ayrıca, bir şekilde DNA'sı hasarlanmış (virüs etkisi veya çevresel nedenlerle) hücreler organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürürler ("cell suicide") ve bunu organizmanın yararı için yaparlar. Doku homeostazisi için (örneğin yara iyileşmesi veya barsak hücrelerinin "turnover"ında olduğu gibi) hücreler ortamdan ölerek kaybolur ("cell deletion"). (Ulukaya, 2003)

Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (Yılmaz, 2005)

Programlı hücre ölümü, bundan 30 yıl önce ilk kez tanımlandığında organize bir şekilde ölen hücredeki, hücresel değişiklikler elektron mikroskobuyla gösterilmiştir. Oldukça çok araştırmada bu programlı hücre ölümünün, kanserin de içinde olduğu birçok hastalık tarafından potansiyel hedef olduğu belirtmiştir. Apoptozisle ilgili çalışma teknikleri gün geçtikçe gelişmektedir (Huerta et al., 2006).

Yaşayan organizmalardaki programlı hücre ölümü yani apoptozis, hücre içi ya da hücreler arası birkaç çeşit uyaran tarafından başlatılan süreçle aktif enerjiye bağlı ve oldukça etkili bir yoldur (Huerta et al., 2006).

Organize edilmemiş hücre ölümü olan nekrozun tersine apoptozis çok dikkatli programlanmış bir süreçtir (Kerr et al., 1972). Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen, apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Diğer bir ifadeyle apoptozis hem sağlıkta hem de hastalıkta meydana gelmektedir (Ulukaya, 2003).

Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrozisde kromatin hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve kondanse olur. Nekrotik hücrenin plazma membranı, bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı sağlamdır ve üzerinde küçük cepcikler oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere “apoptotik bodies” parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır, değişen miktarlarda nukleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozisde plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış

ortama salıverilmesi sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz (Ulukaya, 2003).

Apoptozisin en önemli özgün yönü, DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180–200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo bazçifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir. DNA'yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase I ve II'de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyaranın özelliğine göre değişebilir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden birisi de normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (Ulukaya, 2003).

Tablo 1.1. Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması. TNRF–1, tumor nekrozis factor reseptörü–1 (Ulukaya, 2003).

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan nedenler	•İskemi •Hipertermi •Hipoksi •Litik viral enfeksiyon •Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları •Şiddetli oksidatif stress	•Büyüme faktörü eksikliği •Hücre yaşlanması "Senescence" •HIV •Kanser ilaçları •Radyasyon •Yüksek doz glukokortikoid •Fas veya TNFR–1 reseptörlerinin aktivasyonu •Sitotoksik T lenfositler •Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
Morfolojik özellikler	•Hücre membranı bütünlüğünün kaybı •Kromatin "flocculation"u •Hücre şişmesi •Organellerin disintegrasyonu •Endoplazmik retikulumun dilatasyonu •Büyük vakuollerin oluşumu •Hücre lizisi	•İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu •Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması •Hücre küçülmesi •Organellerde disintegrasyon yok •Hücrenin intact mitakondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması
	•Bozulmuş iyon	•İyi kontrollu, bazı

Biyokimyasal özellikler	hemostazisi •ATP gerekmez (pasif süreç) •+4 oC'de gerçekleşebilir •DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) •Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümün geç safhasında)	aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması •ATP gereklidir (aktif süreç) +4 oC'de gerçekleşmez) •DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirteci) •Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	•Hücreler gruplar halinde ölür •Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir •Lizozomal enzimler salınır •İnflamasyona neden olur	•Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür •Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir •Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler •İnflamasyon görülmez

Apoptozis ilk defa Kerr ve Wyllie tarafından 1972'de tanımlanmıştır (Kerr et al., 1972). Bu kişiler organize edilmiş hücre ölümü geçiren hücrelerde meydana gelen değişiklikleri elektron mikroskobu yardımıyla göstermişlerdir (Cummings et al., 1997). Kanserin de aralarında olduğu birçok hastalık ve onlarının hızla ilerlemesi yüzünden 30 yıl önce apoptozisle ilgili oldukça genişletilmiş çalışmalar yapılmaya başlanmıştır ve bu programlı hücre ölümünün nasıl gerçekleştiğini göstermek amacıyla apoptozisis belirleme yöntemleri de gelişmektedir (Huerta et al., 2006).

1.3.1. Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan genler

Kanser tedavisinde ana mücadele, birçok tümör hücresinin p53, Bcl ailesi proteinleri ya da bunların kaspaz sinyalini uyarmasında anahtar olan apoptotik gen mutasyonları taşımasıdır (Hollstein et al., 1994).

Tablo 1.2. Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan genler

• Fas, TRAIL, TNF (almaç ve ligantlar)	• Kaspazlar
• Bcl–2 Ailesi Proteinleri	Granzim, Kalpain
• Kinazlar	• Kaspaz Düzenleyicileri
RIP3, CAP, AKT, PKA, MapK	IAP/ Survivin, Apaf-1
• Mitokondri Proteinleri	• Transkripsiyon Faktörleri
VDAC, ANT, Sitokrom C, AIF, SMAC	P53, myc, Nur77
• Proteazlar	• Diğerleri
FADD, TRADD, DAD1	

Bcl–2 ailesi bir hücrede, apoptotik süreçte ve kaskatın proteolitik parçalanması olaylarında bir ana oyuncu olarak sayılan, kaspaz olarak adlandırılan, ölüm proteazlarıyla ilişkili, mitokondrial apoptogenik faktörlerin serbest kalmasını kontrol ederek yaşamı ya da ölümü belirler (Oltvai et al., 1993). Bcl–2 ailesi proteinleri; anti apoptotik (Bcl–2, Bcl-X_L ve Bcl-W gibi) ve proapoptotik (Bax, Bad, Bak, Bak/MTD, Bcl-X_s ve NOXA gibi) üyeler olarak alt bölümlere ayrılabilir (Antonsson and Martinou, 2000). Bcl–2, apoptotik yolu düzenlediği ve hücre ölümünü koruduğu bilinen apoptotik bir gendir. Bax ise proapoptotik gen ailesidir. Apoptozis süreci boyunca seçici olarak hücre ölümünü baskılar ya da teşvik eder (Oltvai et al., 1993). Bcl–2 ve Bax oranlarının, hücrenin ölümünü ya da hayatta kalmasını belirlediği öne sürülmektedir (Hollstein et al., 1994). Kemoterapiye verilen cevap oranı ve onkojenik potansiyelin artması, proapoptotik Bcl-2 proteinlerinin ifadesindeki azalma ya da anti apoptotik Bcl-2 proteinlerinin ifadesindeki artmayla ilişkilidir (Ferlini et al., 2003).

Kanser gelişiminde iyi bilinen tümör baskılayıcı gen p53'dür. p53 geni, DNA'da meydana gelen hasara hücrenin verdiği tepkide kendisini gösterir. Bu gen DNA hasarlanması sonucu aktive olarak p21, BAX, MDM2 ve GADD45 gibi bir dizi genin aktivasyonunda rol oynar. Bunlar da hücre döngüsünün G_1/S fazlarını, G_2/M'de DNA hasar kontrol noktasını ve apoptozisi düzenlemeye yardımcı olurlar (Bertram 2001; Lewin 1997; Karp 1999; Shay et al., 1991). Tümör baskılayıcı gen p53'ün hücre döngüsünü ve insan hücrelerindeki DNA hasarı ya da hipoksi, nükleotid kaybı, onkojenlerin aktivasyonu gibi çeşitli hücresel streslerin aktivasyonu sonucu ortaya çıkan apoptozu durdurmada çok önemli olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Bennett, 1999; May and May, 1999). Normal p53 fonksiyonunun kaybı, tümör oluşumu ve gelişimindeki risk artışıyla ilişkilidir (Donehower et al., 1992). Bununla bağlantılı olarak da gen hedefleme stratejileri; p53 aracılığıyla G_1'in durdurulmasını sağlayan, -etkili bir inhibitör olarak tanımlanan- siklin Ecdk2 ve siklin Dcdk4/6'yı da içeren birkaç siklin cdk (cyclin dependent kinase=siklin bağımlı kinaz) kompleksinin inhibisyonundan sorumlu, önemli bir aracı (mediatör) olan p21/WAF1'in üzerinde durmaktadır (Bennett, 1999; May and May, 1999). P21/WAF1, siklin cdk kompleksinin substratıyla efektör kısmının temasını önleyerek onu inhibe eder (Agarwal, 2000; May and May, 1999; Sharr and Roberts, 1999).

Apoptozis çeşitli uyarıcılar tarafından tetiklenebilir fakat tipik bir yolu takip eden oldukça düzenlenmiş bir süreçtir (Rieux-Laucat, 2000; Mignon et al., 1999). Apoptozis dengeleyici efektörler, kaspaz olarak isimlendirilirler (Mignon et al., Dietrich, 1997; Ségal-Bendirdjian, 1999). Apoptozis sürecinde kaspazların öldürücü "executioner" olarak rol oynadığı bilinmektedir. Kaspazlar genellikle hücrelerdeki inaktif zimojenlerde bulunurlar ve alt birimlerinde bulunan öğelerin proteolitik parçalanmasıyla aktive olurlar. Parçalanmadan sonra, kaspaz molekülleri bir büyük ve bir küçük alt birim içeren heterodimerler olarak rol oynar. Aktivasyon başladığında, başlatıcı kaspaz kaskatın amplifikasyonuyla sonuçlanan öldürücü kaspazları aktive eder. Aktif kaspazlar kritik hücresel protein substratlarını parçalar ve hücreyi ölüme götürürler (Zou et al., 1997; Li et al., 1997: Liu et al., 2002).

Farklı kaspazlar tanımlanmıştır. Fakat özel olarak ilginç olan biri, ana fenomen efektör olduğu için ve onun aktivasyonu geri dönüşümsüz hücre hasarına yol açtığı için, kaspaz 3'dür. Bu kaspazın aktif formunun ekspressiyon seviyesi genellikle apoptozisi ortaya çıkarmakta kullanılmaktadır (Forest et al., 2005).

Survivin de apoptozis protein ailesinin (IAP) baskılayıcı bir üyesidir. IAP ailesinin bir üyesi olan survivinin, kanser hücrelerinde canlılık ve ölüm arasındaki dengeyi ayarladığı rapor edilmiştir (Ambrosini et al., 1997: Jin et al., 2006). Bazı insan tümörlerini baskıladığı için kanser terapilerinde iyi bir hedef olabilir (Jin et al., 2006).

1.3.2. Apoptozis sürecine genel bakış

Apoptozis "up" ve "down" regülasyon özelliklerine sahip moleküllerin karşılıklı etkileşimlerini içerir. Proapoptotik moleküllerin uyarımı ya da anti apoptotik faktörlerin inhibisyonu hücrenin tipine ve saldırı biçimine bağlıdır (Huerta et al., 2006).

Hücrelerin bu uyarılara verdiği cevap gelen uyarının türüne göre değişir. Çünkü apoptozis sırasında birçok sinyal gönderilir ve bu sinyaller farklı hücrelerde farklı biçimde algılanırlar ve süreç bu farklılıklara göre işler. Memeli hücrelerinde iki tane büyük apoptotik yol "pathway" belirlenmiştir. Bunlar; ölüm almacı (ekstrinsik) ve mitokondrial (intrinsik) iç yoldur (Pınarbaşı, 2007).

Tek bir bileşenin aktivasyonu ve inaktivasyonu hücrenin sonunu değiştirecektir ve hücreyi apoptozise götürecektir (Huerta et al., 2006).

Klasik apoptozisde, sistin aspartatın spesifik proteazı olan ve kaspazlar olarak adlandırılan, yıkıcı proteolitik enzimlerin aktivasyonu hücrenin ölümünü belirler. Kaspazlar başlatıcı "iniator" kaspazları (8–10) ve efektör kaspazları (3–6–7) içeren bir gruptur (Huerta et al., 2006).

Efektör kaspazların aktivasyonu tip 1 ve tip 2 apoptozisi ortaya çıkarır (Huerta et al., 2006).

1.3.2.1. Tip 1 apoptozis

Apoptozis; dış kaynaklı ya da ölüm reseptörleri yoluyla;

1) TNF (tümör nekroz faktör) reseptörüne bağlanan TNF ligantının bağlanması DR4 VE DR5 reseptörlerine TRAIL' in bağlanması ya da Fas reseptörüne FasL ligantının bağlanmasıyla başlatılır.

2) Bu ilişki başlatıcı (iniator) kaspaz 8 ve 10'un aktivasyonunu sağlayan FADD ya da TRADD gibi adaptör molekülleri harekete geçirir. Böylece sırasıyla; kaspaz 8 ve 10 parçalanır. Bunların parçalanması öldürücü kaspazlar 3,6 ve 7'yi aktive eder (Krammer, 2000; Walczak and Krammer, 2000; Huerta et al., 2006).

1.3.2.2. Tip 2 apoptozis

İntrinsik ya da mitokondrial yol; mitokondrial membranlar arasından sitozole sitokrom C' nin salınıvermesiyle aktive olur. Sitokrom C salındığında Apaf–1, ATP ve prokaspaz 9'la etkileşerek **apoptozom** adı verilen çok proteinli bir yapıyı oluşturur. Bu aşamadan sonra ya Apaf–1, sitokrom C ve prokaspaz 9 üçü birden, stoplazmik prokaspaz 9 komplekse katılır katılmaz harekete geçerek aktivasyon gerçekleşir ya da iki apoptozom birbiriyle etkileşime girer ve başka bir apoptozomda yer alan prokaspaz 9'u aktive eder. Prokaspazın aktivasyonu, kaspaz 9'u aktive eder. Kaspaz 9'un aktivasyonu da apoptozisi uyaran kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktivasyonunu sağlar (Adrain and Martin, 2001; Pınarbaşı, 2007).

Ayrıca kaspaz 9'un aktivasyonunda apoptozomun rol almadığı bir başka yol da tanımlanmıştır (Chauhan et al., 2001; Sperandio et al., 2000; Huerta et al., 2006).

Mitokondrial membranın sitokrom C'ye geçirgenliği proapoptotik ve anti apoptotik aracıların oranıyla ilişkili olarak belirlenir. Proapoptotik moleküller Bax ve/veya Bak mitokondrial membranlar arasında transloke olduğunda, apoptozom formundaki sitokrom C varlığında belirgin bir artış olur. Bax ya da Bak gibi proapoptotik moleküllerin etkileri; mitokondrial membran geçirgenliğinin değiştirilmesi şeklindedir. Çünkü proapoptotik moleküllerin kendilerini membranlar arasına yerleştirme yetenekleri vardır. Bir hipoteze göre; bu moleküller, membranların içine yerleşerek işlev görürler ve kanallar ya da porlar oluşturarak mitokondri matriksine sızarlar (Hengartner, 2000; Huerta et al., 2006). Bax ya da Bak'ın çalışma şekli konusundaki diğer bir görüş; bunların bağımsız anyon kanallarının voltajında önemli bir değişime neden oldukları şeklindedir (Hengartner, 2000; Huerta et al., 2006). Böylece büyük proteinlerin zardan geçişine izin verilir (Huerta et al., 2006).

Proapoptotik molekül çiftleriyle, anti apoptotik faktörler (Bcl–2, Bcl-$_X$L ve Mcl–1) onların anti apoptotik işlevlerini nötralize ederler. Böylece proapoptotik ve anti apoptotik aracıların oranı apoptozom formundaki sitokrom C varlığının miktarıyla belirlenir (Huerta et al., 2006).

Mitokondrial yol; apoptozisin uyarılmasıyla birlikte SMAC/DIABLO ve Omi/HTRA-2'nin serbest kalması ile de sonuçlanır. Bu faktörler cIAP1, cIAP2 ve XIAP gibi inhibitörleri IAP'nin faaliyetinin durdurulmasında rol alır (Du et al., 2000; Huerta et al., 2006).

IAP'lerin aktivasyonu ve/veya sentezi nüklear transkripsiyon faktörü kappa B (NF_KB)'nin kontrolü altındadır. NF_KB normalde, ikinci bir molekül olan I_KB'ye bağlı olarak inaktif halde, sitozolde bulunur (Mayo and Baldwin, 2000; Huerta et al., 2006).

Tip 1 ve tip 2 apoptozis arasındaki bağlantı değişik aşamalarda ortaya çıkar. Kaspaz 8'in aktivasyonu Bid'in uyarılmasıyla sonuçlanır. Bid de (tip 2 hücrelerde)

apoptozom ve sitokrom C'nin salınmasından sorumludur (Roy and Nicholson, 2000; Huerta et al., 2006). Benzer şekilde efektör "downstream" kaspaz 6'nın uyarılması ve geriye dönüp kaspaz 8'in aktivasyonuna neden olabilir (Slee et al., 1999; Huerta et al., 2006).

Kaspaz kaskattan bağımsız apoptozis mekanizmaları da tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar proteazları, apoptozis indükleyici faktörü (AIP), endonükleaz G'yi, kalpainleri ve kathepsinsleri içerebilir (Broker et al., 2005). AIF, mitokondrial membranlar arasından sitozole salınarak bir DNAaz olan siklopilin ile etkileşir. Nükleusta translokasyon gerçekleşirken DNA fragmentasyonu başlatılır (Urbano et al., 2005).

1.3.3. Apoptozisin özet olarak belli başlı aşamaları

— Apoptozisin indüksiyonu

— Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması

— Sitokrom C'nin salıverilmesi

—Apoptozom oluşumu (sitokrom c+Apaf–1 +kaspaz–9)

— Mitokondrial transmembran potansiyelin değişmesi

— Kaspazların aktivasyonu

— Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması

— DNaz'ın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmentasyonu (internukleozomal DNA fragmentasyonu)

— Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi olarak bilinmektedir (Ulukaya, 2003).

1.3.4. Apoptozis belirleme yöntemleri

Hücrelerin, nekrozise karşı programlı hücre ölümü geçirip geçirmediğini saptayan birçok çalışma vardır. Apoptozis çalışmaları çok değişik bölümlere ayrılabilir:

1. Time progression: Zaman (erken apoptozis, geç apoptozis)
2. Ekstrinsik yola karşın intrinsik yol
3. Bölümlere ayırma: Nükleus, sitozol, mitokondri, hücre membranı

Apoptozisi belirlemede kullanılan spesifik test tipleri, yapılan çalışmaya özgüdür ve çalışmada kullanılan hücre ya da doku örneğine bağlıdır. Apoptozis, ilki membranda görülen bir dizi morfolojik değişiklikle ortaya çıkar. Hücreden hücreye adhezyon azalır ve diğer sitozolik ya da mitokondrial proteinler -nüklear değişimler sonucu- yer değiştirirler. Bu süreç 1 ya da 3 saat sürer (Gavrieli et al., 1992: Huerta et al., 2006). Apoptozisin son belirteci düzenli bir internükleozomal DNA fragmentasyonudur. Çünkü programlı hücre ölümünün biyokimyasal işareti sonuçta DNA fragmentasyonuna yol açan kaspaz kaskatın aktivasyonudur ki, bir hücrenin apoptozis sürecine girip girmediğinin kanıtlanması için hem kaspaz aktivasyonunun hem de DNA fragmentasyonunun gösterilmesi gerekir. Çünkü DNA fragmentasyonu olmadan da kaspaz 3 aktivasyonu ve apoptozise özgün morfolojik değişiklikler gözlenebilir (Takemura et al., 2001: Huerta et al., 2006). Apoptozisi belirlemek için ticari olarak satılan birçok kit vardır (Hoffman, 2006; Chemicon International, 2006: Huerta et al., 2006).

Apoptozisi belirlemek için kullanılan her metodun avantajları ve dezavantajları vardır ve çoklu tamamlayıcı tekniklerle apoptozisi saptamak en iyisidir. Örneğin; DNA fragmentasyon deneyleriyle morfolojik değişiklikleri mikroskobik inceleme apoptozisle meydana gelen hücre ölümünü belirlemek için kullanılan birbirinden bağımsız, güvenilir iki tekniktir. Ancak programlı hücre ölümü geçiren hücreler için morfolojik inceleme hala en güvenilir teknik olarak yerini korumaktadır (Huerta et al., 2006).

Apoptozis görüntüleme yöntemleri;

1.3.4.1. Morfolojik değişiklikler

a) Elektron mikroskobu

Apoptozis geçirmiş hücrelerin, geçirdiği morfolojik değişikliklerin, nekrozisdekinden farkı ilk olarak elektron mikroskobunda gözlenmiştir. İkisi arasındaki farkı ayırt eden en iyi yöntem aslında elektron mikroskobuyla incelemedir. Apoptozisin ilk ve son aşamalarındaki spesifik morfolojik değişiklikler elektron mikroskobu ile belirlenebilir. Elektron mikroskobu, apoptozis taramalarında oldukça spesifik ve hassas bir testtir ve TUNEL yöntemiyle DNA fragmentasyonunun boyanmasını değerlendirmede kullanılabilir. Bu yöntemde; hücreler fiske edilir, boyanır, dehidrate edilir, gömülür ve ultramikrotom ile ince kesitlere ayrılır. Bundan sonra hücre kesitleri bakır gridlere (ızgara) toplanır, boyanır ve görüntülenir (Huerta et al., 2006).

Elektron mikroskobu pahalı ekipmanlar ve özel eğitim gerektirdiği için apoptozisi görüntülemede çok yaygın olarak kullanılan bir teknik değildir (White and Cinti, 2004: Huerta et al., 2006). Çünkü büyük örnek alanlarını görüntülemek oldukça zordur ve zaman alır (Huerta et al., 2006).

b) Işık ve Fluoresan Mikroskobu

Işık mikroskobu, hemotoksilen ve eosinle boyanmış hücrelerdeki apoptotik badileri (cisimleri) ve nüklear kondensasyanları belirler. Işık mikroskobunun apoptotik hücreleri saptama yeteneği düşüktür. Ancak, propidyum iyodürle boyanmış apoptotik hücrelerin çekirdekleri, nekrotik hücrelerden ayırt edilebilir. Yine de ışık mikroskobunun duyarlılığı, fluoresan kullanılarak artırılabilir. Hoechst 33258 gibi nükleer fluoresan boyalar nüklear değişiklikleri incelemede kullanılabilir. Bu

mikroskobik teknikler sadece apoptozisin son safhasındaki olayları belirlemek için kullanılır ve bu tekniklerin kullanımı birçok örneğin gösterilmesinde yetersiz kalmaktadır. Işık mikroskobu, fluoresan mikroskobu ve elektron mikroskobunun da aralarında bulunduğu bütün bu mikroskobik teknikler in vitro apoptozis çalışmalarında kullanılabilir. Böylece apoptozise karakteristik olan apoptotik badileri mikroskobik olarak saptamak mümkün olur (Huerta et al., 2006).

1.3.4.1. DNA fragmentasyonu

a) TUNEL

TUNEL yöntemi 1992'de Gauneli ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur. TUNEL yöntemi bu tarihten sonra apoptozis çalışmalarında kullanılan in situ deneylerde hızla yaygınlaşmaya başlamıştır. TUNEL, fragmente olmuş DNA'nın 3'-OH ucuna bağlanan spesifik terminal deoksinükleotitidil transferaz (TDT)'ye dayalı bir yöntemdir. Histolojik kesitlerde proteolitik uygulamayı takiben DNA kırıklarının olduğu bölgelerdeki TDT'ye X-dUTP ilave edilir. Avidin-peroksidazla güçlendirilmiş nükleotid uç kısımları işaretlenir ve işaretlenmiş hücreler ışık ya da fluoresan mikroskobuyla, flow sitometri ya da immunohistokimyasal yöntemle incelenir (Gavrieli et al., 1992). Bu yöntem bazı yönlerden dezavantajlara sahiptir. Birincisi fiksasyon ve dokuya muamele TUNEL deneylerinin sonuçlarında önemli değişikliklere neden olabilir (Charriaut-Marlangue and Ben, 1995; Lucassen et al., 1995). İkincisi formalinle fiksasyon yapıldıktan sonra parafine gömülen kesitler eğer fiksasyon uzadıysa hatalı apoptozis oranları ortaya çıkarabilir (Davison et al., 1995). Buna ek olarak, apoptozis sürecindeki belirli bir zaman aralığındaki apoptozis ölçümleri, o dokudaki doğru programlı hücre ölüm oranını göstermede hatalı olabilir. Son olarak TUNEL yöntemi apoptozise spesifik değildir. Herhangi bir yolla ölmüş hücreye ait DNA parçalanmalarını da belirler (Grasl-Kraupp et al., 1995). Bu teknikle işaretlenmiş hücreler nekrotik hücreler de olabilir. Tüm bu dezavantajlara rağmen TUNEL deneylerinin avantajlı olduğu noktalar da bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; apoptotik

göstergelerde sonuç olarak sayılan hücrelerle pozitif çekirdek oranlarını belirleyerek apoptozisi ölçmenin mümkün olmasıdır. Dahası TUNEL deneylerinde; kültürde büyütülmüş hücreler, lam üzerine fiske edilmiş hücreler, donmuş doku kesitleri ve formalinde fiske edilmiş-parafine gömülmüş doku kesitleri kullanılabilir. Sonuçta tüm bu özellikler göz önüne alındığında TUNEL deneyleri *in vivo* ve *in situ* çalışmalarda apoptozisi belirleyen yöntemler arasında kabul edilebilir ve diğer methodlarla tamamlanarak sonuçlar doğrulandığında apoptozis için güvenilir bir testtir (Huerta et al., 2006).

b) ISEL (uç -işaretleme tekniği)

İn-situ uç işaretleme tekniği, Wijsman ve arkadaşları (1993) tarafından TUNEL deneyi üzerinde bir değişiklik yapılarak ortaya koyulmuştur. TdT'nin yerine ISEL, 3'-OH ucundan işaretlenmiş DNA çentiği için DNA polimeraz 1'i kullanılır. Ölçüm oldukça gerçeğe yakındır. Isel'in hassasiyeti TUNEL' e göre daha düşüktür ve uygulama daha uzun sürer (Huerta et al., 2006).

c) FIGE (ters alan jel elektroforezi)

300 ve/veya 50 bp'lik DNA parçalarının kromatin lopları olarak şekillenmesinin sonucu olarak meydana gelen DNA fragmentasyonunun gözlemlenmesine dayanır. Bu olay (180–200 bp'lik parçaların) internükleozomal fragmentasyonun oluşmasından önce meydana gelir (Oberhammer et al., 1993).

d) Flow sitometri ve ELISA

DNA fragmentasyonunun flow sitometri ile belirlenmesi, deneyle internükleozomal kırıkları belirleyebilen monoklonal antibadi B-F6 kullanılmasına dayanır (Zunino et al., 1996). Aynı prensiple, enzim bağlı immunosorbent kitleri kullanılarak DNA fragmentasyonlarıyla ilişkili histonlar belirlenebilir. Bu deney kısmen çoğalamayan (hücre kültüründe üretilemeyen) hücreler için kullanışlıdır (Huerta et al., 2006).

ELISA testleri; yetişkin hücrelerle, kültür hücreleriyle, hücre kültürü süspansiyonlarıyla, serumla, plazmayla ve *ex vivo* olarak elde edilmiş lysates hücreleri ile kullanılabilir (Dimmeler et al., 1997).

e) DNA merdivenleşmesi

Endolükleazlar tarafından meydana getirilen 180–200 aralığında olduğu tahmin edilen baz çiftlerini içeren, internükleozomal fragmentasyonu apoptozisin biyokimyasal işaretidir. Standart DNA ekstraksiyon tekniklerinde homojen dokulardan elde edilen nükleik asitler kullanılır. Daha sonra DNA'ya, işaretlenmiş karakteristik DNA örneklerinin belirlendiği agaroz jel elektroforezi uygulanır. Bu deneylerde kullanılabilecek, ticari olarak satılan DNA fragmentasyon kitleri bulunmaktadır (Hoffman, 2006). Bu tekniğin dezavantajı; çok miktarda üretilmiş işaretli DNA örneklerine ihtiyaç duyulmasıdır. Bundan dolayı çok sayıda apoptozis geçirmiş hücreye ihtiyaç duyulur. DNA merdivenleşmesi, bir hücre popülasyonundaki apoptozisi gösterir. Tek bir hücredeki apoptozis derecesini belirlemez. Bu nedenle bu teknik kantitatif değildir. DNA merdivenleşmesi çok zahmetli ve zaman alıcı bir tekniktir (Huerta et al., 2006).

f) DNA fragmentasyon ölçümü

Apoptotik olmayan hücrelerin DNA'sının yüksek moleküler ağırlıklı olmasına karşın, DNA fragmentasyonu geçiren apoptotik hücreler yüksek oranda düşük moleküler ağırlıklı DNA (LMW) içerirler. Düşük moleküler ağırlıklı DNA (LMW), yüksek moleküler ağırlıklı DNA' dan (HMW) filtrasyon ve santrifüjleme ile ayrılabilir. Bu teknikte, replike olan hücreler, apoptozis uyarılmadan önce 5-bromo 2 deoksiüridin (BrdU) gibi bir nükleotid analoğu ile işaretlenir. İşaretlenmiş LMW DNA ve HMW DNA'larının miktarları ölçülür. Bu teknikle apoptozis yalnızca in vitroda, replike olmuş hücrelerde ölçülebilir (Huerta et al., 2006).

g) APO ssDNA

Bu yeni teknik; apoptotik hücrelerin sıcaklıkla denatüre edilmesi sonucu elde edilen DNA'nın tek ipliğinin kullanılması bakımından avantajlıdır. APO ssDNA deneyinde, DNA hasarına spesifik antibadiler kullanılır. Bu antibadileri kullanmak oldukça kolaydır, çabukluk sağlar, kalitatif ve kantitatif sonuçlar verir ve flow sitometriyle, 96'lık plaka okuyucularıyla ya da fluoresan mikroskopla incelenebilir. Bu kitler ticari olarak satılmaktadır (Huerta et al., 2006).

1.3.4.2. DNA boyama yöntemleri

a) Dye exclusion

Ölü hücrelerin, hücre zarı boyalara geçirgendir ve bu nedenle bu hücreler boyanabilirler. Aksine; sağlam hücrelerin plazma zarı boyalara geçirgen olmadığından canlı hücreler boyanamazlar. Tripan mavisi canlı hücreleri ayırt etmekte kullanılır ve

ölmüş hücreler ışık mikroskobunda mavi boyanarak, boyanmamış olan canlı hücrelerden ayırt edilirler (Huerta et al., 2006).

b) DNA'ya bağlanan boyalar

Fluoresan bir boya olan propidyum iyodür (PI), DNA binding üzerine ışıma yapar. Yalnızca canlı olmayan hücreleri boyar. Boyanmış ve boyanmamış hücreler flow sitometri ile sayılır. Apoptozis ve DNA fragmentasyonu sırasında, hücrelerdeki boyanmış DNA sayısının azalmasıyla ilişkilidir (çünkü bu boyamada da ölü hücreler boyanır.). Apoptozis sürecinde G_1 fazındaki hücrelerin miktarı doğal olarak azalır. Flow sitometri ile PI boyamada G_1 ve G_2 fazlarının içerdiği DNA miktarlarının ayırt edilememesi bir dezavantajdır. G_2 fazındaki DNA azalması yanlışlıkla apoptozis geçiren hücreler olarak sunulabilir. Bu nedenle bu test apoptozis için pek spesifik değildir. Başka bir yöntemle de apoptozis tespit edildiğinde, flow sitometri ve PI boyama ile farklı ilaçları ve ilaç konsantrasyonlarının apoptozis üzerine etkisini araştırmak için etkili bir teknik olmaktadır. Hoechest 33342, 4'6-diamidino–2 fenilindol (DAPI) ve YOPRO–1 canlı hücrelerdeki DNA incelenmesi için birleştirilirse oldukça yüksek fluoresan elde edilir. Bu DNA markırları fluoresan mikroskobi ile kromatin kondensasyonunun kolaylıkla görülmesini sağlar ve apoptozisdeki morfolojik değişiklikleri saptamayı kolaylaştırır (Huerta et al., 2006).

c) Annexin V

Anneksin V deneyleri apoptozisin uyarılması sırasındaki gözleme dayanır. Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS'ler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale

getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur. Apoptozisin bu ilk olayı apoptotik hücreler gibi hücrenin proteolitik enzimlerinin salınımı olmadan elemine edilebilen fagositik hücreler olarak tanımlanmasına neden olur (Fadok et al., 1992).

Anneksin V, a–35 kDa Ca^{+2}-fosfatidilserine yüksek afiniteyle binding proteinlere bağlanır (Martin et al., 1995). Anneksin V, florakromla birleşerek fluoresan mikroskopta incelemeyi sağlar. Ayrıca Anneksin V ile kullanılabilen boyalar ışık ve elektron mikroskobunda görüntüleme imkânı sağlayabilen özelliktedir. Böylece bu çalışma hem in vivoda hem de in vitroda kullanılabilir (Huerta et al., 2006).

Anneksin V deneylerinin avantajı; işaretlenmiş hücrelerde flow sitometri ile apoptozisin her aşamasının ölçülmesini sağlayan biyotinlated-anneksin kullanılabilmesidir. Anneksin V ile bağlanmış fluoresan boyalar gerçek zamanlı görüntülemede kullanılabilir (Huerta et al., 2006).

Anneksin V'nin önemli bir dezavantajı ise, apoptotik hücrelerden çok nekrotik hücreleri işaretleyebilmesi, bu nedenle daha az spesifik olmasıdır. Fakat bu durum, ikisi arasındaki farklılığı ayırt edebilen bir DNA binding boyası ile birleşebilen Anneksin V kullanılarak flow sitometri ile telafi edilebilir (Huerta et al., 2006).

1.3.4.4. Antibadies against target of executioner caspases (Öldürücü kaspaz hedeflerine karşı kullanılan antibadiler)

a) PARP

Öldürücü kaspaz 3 ve 7'nin aktivasyonu, DNA tamir mekanizması proteinlerinin inaktivasyonu ve parçalanması ile sonuçlanır. Bu proteinler DNA bağımsız protein kinazları ve poly (ADP riboz) polimerazları (PARP) içerir.

PARP, spesifik DNA kırıklarına bağlanan 113-kDa'luk bir proteindir. PARP'ın enzimatik parçalanmasıyla 89 kDa–24 kDa'luk fragmentler meydana gelir. PARP'ın parçalanmış şekli olan 89 kDa'luk monoklonal antibadiler ticari olarak mevcuttur. Monoklonal antibadi, flow sitometri ile olduğu kadar immunohistokimyasal ve western analizlerde kullanılabilir (Huerta et al., 2006).

b) MP30

MP30 ticari olarak mevcut olan (Hoffman, 2006; Chemicon International, 2006), özellikle öldürücü kaspazları hedef alan diğer bir molekül olan sitokeratin 18'e bağlanan monoklonal antibadidir. Bu antibadi tek hücrelerde ve doku kesitlerinde immunohistokimya ile apoptozisin belirlenmesinde kullanışlı bir yöntemdir. Ek olarak fluoresanla kombine edildiğinde, MP30 flow sitometri ve fluoresan mikroskopla kullanılabilir (Huerta et al., 2006).

c) Flow sitometri

Flow sitometri günümüzde yaygın bir şekilde apoptozisdeki ilk değişiklikleri belirlemekte kullanılmaktadır. Apoptozisdeki hücre döngü analizi, hücre siklusu boyunca DNA içeriği ölçülerek PI boyamayla yapılabilir. Birçok antibadi FITC (fluoresan bir madde) ile işaretlenebilir ve flow sitometri ile birleştirilerek kullanılabilir. Bu aktif kaspazları, Anneksin V' yi, TRAİL' i v.b. içerir (Huerta et al., 2006).

1.3.4. Spesifik apoptoz mediatorları

1.3.5.1. Plazma membranı

a) Fas, FasL, TRAIL-R (DR4, DR5), TNF-α

Fas, 45–52 kDa'luk, hücrede yaygın olarak ifade edilen, transmembran proteinlerine özel olarak bağlanabilen bir transmembran proteinidir. Apoptozis mediator FAS, kendine has ligantı olan FasL reseptörüne bağlanarak apoptozisi uyarır. Bu da bir metaloproteazın hareketiyle meydana gelir (Walczak and Krammer, 2000).

TRAIL ise, apoptozise kendi ligantı olan TRAIL-L ile bağlanarak aracılık eden diğer bir TNF ilişkili proteindir. Fas/TRAIL sırasıyla monoklonal agonistik antibadiler CH–11 ve çözünebilir rekombinant TRAIL/AP 2L (rTRAIL) kullanılarak apoptozisi uyarır.

Benzer şekilde TNF-α'nın rekombinant formu da apoptozis aracısı TNF'yi uyarmada kullanılabilir. Membran bağlı reseptörler Fas, TRAIL ve TNF'ye karşı monoklonal antibadiler ticari olarak satılmaktadırlar ve immunohistokimya ya da FITC ile birleştirilerek kullanılabilir. İmmunohistokimya hücre membranında bulunan bu antibadileri belirlemek için özel laboratuar teknikleri kullanabilir (Huerta et al., 2006).

b) Fosfatidilserin

Fosfatidilserin (PS), apoptotik hücreler gibi fagositik hücreler olarak tanımlanan plazma membranının içinden dışına çıkan apoptozisin ilk göstergesidir. Anneksin V yüksek afiniteli PS bağlanır ve flow sitometri ve fluoresan mikroskobu ile apoptotik hücreleri belirlemek için florokromla birleştirilerek kullanılabilir (Martin et al., 1995).

c) Seramid

Seramid, sfingomiyelin katalitik hidroliziyle üretilir. Seramid, hücre ölümü sırasındaki DNA fragmentasyonunu yönlendiren fosfoprotein fosfataz, serin ve treonin (Jarvis, 1994) protein kinazlarını aktive eden bir hücre içi ikinci habercidir (Dobrowsky, 1992; Mathias, 1991). Bu cevap, kısmen plazma membranındaki sfingomiyelinle TNF-α'nın eşleşmesine aracılık eder. Seramid aynı zamanda nükleer faktör kappa B (NF_KB)'nın aktivitesini artırır.

Sfingomiyalinaz-fre fosfolipaz (Bacillus cerus) ve 1,2 Diaçilgliserol ticari olarak mevcuttur (Huerta et al., 2006).

1.3.5.2. Mitokondri

a) Mitokondrial potansiyel

Mitokondrial fonksiyon bozukluğu apoptozisin erken safhalarında meydana gelirken beraberinde membran potansiyelinde bir azalışı da beraberinde getirmektedir. Mitokondrial potansiyel değişikliği; flow sitometri ile kullanılabilen ve membran potansiyeline hassas fluoresan boyalar olan katyonik lipofilik boya CNTRRos ve diğer florokromlara incelenebilir (Macho et al., 1996).

b) Sitokrom C

Sitokrom C oksidatif solunum zincirinde ve apoptozomun şekillenmesi sırasında kaspaz 9 aktivasyonuyla kaspaz 3 parçalanması döngüsünde görev alan, suda çözünebilir bir proteindir. Sitokrom C hücre nükleusunda transkribe olur, sitozolde translate olur ve sonra mitokondrial alana, koruyucu proteinler tarafından taşınır. Bu

proteinin ürünü 13 kDa boyutundadır ve onu belirleme çalışmalarında kullanılabilecek monoklonal antibadiler ticari olarak satılmaktadır (Huerta et al., 2006).

c) SMAC/DIABLO

IAPs aktivitesini nötralize ederek apoptozisi teşvik eden SMAC/DIABLO mitokondrial bir proteindir. SMAC/DIABLO'nun apoptozisi uyarması üzerine, IAP'nin domaini BIR'a bağlandığı yer olan mitokondrial membranlar arasına gizlenir. Böylece kaspaz 3, 7 ve 9'un aktivitesini engellemek için IAP'nin özelliğini bloke eder (Verhagen et al., 2002).

Sitokrom C gibi SMAC/DIABLO da sitozolde translate edilir ve sitokrom C gibi mitokondrial membranlar arasından içeri aktarılır. Bcl–2 tarafından bloke edilir. SMAC/DIABLO bütün memeli IAPs'leri ile etkileşebilir. İmmunohistokimyada kullanılması için 21-kDa proteinlere uygun monoklonal antibadiler ticari olarak satılmaktadır.

Western blot analizlerde SMAC/DIABLO tanımlanmadan önce izolasyon ve mitokondrial preparasyon gerektirebilir (Huerta et al., 2006).

d) Seramid

Seramid de apoptozisde mitokondrial düzeyde çok önemli bir rol oynar. Mitokondrial permeabilite, seramid kanallarının oluşumuyla artar. Böylece sitokrom C ve diğer proapoptotik proteinlerin mitokondrial membranlar arasından salınımına izin vererek apoptozise yol açar. Mitokondrinin içerdiği enzimler seramid sentezinden ve hidrolizinden sorumludur. Burada mitokondrideki seramid seviyesini düzenleyen bir mekanizma bulunur. Ek olarak, mitokondrial seramid seviyesi, apoptozisin seviyesinin

yükseldiğini gösterir (Siskind, 2005). Apoptozisin uyarılması sırasında, seramidin hücresel seviyesiyle birlikte mitokondrial permeabilitenin ölçümünün mitokondrial seramidin rolüyle ilişkili çalışmalara kolaylık sağlamaktadır (Huerta et al., 2006).

e) Bcl–2 ve ailesi

B hücre lenfoması ailesi proteinleri, Bcl–2 homoloji domainine dayalı, bir düzineden fazla üye içeren, 3 tipik fonksiyonel grup olarak karakterize edilmiştir (Adams and Cory, 1998). Üyelerin tamamlanmış formlarının çoğu dört BH domaini içerir (BH1-BH4) (Adams and Cory, 1998; Antonsson and Martinou, 2000). Buna ek olarak mitokondri dış membranı ya da endoplazmik retikulumdan birine bağlı olan transmembran domaini de içerirler. Bu proteinler antiapoptotik özelliklere sahiptir ve Bcl–2, Bcl-xL ve Bcl-M'yi içerir. Bu ailenin en güçlü anti apoptotik üyesi Bcl-xL'dir. İkinci grup Bcl–2 proteinleri BH4 domaini içermezler. Bu proteinler ise proapoptotik özelliklere sahiptir ve BAX ve Bak içerirler. BH3 sadece proapoptotik Bid ve Bik domain proteinlerinden ibarettir (Huerta et al., 2006).

Pro ve anti apoptotik mitokondrial Bcl–2 üyelerinin stimulasyonu mitokondrial membran permeabilitesine bağlı olarak sitokrom C'nin salınımı ve apoptozu uyarması sonucu apoptozomun şekillenmesiyle belirlenir (Huerta et al., 2006).

Bcl–2 ailesinin bütün üyeleri standart laboratuar teknikleriyle ve western-blot analizleri ve/veya immunohistokimya yöntemleriyle, ticari olarak mevcut olan monoklonal antibadilerle çalışılabilir (Huerta et al., 2006).

f) Apoptizis indükleyici faktör (AIF)

Gittikçe artan güvenilir kanıtlar göstermektedir ki; apoptozis, kaspaz aracıları olmayan bir yolla da meydana gelmektedir. DNA fragmentasyonuna neden olan proteazlar, AIF, endonükleaz G, kalpainler ve kathepsinleri içeren bazı aracılar da tanımlanmıştır (Broker et al., 2005). AIF, bir DNAaz olan siklopilin A ile etkileştiği mitokondrial membranlar arasından sitozole salınır. Nükleus translokasyonu olduğunda DNA fragmentasyonu başlatılır (Urbano et al., 2005).

AIF'ye karşı monoklonal antibadiler ticari olarak satılmaktadır ve bunlar western-blot analizleriyle immünohistokimyada kullanılabilirler (Huerta et al., 2006).

1.3.5.3. Sitozol

a) Kaspazlar

Tipik apoptozis öldürücüleri (executioner); spesifik proteazlar, sistin aspartat olarak adlandırılan proteolitik enzimlerdir (kaspaz). Kaspazlar; uzun bir N-terminalle karakterize edilen başlatıcı kaspazları (8–10) ve kısa bir N-terminalle karakterize edilen öldürücü kaspazları (3–6–7) içerir. Kaspazlar apoptozis için esansiyal efektör moleküller olduğu için parçalanmış kaspazlarla yapılan çalışmalarda apoptozisin ilk safhalarının ortaya çıkarılmasına yardımcı olur. İmmünohistokimya, immünositokimya, ELISA ve bazı flow sitometri çalışmaları için bile kaspazlara karşı monoklonal antibadiler bulunmaktadır (Huerta et al., 2006).

Kaspazların aktivasyonu için çok açıklayıcı çalışmalar western-blot analizleriyle ya da immunohistokimyayla olduğu kadar flow sitometriyle; kaspazların PARP gibi hedef moleküllerinin proteolitik parçalanmasının incelenmesini içeren çalışmalardır (Huerta et al., 2006).

Anti-PARP monoklonal antibadiler ticari olarak mevcuttur. Öldürücü kaspazların diğer bir hedef molekülü sitokeratin 18dir (CK–18). Ticari olarak satılan antibadi M–30, CK-18'in yerleştiği bölgede bir kaspaz parçalanmasını tanır. Bu antibadi, tek hücrelerdeki ve immünohistokimyadaki doku kesitlerindeki apoptozisin belirlenmesinde kullanışlıdır. Ek olarak fluoresansla kombine edilip, flow sitometriyle birleştirilerek kullanılabilir (Huerta et al., 2006).

b) Apoptozom

Apoptozis proteaz aktivasyon faktör–1 (Apaf–1), sitokrom C (Apaf–2) ile kaspaz 9'la (Apaf–3) ve ATP ile etkileştiğinde **apoptozom** oluşumuna yol açar. Kaspaz 9'un bu aktivasyonu, kaspaz 3'ün parçalanması ve apoptozisin uyarılmasıyla sonuçlanır. Apaf–1 130 kDa'luk bir proteindir ve bir monoklonal antibadisi ticari olarak bulunmaktadır (Huerta et al., 2006).

c) Apoptozis İnhibitörleri

Apoptozis inhibitörleri ailesi proteinleri, NF_KB'nin kontrolü altındadır. IAP_S'nin hareket mekanizması aktif kaspaz 3–7 ve 9'un direk inhibisyonu yoluyla çalışır. 7 memeli IAP_S'ü tanımlanmıştır ve her biri diğerinden onların BIR ve RING-Zn domainleriyle ayırt edilir. IAP'nin varlığı birçok tümörde önemli bir apoptozis inhibitörü olarak görülmektedir. Bugün IAP'nin varlığı neredeyse bütün transforme hücrelerde ve kanser testlerinde gösterilmiştir (Verhagen and Vaux, 2002; LaCasse et al., 1998). Bütün IAP ailesinin üyelerine karşı, western-blot analizlerinde ve immünohistokimyada kullanılabilecek monoklonal antibadiler ticari olarak mevcuttur (Huerta et al., 2006).

d) Isı Şok Proteinleri

Ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol, proapoptotik ve anti apoptotik özelliklere sahip ısı şok proteinleri ile etkilidir (Jaattela, 1999). Anti apoptotik ısı şok proteinleri, sitokrom C salınımını inhibe eden, Hsp27 veApaf-1'e bağlanarak apoptozomu inhibe eden Hsp70 ve Hsp90'ı içerir. Proapoptotik Hsp60 ve Hsp90 direk olarak kaspaz 3'ü stimüle eder (Zhivotovsky and Orrenius, 2003). Hsps'ye spesifik antibadiler ticari olarak mevcuttur (Huerta et al., 2006).

e) NF_KB

Nüklear faktör kappa B, tipik olarak sitoplazmada –inaktif formu I_KB'ye bağlı olarak- bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. I_KB'nin fosforilasyonu, onun kendi enzimatik bozunmasına yol açar. Bağımsız I_KB ve NF_KB; NF_KB'yi aktif duruma getirir. NF_KB; bağımsız olarak çalışabilir ya da öldürücü kaspazların inhibisyonunun devam ettiği yer olan nükleusta bir çiftmiş gibi davranarak transloke olabilir (Huerta et al., 2006).

NF_KB, Bcl-xL'nin transkripsiyonel düzenlenmesine katılır (Sevilla and Zaldumbide, 2001). NF_KB inhibisyonu, apoptozis aracısı TRAIL olan hücrelerde hassaslaşırken, hem mitokondrial hem de ölüm reseptörleri yolunda NF_KB aracılığıyla inhibisyon etkilidir. NF_KB tespiti için spesifik antibadiler mevcuttur. Hücrede NF_KB'nin yerini belirlemek önemlidir. Eğer NF_KB proteini nükleusta tespit edilirse, bu NF_KB'nin aktif olduğunu gösterir. Bu nedenle apoptozisde NF_KB'nin spesifik rolünü belirlemede immünohistokimya analizleri, western-blot analizlerinden daha üstündür (Huerta et al., 2006).

Bunlara alternatif olarak NF_KB'nin fonksiyonu EMSA (Elektroforetik mobil değişim deneyi) ile belirlenebilir. EMSA, DNA ile etkileşen proteinleri belirlemede kullanışlı bir araçtır (Hongo et al., 2003; Vega et al., 2005).

Bay 11–1075, Bay 11–7085 ve Bay 11–7082 gibi birkaç NF_KB inhibitörü ticari olarak satılmaktadır. SN50 nükleustaki aktif NF_KB kompleksinin translokasyonunu inhibe eder (Huerta et al., 2006).

f) Protozom

Proteozom, apoptozis sürecinde inhibisyon ve stimülasyon özelliklerine sahip 26S'lik bir proteazdır. İşaretli ubiquitinin proteolitik yıkımıyla proteozom, sitozoldeki Omi/HtrA2 ve SMAC/DIABLO seviyesini (düşük tutarak) korur. Diğer bir apoptozis uyarıcısı olan SMC/DIABLO ve Omi/HtrA2'nin bir araya gelmesine ön ayak olan proteozomun 16S'lik aktif birimin yıkımı apoptozisin uyarılmasına yol açar (MacFarlane et al., 2002; Zhang et al., 2004). Proteozom, belirli bir sistemdeki apoptozis sürecindeki rolünü belirleyebilmek için velkat (bortezomib) tarafından etkin bir şekilde inhibe edilebilir (Huerta et al., 2006).

Proteozomun izolasyon ve saflaştırma mekanizması tespit edilmiştir (Hideshima et al., 2001).

Kaspaz aktivitesinin ardından proteozomun çeşitli fragmentasyonlarını saptayabilen birçok monoklonal antibadi mevcuttur (Huerta et al., 2006).

g) Mikroarray analizleri

Gen ekspresyon analizlerinin geniş skalada belirlenmesiyle, birçok apoptotik gen çalışılabilir hale gelmiştir. Mikroarray analizleri, tek bir deneyle aynı anda binlerce geni çalışmak için etkili bir tekniktir. Gen çip oligonükleotid dizisinde belirlenmiş bir gen; tek sıra dedektörleri olarak iş gören 15–20 farklı 25 mer-oligonükleotidle gösterilebilir. Buna ek olarak bu dizilerde kontrol elementi yanlış eşleşmiş bir dizi olarak kullanılabilir (MM). Bunlar, temel bir pozisyondaki yanlış eşleşmiş temel bir homomerik için referans dizi olarak dizayn edilmiş problardır (Huerta et al., 2006).

Var olan yanlış eşleşmiş oligonükleotid, çapraz hibridizasyona, bölgesel backgrounda değer biçilmesine ve işaretli mükemmel işleşmenin (PM) çıkarılmasına olanak tanır (Huerta et al., 2006).

Gen çip ekspresyon deneylerinde ökaryotik mRNA hazır oligo dT cDNA'yı biotinylated cRNA'ya dönüştürür (Lockhart et al., 1996).

Her örnek ayrı bir dizi ile hibritlenir. Hibridizasyon karışımına konsantrasyonları bilinen referans cRNA uçları eklenerek transkript seviyeleri hesaplanır (Huerta et al., 2006).

İki örnek arasındaki farklı mRNA seviyeleri, aynı dizi tiplerinden ayrılmış örneklerden üretilen herhangi iki hibridizasyon örneğinin karşılaştırılmasıyla belirlenir. Bu, standart laboratuar teknikleriyle dokudan ya da hücrelerden elde edilebilen RNA ekstraksiyonu gerektirir (Huerta et al., 2006).

Mikroarray analizleri spesifik malignanslaron apoptotik genlerini belirleme de kullanılmaktadır (Huerta et al., 2006).

h) RNA interferens çalışmaları

RNA interferens çalışmaları apoptozis sürecindeki spesifik genlerin rolünü belirleme çalışmalarını mümkün kılar. RNA interferens öyle bir tekniktir ki; onun sayesinde protein sentezi kromatinin yeniden şekillenmesi sırasında mRNA'yı susturarak korunur. RNAazIII dsRNA kısa interfering RNA_S olarak bilinen 21–28 baz çifti uzunluğunda kısa nükleotid dupleksleri keserek nükleustan çıkarlar. Genler, siRNA molekülleri endonükleik silencer argonaute–2 içeren RNA uyarıcı silencing kompleksi bir multiproteinle etkileştiğinde susturulur. Bu süreç çok spesifiktir ve sadece küçük bir (7 bitişik tamamlayıcı baz çifti) homolog dizi (mRNA'nın hedefi olan) gerektirir (Jackson and Linsley, 2004; Pai et al., 2005).

Bu teknik; FLIP (Abedini et al., 2004), Bcl–2 (Holle et al., 2004; Zangemeister-Wittke, 2003), Bcl-Xl (Zangemeister-Wittke, 2003; Zhu et al., 2005), survivin (Caldas et al., 2005; Uchida et al., 2004) ve XIAP (Lima et al., 2004; Hatano et al., 2004) gibi birçok apoptotik proteini çalışmak için kullanılabilir. siRNA kitleri ticari olarak mevcuttur. Bu spesifik kit, susturulmuş bağımsız RNA tipini kullanabilir. siRNA ile microrray kombinasyonu, kolon kanserindeki önemli genleri aydınlatmada kullanılmaktadır (Huerta et al., 2006).

1.3.6. Apoptozisin uyarılması

1. *In vitro*da hızlı büyüyen hücrelerde, açlık çektirilen hücreler serumsuz ortamda büyütülerek etkili bir şekilde apoptozise sevk edilebilir.
2. TGF-β1 apoptozisi uyarmada kullanılabilir. Hücre tipine (Cell line'a) bağlı olarak dozu 10 ve 100 ng/ml arasında değişir.
3. Kemoterapotik ajanlar mitokondrial yolu etkiler. Dozajlar hücre tipine (cell line'a) bağlı olmakla birlikte 5–50 μg/ml arasında değişir

i. Cisplatinyum
ii. Adriamicin
iii. Etoposid (Huerta et al., 2006).

- **Ölüm Reseptörleri Yolu**

1. TNFα (40mg/ml) ölüm reseptörleri yolunu uyarır.
2. FasL CH–11, Fas reseptörü için spesifik bir monoklonal antibadi, FasL'nin etkisini taklit ederek apoptozisi ölüm reseptörleri yoluyla uyrmakta kullanılabilir.
3. rTRAIL, dozajları hücre tipine (cell line'a) bağlıdır. Fakat tipik oranlar 10 ile 50 ng/ml arasındadır (Huerta et al., 2006).

- **Radyasyon Terapisi**

Işınlama, IR (500 Cgy) bir 137 Cs çift kaynağıyla hücreler ışınlanarak etkili bir şekilde kültür hücrelerinde apoptozis uyarılabilir (Huerta et al., 2006).

1.4. Çalışmada Kullanılan Hücrelerin Özellikleri

1.4.1. A549 hücreleri

Akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başlarında ender olmasına karşın günümüzde görülme sıklığı artan, önemli bir sağlık problemidir. Genel ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı alan akciğer kanseri, kanser ölümlerinin

%28'ini oluşturmaktadır (Bozkurt ve ark., 2004). Akciğer kanserinin %80'i ise küçük hücreli olmayan akciğer kanserleridir (Chang et al., 2004). A549 kanser hücreleri tip 2 alveolar epitel özellikteki bir adenokarsinom insan akciğer cell line'ıdır (Kreja et al., 2002; Seidel 2002). A549 cell line'ı 1972 yılında D.J: Giant ve ekibi tarafından 58 yaşında bir Caucasian erkekten alınan akciğer tümöründen üretilmiştir ve 1976 yılında, altmış sekizinci pasajı M:Lieber tarafından American Type Culture Collection'da stok edilmiştir. Japanese Cancer Research Resource Cell Bank (JCRB) ve Riken Cell Bank (RCB) ATCC'den hücreyi almış ve stoklamış daha sonrada birçok Japon araştırmacıya dağıtmıştır. A549 hücreleri Institute of Fermentation Osaka (Japonya)'dan satın alınmıştır.

1.4.2. V79 379A (CHL) hücreleri

Chinese Hamster Akciğer fibroblast benzeri hücrelerdir. Bu hücreler sitotoksisite, toksisite ve mutajenite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Melo et al., 2001; Corréa et al., 2005). Ayrıca bu hücre hattının *in vivo* ortamda alınan cevaplara benzerlik gösterdiği bilinmektedir. V79 379A hücreleri Institute of Fermentation Osaka (Japonya)'dan satın alınmıştır.

Çin hamsterından elde edilen, akciğer fibroblast hücreleri sürekli bir kültürdür. (Souza-Brito et al., 1998; Rodriguez and Haun, 1999). Sitokrom P450 sistemine sahip değillerdir, mutajenik etkinin değerlendirilmesinde ve sitotoksisite testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Rodriguez and Haun, 1999; Katzer et al., 2002; Melo et al., 2002). Melo ve arkadaşları (2002) hepatositlerdeki dehidrokrotinin sitotoksisitesinin, mitokondrial suksinat dehidrogenazın büyük ölçüde inhibisyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. Gerçekten de; hepatositlerdeki sitotoksisiteyle, V79 fibroblastlarının sitokrom P450 sisteminin ürettiği metabolitlerle dehidrokrotoninin biyoaktivitesinden kaynaklanan sitotoksisite karşılaştırıldığında hepatositlerin, ana bileşiklerden daha toksik olduğu görülmektedir (Rodriguez and Haun, 1999; Melo et al., 2002).

1.5. Çalışmada Kullanılan Test Maddeleri

1.5.1. İlaç hammaddesi olarak bazı ağır metal kompleksleri

Son zamanlarda birçok laboratuvarın raporları reaktif oksijen gruplarının, proteinlerin oksidatif modifikasyonuna neden olduğunu ve böylece proteinlerin bazı ekzojen ve endojen proteinazlarla proteolitik yıkımına karşı son derece hassaslaştığını belirtmektedir (Davies and Chem, 1987: Shrivastava et al., 2002). Bu oksidatif modifikasyonların neredeyse tamamı ROS (reaktif oksijen türevleri) tarafından meydana getirilmektedir. ROS, metaller tarafından katalizlenen oksidasyonlar olarak tanımlanmaktadır ki bu işlem *in vitro* çalışmalarda demir ve bakır tuzlarıyla meydana getirilmektedir (Cabiscol et al., 2000; Routier et al., 1997: Shrivastava et al., 2002).

Bakır kompleksleri ve bakır iyonlarıyla oluşturulan bazı ligantların DNA parçalanmasına neden olduğu saptanmıştır (Marshall et al., 1981: Shrivastava et al., 2002).

Günümüzde yapılmış birçok çalışmada, test maddesi olarak kullanılan Ni, Mn, Cu, Fe, Zn, Pd, Pt gibi birçok metalle oluşturulmuş komplekslerin kanser hücreleri üzerinde apoptotik etkiye ve hücre proliferasyonu üzerinde toksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Kanser tedavisiyle ilgili yapılan araştırmalardaki bulgular göz önüne alındığında, apoptozis ve sitotoksisitenin kemoterapiyle yakından ilişkili olması bu metal komplekslerinin kanser tedavisi için oldukça uygun ilaç hammaddeleri olduğu görülmektedir (Shrivastava et al., 2002).

1.5.1.1. $\underline{[CuL](NO_3)_2}$

Bakır, bütün aerobik organizmaların biyokimyasında temel bir rol oynayan esansiyel bir geçiş elementidir (Etcheverry et al., 2007). Birçok kritik enzimatik yolda

seçilmiş bir kofaktör olarak bakır, doğal redoks tepkimelerinde bir seri elektron transferini üstlenir. Bu enzimlerin fonksiyonu; hücresel proliferasyon, demir homeostasisi, pigment formasyonu, nerotransmit üretimi, peptid biyogenezi, doku biyosentezi ve antioksidant savunmasında esansiyeldir (Etcheverry et al., 2007).

1.5.1.2. $\underline{[NiL](ClO_4)_2}$

Nikelin bazı komplekslerinin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Bottari et al., 2001).

Nikelin bazı bileşiklerinin Walker 256 karsinoma testinde karsinostatik aktivite gösterdiği bilinmektedir (Shrivastava et al., 2002).

1.6. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

1.6.1. Mitokondrial aktiviteye dayalı MTT testi

Sitotoksisite çalışmaları birçok bakımdan çok önemlidir. Bugün; mikrowell deneylerine dayanan ve farklı noktaları ölçen birçok metod vardır. Bunlardan çok yaygın olan bir tanesi MTT deneyleridir (Holst and Oredsson, 2004).

MTT deneylerinde; 3-(4,5-dimetiliazol–2-yl)-2,5 difenil tetrozolyum bromid (MTT), mikrowelldeki hücrelere medyumlar birlikte eklenir. MTT yaşayan hücreler tarafından endostoz (kemikleşme) yoluyla reaksiyona girer ve hücre içerisinde mitokondrial nikotinamid adenin dinükleotid fosfat bağımsız dehidrogenaz yoluyla mavi formazan kristallerine indirgenir. Homojen popülasyonlar kullanıldığında, üretilen formazan miktarının direkt olarak hücre sayısıyla orantılı olduğu kabul edilir (Berridge and Tan, 1993; Denziot and Lang, 1986; Fricker and Buckley, 1996; Husoy et

al., 1993; Mosmann, 1983; Nocari et al., 1998; Plumb et al., 1989; Takahashi et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002). MTT içeren medyum uzaklaştırıldıktan sonra hücredeki formazan kristalleri dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek çözdürülür ve absorbansı gözlenir (Holst and Oredsson, 2004).

MTT deneyleri hücre sayısının bir ölçümü olarak kabul edilir (Berridge and Tan, 1993; Denziot and Lang, 1986; Fricker and Buckley, 1996; Husoy et al., 1993; Mosmann, 1983; Nocari et al., 1998; Plumb et al., 1989; Takahashi et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002). Her ne kadar bu kabul sabit bir hücre sayısının mitokondrial aktivitesini gösterse de, bu aktiviteyi etkilemez. Çünkü bu deney elektron transport zinciriyle bir substratın indirgenmesine dayanır (Holst and Oredsson, 2004).

1.6.2. Fluoresan boyama ile morfolojik inceleme (DAPI Boyama)

DAPI boyama aynı anda canlı ve ölü hücreleri boyamak için kullanılabilir (Kemp and Brouwer, 2004).

DAPI (4'6-diamidino–2 fenilindol) membrandan geçebilen ve hücrelerin membranları arasına girerek DNA'ya bağlanabilen mavi bir fluoresan proteinidir. DNA'ya bağlandığında, DAPI'nin fluoresansı 20 kat artar ve bütün hücrelerin çekirdekleri boyanır ve böylece DNA incelenmesi kolaylaşır. Bu deney, tekrarlanabilir, güvenilirdir ve yapması kolaydır (Kemp and Brouwer, 2004).

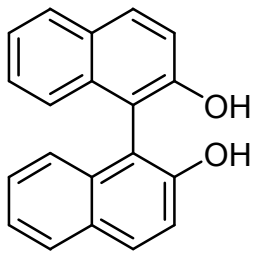
2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan İlaç Hammaddeleri

Çalışmalarda kullandığımız bazı binaftol türevlerinden hareketle elde edilen metal kompleksleri $[CuL](NO_3)_2$ ve $[NiL](ClO_4)_2$ ve bu maddelerin elde edilmesiyle ilgili tüm veriler Anadolu Üniversitesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Kadriye BENKLİ ve Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Gühergül ULUÇAM tarafından sağlanmıştır.

2.1.1. L^H Ligantının ve çeşitli metal komplekslerinin sentezi

2.1.1.1. ±2,2'-dihidroksi -1,1'-binaftil (109) eldesi (Vogel, 1987)



(109)

Şekil 2.1. ±2,2'-dihidroksi -1,1'-binaftil

1.88g (0.013mol) β-naftol 250mL su içinde ısıtılarak çözüldü. Bu çözeltiye 25mL suda çözülen 3.55g (0.013mol) $FeCl_3.6H_2O$ yavaş yavaş damlatılmaya başlandı ve hemen çökelek oluşmaya başladı. Daha sonra 1.88g (0.013mol) β-naftol katı olarak

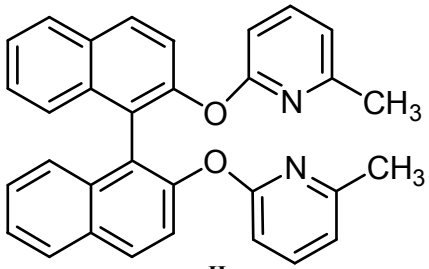
bu karışıma eklendi. Bu çözeltiye tekrar 25mL suda çözülen 3.55g (0.013mol) $FeCl_3.6H_2O$ yavaş yavaş damlatıldı. Karışım yarım saat daha ısıtıldı. Sıcakken süzüldü ve su ile yıkandı. Toluenden kristallendirildi. Krem renkli kristaller elde edildi (2.50g, %65). E.n. 215-217ºC bulundu (kay., e.n. 215ºC).

γ_{max}/cm^{-1} (KBr tablet): 3488, 3408, 3056 (O-H), 1612, 1593 (aromatik halka), 1216 (Ph-O).

δ_H (300 MHz; $CDCl_3$): 5.02 (2H, s, OH), 7.16 (2H, d, *J* 8.2 Hz), 7.28–7.40 (6H, m), 7.89 (2H, d, *J* 8.8 Hz), 7.99 (2H, d, *J* 8.8 Hz).

δ_C (75.5 MHz; $CDCl_3$): 111.06, 117.97, 124.26, 124.43, 127.71, 128.63, 129.70, 131.64, 133.64, 152.98.

2.1.1.2. L^H ligantının eldesi (Cannon vd., 1967)



L^H

Şekil 2.2. L^H ligantının eldesi

0.29g (1mmol) ±2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftil (**109**) 5mL sıcak DMF içinde çözülerek, üzerine katı olarak 0.27g (2mmol) K_2CO_3 yavaş yavaş eklendi. Geri soğutucu altında ısıtıldı. 0.35g (2mmol) 6-bromo–2-metilpridin (**103**) 3mL DMF içinde çözülerek ilk çözeltiye yarım saat süre ile damlatıldıktan sonra, çözelti iki saat daha geri soğutucu altında ısıtıldı. Çözelti 5mL kalıncaya kadar destillendi. Balonda kalan

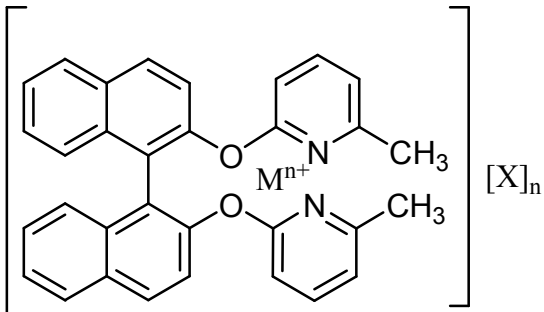
çözelti 40mL su bulunan behere döküldü. Krem renkli toz ürün süzüldü. Seyreltik NaOH ve su ile yıkandı ve kurutuldu (0.23g, %50). E.n. 215–223^{o}C dir.

δ_H (300 MHz; $CDCl_3$): 2.49 (6H, s, CH_3), 7.10–7.12 (4H, m), 7.26–7.36 (8H, m), 7.84–7.95 (6H, m).

δ_C (75.5 MHz; $CDCl_3$): 24.32 (CH_3), 111.12 (C), 117.98, 122.28, 124.22, 124.42, 125.21, 127.66 (C), 128.60, 129.67, 131.59, 133.64 (C), 138.74, 141.53 (C), 152.97 (C), 160.22 (C).

m/z: 469 [$(M+H)^+$, %100].

2.1.1.3. L^H ligantının Ni(II), Cu(II), perklorat ve/veya nitrat tuzları ile oluşturduğu kompleksler



$[ML^H](X)_n$

M=Ni^{2+}, Cu^{2+}.

X= NO_3^-, ClO_4^-. n=1, 2.

Şekil 2.3. L^H ligantının Ni(II), Cu(II), perklorat ve/veya nitrat tuzları ile oluşturduğu kompleksler

Bir balonda 0.07g (0.14mmol) $\mathbf{L^H}$ ve 0.14mmol metal tuzu 20mL MeOH içinde çözülerek iki saat geri soğutucu altında ısıtıldı. Sıcak sıcak süzüldü ve kristallenmeye bırakıldı. Cu(II) tuzu ile yapılan reaksiyon oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Elde

edilen kristaller süzülerek kurutuldu. Kristallerin renkleri ve verimleri Tablo 2.1.'de, IR spektrum değerleri Tablo 2.2.'de, FAB-kütle spektrum değerleri Tablo 2.3.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. L^H ligantının komplekslerinin renkleri ve verimleri

Kompleks	**renk**	**% verim**
$[NiL^H](ClO_4)_2$	krem	100
$[CuL^H](NO_3)_2$	kahverengi	20

Tablo 2.2. L^H ligantının komplekslerine ait IR (KBr tablet/cm^{-1}) spektrum değerleri

Kompleks	**ν(Anyon)**
$[NiL^H](ClO_4)_2$	1094, 627
$[CuL^H](NO_3)_2$	1382

Tablo 2.3. $[CuL^H](NO_3)_2$ komplesine ait FAB-kütle (m/z) spektrum değeri

Kompleks	**Pik (m/z)**	**%**	**yapı**
$[CuL^H](NO_3)_2$	593	15	$[CuL^H(NO_3)]^+$
	531	20	$[CuL^H]^+$
	469	35	$[L^H+H]^+$

2.1.2. L^H Ligantının ve çeşitli metal komplekslerinin sentezi

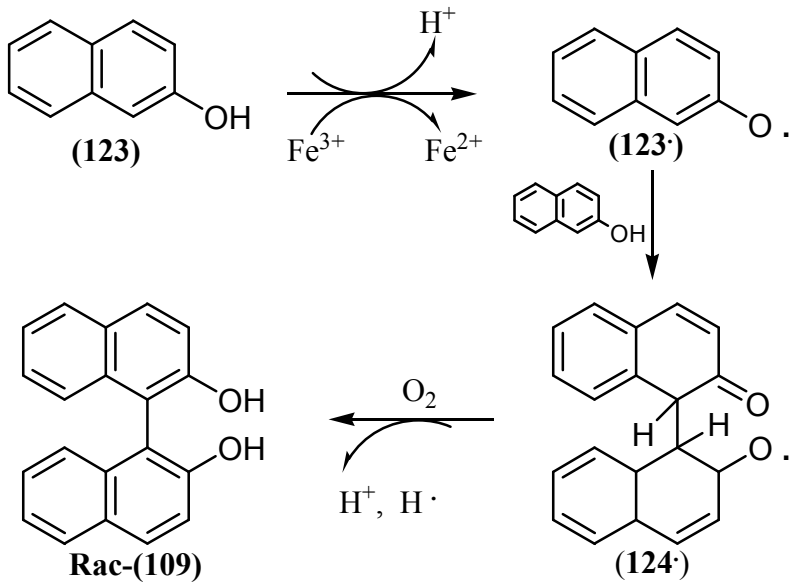
2.1.2.1. 2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftil (109)

2,2'-disubtituye–1,1'-binaftilin türevleri organik sentezlerde geniş olarak çalışılmıştır. Bu tip bileşiklerin en önemlisi olan ±2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftil (**109**) yüksek sıcaklıklarda kararlı ve çeşitli şartlarda birçok asimetrik reaksiyonu sağlayan kiral atropoizomerlere sahiptir. Rasemik 2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftil (**109**) elde etmenin çok farklı metodları vardır. Bunlar, genellikle %90 verimle, kenetleme

maddesi olarak $FeCl_3.6H_2O$ (Toda vd., 1989, Villemin ve Sauvaget, 1994), $TiCl_4$ (Doussot vd. 2000), Cu-amin kompleksleri (Feringa ve Wynberg, 1977, Feringa ve Wynberg, 1978, Hovorka vd., 1992), $Mn(acac)_3$ (acac=asetilaseton) (Yamamoto vd., 1984, Mastrorilli vd., 2001), $K_3[Fe(CN)_6]$ (Feringa ve Wynberg, 1981) kullanarak 2-naftolün oksidatif kenetleme yoluyla elde etmektir.

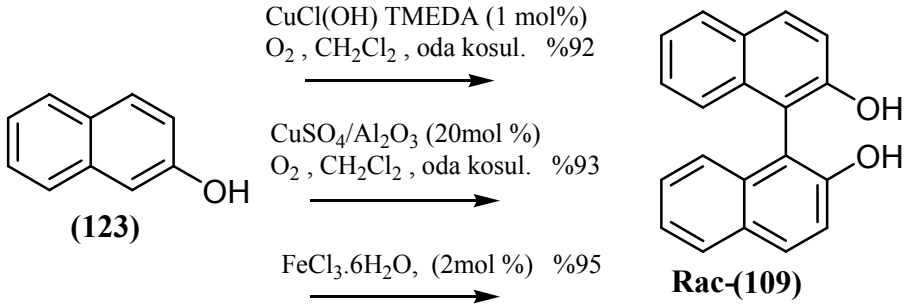
Biz de çalışmalarımızda oksidatif kenetleme maddesi olarak $FeCl_3.6H_2O$'yu seçtik ve β-naftol (**123)** ile reaksiyonundan krem renkli yünümsü rasemik 2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftili (**109**) %65 verimle elde ettik (Vogel, 1987).

Bu reaksiyonun mekanizması mantıki olarak, bir molekül binaftolün elde edilmesi için bir molekül Fe^{3+}'ü gerektirir. Fe^{3+} ile β-naftolün (**123**) bir elektronla oksidasyonundan oluşan radikal **123·**, karbanil radikali **124·**'ü vermek üzere tekrar β-naftole (**123**) katılır. Karbanil radikali tekrar aromatikliği kazanmak üzere O_2 tarafından oksitlenir ve H· radikalini elimine eder (Şekil 2.4.) (Brunel, 2005).



Şekil 2.4. ±2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftilin (109) elde edilme mekanizması

Bu kenetlenme reaksiyonları genellikle katalitik prosesler değildirler ve metal tuzlarının stokiyometrik miktarından daha fazlasına gerek duyarlar. Fakat katalitik miktarlarda da reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlar 50ºC de $FeCl_3.6H_2O$ (2mol %) (Love ve Bills, 2002, Ji vd., 2002), $FeCl_3/Al_2O_3$ (Li vd., 1999, Armengol vd., 1999), Cu(II)amin kompleksinin (1mol %) kullanılması (Hovorka ve Zavada, 1992, Noji vd., 1994, Smrcina vd., 1991), $VO(acac)_2$ (Hwang vd., 1999), metiltriokso rutenyum (Sharma vd., 2003), havanın bulunduğu koşullar altında alumina destekli Cu(II)sülfat katalizörü (20mol %) (Sakamoto vd., 1997, Sakamoto vd., 1994) ve vanadil fosfat (VOPC) (Rocha vd., 2002), kullanılarak β-naftolün toz karışımları havada ses dalgalarıyla katalitik olarak yürür (Şekil 2.5.).

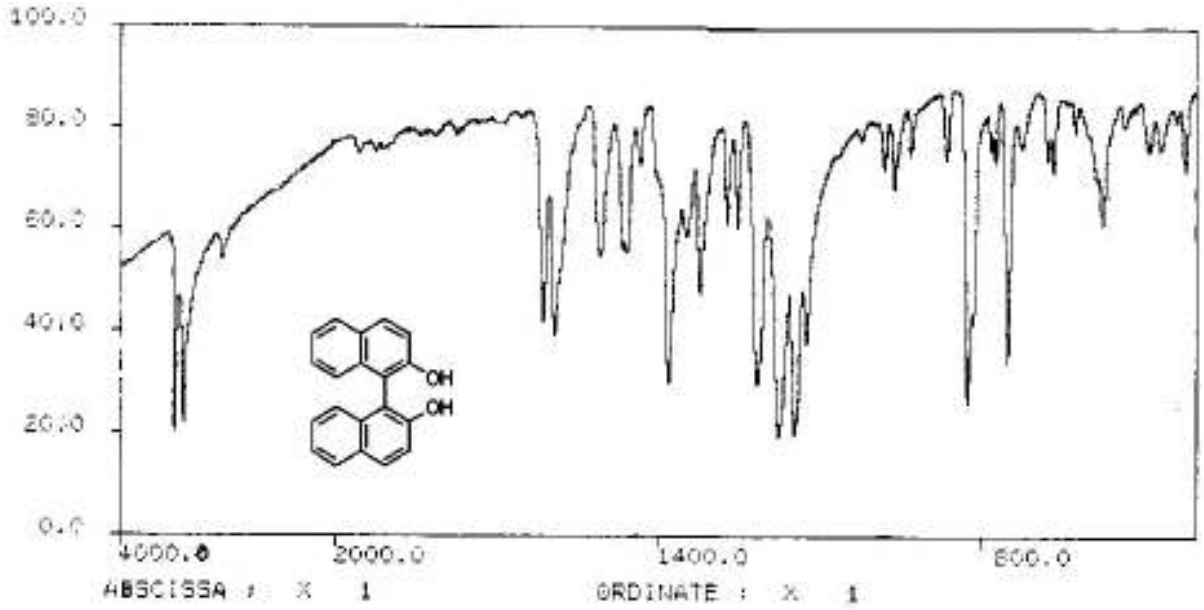


Şekil 2.5. Katalitik olarak ±2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftil elde etme yollarından bazıları

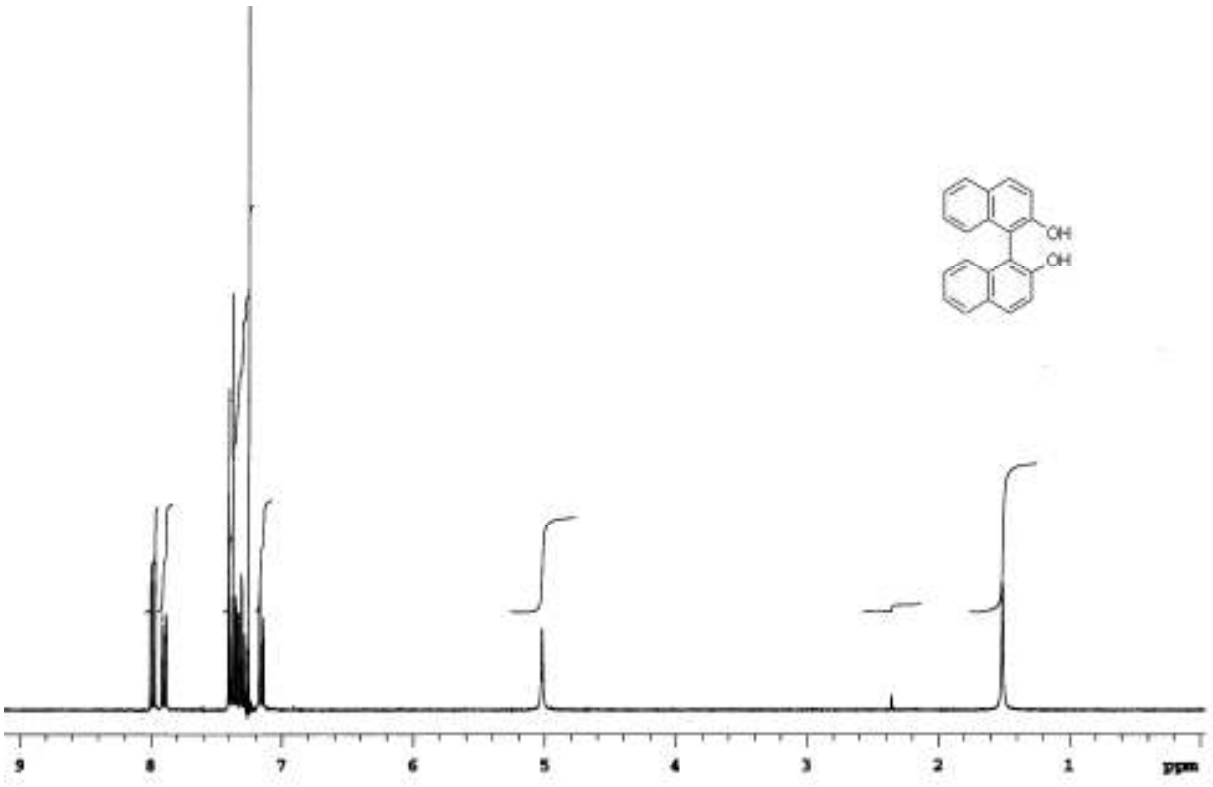
Elde ettiğimiz ±2,2'-dihidroksi-1,1'-binaftil (109) için e.n. 217ºC bulunmuş, bu da kaynakta verilen değerle (kay., e.n. 215-217ºC) uyumludur. Bu ürün için alınan IR spektrumunda ϒ(O-H)'e ait pik 3488-3408cm^{-1} de, ayrıca 1216cm^{-1}'de ϒ(Ph-O) piki gözlenmiştir (Şekil 2.6.)

^1H NMR spektrumunda OH protonuna ait 5.02ppm de bir singlet ve aromatik halkaya ait pikler ise 7.16 ve 7.99ppm arasındadır. Spektrum integrasyonu ondört protonu göstermektedir, bu da yapımızdaki proton sayısıyla uyumludur (Şekil 2.7.).

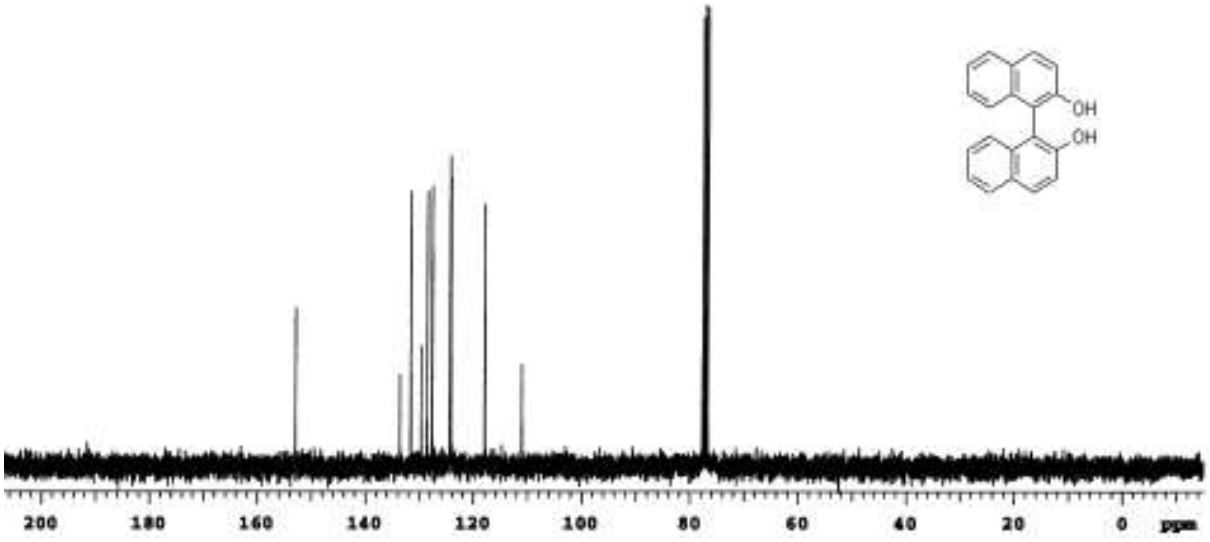
^{13}C NMR spektrumunda on karbon piki bulunmakta olup yapımızı doğrulamaktadır (Şekil 2.8.)



Şekil 2.6. ±2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftilin (109) IR spektrumu



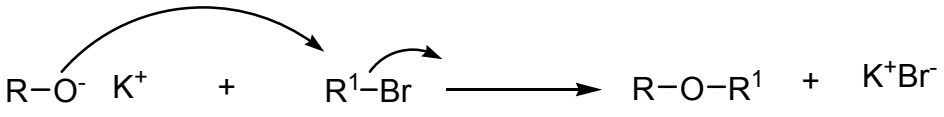
Şekil 2.7. ±2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftilin (**109**) ^{1}H NMR spektrumu



Şekil 2.8. ±2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftilin (109) ^{13}C NMR spektrumu

2.1.2.2. <u>L^H ligantının eldesi</u> (Cannon vd., 1967)

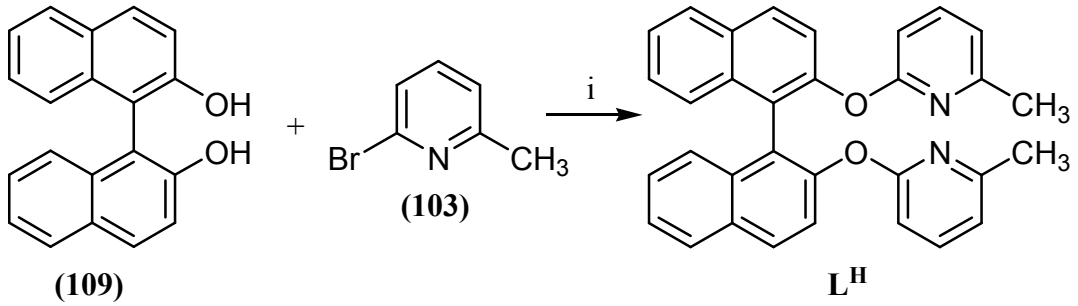
Elde ettiğimiz ±2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftil (**109**) ile ligantları oluşturmak için Williamson eter sentezi uygulandı. Williamson eter sentezinin genel mekanizması Şekil.2.9.'da verilmiştir (Uyar, 1998).



Şekil 2.9. Williamson eter sentezinin genel mekanizması

Kaynaktaki yöntemi kendi maddelerimize uyarladık. Bölüm 4.4.1'de elde ettiğimiz 6-bromo–2-metilpridin (**103**) ile ±2,2'-dihidroksi–1,1'-binaftili (**109**) DMF içinde çözerek, katı potasyum karbonat ekledik. Reaksiyon tamamlandıktan sonra açık

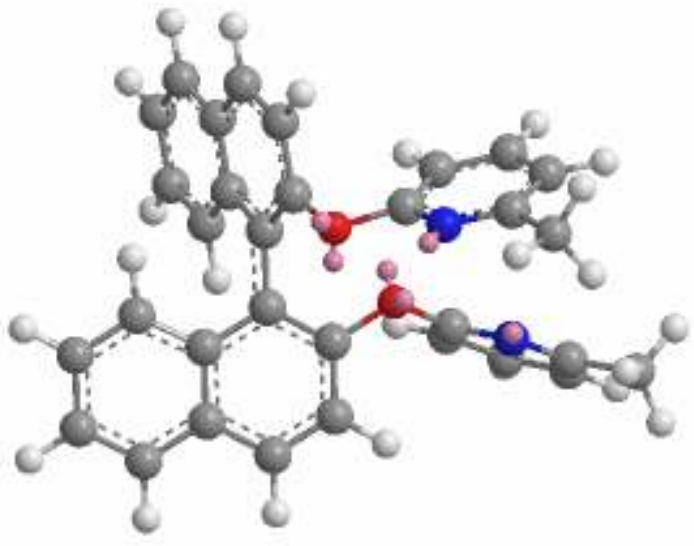
zincirli ligant $\mathbf{L^H}$'ı oluşturduk (Şekil 2.10.). $\mathbf{L^H}$ ligantının üç boyutlu şematik gösterimi Şekil 2.11.'de verilmiştir.



(109) **(103)** $\mathbf{L^H}$

i)DMF, K_2CO_3

Şekil 2.10. L^H ligantının sentezi

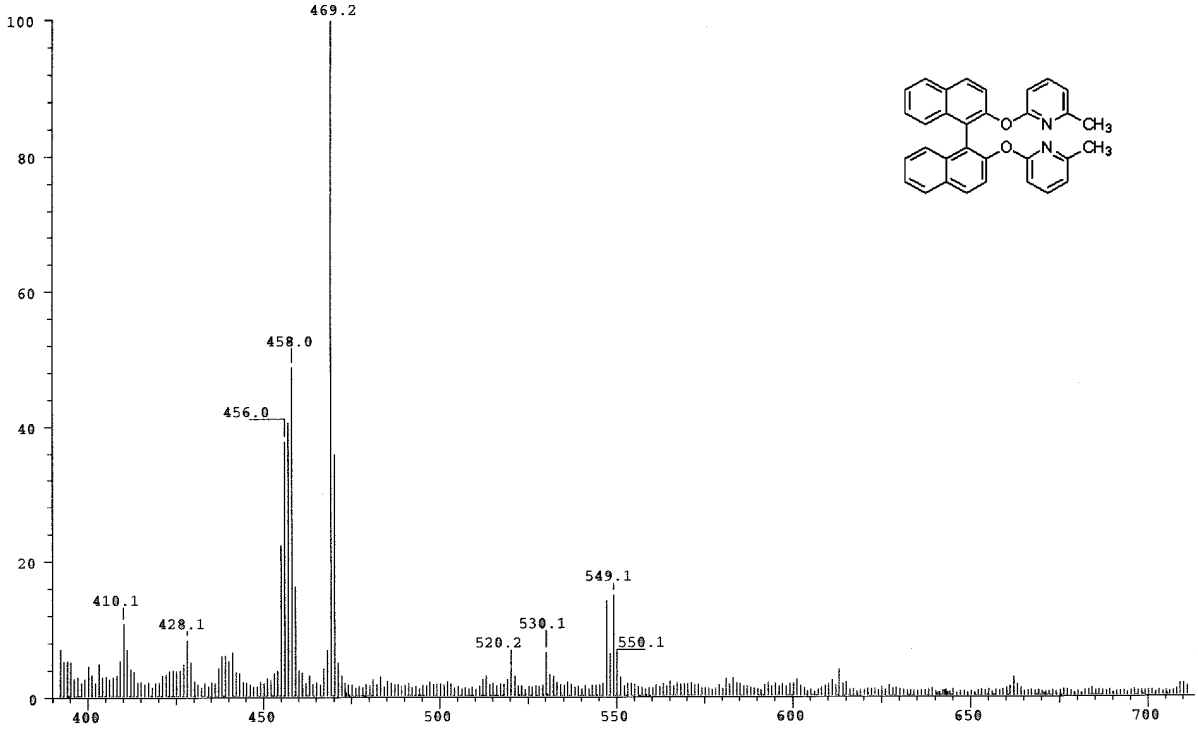


Şekil 2.11. L^H ligantının üç boyutlu şematik gösterimi

Alınan ^{1}H NMR spektrumundaki CH_3'ün altı protonuna ait singlet 2.49 ppm de aromatik protonlar ise 7.10 ve 7.95 ppm aralığında olup, piklerin integrasyonu yirmi dört protonu göstermiştir, bu da yapımızdaki proton sayısıyla uyumludur.

^{13}C NMR spektrumunda onaltı karbon piki elde edimiş ve DEPT alındığında 24.32ppm'de CH_3, 111.12, 127.66, 133.64, 141.53, 152.97, 160.22ppm'de altı tersiyer karbon saptanarak yapımızdaki karbonlarla uyumludur.

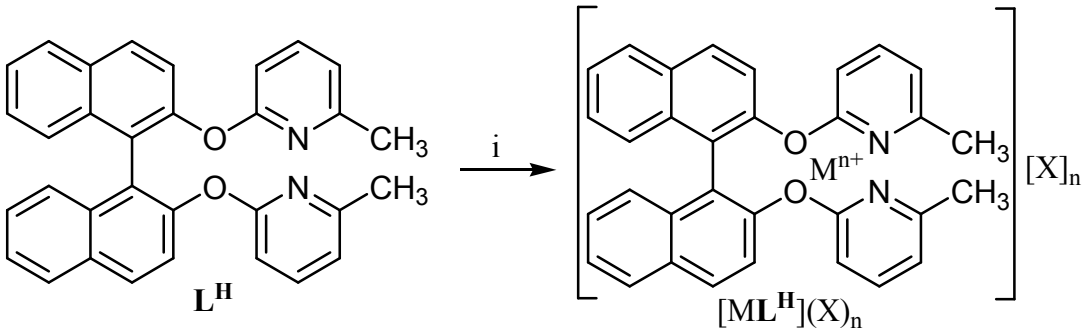
L^H ligantı için FAB-kütle spektrumundaki pik (m/z) 469 da $[M+H]^+$ yapısını vermekte ve şiddeti %100 olup, bu yapıyı desteklemektedir (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. L^H ya ait FAB-kütle (m/z) spektrumu

2.1.2.3. L^H ligantının Ni(II), Cu(II) perklorat ve/veya nitrat tuzları ile oluşturduğu kompleksler

0.15mmol $\mathbf{L^H}$ ligantının 0.15mmol uygun metal tuzu ile reaksiyonu sonucunda çeşitli kompleksler elde edilmeye çalışıldı (Şekil 2.13.).



$\mathbf{L^H}$ $[M\mathbf{L^H}](X)_n$

i)MeOH, $[M(X)_n]$ { $M=Ni^{2+}$, Cu^{2+}

$X= (ClO_4)^-$, $(NO_3)^-$; n=1, 2.}

Şekil 2.13. L^H ligantının komplekslerinin sentezi

Elde edilen kompleksler %10–100 arasında değişen verimle elde edilmiş ve renkleriyle birlikte Tablo 2.2.'de, IR spektrum değerleri Tablo 2.3.'de verilmiştir.

Tablo.2.12'de verilen $[Cu\mathbf{L^H}](NO_3)_2$ kompleksi için FAB-kütle spektrum sonucunda elde edilen birinci pik (m/z) 593'te $[Cu\mathbf{L^H}(NO_3)]^+$-NO_3^-'yı veren ve şiddeti %15, ikinci pik (m/z) 531'de $[Cu\mathbf{L^H}]^+$-$2NO_3^-$'yi veren ve şiddeti %20, üçüncü pik (m/z) ise 469'da $[\mathbf{L^H}+H]^+$'yı veren ve şiddeti %35 olarak belirlenmiş ve yapımızla uyumludur.

2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Nutrient Mikture F–12 (HAMS, Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma), Penicilin-Streptomycin (Biological Industries), Tripsin-EDTA solution (Biological İndustries), %0,5 lik Triton X–100 (Sigma), Sodyum bikarbonat (Sigma), %3,7 Formaldehit (Merck), Dimethyl Sulfoxide (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (Carlo Erba), Formaldehit (Merck), CaCl (Merck), KCl (Sigma), NaCl (Merck), KH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), EDTA (Merck), MTT (Biological Industries), DAPI (Sigma), Sıvı Azot.

2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 cm^2'lik flasklar, 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP), cam mezürler, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml hacimlerinde), enjektörler (10, 20 ve 50 ml hacimlerinde), 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeleri, 10 ml'lik tek kullanımlık pipetler. Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı.

2.4. Kullanılan Aletler

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), Otoklav, Derin dondurucu (-20, -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO_2 inkübatörü (Heraus), Steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, otomatik pipetler, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza Cihazı (ELx808-IU, Bio-Tek), Olympus BX51 fluoresan mikroskobu, Inverted Mikroskop (IX71 Olympus), 12 Kanallı mikropipet (eppendorf), dağıtıcı pipet (eppendorf).

2.5. Kullanılan Hücreler

2.5.1. A549 hücre kültürü

A549 hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum, Nutrient Mikture F–12 (HAM), Penicilin-Streptomycin ve %7,5 $NaHCO_3$ içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm^2'lik flasklarda %95'lik hava ve %5 CO_2'li gaz ortamında, 37 ^oC'deki CO_2 inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.5.2. V79 379A hücre kültürü

V79 379A hücreleri, inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicilin-Streptomycin ve %9,5 $NaHCO_3$ içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm^2'lik flasklarda %95'lik hava ve %5 CO_2'li gaz ortamında, 37 ^oC'deki CO_2 inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.6. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

$[CuL](NO_3)_2$ ve $[NiL](ClO_4)_2$; dimetil sülfoksit (DMSO; Carlo Erba) içinde çözülerek 10 μM, 20 μM ve 40 μM'lık dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak hazırlanmıştır. $[CuL](NO_3)_2$ ve $[NiL](ClO_4)_2$, DMSO içinde çözüldüğü için; negatif kontrol olarak çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. Stok $[CuL](NO_3)_2$ ve $[NiL](ClO_4)_2$ oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.7. Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 ^{o}C,1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, bazı cam ve metal malzemeler de alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 ^{o}C'de 2 saat, süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 mm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirmek suretiyle steril edilerek kullanılmıştır.

2.8. Yöntem

2.8.1. Hücre kültürü

A549 ve V79 379A hücreleri uygun besiyerinde ve 25 cm²'lik flasklarda yetiştirilmiş ve %95 hava ve %5 CO_2'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO_2 inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmişlerdir.

2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT testi için 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda belirlenen sayıda (V79 379A için 5000, A549 için 5000) hücre olacak şekilde % 10 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 0,1 ml hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37°C'de 24 saat inkübe edilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle

uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere, test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 24 ve 48 saat 37°C'de CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir.

$[CuL](NO_3)_2$'nin ve $[NiL](ClO_4)_2$'nin belirlenen dozları hazırlanmıştır. $[CuL](NO_3)_2$ ve $[NiL](ClO_4)_2$ için çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde ve final konsantrasyonları; $[CuL](NO_3)_2$'nin ve $[NiL](ClO_4)_2$'nin 10–20 ve 40 μl olacak şekilde hazırlanmıştır.

2.8.3. MTT ölçümü

Test maddeleri ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5 mg/ml^{-1} MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin mitokondrial metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 bağımsız deneyde 8 kez tekrar edilmiştir (Mosmann, 1983).

2.8.4. Fluoresan boyama ile morfolojik inceleme

6'lı plakalara yerleştirilen steril lameller üzerine ekilen A549 ve V79 379A hücreleri 24 saat lamellerin üzerine yapışmaları için 37^oC'de %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Metal komplekslerinin sitotoksisite testleri sonucunda belirlenen etkili dozları, lameller üzerine yapışan hücrelere 12 saat süresince

uygulanmıştır. Bu süre sonunda lameller % 3,7'lik formaldehit ile tespit edilmişlerdir. Daha sonra steril fosfatlanmış tampon çözeltisi (PBS: 137 μM NaCl, 2.7 μM KCl, 15 μM KH_2PO_4, 8 μM $NaHPO_4$; PH 7.3) ile yıkamaları yapılan lamelle, 1mg/ml DAPI (4'6-diamidino–2 fenilindol) ile 30 dakika boyanmışlardır. Daha sonra PBS ile yıkanan lameller fotoğraflanmıştır.

2.8.5. Mikroskopi

Hücreler Olympus BX51 fluoresan mikroskobu altında, immunohistokimyasal yapıları Olypus U-UHK fluoresan mikroskobunda incelenmişlerdir.

2.8.6. Fotografi

Kültür hücrelerinin mikroskop altında saptanan uygun görüntüleri PM–30 otomatik aracı kullanılarak fotoğraflanmıştır.

2.9. İstatiksel Değerlendirme

MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p<0.05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Test maddelerinin uygun dozları, sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla V79 379A ve A549 hücreleri üzerine uygulanmış, gerekli zaman sonrasında hücrelere MTT verilmiş ve ELISA plate okuyucusunda sonuçlar değerlendirilmiştir.

Test maddelerinin MTT deneylerinden elde edilen sonuçlarına göre belirlenen dozlarının apoptozise neden olup olmadığını göstermek amacıyla V79 379A ve A549 hücreleri üzerine bu maddeler denenmiş ve DAPI boyaması yapılmıştır. Daha sonra elde edilen sonuçlar Olympus BX51 fluoresan mikroskobu ile incelenmiş ve Olympus PM–30 otomatik fotomikrografi aracı ile fotoğraflanmıştır.

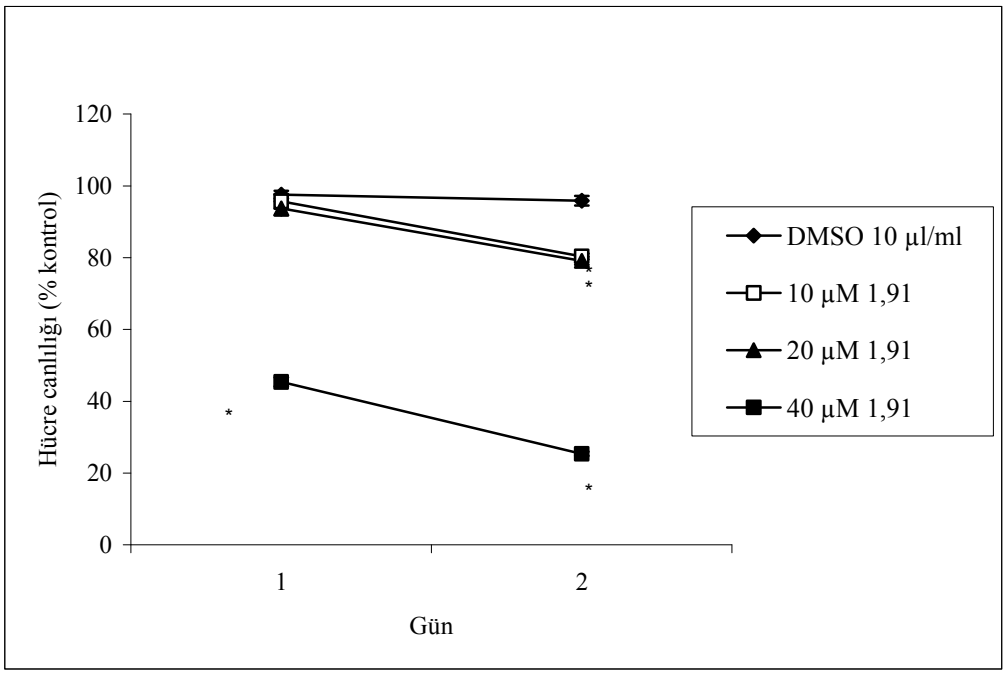
3.1. $[CuL](NO_3)_2$'nin A549, V79 379A (CHL) Hücreleri Üzerine Etkileri

3.1.1. $[CuL](NO_3)_2$'nin MTT testi sonuçları

$[CuL](NO_3)_2$ uygulanan A549 hücreleriyle yapılan MTT testi sonucunda, uygulanan maddenin 10 µM ve 20 µM'lık dozlarının A549 hücreleri üzerindeki ilk 2 günlük sonuçlarının birbirine çok benzediği görülmektedir. $[CuL](NO_3)_2$'nin 10 µM ve 20 µM'lık dozları 1. gün hücre canlılığını yaklaşık olarak % 5 oranında, 2. gün ise % 20 oranında azaltmıştır. Bu 2 dozun 2.gün sonuçları kontrole göre anlamlı farklılıklar göstermektedir.

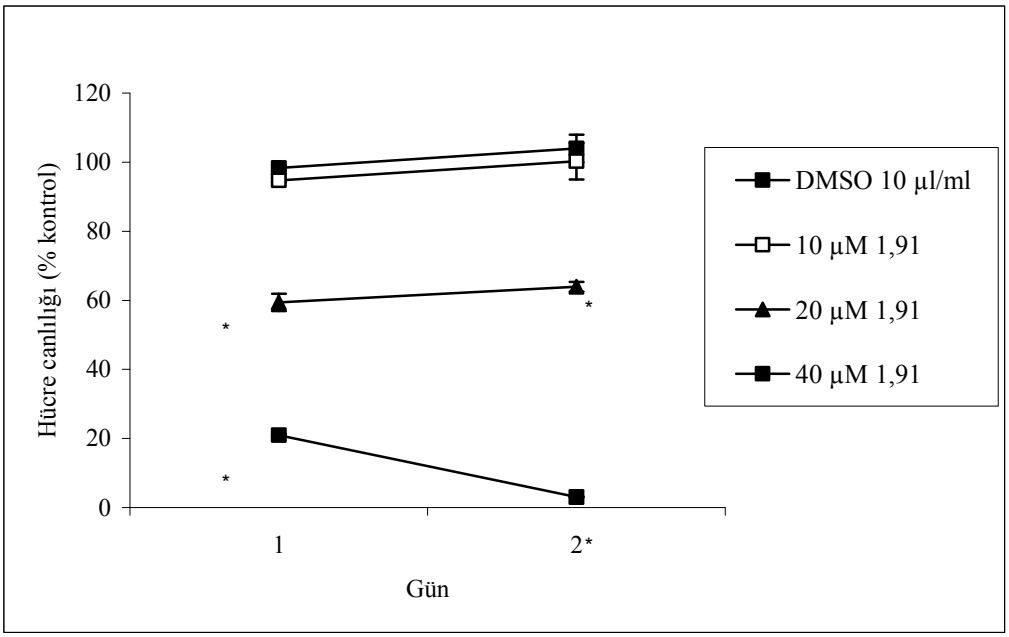
40 µM'lık doz 1.gün hücre canlılığını % 55 oranında azaltmıştır. 2.gün ise hücre sayısı kontrole göre % 30'lara düşmüştür. 40 µM'lık dozun 1. ve 2. gün sonuçları kontrole göre anlamlı farklılıklar göstermektedir.

$[CuL](NO_3)_2$'nin tüm dozlarının, A549 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı sitotoksisiteye neden olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.1. $[CuL](NO_3)_2$'nin A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

$[CuL](NO_3)_2$'nin 10 µM'lık dozu 1. ve 2. gün V79 379A hücrelerinin sayısında % 5 oranında azalmaya neden olmuştur. 20 µM'lık dozun 1. ve 2. gün sonuçları birbirine benzemektedir. Bu doz hücreler üzerinde % 40 oranında sitotoksisite göstermiştir. 40 µM'lık doz ilk gün yaklaşık olarak % 80 oranında hücre sayısında azalmaya neden olmuştur. Bu doz, 2. gün neredeyse tüm hücrelerin ölümüne neden olmuştur. 20 ve 40 µM'lık dozlarının 1. ve 2. gün sonuçlarının kontrole göre anlamlı farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 3.2. [CuL]$(NO_3)_2$'nin V79 379A hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

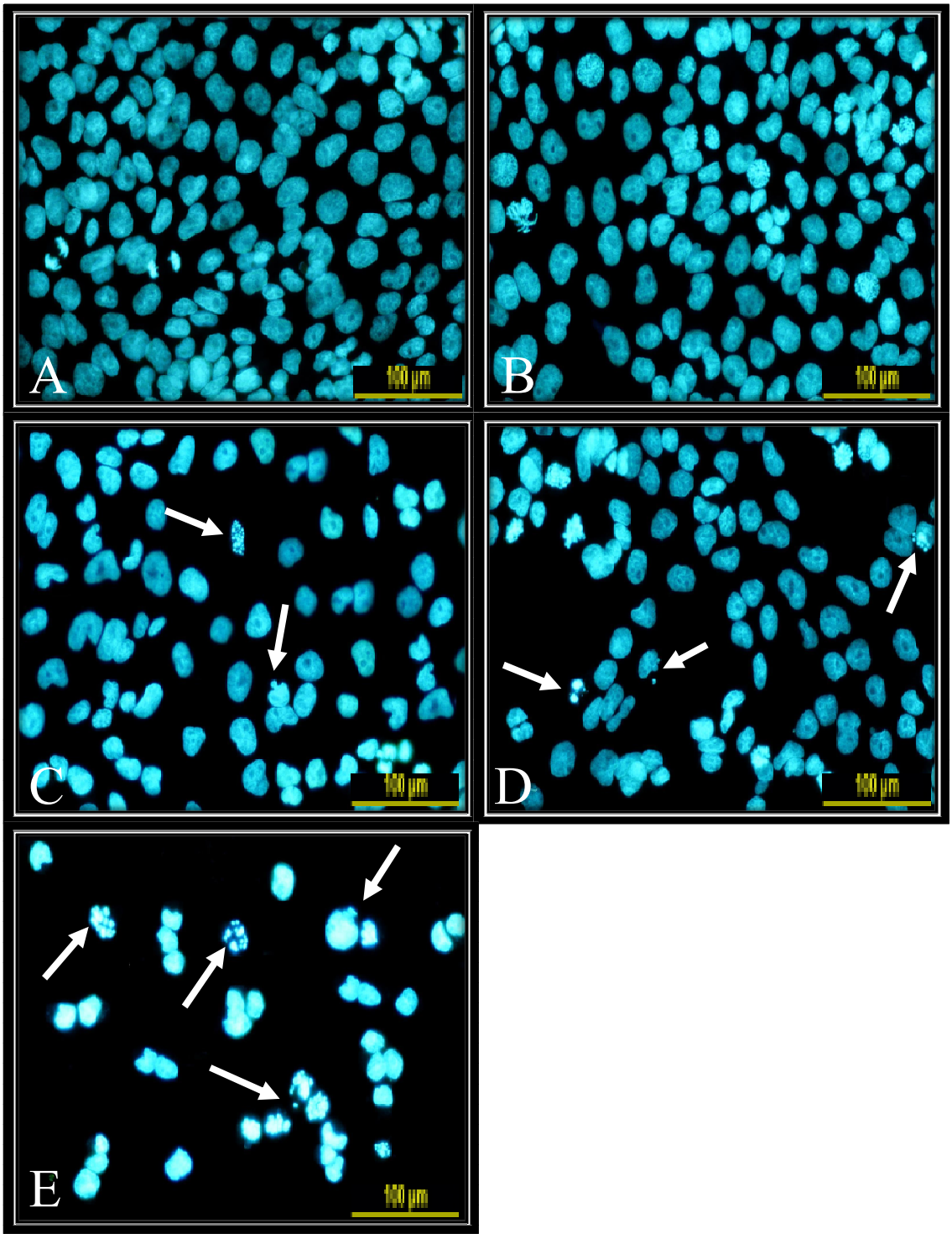
3.1.2. [CuL] $(NO_3)_2$'nin fluoresan boyama ile incelenmesi

Bu maddenin DAPI boyama sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda en düşük dozlardan itibaren V79 379A ve A549 hücreleri üzerinde etkili olduğu görülmektedir. [CuL]$(NO_3)_2$'nin; V79 379A ve A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi benzerlik göstermektedir.

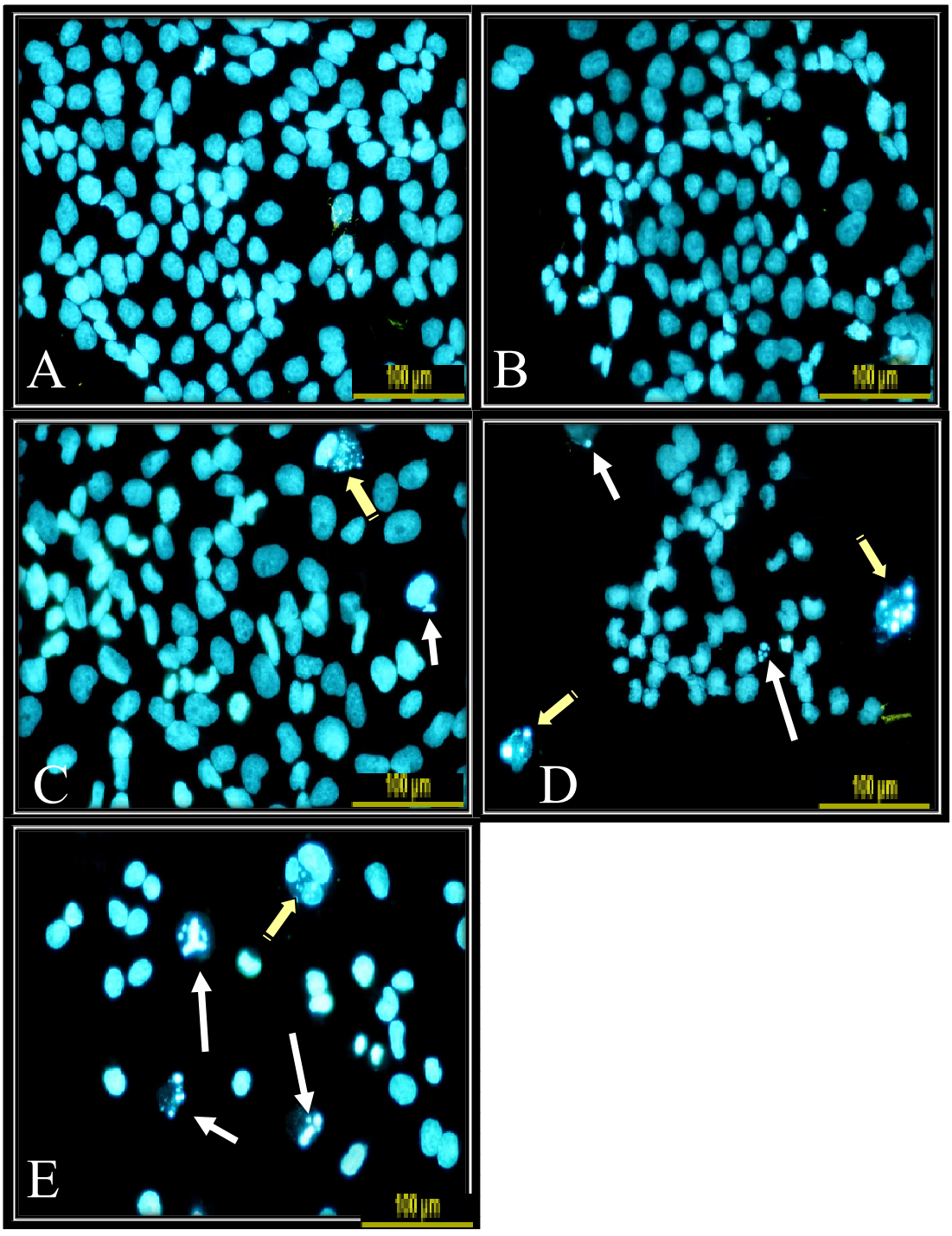
[CuL]$(NO_3)_2$'nin en düşük dozu olan 10 µM'lık doz hücre sayısında belirgin bir azalışa neden olmasa da, fotoğraflarda hücrelerin kısmen kondanse olduğu, apoptotik badilerin ve hücreler üzerinde cepciklerin "blepping" oluştuğu görülmektedir.

[CuL]$(NO_3)_2$'nin uygulanan dozları yükseldikçe hücre sayısının azaldığı ve oluşan apoptotik badilerle bleppinglerin sayısının arttığı gözlenmiştir. Sonuçlar Şekil 3.3.'de ve 3.4.'de görülmektedir.

Şekil 3.3. $[CuL](NO_3)_2$'nin CHL hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI Boyama ile İncelenmesi. A: kontrol, B: DMSO, C: 10 µM'lık doz, D: 20 µM'lık doz, E: 40 µM'lık doz. Ölçü birimi:100 µm.



Şekil 3.4. $[CuL](NO_3)_2$'nin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI Boyama ile İncelenmesi. A: kontrol, B: DMSO, C: 10 µM'lık doz, D: 20 µM'lık doz, E: 40 µM'lık doz. Sarı okla işaretlenen hücreler; "Giant cell" dev hücre. Ölçü Birimi:100 µm.

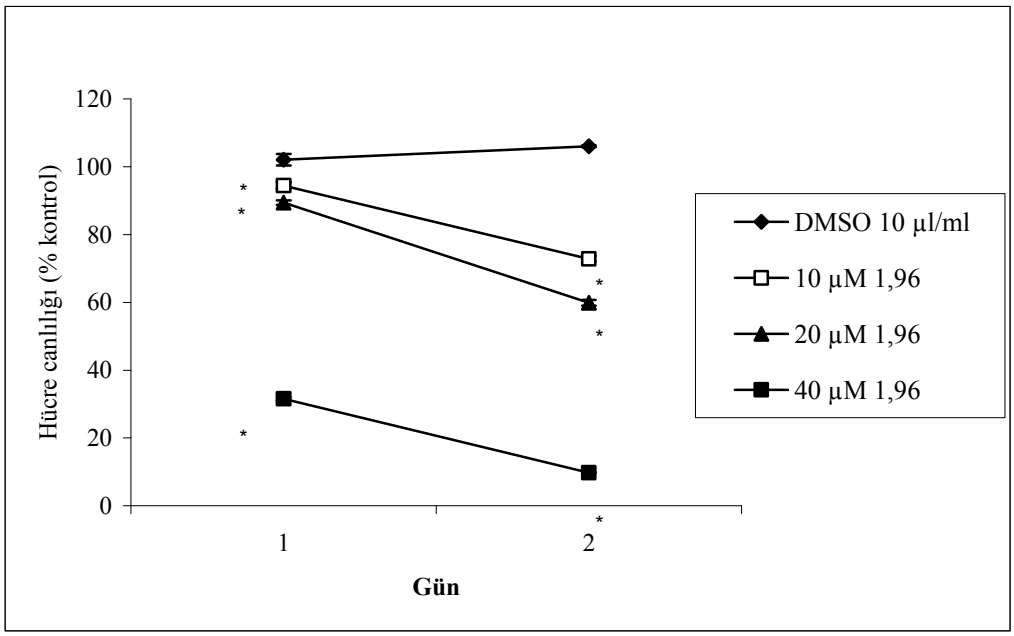


3.2. $[NiL](ClO_4)_2$'nin A549, V79 379A (CHL) Hücreleri Üzerine Etkileri

3.3.1. $[NiL](ClO_4)_2$'nin MTT testi sonuçları

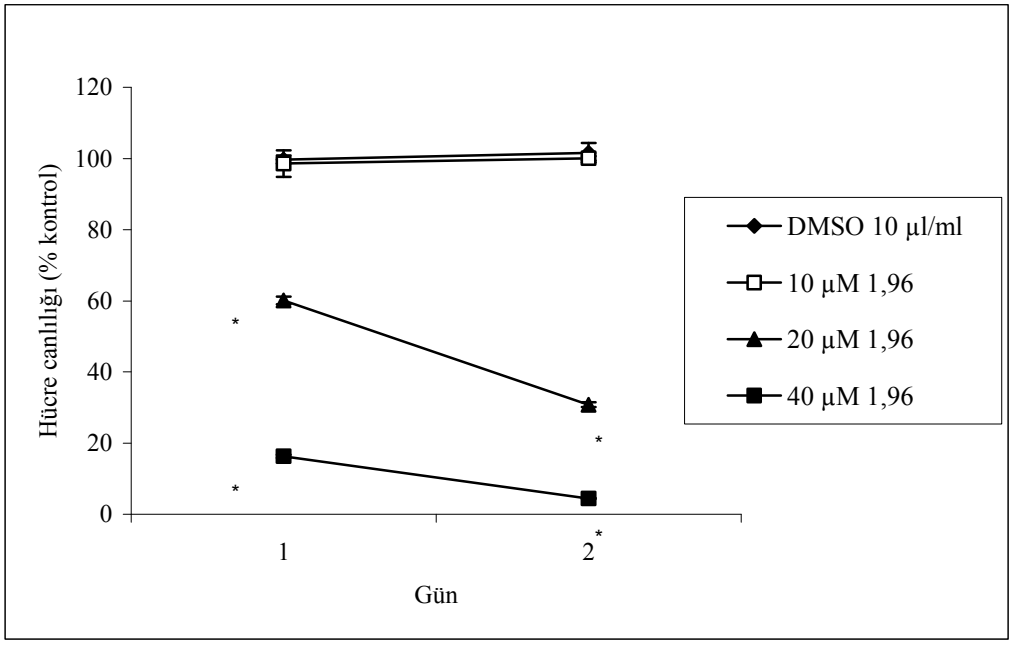
$[NiL](ClO_4)_2$'nin 10 µM'lık dozu A549 hücrelerinin sayısında ilk gün % 5, 2.gün % 25 oranında azalmaya neden olmuştur. 20 µM'lık doz ilk gün % 10, 2.gün % 40 oranında hücre sayısında azalmaya neden olmuştur. 40 µM'lık doz 1.gün % 70 oranında, 2.gün % 90 oranında hücre sayısında azalmaya neden olmuştur. $[NiL](ClO_4)_2$'nin tüm dozları A549 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı sitotoksisite göstermiştir. Üç dozun iki günlük sonuçları kontrole göre anlamlı farklılıklar göstermektedir.

$[NiL](ClO_4)_2$'nin dozlarının, A549 hücreleri üzerindeki sitotoksisitesi her 2 günde de, $[CuL](NO_3)_2$'nin göre daha fazladır.



Şekil 3.5. $[NiL](ClO_4)_2$'nin A549 hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

[CuL] $(NO_3)_2$'nin (1,96 kodlu maddenin) 10 µM'lık dozu, V79 379A hücreleri üzerinde her iki günde de hücre canlılığında azalmaya neden olmamıştır. 20 µM'lık doz ilk gün % 40 oranında, 2. gün % 70 oranında hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur. 40 µM'lık doz ilk gün % 82 oranında, 2. gün % 95 oranında hücre sayısında azalmaya neden olmuştur. 20 ve 40 µM'lık dozlarının 1. ve 2. gün sonuçlarının kontrole göre anlamlı farklılıklar gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 3.6. [NiL]$(ClO_4)_2$'nin V79 379A hücreleri üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

[NiL]$(ClO_4)_2$ ve [CuL]$(NO_3)_2$ maddelerinin en yüksek dozu (40 µM), sağlam V79 379 A hücreleri üzerinde kanserli A549 hücrelerine göre daha toksik görünmektedir. Bu iki hücrenin kökenlerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

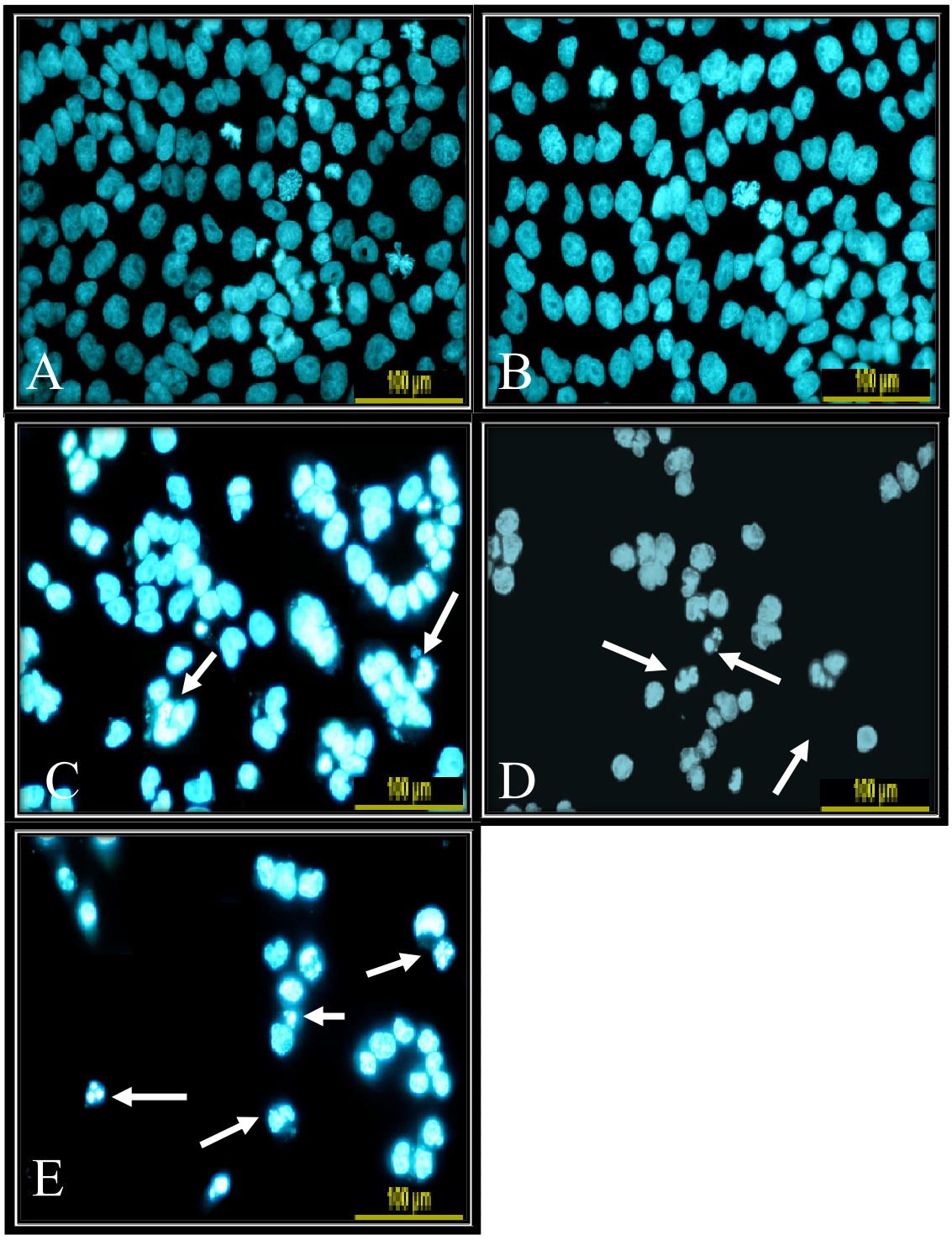
3.3.2. [NiL] $(ClO_4)_2$'nin fluoresan boyama ile incelenmesi

[NiL]$(ClO_4)_2$ uygulanan hücrelerde DAPI boyama sonucunda gözlenen sonuçlar bu maddenin, [CuL] $(NO_3)_2$'ya göre daha etkili olduğunu göstermektedir.

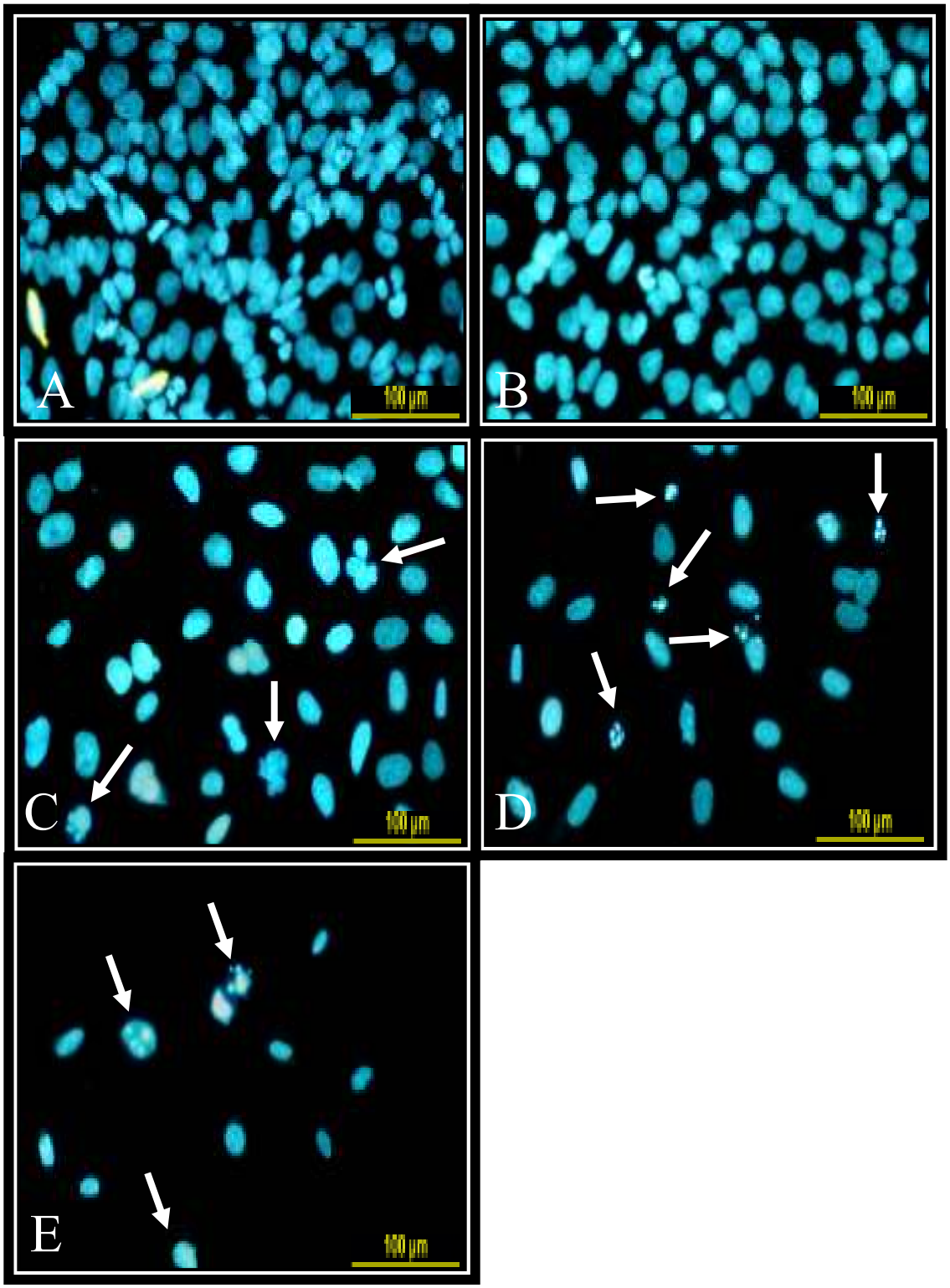
[CuL]$(NO_3)_2$'nin aksine [NiL]$(ClO_4)_2$'nin uygulandığı hücrelerde ilk dozlar da hücre sayısında belirgin azalmaya neden olmuş, hücrelerde kondensasyon, apoptotik badi oluşumu ve bleppingler oldukça çok sayıda görülmüştür.

Ayrıca bu maddenin uygulandığı kanserli hücrelerde hücre sayısındaki azalış, sağlıklı hücrelere oranla biraz daha belirgindir.

Şekil 3.7. [NiL] $(ClO_4)_2$'nin CHL hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI Boyama ile İncelenmesi. A: kontrol, B: DMSO, C: 10 µM'lık doz, D: 20 µM'lık doz, E: 40 µM'lık doz. Ölçü birimi: 100 µm.



Şekil 3.8. [NiL] $(ClO_4)_2$'nin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI Boyama ile İncelenmesi. A: kontrol, B: DMSO, C: 10 µM'lık doz, D: 20 µM'lık doz, E: 40 µM'lık doz. Ölçü birimi: 100 µm.



4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanserleri, en ölümcül ve en sık görülen tümörler arasındadır (Forest et al., 2005).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri genellikle radyasyona ve kemoterapiye karşı dirençlidir ve genellikle cerrahi müdahaleden sonraki safhada yeniden ortaya çıkar. Günümüze dek uygulanan tedavi yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Yeni terapilerin akciğerdeki neoplazm "tümör" oranındaki artışı azaltması gerekmektedir (Kim et al., 2003).

İdeal olarak, kemoterapotik ilaçlar yalnızca neoplastik hücreleri özel olarak hedeflenmelidir ve normal hücrelerde minimal kolateral zararla, tümör hücrelerinde sitotoksik ve/veya sitostatik (hücre gelişimi önleyici) etkileri uyararak tümörün yükünü hafifletmelidir. Gerçekte kemoterapinin etkinliği spesifite, hızlı ilaç metabolizması ve hem iç hem de sonradan kazanılmış ilaç dirençliliği yüzünden, sistemik toksisiteyi kapsayan bir dizi şaşırtıcı faktörden ayrı tutulmaktadır (Johnstone et al., 2002). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserini de içine alan bir grup tümörün ilaçlara yanıtı zayıftır. Buna rağmen bir metal kompleksi olan cisdiamindikloroplatinyuma dayanan çoklu kemoterapi çoğu kanserlerin ileri aşamalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Gridelli et al., 1998).

Metal kompleksleri, yardımcı moleküllerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik yeteneklerinden dolayı ilaç dağıtımının potansiyel adaylarıdır (Ren et al., 2002).

Yapılan bazı çalışmalarda; metal bileşiklerinin lenf kanseri, epidermal kanserler, ovaryum ve testis kanserleri gibi çeşitli insan kanserlerinin büyük bir kısmına ve bazı sıçan tümör hücrelerine karşı antitümör aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır (Mazumder et al., 2005; Shrivastav et al., 2002; Etcheverry et al., 2007; Bottari et al., 2007).

İlaç dağıtım sisteminin ana amacı, hedef bölgede spesifik bir zaman periyodunda gerekli ilaç miktarının etkili ve kesin dağımıdır. İlaç dağıtımının ileri biçimlerinin tasarlanmasında, ilgili ilaç moleküllerinin istenmeyen özelliklerini gidermek için uygun taşıyıcı materyaller kullanılır (Hiramaya and Uekama, 1999; Szente and Szetji, 1999; Rajewski and Stella, 1996).

İlaç direnç mekanizmalarının çoğu, ilaç-hedef etkileşimlerinin modifiye edilmesi ve gittikçe ilaç dirençliliğinin anahtar bir mekanizması olarak tanınan apoptozis aktivasyonunu uyaracak hasar-ilaç çiftlerinin etkinliğinin ayarlaması üzerine tanımlanmıştır. Bu yüzden, geleneksel kemoterapotik ajanların proapoptotik yeteneği artırıcı yaşam sinyalini bozma, ilaç dirençliliğinin üstesinden gelmek için güçlü bir stratejidir. Kanser hücrelerinin apoptozis uyarıcı ilaçlardan kurtulma yeteneği, yeni ilaçların gelişimine ve aynı zamanda kemoterapinin ilerlemesine yol açmaktadır (Makin and Dive, 2001).

Apoptozisin fizyolojideki ve patolojideki önemi günümüzde yaygın olarak kabul edilmektedir. Apoptozisdeki olumsuz değişiklikler; kanser, otoimmun hastalıklar, viral enfeksiyon, dejeneratif bozukluklar ve kalp yetmezliği gibi birçok hastalıkla bağlantılıdır. Bu nedenle apoptozisin kontrol altına alınmasını sağlayan hücresel regülasyon mekanizması, yalnızca gelişim ve doku homeostasisinin sağlanması için değil aynı zamanda birçok hastalık patojeni için de çok önemlidir (Liu et al., 2002).

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü, yaygın olarak çok önemli olan internükleozomal DNA fragmentasyonu gibi karakteristik morfolojik değişikliklerle hücre ölümünün fizyolojik bir formu olarak tanımlanır (Bowen and Bowen, 1990). Apoptozis, kanser gelişim ve tedavi sürecinde sitotoksisiteye neden olan kemoterapotik ajanların rollerinin tanımlanması için yapılan denemelerde çalışılmaktadır (Tong et al., 2000).

Biz de yaptığımız çalışmada kullandığımız metal komplekslerinin, kanser tedavisinde kullanılabileceğini düşündüğümüz için; öncelikle bu maddelerin sitotoksik

etkisini araştırdık. Test bileşenlerinin neden olduğu, hücre canlılığında meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek amacıyla çalışmamızda MTT yöntemini kullanıldık.

MTT deneyi, 3-(4,5-dimetiliazol–2-yl)-2,5 difenil tetrozolyum bromid, oksidatif enzimlerden birinin aktivitesini ölçerek hücre enerji metabolizmasını belirlemede kullanılmaktadır. Bu boya, mitokondride suksinik dehidrogenazla çözünmeyen mor renkli bir formazan ürününe indirgenir (Järvinen et al., 2000).

Tetrozolyum tuzunun mavi bir formazan ürünü olan bromide dönüşümüne dayalı olan bu deneyler hücre canlılığını ve proliferasyonunu ölçmekte yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu deneylerin klinik etkilerinin genel doğruluğunun %83 olduğu rapor edilmiştir (Bruggisser et al., 2002).

MTT deneyinin sonuçları; kullanılan her iki maddenin de hücreler üzerinde sitotoksik etki yaptığını, ayrıca; $[NiL](ClO_4)_2$'nin dozlarının, A549 hücreleri üzerindeki sitotoksisitesi her 2 günde de, $[CuL](NO_3)_2$'ye göre daha fazla olduğunu göstermektedir. $[CuL](NO_3)_2$ ve $[NiL](ClO_4)_2$ maddelerinin en yüksek dozu (40 μM), sağlam V79 379 A hücreleri üzerinde, kanserli A549 hücrelerine göre daha toksik görünmektedir.

Antikanser ajanlar içeren birçok kimyasal bileşik bazı hücre hatlarında apoptozis uyarıcıdır. Skuamöz hücre karsinoma ve adenokarsinoma gibi akciğer tümörleri aslında kemoterapi direncini sıklıkla terapinin ilk aşaması sırasında hızlı bir direnç kazanarak geliştirirler (Järvinen et al., 2000).

Neroblastoma, melanoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseriyle yapılan in vitro çalışmalar antioksidantların çeşitli antitümör ajanların büyümeyi baskılayıcı etkisini artırdığını göstermiştir (Weijl, 1997).

Memeli hücre biçimi; hücre farklılaşması, apoptozis, hücre bölünmesi ve büyümenin durmasında kritik bir öneme sahiptir (Mauro et al., 1999).

Hücre morfolojisi kısmen hücre ve ektraselüler matriks arasındaki bağ ile belirlenen intrasellüler hücre iskelet ağının organizasyonunu yansıtır (Bernal, 1983; Ben-Ze'ev et al., 1988). Çoğu hücre kusursuz büyüme, normal işlev ve hatta yaşam için bu bağa ve sonradan ekstrasellüler matriksin substrattan ayrılmasına ihtiyaç duyar (Ruoslahti, 1997). Doku-spesifik gen ekspressiyon regülasyon mekanizması, hücre iskeletinin organizasyonuyla ve dolayısıyla hücre morfolojisi ile sıkı bir ilişki içindedir (Ben-Ze'ev et al., 1988). Mikroflament polimerizasyonu, mikrotübül birleşmesi ve DNA sentezi olaylarının hepsi; in vitro hücre hatlarında ve dokulardaki kalabalık hücre populasyonlarında sıkışıklığın artması gibi durumlarda dışardan mekanik güç uygulanmasıyla hücrenin şekil değiştirmesine karşı çok hassastır (Dennerll et al., 1988).

Bu nedenle hücre büyümesinin ilerlemesiyle ekstrasellüler matriks hücresel adhezyonu takiben hücre ayrılması (Ingber, 1990) ve DNA sentezi aşamalı olarak durur (Folkmann and A. Moscona, 1978).

Apoptoziste de genel hücre morfolojisi değişir. Örneğin hücrelerin yuvarlaklaşması bir apoptozis indikatörüdür (Clay et al., 1999; Domnina et al., 2002; Kouroku et al., 2000). Apoptozis çok aşamalı bir hücre ölüm biçimi olduğundan birçok teknikle bu süreç belirlenebilir (Daniel and DeCoster, 2004).

Bu gibi değişiklikleri saptamak için sıklıkla kullanılan apoptozis deneyleri arasında DAPI boyama bulunmaktadır. DAPI boyama, nüklear büyüklük ve yuvarlaklığa dayanan, bir nüklear morfoloji indikatörüdür (Daniel and DeCoster, 2004).

Çalışmalarımızın devamında apoptozisi belirlemek amacıyla yaptığımız boyamada DAPI (4’6-diamidino–2 fenilindol) kullandık. Boyamanın ardından genel hücre biçimlerini belirleyebilmek için öncelikle mikroskobik inceleme, ardında da fotoğraf çekimleri yaptık. Şekil 3.3, 3.4, 3.7 ve 3.8’de görüldüğü gibi her iki maddenin de en düşük dozlardan itibaren hem sağlıklı hem kanserli hücreleri apoptozise sürüklediği, hücrelerin kondanse olduğu, apoptotik badilerin ve bleppinglerin oluştuğu, hücre sayılarının önemli ölçüde düştüğü görülmektedir.

DAPI deneyinin sonuçları, MTT deneyinin sonuçlarını doğrular niteliktedir. $[CuL](NO_3)_2$ sağlıklı hücrelerin sayısını $[NiL](ClO_4)_2$'ye göre daha fazla düşürmüştür. Ancak genel görüntü alanında yapılan incelemelerde $[NiL](ClO_4)_2$'nin daha fazla apoptotik badiye ve bleppinge neden olduğu fark edilmiştir. $[NiL](ClO_4)_2$' nin ilk dozu, $[CuL](NO_3)_2$'nın ilk dozuna göre daha etkilidir.

MTT deneylerinden elde edilen verilere göre; $[NiL](ClO_4)_2$'nun 10 □M'lık dozu sağlıklı akciğer hücrelerinin çoğalması üzerinde bir etki yapmazken, kanserli hücrelerin 1. gün %5'ini, 2. gün ise %25'ini öldürdüğü söylenebilir. Bu sonuçlara göre; Ni metali içeren bu maddenin kanser tedavisinde kemoterapotik bir ilaç hammaddesi olabileceğini düşünmekteyiz. Daha önce yapılan bir çok araştırmada da Ni metali içeren bazı komplekslerin sıçan tümör hücrelerinin proliferasyonunda maksimum inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir (Shrivastav et al., 2002)

$[CuL](NO_3)_2$'nun ise yine 10 μM'lık dozunun kanserli hücrelerde daha etkili olduğu, hücre sayısını en azından %5 oranında azalttığı gözlenmektedir. Literatürlerde Cu'ın farklı tümör hücrelerinde anti tümör aktiviteye sahip olduğu söylenmektedir.

Shrivastav ve arkadaşları (2002), Ni ve Cu'nun çeşitli komplekslerinin in vitro da tümör gelişimini önlediğini ve en etkili apoptotik etkinin Ni'in bazı komplekslerinde görüldüğünü tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında kullanılan $[CuL](NO_3)_2$ ve $[NiL](ClO_4)_2$ maddelerinin kanserli akciğer hücreleri (A549) üzerinde bıraktığı sitotoksik ve apoptotik etkilerin kemoterapotik ilaç gelişiminde anlamlı olabileceğini, özellikle $[NiL](ClO_4)_2$'nun kanser tedavisi için bir umut olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abedini, M. R., Qiu, Q., Yan, X., et al., 2004, Possible role of FLICE-like inhibitory protein (FLIP) in chemoresistant ovarian cancer cells in vitro, Oncogene, 23, 6997p.

Adams, J. M. and Cory, S., 1998, The Bcl–2 protein family: Arbiters of cell survival. Science, 281, 1322p.

Adrain, C. and Martin, S. J., 2001, The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas., Trends Biochem Sci., 26, 390p.

Agarwal, R., 2000, Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents, Biochemical Pharmacology 60, “1051–1059”.

Antonsson, B. and Martinou, J. C., 2000, The Bcl–2 protein family, Experimental Cell Research, 256, “50–57”.

Ben-Ze'ev, A., Robinson, G. S., Bucher, et al., 1988, Cell–cell and cell–matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures and rat hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, “2161–

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

2165".

Bendirdjian, S., 1999, Cell death: signaling and execution of apoptosis, Hématologie, 5, "376–387".

Bennett, M. R., 1999, Mechanisms of p53-induced apoptosis, Biochemical Pharmacology, 58, "1089–1095".

Bernal, S. D., Baylin, S. B., Shaper, J. H., et al., 1983, Cytoskeleton-associated proteins of human lung cancer cells. Cancer Res. 43, pp. "1798–1808".

Berridge, M. V., and Tani A. S., 1993, Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol–2-yl)-2,5-diphenyltetrozolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence and involment of mitochondrial electron transfer in MTT reduction, Arch., Biochem, Biophys, 303, "474-482".

Bertram, J. S., 2001, The Molecular Biology Of Cancer, Moleculer Aspects of Medicine, 21**, "**167–223".

Bottari, B., Maccari, R., Monforte, et al, 2001, Nickel(II) 2,6-Diacetylpyridine

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Bis(isonicotinoylhydrazonate) and Bis(benzoylhydrazonate) Complexes: Structure and Antimycobacterial Evaluation. Part XI, Bioorganic & Medicinal Chemistry,9, "2203–2211".

Bowen, I. D., Bowen, S. M., 1990, Programmed cell death in tumours and tissues, London, Chapman and Hall, "1–68".

Bozkurt, B., Selçuk, T., Fırat, ve diğerleri, 2004, 1972-2002 döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde akciğer kanseri tanısı konulan hastaların histolojik ve epidemiyolojik değerlendirmesi, Toraks Dergisi, Cilt, 5(3), 148-153s.

Bredel, M., 2001, Anticancer drug resistance in primary human brain tumors, Brain Res. Rev., 35, "161-204".

Broker, L.E., Kruyt, F.A., Giaccone, G., 2005, Cell death independent of caspases: A review. Clin. Cancer Res.;11, 3155p.

Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000, Int. Microbiol, 3, "3–8".

Caldas, H., Jiang, Y., Holloway, M. P., et al., 1994.,Survivin splice variants regulate the

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

balance between proliferation and cell death, Oncogene, 2005, 24p.

Charriaut-Marlangue, C., Ben Ari ,Y. ,1995, A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis, Neuroreport, 7, 61p.

Chauhan, D., Hideshima,T., Rosen, S., et al., 2001, Apaf–1/cytochrome c-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. J Biol. Chem., 276, 24453p.

Chemicon International. http://www.chemicon.com/resource/litlibrary/2005Catalog/2005TOC.asp. 2006.

Chen, Y. L, Lin, S. Z., Chang, J. Y., et al, 2006, Biochem-Pharmacol, 72(3): "308-19"

Cheng, Lee, Lin, et al, 2005, Cancer Letters, Volume 222, Issue 2, 2005, "183–193".

Clay, C. E., Namen, A. M., Atsumi, G., et al, 1999, Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. Carcinogenesis 20 "1905–1911."

Cummings, M. C., Winterford, C. M., Walker, N. I., 1997, Apoptosis, Am J Surg

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Pathol; 21.88.

Daniel, H. A., Corrêa, Patricia, S., Melo, 2005, Dehydrocrotonin and its β-cyclodextrin complex: Cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes European Journal of Pharmacology, Volume 510, Issues 1–2, 7 March 2005, Pages "17–24"

Davison, F. D., Groves, M. and Scaravilli, F., 1995, The effects of formalin fixation on the detection of apoptosis in human brain by in situ end-labelling of DNA, Histochem J., 27, 983p.

Dennerll, T. J., Joshi, H. C., Steel, V. L., et al., 1988 Tension and compression in the cytoskeleton of PC–12 neurites II: quantitative measurements. J. Cell Biol. 107p., "665–674".

Denziot, F. and Lang, R., 1986, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensivity and reliability, J. Immunol, Methods 89, "271–277".

Dietrich, J. B., 1997, Apoptosis and anti-apoptosis genes in the Bcl-2 family, *Arch.* Physiol. Biochem. 105p., "125–135".

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Dimmeler, S., Haendeler ,J., Nehls, M., et al., 1997, Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. J Exp Med 185, 601p.

Domnina, L. V., Ivanova, O. Y., Cherniak, B. V., 2002, Effects of the inhibitors of dynamics of cytoskeletal structures on the development of apoptosis induced by tumor necrosis factor. Biochemistry, Moscow, 67, "737–746".

Dobrowsky, R. T. and Hannun, Y. A., 1992, Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase, J. Biol Chem., 267, 5048p.

Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L.,et al., 1992, Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours, Nature, 356, "215–221".

Dredge, K., Dalgleish A. G. and Marriott, J. B., 2003, Angiogenesis İnhibitors in Cancer Therapy, Current Opinion in Investigational Drugs, 4, "667–674".

Du ,C., Fang, M., Li, Y., et al., 2000, A mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Cell, 102, 33p.

Eisenberg, D. M., Davis, R. B., Ettner, S. L, et al., 1998, Trends in Alternative Medicine use in the United States, 1990–1997, results of a follow-up national survey, J Am Med Assoc, 280, "1569–75".

Etcheverry, S. B., Ferrer, E. G., Naso, L., et al., 2007, Losartan and its interaction with copper(II): Biological effects, Bioorganic & Medicinal Chemistry 15, "6418–6424".

Fadok ,V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., et al. 1992, Exposure of phos-phatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol 148, 2207p.

Ferlini, C., G. Raspaglio, S. Mozzetti, et al., 2003, Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance, Molecular Pharmacology, 64, "51–58p".

Folkmann, J. and Moscona, A., 1978, Role of cell shape in growth control. Nature 273. "345–349"

Forest, V., Peoc'h, M., Campos, L., et al., 2005, Effects of cryotherapy or chemotherapy

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

on apoptosis in a non-small-cell lung cancer xenografted into SCID mice, Cryobiology, Volume 50, Issue 1, "29–37".

Furst, A., 1963, Chemistry of Chelation in Cancer, Springfield, IL.

Gavrieli, Y., Sherman, Y.and Ben-Sasson ,S.A., 1992, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol,119, 493p.

Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B., Koudelka, H., et al., 1995, In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. Hepatology 21, 1465p.

Gridelli, C., Perrone, F. and Monfardini, S., 1998, Current controversies in cancer are platinum compounds mandatory in the treatment of metastatic non-small cell lung cancer, Contra. Eur. J. Cancer 34, "1995–1997".

Harvey, A., 2000, Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products, Drug Discovery Today, 5, "294–300".

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Hatano M, Mizuno M, and Yoshida J., 2004, Enhancement of C2-ceramide antitumor activity by small interfering RNA on X chromosomelinked inhibitor of apoptosis protein in resistant human glioma cells. J Neurosurg, "101–119".

Hengartner, M. O., 2000, The biochemistry of apoptosis. Nature 407, 770p.

Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan ,D., et al. 2001, The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. Cancer Res., 61, 3071p.

Hirayama, F. and Uekama, K.,1999, Cyclodextrin-based controlled drug release system, Adv. Drug Deliv. Rev. 36, "125–141".

Hockenbery, D., 1995, Defining apoptosis, American Journal of Pathology 146, "16-19".

Hoffman Le Roche Inc. http://www.rochediagnostics.com/researchers/cellbiology_immunochemistry.html#apoptosis. 2006.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Holle, L., Hicks ,L., Song, W., et al., 2004, Bcl–2 targeting siRNA expressed by a T7 vector system inhibits human tumor cell growth in vitro. Int.J.Oncol., 24, 615p.

Hollstein, M. K. Rice, M. S., Greenblatt, T., et al., 1994, Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines, Nucleic Acids Research,22, "3551–3555".

Holst, M. C., and Oredsson, S. M., 2004, Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation if the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines, Toxicology in vitro.

Hong, M. Y., Chapkin, R. S., Davidson, L. A., et al., 2003, Fish oil enhances targeted apoptosis during colon tumor initiation in part by downregulating Bcl–2, Nutrition and Cancer 46, "44–51".

Hongo F., Garban, H., Huerta-Yepez, S., et al., 2005, Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 336, 692p.

Ingber, D. E., 1990, Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

modulating cell shape. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, "3579–3583".

Jaattela, M., 1999, Escaping cell death: Survival proteins in cancer,Exp Cell Res., 248,30p.

Jackson, A. L, Linsley, P. S., 2004, Noise amidst the silence: Off-target effects of siRNAs Trends Genet, "20–521".

Jarvis, W. D., Kolesnick, R. N., Fornari,F. A., et al. 1994, Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway, Proc. Natl. Acad.Sci., USA, 91, 73p.

Johnstone, R. W.; Ruefli ., A. A. and Lowe, S. W., 2002, Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy, Cell 108, "153–164".

Huerta, S., Goulet, E. J., Huerta-Yepez, S., et al., 2006, Screening and Detection Of Apoptosis, Journal of Surgical Research, 139, "143–156".

Karp, G., 1999, Cell and Molecular Biology "Concept and experiments", Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., Canada, USA, "704-705".

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Katzer, A., Marquardt, H., Westendorf, J., et al., 2002, Polyetheretherketone—cytotoxicity and mutagenicity in vitro, Biomaterials 23, pp. "1749–1759".

Kemp, D. C. and Brouwer, K. L. R., 2004, Viability assessment in sandwich-cultured rat hepatocytes after xenobiotic exposure Toxicology in Vitro, Volume 18, Issue 6, December, "869–877".

Kerr, J. F., Wyllie, A.H., Currie, A. R., 1972, Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, Br. J. Cancer, "26–239".

Kim, D. K., Baek, J. H., Kang, C. M., et al., 2000, Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication, International Journal of Cancer, 87, "629–636".

Koo, H. N., Jeong, H. J., Hong, S. H., et l., 2002, High molecular weight water-soluble chitosan protects against apoptosis induced by serum starvation in human astrocytes, Journal of Nutritional Biochemistry 13 , "245–249".

Kouroku, Y., Fujita, E., Urase, K., et al., 2000, Caspases that are activated during

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

generation of nuclear polyglutamine aggregates are necessary for DNA fragmentation but not sufficient for cell death. J. Neurosci. Res. 62. "547–556"

Krammer, P. H., 2000, CD95's deadly mission in the immune system. Nature "407-789".

Kreja, L., Seidel H. J., 2002, On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in.

LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., et al.,1998, The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. Oncogene, 17, 3247p.

Lee, E. J., Shin, I., Kwon, S. K., et al., 2003, Chemopreventive allylthiopyridazines inhibit invasion, migration and angiogenesis in hepatocarcinma cells, International Journal of Ongology 23, "1645–1650".

Lewin, B., 1997, Oncogenes and cancer, Genes, Oxford Universty Press, Second Edition, New York, USA, "1131–1172".

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Lima, R. T., Martins, L. M., Guimaraes, J. E., et al., 2004, Specific downregulation of Bcl–2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells, Cancer Gene Ther.,11, 309p.

Liu B., Liu Y., Chen J., et al., 2002, Sino-German Laboratory for Molecular Medicine and Center for Molecular Cardiology, Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, 167 Beilishilu, Beijing 100037, China.

Livingstone, S. E., Mikhelson, A. E., 1970, Inorg. Chem.,9, 2545p.

Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., et al., 1996, Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nat Biotechnol 14, 1675p.

Lucassen, P. J., Chung, W. C., Vermeulen, J. P., et al., 1995, Microwaveenhanced in situ end-labeling of fragmented DNA: Parametric studies in relation to postmortem delay and fixation of rat and human brain, J. Histochem Cytochem, 43,1163p.

MacFarlane, M., Merrison,W., Bratton, S.B., et al., 2002, Proteasomemediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

vitro. J Biol Chem, 277, 36611p.

Macho, A., Decaudin, D., Castedo, M., et al.,1996, Chloromethyl-XRosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. Cytometry, 25, 333p.

Makin, G. and Dive, C., 2001, Apoptosis and cancer chemotherapy, Trends Cell. Biol. 11, "S22–S26".

Marshall, L. E., Graham, D.R., Reich, K.A., et al., 1981, Chem. Soc. 20, "244–250".

Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., et al., 1995, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl–2 and Abl. J. Exp. Med.,182, 1545p.

Mathias, S, Dressler K. A, Kolesnick R. N., 1991, Characterization of a ceramide-activated protein kinase: Stimulation by tumor necrosis factor alpha. Proc Natl Acad Sci USA, 88:10009.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Mathur, R., Suresh, K. G., Neeta, S., et al., 2005, Evaluation of teh Effect Of Withania somnifera root extracts on cell cycle and angiogenesis, Journal of Ethnopharmacology, 6p.

Mauro A. C., Schwartsmann, G., Bernard, E. A., ET AL., 1999, Phenotype modulation of cellular UV-sensitivity, Cancer Letters, Volume 145, Issues 1–2, "65–71"

May, P. and May, E., 1999,Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein, Oncogene,18, "7621–7636".

Mayo, M. W., Baldwin, A. S., 2000, The transcription factor NF-kappaB: Control of oncogenesis and cancer therapy resistance, Biochim. Biophys. Acta., 1470, M 55p.

Mazumder, U. K., Gupta, M., Karki, S. S., et al. 2005, Synthesis and pharmacological activities of somemononuclear Ru(II) complexes Bioorg. Med. Chem. 13 "5766–5773."

Melo, P. S., Duran, N. and Haun, M., 2001, Cytotoxicity of derivatives from dehidrocrotonin on V79 cells and Escherichia coli, Toxicology Letters, 159 (3),

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

"135–141".

Mignon, N., Rouquet and Joulin, V., 1998, Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose: un enjeu thérapeutique pour demain, Médecine/Sciences, 14 "9–17".

Mossman, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of Immunological Methods, 65, "55–63".

Oberhammer, F., Wilson, J. W., Dive, C., et al. 1993, Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. EMBO J, 12, 3679p.

Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J., 1993, Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death, Cell 74, "609–619".

Pai, S. I., Lin, Y. Y., Macaes, B., et al. 2005, Prospects of RNA interference therapy for cancer, Gene Ther.,13, 464p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Pınarbaşı, E., 2007, Apoptozis, Moleküler Biyoloji Protein Sentezi ve Yıkımı, Nobel Yayınevi, 613 s.

Rieux-Laucat, F., 2000, The Fas pathway: signaling of apoptosis, Hématologie 6, "136–142".

Rodriguez and Haun, M., 1999, Cytotoxicity of *trans*-dehydrocrotonin from Croton cajucara on V79 cells and rat hepatocytes, Planta Med. 65, "522–526".

Roy, S., Nicholson, D. W., 2000, Cross-talk in cell death signaling. J. Exp. Med., 192, 21p.

Robertson, M., Feuerstein, B., Dave, C., et l., 1979, The generality of methyglyoxal bis (guanylhydrazone)-induced mitochondrial damage and dependence of this effect on cell proliferation, Cancer Res., 39, "1919-1926".

E. Ruoslahti, 1997, Stretching is good for a cell. Science 276, "1345–1346".

Sevilla, L., Zaldumbide, A., Pognonec, P., et al., 2001, Transcriptional regulation of the bcl-x gene encoding the anti-apoptotic Bcl-xL protein by Ets, Rel/NFkappaB,

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

STAT and AP1 transcription factor families, Histol Histopathol 16, 595.

Shay, J. W., Wright, W. E. and Werbin, H., 1991, Defining the molecular Mechanisms of Human Cell Immortalization, Biochimica et Biophysica Acta, 1072, "1–7".

Schubert, J., 1966, Sci. Am., 214, 40p.

Sharr, C. J. and Roberts, 1999, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, Genes & development 13,"1501–1512".

Shrivastav, A., Singh, N. K., Srivastava, 2002, Synthesis, Characterization and Antitumor Studies of Transition Metal Complexes of o-Hydroxydithiobenzoate Bioorg. Med. Chem.,10, "2693–2704".

Shrivastava, H. Y., Kanthimathi, M., Nair, B. U., 2002, Copper(II) complex of a tridentate ligand: an artificial metalloprotease for bovine serum albumin, Biochimica et Biophysica Acta 1573, 149– 155 Siskind LJ. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. J Bioenerg Biomembr 2005;37.143.

Siskind, L. J., 2005, Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. J Bioenerg

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Biomembr, 37, 143p.

Slee, E. A., Adrain, C., Martin, S. J., 1999, Serial killers: Ordering caspase activation events in apoptosis, Cell Death Differ 6, 1067p.

Souza-Brito, J. A. Rodriguez, C. A. Hiruma-Lima, M., et al., 1998, Antiulcerogenic activity of *trans*-dehydrocrotonin from Croton cajucara, Planta Med. 64 "126–129".

Sperandio,S., de Belle, I., Bredesen, D. E., 2000, An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 97, 14376p.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., et al., 1993, Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family, Cell 75 pp. "1169–1178".

Thompson, C. B., 1995, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, Science 267pp. "1456–1462".

Tong, D., Poot, M., Hu, D. and Oda, D., 2000, 5-Fluorouracil-induced apoptosis in

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

cultured oral cancer cells, Oral Oncology, Volume 36, Issue 2, "236–241".

Uchida, H., Tanaka, T., Sasaki, K., et al., 2004, Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo, Mol. Ther.,10, 162p.

Ulukaya, Engin, 2003, Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi BiyokimyaAnabilim Dalı, Bursa,http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf (30–06–2007 22.25)

Urbano, A., Lakshmanan, U., Choo, P. H., et al. 2005, AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells, EMBO., J. 24, 2815p.

Vega, M. I., Jazirehi A. R., Huerta-Yepez, S., et al., 2005, Rituximabinduced inhibition of YY1 and Bcl-xL expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF-kappa B activity: Role of YY1 and Bcl-xL in Fas resistance and chemoresistance, respectively. J Immunol, 175:2174.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Verhagen, A. M., Vaux, D. L., 2002, Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac., Apoptosis 7,163p.

Walczak, H., Krammer,P. H., 2000, The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems, Exp. Cell Res., 256,58p.

Weijl, N. I., Clenton, F. J. and Osanto, S., 1997, Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity, Cancer Treat. Rev. 23, 209–240.

Wijsman, J. H., Jonker, R. R., Keijzer, R., et al., 1993, A new method to detect apoptosis in paraffin sections: In situ end-labeling of fragmented DNA. J Histochem Cytochem, 41,7p.

Wu, F., Lukinus, A., Bergström, M., Eriksson, B., Watnabe, Y and Langström, B., 1999, A Mechanism behind the Antitumour Effect of 6- diazo–5-oxo- L-norluicine (DON) : Distruption of Mitochondria, Pergamon, Vol 35 No 7, “1155–1161 “.

Yılmaz, İ., 2005, Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul.

Zangemeister-Wittke, U., 2003, Antisense to apoptosis inhibitors facilitates chemotherapy and TRAIL-induced death signaling. Ann N Y Acad Sci.,1002, 90p.

Zhang, H. G, Wang, J, Yang X, et al., 2004; Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. Oncogene, 23, 2009.

Zhivotovsky, B., Orrenius, S., 2003, Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: Role in drug resistance. Semin Cancer Biol.,13, 125p.

Zhu, H., Guo, W., Zhang, L., et al. 2005, Bcl-XL small interfering RNA suppresses the proliferation of 5-fluorouracil-resistant human colon cancer cells. Mol. Cancer. Ther., 4, 451.

Zunino, S. J., Singh, M. K., Bass, J., et al. 1996, Immunodetection of histone epitopes correlates with early stages of apoptosis in activated human peripheral T lymphocytes. Am. J., Pathol, 149, 653p.