



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**E VİTAMİNİNİN SIÇAN C6 GLİOMA HÜCRELERİ  
ÜZERİNDEKİ APOPTOZ İNDÜKLEYİCİ ETKİSİ**

**Zeynep OKTAY**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman**

**Prof.Dr. Nazlı ARDA**

**Eylül, 2011**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**E VİTAMİNİNİN SIÇAN C6 GLİOMA HÜCRELERİ  
ÜZERİNDEKİ APOPTOZ İNDÜKLEYİCİ ETKİSİ**

**Zeynep OKTAY**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman**

**Prof.Dr. Nazlı ARDA**

**Eylül, 2011**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 07/09/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Nazlı ARDA (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. A. Süha YALÇIN  
Marmara Üniversitesi  
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 5664 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında sonsuz anlayış ve desteğiyle hep yanımda olan, benim için çok değerli olan bilgi ve tecrübeleriyle bana her daim yol gösteren, ilgi ve yardımlarını benden hiç eksik etmeyen değerli hocam **Prof. Dr. Nazlı ARDA**'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans çalışmalarımı yürüttüğüm Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde bana emeği geçen, başta Bölüm Başkanı **Prof. Dr. Avni KURU** olmak üzere tüm Öğretim Üyesi hocalarıma saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullanmış olduğum hücre hattının, Bölümümüz kültür koleksiyonuna katılmasını sağlayan, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi **Prof. Dr. Ayhan BİLİR**'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince bana her konuda yardımcı olan, sorularımı asla yanıtsız bırakmayan, hocalarım **Araş. Gör. Dr. Evren ÖNAY UÇAR**'a ve **Araş. Gör. Dr. Murat PEKMEZ**'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve önerilerini benimle paylaşarak bana yol göstermiş olan, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Uzman Araştırmacılarından **Dr. Ceyda AÇILAN AYHAN**'a teşekkürü bir borç bilirim. Ülkemizin bu saygın kurumundaki analizlerim sırasında vermiş olduğu teknik destek ve göstermiş olduğu yakın ilgiden dolayı Uzman Teknisyen **Ömer KAÇAR**'a çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan ve beni bugünlere getiren, yaşamımın her safhasında desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, varlıklarıyla bana ve yaşamıma güç katan, hayatımın anlamı sevgili Annem **Rukiye Gülten ERYILMAZ**'a ve sevgili Teyzem **Leyla BALCI**'ya sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışma onlara ithaf edilmiştir.

İstanbul, 2011

Zeynep OKTAY

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ .....	iv
TABLO LİSTESİ .....	v
SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ .....	vi
ÖZET .....	viii
SUMMARY .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL KISIMLAR .....	5
2.1. APOPTOZ .....	5
2.1.1. Kaspazlar .....	7
2.1.2. Apoptozun Moleküler Mekanizması .....	10
2.1.2.1. Dış Yolak (Ölüm Reseptörleri Yolağı) .....	10
2.1.2.2. İç Yolak (Mitokondriyal Yolak) .....	12
2.1.2.3. Perforin / Granzim İndüklü Apoptoz ve Kaspaz-Bağımsız Apoptotik Yolak ....	16
2.2. APOPTOZ VE KANSER .....	17
2.3. E VİTAMİNİ .....	19
2.3.1. $\alpha$ -Tokoferol Süksinat .....	21
2.3.2. E Vitamini ve Kanser .....	21
2.3.3. E Vitamini ve Apoptoz .....	22
3. MALZEME VE YÖNTEM .....	24
3.1. MALZEMELER .....	24
3.1.1. Kimyasallar .....	24

3.1.2. Besiyerleri .....	24
3.1.3. Cihazlar .....	24
3.2. SIÇAN C6 GLİOMA HÜCRE HATTI .....	24
3.3. E VİTAMİNİ SOLÜSYONUNUN HÜCRELERE UYGULANMASI .....	26
3.4. APOPTOZ ANALİZLERİ .....	27
3.4.1. Nukleus Morfolojisi .....	27
3.4.2. Apoptoza Giden Hücrelerin Mikroskopik Canlı Video Kaydı (“Live Cell Imaging”) .....	27
3.4.3. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	28
3.4.4. Kaspaz-9 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	29
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>31</b>
4.1. APOPTOZ ANALİZLERİ .....	31
4.1.1. Morfolojik Değerlendirme .....	31
4.1.2. Apoptoza Giden Hücrelerin Mikroskopik Canlı Video Görüntüleri .....	38
4.1.3. Kaspaz-3 Aktivitesi .....	40
4.1.4. Kaspaz-9 Aktivitesi .....	40
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>48</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>56</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 2.1</b>	: Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen morfolojik değişimler ..... 7
<b>Şekil 2.2</b>	: Kaspazların yapısı ..... 9
<b>Şekil 2.3</b>	: Şematik gösterimle dış yolak (ölüm reseptörleri yolağı) ..... 11
<b>Şekil 2.4</b>	: Bcl-2 ailesine ait anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler ..... 13
<b>Şekil 2.5</b>	: Sitokrom c salınımı, apoptozom oluşumu ve kaspaz-9 aktivasyonu.... 15
<b>Şekil 2.6</b>	: İçsel (mitokondriyal) apoptotik yolak ..... 16
<b>Şekil 2.7</b>	: Tokoferollerin ve tokotrienollerin kimyasal yapıları ..... 20
<b>Şekil 2.8</b>	: Alfa-tokoferol süksinatın kimyasal yapısı ..... 21
<b>Şekil 3.1</b>	: Başlangıç hücre sayısı $1 \times 10^5$ hücre/ml olan 2 günlük C6 glioma hücrelerinin faz kontrast invert mikroskop altında görüntüsü (20X) ... 26
<b>Şekil 4.1</b>	: $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulanmış C6 glioma hücrelerinin 0. saatte floresan mikroskopundaki görüntüleri (40X; Hoechst)..... 33
<b>Şekil 4.2</b>	: $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulanmış C6 glioma hücrelerinin 24. saatte floresan mikroskopundaki görüntüleri (40X; Hoechst)..... 34
<b>Şekil 4.3</b>	: $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulanmış C6 glioma hücrelerinin 32. saatte floresan mikroskopundaki görüntüleri (40X; Hoechst) ..... 35
<b>Şekil 4.4</b>	: $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulanmış C6 glioma hücrelerinin 40. saatte floresan mikroskopundaki görüntüleri (40X; Hoechst)..... 36
<b>Şekil 4.5</b>	: $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulanmış C6 glioma hücrelerinin 48. saatte floresan mikroskopundaki görüntüleri (40X; Hoechst)..... 37
<b>Şekil 4.6</b>	: 48 saat süreyle $50 \mu\text{M}$ $\alpha$ -TOS uygulanmış C6 glioma hücrelerindeki morfolojik değişimleri gösteren video kaydı ile elde edilen fotoğraflar (20X) ..... 39



## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1</b>	: Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar .....	6
<b>Tablo 2.2</b>	: Apoptotik yollardaki moleküller hedef alınarak geliştirilmiş terapötik ajanlar ve araştırma düzeyleri .....	18
<b>Tablo 4.1</b>	: $\alpha$ -Tokoferol süksinatın C6 glioma hücrelerinin morfolojisinde apoptoza bağlı olarak meydana getirdiği değişiklikler.....	31
<b>Tablo 4.2</b>	: $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulanmış C6 glioma hücrelerindeki kaspaz-3 aktivitesi (pikomol AMC/dakika/ml) (kontrol grubunun katı şeklinde ifade edilmiştir).....	40
<b>Tablo 4.3</b>	: $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulanmış C6 glioma hücrelerindeki bağıl kaspaz-9 aktivitesi (kontrol grubunun katı şeklinde ifade edilmiştir).....	41

## SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ

<b><math>\alpha</math>-TOS</b>	: Alfa-tokoferol süksinat
<b>ATRA</b>	: All trans retinoic acid.
<b>Ac-DEVD-AMC</b>	: Asetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metil kumarin
<b>AIDS</b>	: Kazanılmış bağışıklık eksikliği sendromu (“Acquired Immune Deficiency Syndrome”)
<b>AIF</b>	: Apoptoz indükleyici faktör (“Apoptosis Inducing Factor”)
<b>ALPS</b>	: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom (“Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome”)
<b>ALS</b>	: Amiyotrofik lateral skleroz
<b>Apaf-1</b>	: Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>Bad</b>	: Hücre ölümü Bcl-2 antagonisti (“Bcl-2 antagonist of cell death”)
<b>Bak</b>	: Bcl-2 antagositi öldürücü 1 (“Bcl-2 antagonist killer 1”)
<b>Bax</b>	: Bcl-2 ilişkili X proteini (“Bcl-2 associated X protein”)
<b>Bcl-2</b>	: $\beta$ -hücreli lenfoma 2 (“ $\beta$ -cell lymphoma-2”)
<b>Bcl-X<sub>L</sub></b>	: Bcl-2 ilişkili protein, uzun izoform (“Bcl-2 related protein, long isoform”)
<b>Bcl-w</b>	: Bcl-2 benzeri 2 proteini (“Bcl-2 like 2 protein”)
<b>BH</b>	: Bcl-2 homoloji
<b>Bid</b>	: BH3 etkileşim domeni ölüm antagonisti (“BH3 interacting domain death antagonist”)
<b>Bim</b>	: Bcl-2 etkileşimli protein BIM (“Bcl-2 interacting protein BIM”)
<b>CADN<sub>az</sub></b>	: Kaspazla aktifleşmiş DNaz (“Caspase-Activated DNase”)
<b>CARD</b>	: Kaspaz bağlayıcı domen (“Caspase Recruitment Domain”)
<b>CL</b>	: Sitotoksik lenfosit (“Cytotoxic Lymphocyte”)
<b>CTL</b>	: Sitotoksik T lenfosit (“Cytotoxic T Lymphocyte”)
<b>DD</b>	: Ölüm domeni (“Death Domain”)
<b>DED</b>	: Ölüm etkili domen (“Death Effector Domain”)
<b>DISC</b>	: Ölüm indükleyici kompleks (“Death Inducing Complex”)
<b>DR</b>	: Ölüm reseptörü (“Death Receptor”)
<b>DMEM/F12 HAM</b>	: “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium / Nutrient Mixture F-12 HAM”
<b>FADD</b>	: Fas ilişkili ölüm domeni (“Fas-Associated Death Domain”)
<b>FasL</b>	: Yağ asidi sentaz ligandı (“Fatty acid synthetase Ligand”)
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu (“Fetal Bovine Serum”)
<b>GBM</b>	: Glioblastoma multiform
<b>ICAD</b>	: Kaspazla aktifleşmiş DNaz inhibitörü (“Inhibitor of Caspase-Activated DNase”)

<b>ICE</b>	: İnterlökin-1 $\beta$ -dönüştürücü enzim (“Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme”)
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b>LEHD-AFC</b>	: Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-triflorometil kumarin
<b>NGF</b>	: Sinir büyüme faktörü (“Nerve Growth Factor”)
<b>NOXA</b>	: Forbol-12-miristat-13-asetat indüklü protein 1 (“Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1”)
<b>PBS</b>	: “Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline”
<b>PUMA</b>	: Bcl-2 bağlayan komponent 3 (“Bcl-2 binding component 3”)
<b>rfu/dk</b>	: Dakikadaki rölatif floresan birim (“Relative fluorescence unit per minute”)
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktör (“Tumor Necrosis Factor”)
<b>TNF-R</b>	: Tümör nekroz faktör reseptör
<b>TRAIL</b>	: Tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz indükleyici ligand
<b>TRADD</b>	: TNF reseptör ilişkili ölüm domeni (“TNF Receptor-Associated Death Domain”)
<b>TOC</b>	: Tokoferol
<b>TT</b>	: Tokotrienol

## ÖZET

### E VİTAMİNİNİN SIÇAN C6 GLİOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOZ İNDÜKLEYİCİ ETKİSİ

E vitamininin çeşitli analogları ve türevleri destekleyici kanser tedavisinde kullanılmaktadır. E vitamininin antioksidan aktiviteye ek olarak, anti-karsinojenik etkiye de sahip olduğu bildirilmektedir. Anti-karsinojenik etkisini apoptozu indükleyerek ve/veya proliferasyonu baskılayarak gösterdiği öne sürülmektedir.

“Programlı hücre ölümü” olarak tanımlanan apoptoz, son yıllarda önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Özellikle kanser hücrelerinin farklı ilaçlar ve ajanlarla apoptoza yönlendirilebildiğinin anlaşılması, kanser tedavisine ilişkin yeni yöntemlerin geliştirilmesi açısından çok önemlidir. Dolayısıyla E vitamininin kanser hücreleri üzerindeki apoptoz indükleyici etkisi çok önemlidir. Bir E vitamini türevi olan  $\alpha$ -tokoferol süksinat ( $\alpha$ -TOS)’ın apoptoz indükleyici etkisi, kolon, mide, karaciğer ve meme kanseri gibi farklı tipte kanser hücreleri üzerinde araştırılmış, ancak glioma hücrelerinde bugüne kadar floresan mikroskopisine ve kaspaz enzim aktivitesi tayinine dayalı hiçbir çalışma yürütülmemiştir.

Bu çalışmada  $\alpha$ -TOS’un apoptoz indükleyici etkisi, sıçan C6 glioma hücrelerinde araştırıldı. Hücrelere farklı inkübasyon süreleri (24, 32, 40 ve 48 saat) boyunca  $\alpha$ -TOS’un 5 farklı konsantrasyonu (10, 30, 50, 70 ve 100  $\mu$ M) uygulandı. Hücrelerde apoptozla ilişkili morfolojik değişimler Hoechst boyaması ile floresan mikroskopunda incelendi ve mikroskopik canlı video kaydı ile görüntülendi. Hücre ölümü, apoptozun kilit (son) enzimi kaspaz-3’ün aktivitesi ölçülerek moleküler düzeyde doğrulandı. Bu analizlere ek olarak, hücrelerde mitokondriyal apoptotik yolağın göstergesi olan kaspaz-9 aktivitesi ölçüldü.

10 ve 30  $\mu$ M  $\alpha$ -TOS uygulamalarının denenen hiçbir inkübasyon süresinde apoptozu indüklediği gösterildi. Denenen dozlar içinde 50, 70 ve 100  $\mu$ M  $\alpha$ -TOS’un 40 ve 48 saatlik uygulamalarda, hücreleri apoptoza götürdüğü belirlendi. Bunun yanı sıra 48 saat süreyle 50  $\mu$ M  $\alpha$ -TOS uygulanmış hücrelerde meydana gelen apoptoz, mikroskopik canlı video kaydı ile elde edilmiş gerçek zamanlı görüntülerle izlendi.

Kaspaz-3 aktivitesi 100  $\mu$ M-32 saat, 50  $\mu$ M-40 saat, 70  $\mu$ M-40 saat, 100  $\mu$ M-40 saat, 50  $\mu$ M-48 saat, 70  $\mu$ M-48 saat ve 100  $\mu$ M-48 saatlik örneklerde kontrolün, sırasıyla 8.5, 5, 6.6, 4, 3.15, 4.65, 1.13 katı olarak belirlendi. Kaspaz-9 aktivitesi, 100  $\mu$ M-32 saat, 50  $\mu$ M-40 saat, 70  $\mu$ M-40 saat, 100  $\mu$ M-40 saat, 50  $\mu$ M-48 saat, 70  $\mu$ M-48 saat ve 100  $\mu$ M-48 saatlik örneklerde kontrolün, sırasıyla 1.18, 1.10, 2.09, 5.62, 1.67, 7.23 ve 12.63 katı olarak belirlendi.

Sonuç olarak,  $\alpha$ -TOS'un sıçan C6 glioma hücrelerinde doza ve zamana bağılı olarak apoptozu indüklediği ve mitokondriyal apoptotik yolağın göstergesi kaspaz-9 enzimini aktive ettiği ortaya konuldu.

## **SUMMARY**

### **APOPTOSIS INDUCING EFFECT OF VITAMIN E ON RAT C6 GLIOMA CELLS**

Several vitamin E analogues and derivatives are used in adjuvant cancer therapy. In addition to antioxidant activity, anti-carcinogenic effect of vitamin E is reported. It is suggested that it shows anti-carcinogenic effect by inducing apoptosis and/or inhibiting proliferation.

Apoptosis, which is defined as “programmed cell death”, has become an important research area in recent years. Particularly, the understanding of cancer cells’ inducibility to apoptosis by various drugs and agents is very important for developing new methods related to cancer therapy. Thus, apoptosis inducing effect of vitamin E on cancer cells is quite important. Apoptosis inducing effect of alpha-tocopherol succinate ( $\alpha$ -TOS), a derivative of vitamin E, has been investigated on several cancer cells, such as colon, gastric, liver and breast cancer cells, but no study has been performed on glioma cells, so far.

In this study, the apoptosis inducing effect of  $\alpha$ -TOS on C6 rat glioma cells was investigated. The cells were treated with 5 different concentrations (10, 30, 50, 70 and 100  $\mu$ M) of  $\alpha$ -TOS for different (24, 32, 40 and 48 hours) incubation periods. Morphological changes related to apoptosis in the cells were detected with Hoechst staining in fluorescence microscopy and monitored by live cell imaging. Cell death was verified on molecular basis by measuring caspase-3, key enzyme of apoptosis, activity. In addition to these analyses, caspase-9 activity as a marker of intrinsic apoptotic pathway in the cells was measured.

It has been shown that 10 and 30  $\mu$ M  $\alpha$ -TOS did not show any apoptotic effect for non of tested incubation periods. Apoptosis was detected in the cells, which treated with 50, 70 and 100  $\mu$ M  $\alpha$ -TOS for 40 hours and 48 hours. In addition, apoptosis in the cells, which treated with 50  $\mu$ M  $\alpha$ -TOS for 48 hours was shown on the real-time images recorded with live cell imaging.

Caspase-3 activity was 8.5, 5, 6.6, 4, 3.15, 4.65 and 1.13 fold of control in the 100  $\mu$ M-32 h, 50  $\mu$ M-40 h, 70  $\mu$ M-40 h, 100  $\mu$ M-40 h, 50  $\mu$ M-48 h, 70  $\mu$ M-48 h and 100  $\mu$ M-48 h samples, respectively. Caspase-9 activity was 1.18, 1.10, 2.09, 5.62, 1.67, 7.23 and 12.63 fold of control in the 100  $\mu$ M-32 h, 50  $\mu$ M-40 h, 70  $\mu$ M-40 h, 100  $\mu$ M-40 h, 50  $\mu$ M-48 h, 70  $\mu$ M-48 h and 100  $\mu$ M-48 h samples, respectively.

In conclusion  $\alpha$ -TOS was found to induce apoptosis in a dose- and time-dependent manner in C6 glioma cells and activate caspase-9 enzyme, a marker of mitochondrial apoptotic pathway.

## 1. GİRİŞ

Çok hücreli organizmaların sağlıklı bir şekilde varlıklarını sürdürebilmeleri hücrelerinin yapı ve fonksiyonlarına bağlı olduğu kadar, dokularındaki hücre sayısının belli bir düzeyde bulunmasına da bağlıdır. Bu nedenle organizmalarda hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin sürekli korunması gerekir. İşte bu dengenin kurulmasında “apoptoz” adı verilen hücre ölümü büyük önem taşır. Apoptoz; kendine özgü morfolojik özelliklere sahip, genetik olarak düzenlenen, programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Apoptoz doku homeostazisinin sağlanmasında, embriyonik gelişimde, tümörojenik veya virüsle enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasında fonksiyoneldir (Zhang ve diğ., 2004).

Apoptoz sırasında hücrede birçok karakteristik morfolojik değişim meydana gelir. Öncelikle hücre, komşu hücrelerle ve tutunduğu yüzeyle olan temasını kaybeder ve büzülür. Kromatin kondensasyonu ve nüklear fragmentasyon meydana gelir. Hücre membranında membran tomurcuklanması (“blebbing”) olur. Tomurcukların ayrılmasıyla da “apoptotik cisimcikler” adı verilen, hücresel organelleri ve nüklear fragmentleri içeren, hücre membranıyla çevrili yapılar oluşur. Bu apoptotik cisimcikler daha sonra çevre hücreler tarafından fagositozla ortadan kaldırılır (Ziegler ve Groscurth, 2004).

Apoptoz, iki temel yolak üzerinden indüklenir. Bunlardan biri, ölüm reseptörleri adı verilen hücre yüzey reseptörlerinin fonksiyonel olduğu dışsal apoptotik yolak, diğer adıyla ölüm reseptörleri yolağıdır. Diğer ise, mitokondrinin fonksiyonel olduğu içsel apoptotik yolak, diğer bir deyişle mitokondriyal yolaktır. Bunların yanı sıra sitotoksik T lenfositlerinin etkili olduğu perforin/granzim indüklü bir apoptotik yolak da mevcuttur (Elmore, 2007). Apoptotik süreçte anahtar rol oynayan moleküller kaspazlardır. Kaspazlar sistein proteazlardır ve apoptozun başlangıcından bitişine kadar her kademesinde görev alırlar. Kaspazlar hücresel substratların yıkımından sorumludurlar ve dolayısıyla apoptoz sırasında morfolojik değişimlere yol açarlar (Slee ve diğ., 2001).

Apoptoz mekanizmasındaki düzensizlikler çeşitli hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. Örneğin, kanserlerin ve otoimmün hastalıkların önemli bir özelliği apoptozdaki yetersizliktir (Kerr ve diğ., 1994; Worth ve diğ., 2006). AIDS hastalığında ve nörodejeneratif hastalıklarda ise apoptoz normalden fazla oranda gerçekleşmektedir (Mattson, 2000; Roshal ve diğ., 2001).

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanan bir hastalıktır. Hücre ölümündeki düşüş ve hücre proliferasyonundaki artışın karsinogenez sürecinde etkili olduğu bilinmektedir (King ve Cidlowski,1998). Kansere yönelik bütün tedavi stratejileri kanser hücrelerini ortadan kaldırmayı ve malignant dokuların büyümesini engellemeyi amaçlamaktadır. Son yıllarda apoptozun moleküler mekanizmasıyla ilgili edinilen bilgiler ve kanser oluşumunda baskılanmış apoptozun etkili olduğunun bulunması, kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen yeni tedavi ajanlarının ve yöntemlerinin araştırılmasına neden olmuştur. Apoptotik yollardaki molekülleri hedef alarak kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen ve klinik araştırmalarla faz çalışmaları süren birçok terapötik ajan geliştirilmiştir. (Ghobrial ve diğ., 2005).

Son yıllarda kanser araştırmalarında önem kazanan bir diğer konu ise, kansere karşı kimyasal koruyuculuk (“cancer chemoprevention”)’tur. Bu yaklaşım, pre-malignant hücrelerin malignant hücrelere dönüşmeden önce, çeşitli doğal veya sentetik ajanlar kullanılarak ortadan kaldırılmasını (karsinogenez sürecini önlemeyi) amaçlar (Sun ve diğ., 2004). Yapılan araştırmalar bazı karsinogenez-önleyici ajanların, transforme hücrelerde apoptozu indükleyerek etkili olduklarını göstermiştir. Örneğin, prostat kanserli farelere yeşil çay ekstraktları uygulandığında, prostat kanseri gelişiminde belirgin bir inhibisyon ve prostat kanseri hücrelerinde apoptoz indüksiyonu gözlenmiştir (Sun ve diğ., 2004).

Bütün bunlar göstermektedir ki, apoptoz hem pre-malignant hücrelerin malignant hücrelere dönüşmesinin engellenmesinde, hem de malignant hücrelerin yok edilmesinde önemli bir hedeftir.

Kanserden korunmada antioksidanların önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Ayrıca antioksidanlar, kanser tedavisi sırasında da tedavinin toksik etkilerini azaltmak ve



tedavinin etkinliğini arttırmak amacıyla kullanılabilirler (Borek, 2004). Kanser tedavisinde destekleyici ajan olarak kullanılan antioksidanlardan biri de E vitamindir. E vitamini yağda çözünen bir vitamindir. Lipid peroksidasyonunu ve serbest radikal oluşturan diğer reaksiyonları önler (Brigelius-Flohé ve Traber, 1999). E vitaminin çeşitli kanser hücreleri üzerinde doza ve uygulama süresine bağlı olarak anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Sakai ve diğ., 2006; Campbell ve diğ., 2006; Yu ve diğ., 2008).

Beyin tümörleri, insanlarda ölüme neden olan hastalıkların önemli bir grubunu oluşturur. Beyin tümörlerinin %70'inden fazlası glial hücrelerden türelenen gliomalardır (Ohgaki ve Kleihues, 2005). Gliomaların en malignant formu glioblastoma multiform (GBM)'dur. GBM tedavisinde uygulanan yöntemler cerrahi girişim, radyoterapi ve kemoterapidir. Ancak bu yöntemler hastalarda iyileşme sağlayamamaktadır ve tedavi sonrasındaki yaşam süresi 5 yılı geçmemektedir (Holland, 2000; Ohgaki ve Kleihues, 2005; Brandes ve diğ., 2008).

Farklı E vitamini formlarının sıçan glioma hücreleri üzerinde anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkiler gösterdiği bilinmektedir (Betti ve diğ., 2006). E vitaminin süksinil içeren ve araştırmalarda en çok kullanılan formu olan  $\alpha$ -tokoferol süksinatın, araştırma grubumuz tarafından yürütülen çalışmalarda indometasin uygulanmış sıçan C6 glioma hücrelerinde DNA hasarını indirgeyici etki gösterdiği bulunmuştur (Pekmez, 2010).

Bu tezin temel hedefi,  $\alpha$ -TOS'un glioma hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini ileri görüntüleme ve analiz yöntemleri kullanarak moleküler düzeyde araştırmaktır. Çalışmalar glioblastoma multiform hücreleriyle benzerlik gösteren ve model sistem özelliği taşıyan sıçan C6 glioma hücre hattı ile yürütülmüştür (Grobben ve diğ., 2002). Çalışmalar kapsamında C6 glioma hücrelerine farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde  $\alpha$ -TOS uygulanmıştır. Uygulamaların apoptoz üzerindeki etkisini belirlemek için, apoptoza özgü morfolojik değişimler floresan mikroskopta izlenmiş ve kaspaz enzim aktiviteleri florometrik yöntemlerle belirlenmiştir.

Tezde elde edilen verilerin  $\alpha$ -TOS'un, glioma hücrelerinde apoptoza yol açıp açmadığını ayrıntılı bir şekilde ortaya koyması, eğer açıyorsa apoptoz mekanizması

hakkında bilgi sağlanması ve pro-apoptotik etkiye sahip E vitamini formları arasında  $\alpha$ -TOS'un yerine ilişkin mevcut literatüre katkıda bulunması beklenmektedir.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. APOPTOZ

Çok hücreli organizmalarda, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında daima bir denge vardır. Bu denge organizmanın gelişimi ve doku homeostazisinin sağlanması açısından büyük önem taşır. Bu dengenin bozulması embriyogenez sürecinde hatalara yol açar, ayrıca dejeneratif hastalıkların ve kanserin gelişiminde rol oynar (Danial ve Korsmeyer, 2004). Yaşam süresince dokulardaki hücre sayısı apoptoz sayesinde dengede tutulur. Apoptoz genetik olarak düzenlenen, enerjiye (ATP'ye) bağımlılık gösteren fizyolojik hücre ölümüdür. Apoptoz ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında tanımlanmıştır (Kerr ve diğ., 1972). Daha sonra, bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ın gelişim sürecindeki programlanmış hücre ölümünün incelenmesi sonucunda apoptozun genetik mekanizmasıyla ilgili bilgiler elde edilmiştir (Horvitz, 1999).

Apoptoz embriyogenez sürecinde, dokulardaki hücre sayısının dengede tutulmasında, hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında, doku-organ involüsyonu ve artrofisinde, bağışıklık sisteminin gelişiminde ve dengede tutulmasında fonksiyoneldir (Kerr ve diğ., 1972; Brill ve diğ., 1999; Opferman,2008).

Apoptoz çeşitli patolojik süreçlerde de rol oynar. Bazı hastalıklar apoptozdaki yetersizlikten kaynaklanırken, bazıları ise apoptozun aşırı gerçekleşmesine bağlı olarak gelişir (Elmore, 2007). Örneğin, kanserlerin ve otoimmün lenfoproliferatif sendromunun ("Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome", ALPS) önemli bir nedeni apoptozdaki yetersizliktir (Kerr ve diğ., 1994; Worth ve diğ., 2006). AIDS hastalığında ve nörodejeneratif hastalıklar olan Alzheimer, Parkinson, Huntington ve amiyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalıklarında ise normalden fazla gerçekleşen apoptoz önemli rol oynamaktadır (Roshal ve diğ., 2001; Mattson, 2000; Singh ve Dikshit, 2007).

Apoptoz ile diğerk bir hücre ölümü tipi olan nekroz arasında önemli farklar vardır (Tablo 2.1.) (Elmore, 2007).

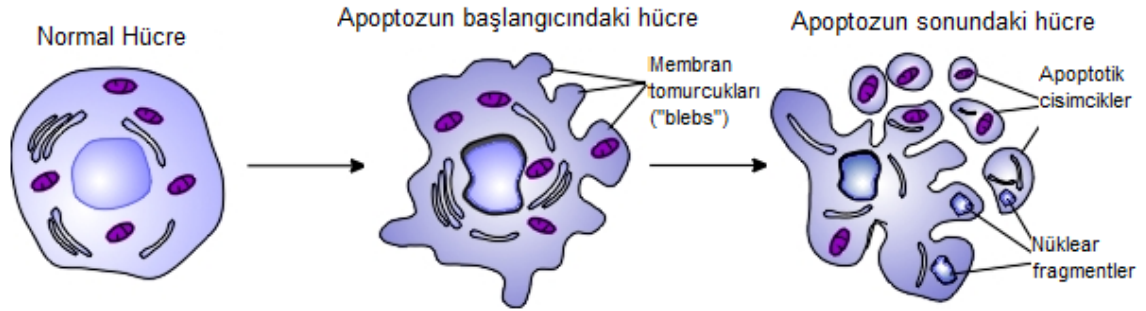
**Tablo 2.1.** Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar

<b>Apoptoz</b>	<b>Nekroz</b>
Enerjiye (ATP'ye) ihtiyaç duyan aktif bir süreçtir.	Enerjiye ihtiyaç yoktur.
Tek bir hücreyi veya hücre grubunu etkiler.	Geniş bir alandaki bütün hücreleri etkiler.
Hem fizyolojik hem patolojik durumlarda görülür.	Sadece patolojik durumlarda görülür.
Karakteristik morfolojik değişimler meydana gelir.	Morfolojik değişimler rastgeledir.
Hücre büzülmesi meydana gelir.	Hücrenin hacmi artar.
Hücre membranı apoptoz süresince bütünlüğünü korur.	Hücre membranı patlar ve sitoplazmik içerik hücre dışına yayılır.
Sitoplazmik içerik hücre dışına çıkmadığı için çevre dokularında inflamasyon yanıtı oluşmaz.	Sitoplazmik içerik hücre dışına çıktığı için çevre dokularında inflamasyon yanıtı oluşur.

Apoptoz, çeşitli eksojen ve endojen indükleyiciler tarafından tetiklenebilir. Oksidanlar, iyonlaştırıcı radyasyon, kemoterapötik ajanlar, hipertermi, büyüme faktörü veya hormon eksikliği, glukokortikoidler, sitokinler, öldürücü hücreler ("killer cells"), çeşitli kimyasallar ve viral ajanlar başlıca apoptoz indükleyicileridir (Majno ve Joris, 1995; Matés ve Sánchez-Jiménez, 2000).

Apoptoza giden bir hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişimler meydana gelir. İlk önce, apoptoza giden hücrenin tutunduğu yüzeyle arasındaki adezyon ortadan kalkar ve hücre yuvarlaklaşır. Aynı zamanda apoptotik hücrenin komşu hücrelerle olan teması da ortadan kalkar. Apoptoza giden hücrenin hacminde azalma olur ve hücre büzülmesi meydana gelir. Kromatin nüklear membrana yaklaşır ve yoğunlaşır. DNA, nükleozomlar arası bölgelerinden kesilerek 180-200 baz çifti büyüklüğündeki internükleozomal fragmentlere ayrılır. Hücre membranında kabarcık şeklinde girintili-çıkıntılı yapıların ("bleb") oluşmasıyla, membran tomurcuklanması ("membran

blebbing”) meydana gelir. Son olarak apoptotik hücre; apoptotik cisimcik (“apoptotic body”) adı verilen, membranla çevrili, içinde sitoplazmayı, hücresel organelleri ve nükleus fragmentlerini içeren küçük parçalara ayrılır (Şekil 2.1.) (Willingham, 1999; Saraste ve Pulkki, 2000). Apoptotik cisimcikler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi aktif fagositler ve çevrelerindeki hücreler tarafından ortadan kaldırılır (Marek ve Erwig, 2009). Apoptoz sırasında hücre, membranındaki fosfolipid asimetrisini kaybeder. Normalde hücre membranının sitozolik tarafında bulunan fosfotidilserin (PS), apoptoz sırasında membranın hücre dışına bakan tarafına geçer. Apoptotik cisimciklerin fagositler tarafından tanınmasında bu fosfotidilserin translokasyonu önemli rol oynar (Erwig ve Henson, 2008; Savill ve Fadok, 2000).



Şekil 2.1. Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen morfolojik değişimler.  
(<http://www.utm.utoronto.ca/~w3cellan/apoptosis.html>)

### 2.1.1. Kaspazlar

Kaspazlar, apoptoz sürecinin başlatılmasından sonlandırılmasına kadar her basamağında anahtar rol oynayan sistein proteazlardır. Bu proteazlar, substrat kesiminde nükleofilik grup olarak sisteini kullanmaları ve substratlarını kestikleri bölgelerde aspartik asite spesifiklik göstermeleri nedeniyle “sistein-bağımlı aspartat spesifik proteazlar” (Cysteine-dependent Aspartate-Specific Proteases”, CASPASES) olarak adlandırılırlar (Thornberry ve Lazebnik, 1998; Chang ve Yang, 2000).

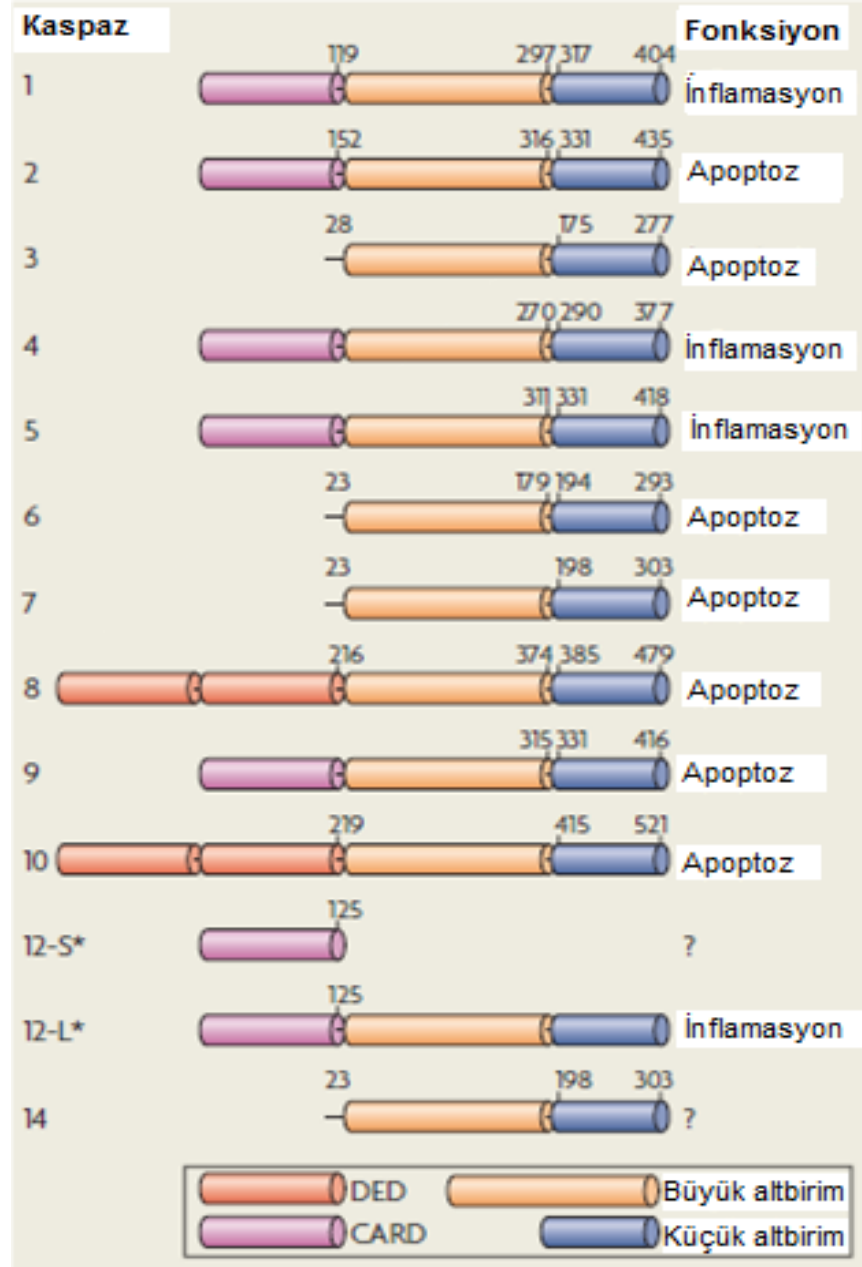
Kaspazların keşfi sürecindeki ilk çalışmalar, 1992 yılında interlökin-1 $\beta$ -dönüştürücü enzimin (“interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme”, ICE) bulunması (bu enzim daha sonra “kaspaz-1” olarak adlandırılmıştır) ve sonrasında *C.elegans*'taki programlanmış hücre ölümünde görevli *ced-3* geninin tanımlanarak, ICE ile olan benzerliğinin ortaya

konulması ile sonuçlanmıştır. Bu çalışmalar, hücre ölümünde görevli, katalitik açıdan aspartik asit spesifikliğı gösteren başka sistein proteazların olup olmadığı yönündeki araştırmalara hız kazandırmıştır (Riedl ve Scott, 2009).

Memelilerde tanımlanmış olan 14 farklı kaspaz vardır. Bunların 11 tanesi insanlarda bulunan kaspazlardır ve bunlardan 7 tanesi apoptozda görevlidir. Apoptotik kaspazlar, başlatıcı (“initiator”) kaspazlar ve sonlandırıcı (“executioner”) kaspazlar olarak iki gruba ayrılır. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) apoptozun başlatılmasından, sonlandırıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) ise apoptotik sürecin sonlandırılmasından sorumludur. Kaspaz-1 (ICE), kaspaz-4 ve -5 inflamatuvar kaspazlardır ve inflamasyon yanıtının oluşumundan sorumludurlar (Riedl ve Scott, 2009; Shi, 2009).

Bütün kaspazlar hücrelerde katalitik olarak inaktif olan zimojenler (prokaspazlar) olarak sentezlenirler ve apoptoz sırasında proteolitik kesimlerle aktif kaspazlara dönüşürler. Kaspazların genel yapısına bakıldığında, bütün prokaspazların, yüksek homoloji gösteren bir “proteaz domeni” (“protease domain”) içerdiği görülür. Bu proteaz domeninin biri “büyük altbirim” (yaklaşık 20 kDa’luk) (p20) ve diğeri “küçük altbirim” (yaklaşık 10 kDa’luk) (p10) olmak üzere 2 altbirimi vardır. Bazı prokaspazlarda, büyük ve küçük altbirimler arasında yaklaşık 10 amino asitlik bir “kısa bağlayıcı bölge” (“short linker”) bulunmaktadır. Ayrıca her prokaspaz, bir öncül domen (“prodomain”) de içermektedir.

Başlatıcı apoptotik kaspazların ve inflamatuvar kaspazların öncül domeni 100’den fazla amino asit içerirken, sonlandırıcı apoptotik kaspazların öncül domenindeki amino asit sayısı 30’dan azdır. Uzun öncül domenler “ölüm etkili domen” (“Death Effector Domain”, DED) ve “kaspaz bağlayıcı domen” (“Caspase Recruitment Domain”, CARD) gibi farklı motifler içerirler. Prokaspaz-8 ve -10’da DED, prokaspaz-1, -2, -4, -5 ve -9’da CARD bulunmaktadır (Şekil 2.2) (Chang ve Yang, 2000).



\*12-S: katalitik olarak inaktif olan kaspaz-12 proteini (caspase-12S\*).

\*12-L: tam-boy (full-length) kaspaz-12 (caspase-12L\*).

**Şekil 2.2.** Kaspazların yapısı (Taylor ve diğ., 2008).

Kaspaz-3 ve -7 gibi sonlandırıcı kaspazların aktivasyonu, bir başlatıcı kaspaz tarafından gerçekleştirilir. Aktifleşme sırasında, başlatıcı kaspaz tarafından kesilen sonlandırıcı kaspazın, büyük ve küçük altbirimleri birbirinden ayrılır. Başlatıcı kaspazlar ise apoptotik koşullar altında, kaspaz adaptörleri ile interaksiyona girerek aktifleşirler (Shi, 2009; Chang ve Yang, 2000).

## 2.1.2. Apoptozun Moleküler Mekanizması

### 2.1.2.1. Dış Yolak (Ölüm Reseptörleri Yolağı)

Dış yolak, “ölüm reseptörleri” adı verilen hücre yüzey reseptörlerine spesifik ölüm ligandlarının (“death ligand”) bağlanması sonucu aktifleşir. Ölüm reseptörleri, Tümör Nekroz Faktör / Sinir Büyüme Faktörü (“Tumor Necrosis Factor / Nerve Growth Factor”, TNF / NGF) reseptör süperalesine ait olan hücre yüzey sitokin reseptörleridirler. Bilinen 6 tane ölüm reseptörü vardır. Bunlar Fas (CD95 veya Apo1), TNF-R1 (p55 veya CD120a), ölüm reseptörü 3 (“death receptor 3”, DR3 veya Apo3), ölüm reseptörü 4 (“death receptor 4”, DR4 veya TRAIL-R1), ölüm reseptörü 5 (“death receptor 5”, DR5 veya TRAIL-R2) ve ölüm reseptörü 6 (“death receptor 6”, DR6)’dır (Guicciardi ve Gores, 2009).

Bu ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar, TNF süper gen ailesine ait tamamlayıcı sitokinlerdir. Fas ligandı (FasL), Fas reseptörüne; TNF ve lenfotoksin  $\alpha$ , TNF-R1 reseptörüne; Apo3 ligandı, DR3 reseptörüne; TRAIL’ler ise DR4 ve DR5 reseptörlerine bağlanır (Ashkenazi ve Dixit, 1998; Guicciardi ve Gores, 2009).

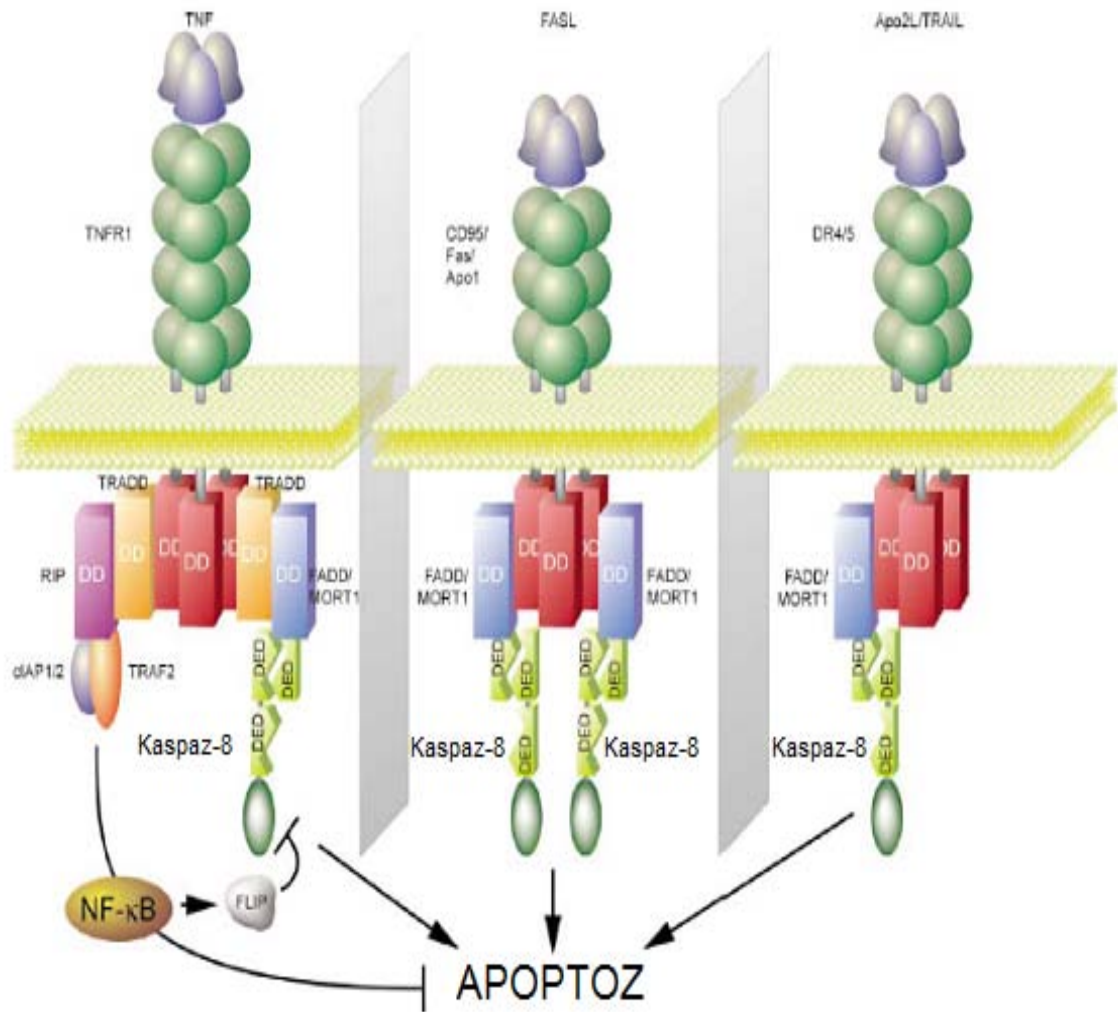
Ölüm reseptörleri, sistince zengin hücre dışı bir bölge ile “ölüm domeni” (“death domain”, DD) adı verilen sitoplazmik bir bölgeye sahiptirler. Ölüm domeni, ölüm reseptörünün ölüm sinyalini iletmesinde görevlidir (Guicciardi ve Gores, 2009).

Apoptozun dış yolak ile indüklenmesi sürecinde; ligand bağlanması sonucu aktifleşen ölüm reseptörü, bir adaptör protein olan “Fas ilişkili ölüm domeni”ni (“Fas-Associated Death Domain”, FADD) kendisine bağlar. FADD; biri “ölüm domeni” (“death domain”, DD), diğeri ise “ölüm etkili domen” (“death effector domain”, DED) olmak üzere 2 tane protein etkileşim bölgesinden oluşmaktadır. FADD, kendisinde ve ölüm reseptöründe bulunan ölüm domenleri arasındaki etkileşimler sonucu ölüm reseptörüne bağlanır. FADD, ölüm reseptörüne Fas-sinyal yolağında olduğu gibi doğrudan da bağlanabilir, TNF-R1 - sinyal yolağında olduğu gibi bir diğer adaptör olan TNF Reseptör İlişkili Ölüm Domeni (“TNF Receptor-Associated Death Domain”, TRADD) aracılığıyla da bağlanabilir (Thorburn, 2004). FADD’ın prokaspaz-8’e bağlanması ise DED aracılığıyla olur. FADD, kendisinde ve prokaspaz-8’de bulunan DED’ler arasındaki etkileşimler sonucu prokaspaz-8’e bağlanır. FADD’ın ölüm reseptörüne ve prokaspaz-



8'e bağlanması sonucu, reseptörde "ölüm uyarıcı kompleks" ("Death Inducing Complex", DISC) adı verilen bir kompleks oluşur (Thorburn, 2004). DISC'teki prokaspaz-8, otokatalizle aktifleşir ve aktif kaspaz-8'e dönüşür. Aktif kaspaz-8 de, kaspaz-3 ve -7 gibi sonlandırıcı kaspazları aktifleştirir. Aktifleşen bu kaspazlar da hücrel substratları yıkarak, apoptotik hücrede görülen morfolojik ve biyokimyasal değişimleri meydana getirirler.

Dış yolak ile apoptoz indüksiyonu Şekil 2.3'te özetlenmiştir.



**Şekil 2.3.** Şematik gösterimle dış yolak (ölüm reseptörleri yolağı).  
(Danial ve Korsmeyer, 2004)

### 2.1.2.2. İç Yolak (Mitokondriyal Yolak)

Apoptoz indüksiyonunda geçerli bir diğer yolak, mitokondrinin anahtar rol oynadığı iç yolak, kısaca mitokondriyal yolaktır. DNA hasarı, büyüme faktörlerinin ve hormonların yokluğu, radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, serbest radikaller ve viral enfeksiyonlar mitokondriyal yolaktan apoptozu indükleyen tetikleyicilerdir ve bu tetikleyiciler reseptör-aracılı değildirler (Elmore, 2007).

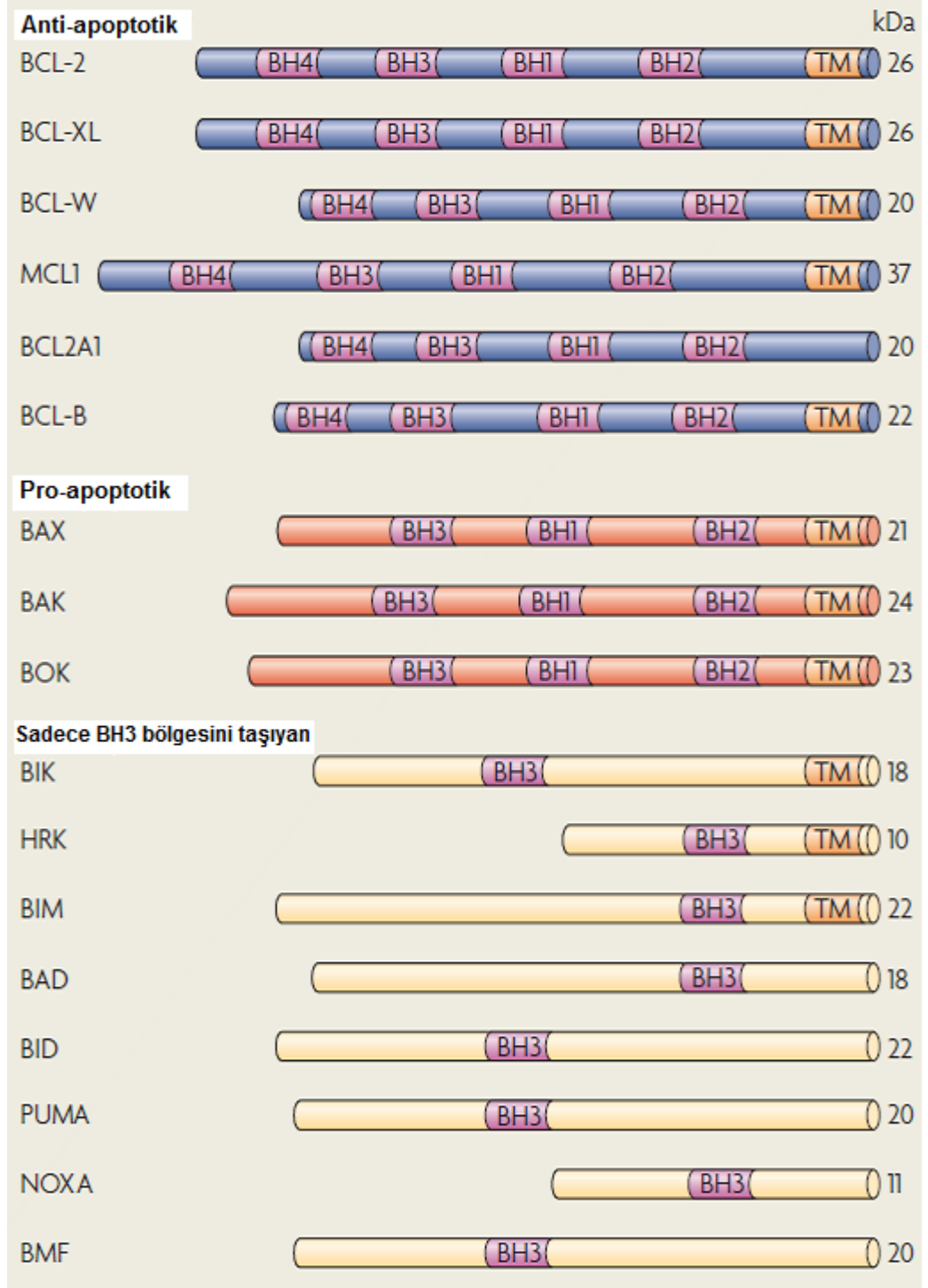
Mitokondriyal apoptotik yolağın işleyişi, Bcl-2 protein ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir (Cory ve Adams, 2002).

*Bcl-2* (“ $\beta$ -cell lymphoma-2”) gen ailesinin üyesi olan *Bcl-2* geni,  $\beta$ -hücreli foliküler lenfomada t(14;18) kromozom translokasyon bölgesinde tanımlanmış bir gendir (Youle ve Strasser, 2008). Memelilerde tanımlanmış en az 20 tane Bcl-2 proteini vardır ve bunlar en az bir ortak korunmuş “Bcl-2 homoloji” (BH) bölgesine sahiptirler (Cory ve Adams, 2002).

Bcl-2 protein ailesi üyeleri, BH bölgelerine ve fonksiyonlarına göre 3 farklı gruba ayrılır. Apoptozu engelleyici anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, A1, Mcl-1 proteinleri, 4 farklı BH bölgesine (BH1- BH4) sahiptirler. Apoptozu indükleyici pro-apoptotik proteinler de kendi içinde 2 gruba ayrılır. Birinci grup “pro-apoptotik Bax/Bak ailesi” proteinleridir ve üyeleri Bax ile Bak’tır. Bunlar BH1, BH2 ve BH3 homoloji bölgelerini taşırlar. Pro-apoptotik proteinlerin ikinci grubunda yer alan Bad, Bid, Bim, NOXA ve PUMA gibi proteinler ise sadece BH3 bölgesine sahiptirler ve bundan dolayı “sadece BH3” (“BH3-only”) proteinler olarak da adlandırılırlar (Cory ve Adams, 2002; Youle ve Strasser, 2008; Jeong ve Seol, 2008).

Bcl-2 protein ailesinin üyeleri, apoptozu mitokondriyal yolak üzerinden düzenlerler. Bad, Bid, Bim gibi “sadece BH3” taşıyan moleküller periferal ölüm sinyallerini almakla görevlidirler ve Bax, Bak gibi apoptozu indükleyici molekülleri aktifleştirirler. Aktifleşen Bax ve Bak proteinleri ise mitokondriyal apoptotik yolağı başlatırlar (Ding ve Yin, 2009).

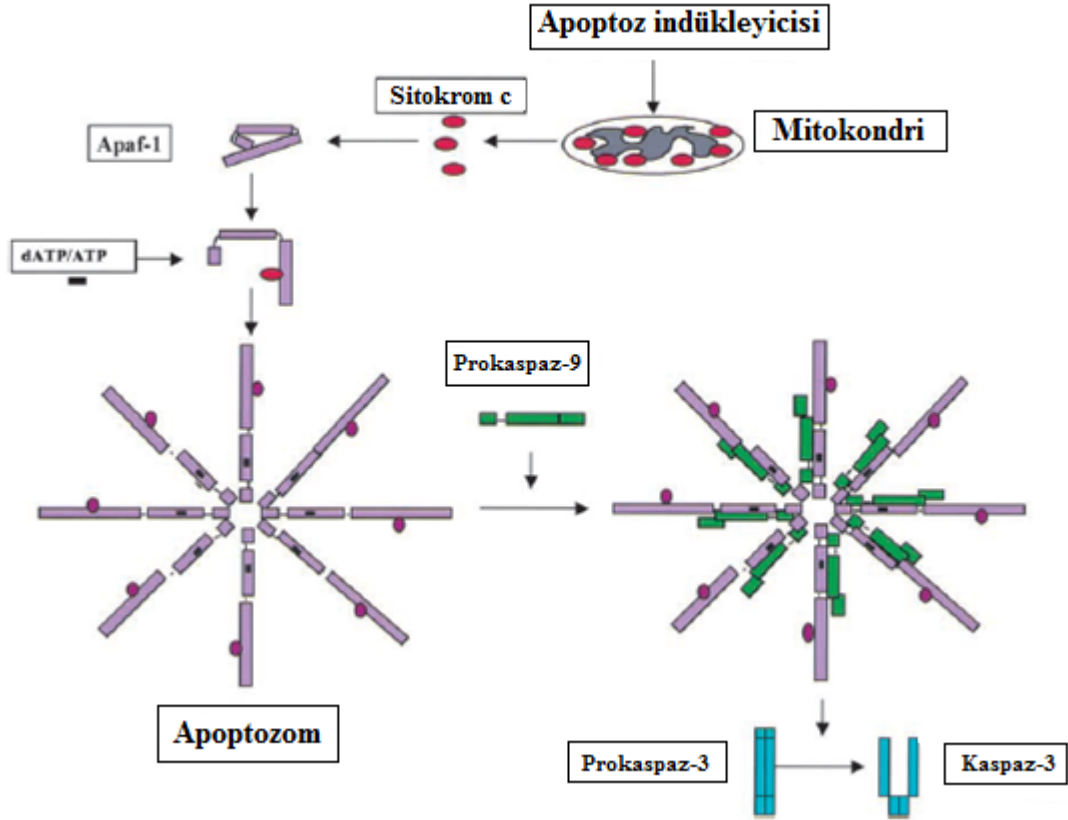
Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeleri ve bu üyelerin yapıları Şekil 2.4'te toplu olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Bcl-2 ailesine ait anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler (Taylor ve diğ.,2008).

Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik üyeleri olan Bax ve Bak, mitokondriyi etkileyerek içsel apoptotik yolağı düzenlerler. Canlı hücrelerde, Bax ve Bak monomer olarak bulunurlar. Bir ölüm sinyali alındığında, normalde sitozolde bulunan Bax mitokondriye gider, mitokondrinin dış membranına entegre olur ve orada oligomerleşir. Normalde mitokondride bulunan inaktif Bak da oligomerize olur ve aktifleşir. Tüm bunların sonucunda mitokondrinin dış membran geçirgenliğinde değişiklikler meydana gelir. Mitokondrinin membranlar arası bölgesindeki (“intermembran space”, IMS) apoptojenik proteinler dışarı salınır (Campello ve Scorrano, 2009). Mitokondriyal apoptotik yolakta en temel iki olay, mitokondrinin membran geçirgenliğinin bozulması ve apoptojenik proteinlerin mitokondriden sitozole salınmasıdır. Mitokondriden sitozole salınan bu pro-apoptotik proteinlerin en önemlileri sitokrom c, Smac/DIABLO (“second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI”), apoptoz indükleyici faktör (“apoptosis inducing factor”, AIF) ve endonükleaz G’dir (Wang, 2001).

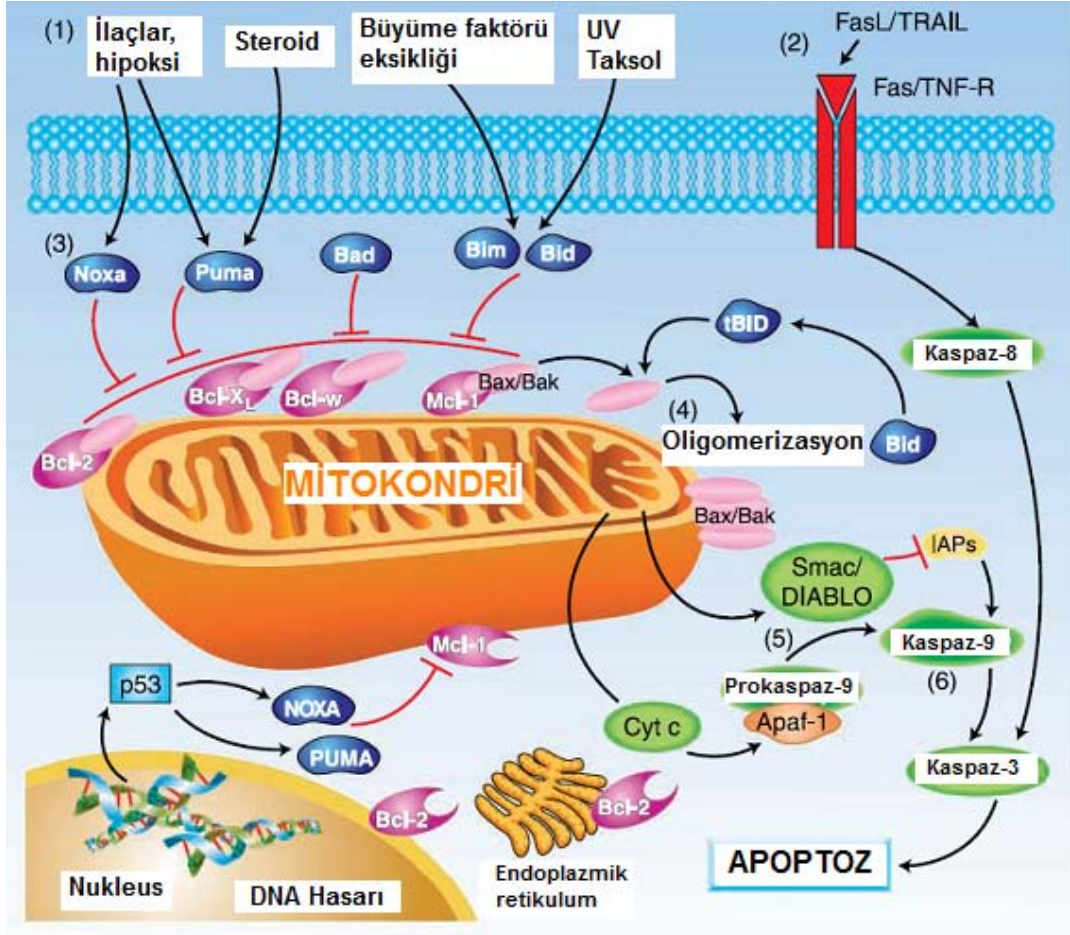
Sitozole salınan sitokrom c, sitozolik bir protein olan APAF-1 (“apoptosis protease-activator factor 1”)’e bağlanır ve böylece APAF-1’de konformasyonel bir değişim meydana gelir. Bu konformasyonel değişim dATP/ATP’nin bağlanmasını kolaylaştırır. Sitokrom c - APAF-1 kompleksine dATP/ATP’nin bağlanması ile “apoptozom” adı verilen bir kompleks oluşur. Prokaspaz-9 molekülleri, apoptozoma bağlanarak aktifleşir ve aktif kaspaz-9’a dönüşürler. Aktif kaspaz-9 enzimi de, kaspaz-3 gibi sonlandırıcı kaspazları aktifleştirir (Şekil 2.5) (Wang, 2001).



**Şekil 2.5.** Sitokrom c salınımı, apoptozom oluşumu ve kaspaz-9 aktivasyonu (Wang, 2001).

Sitokrom c dışındaki diğer pro-apoptotik proteinlerin de apoptoz sürecinde önemli görevleri vardır. AIF ve endonükleaz G, kaspaz aktivitesinden bağımsız olarak çalışırlar (Wang, 2001). AIF, mitokondriden salındıktan sonra nukleusa giderek DNA'yı yaklaşık 50 kb büyüklüğündeki parçalara ayırır ve periferel nuklear kromatin kondensasyonunu meydana getirir (Loo ve diğ., 2002). Endonükleaz G de mitokondriden salındıktan sonra nukleusa gider ve DNA'yı oligonükleozomal parçalara fragmente eder (Li ve diğ., 2001). Apoptotik DNA fragmentasyonundan sorumlu olan diğer bir molekül ise kaspazla aktifleşen DNaz ("caspase-activated DNase", CAD)'dır. Normalde CAD hücrede kendi inhibitörü ICAD ("inhibitor of caspase-activated DNase") ile birlikte inaktif bir kompleks şeklinde bulunur. Apoptoz sürecinde kaspaz-3, ICAD'ı kırar ve CAD serbest kalır. Serbest kalan CAD nukleusa giderek, oligonükleozomal DNA fragmentasyonunu ve ileri kromatin kondensasyonunu meydana getirir (Enari ve diğ., 1998; Sakahira ve diğ., 1998).

Apoptozun içsel yolak ile indüksiyonu, bütün aşamalarıyla Şekil 2.6'da özetlenmiştir.



Şekil 2.6. İçsel (mitokondriyal) apoptotik yolak (Kang ve Reynolds, 2009).

### 2.1.2.3. Perforin / Granzim İndüklü Apoptoz ve Kaspaz-Bağımsız Apoptotik Yolak

Sitotoksik lenfositler (CL); doğal öldürücü hücreler (“natural killer cells”, NK) ve sitotoksik T lenfositlerinden (CTL) oluşurlar ve organizmayı hücre içi patojenlere ve transforme olmuş hücelere karşı korurlar (Hoves ve diğ., 2010). Sitotoksik lenfositlerin, virüsle enfekte olmuş hüceleri veya transforme olmuş hüceleri ortadan kaldırmak için kullandıkları başlıca yolak perforin/granzim indüklü apoptozdur (Trapani ve Smyth, 2002).

Bu apoptotik yolakta ilk önce, transmembran por oluşturan bir protein olan “perforin” ile serin proteazlar olan “granzim”ler (granzim A ve B) sitoplazmik granüllerden eksositoz ile salınırlar. Granzimler, perforinler aracılığıyla hedef hücrenin içine gönderilirler ve hedef hücrede apoptozu indüklerler (Trapani ve Smyth, 2002).

Granzim B hedef hücrede apoptozu 2 farklı şekilde indükler. Birincisinde; granzim B Bid molekülünü kırar ve bu sayede sitokrom c'nin mitokondriden dışarı salınması sonucu mitokondriyal apoptotik yolak indüklenmiş olur. İkinci durumda ise granzim B, apoptozun başlangıcındaki sinyal yollarını by-pass ederek doğrudan kaspaz-3'ü aktifleştirir ve apoptozun sonlandırıcı fazını indüklemiş olur (Elmore, 2007).

Bir diğer granzim çeşidi olan granzim A ise hedef hücrede apoptozu kaspaz-bağımsız yoldan indükler. Hedef hücrede granzim A tarafından indüklenen hücre ölümünde, apoptozu özgü morfolojik değişimlerin hepsi görülür. Ancak granzim A, kaspaz aktivasyonu meydana getirmez ve kaspaz yolağı substratlarının (Bid, ICAD gibi) kırılmasını indüklemez (Lieberman ve Fan, 2003).

## 2.2. APOPTOZ VE KANSER

Kanser; hücrenin, bölünme ve ölüm mekanizmalarındaki hasarlara bağlı olarak, hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelen kontrolsüz hücre çoğalmasdır. Apoptotik yollardaki bozukluklar karsinogenezi tetikleyebilmekte, ayrıca kanser terapisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirilmesinde etkili olabilmektedirler (Kang ve Reynolds, 2009).

Genel olarak, kanser hücrelerinin apoptotik mekanizmalarında görülen hasarlar pro-apoptotik genlerin baskılanmış olması, anti-apoptotik genlerin aşırı anlatım yapması ve kaspaz genlerindeki mutasyonlardır (Ghobrial ve diğ., 2005). Hematolojik malignitelerde, *Bcl-2* gen ailesinin anti-apoptotik üyelerinin aşırı anlatım yaptığı belirlenmiştir (Reed, 2008). Çeşitli kanser hücrelerinde, kaspaz genlerinde meydana gelen mutasyonlarla ilgili yapılmış olan çalışmalarda mide kanseri hücrelerinde kaspaz-8 mutasyonları; meme kanseri MCF-7 hücre hattında, kolon kanseri, karaciğer kanseri ve multiple miyeloma hücrelerinde kaspaz-3 mutasyonları; kolon kanseri (kolon adenokarsinoma) hücrelerinde ise kaspaz-7 mutasyonları belirlenmiştir (Ghavami ve diğ., 2009). Ayrıca glioblastoma multiform hücrelerinde kaspaz-8 gen sessizleşmesi olduğu görülmüştür (Martinez ve diğ., 2007). Kanser apoptozla olan bu bağlantısı, kanser terapisinde apoptoz indüksiyonunu hedef alan stratejilerin geliştirilmesini gerektirmiştir. Apoptozun moleküler mekanizmasının aydınlatılmasıyla birlikte, bu

mekanizmada kritik öneme sahip molekülleri hedef alan kemoterapötik ajanlar geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda dışsal apoptotik yolağı (ölüm reseptörleri yolağını), içsel apoptotik yolağı (mitokondriyal yolağı), Bcl-2'yi veya kaspazların sentetik olarak aktive edilmesini hedef alan kemoterapötik ajanlar geliştirilmiştir. Bu kemoterapötik ajanlardan bazıları klinik öncesi deneme aşamasındadır, bazılarının faz çalışmaları sürmektedir, bazıları ise klinikte kullanılmaktadır (Ghobrial ve diğ., 2005; Ashkenazi, 2008).

İçsel ve dışsal apoptotik yolaklardaki molekülleri ve kaspazları hedef alan terapötik amaçla geliştirilmiş bazı ajanlar ve bunların araştırma düzeyleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.2.** Apoptotik yolaklardaki moleküller hedef alınarak geliştirilmiş terapötik ajanlar ve araştırma düzeyleri

Apoptotik yolak	Ajan	Hedef molekül	Araştırma düzeyi
Dışsal apoptotik yolak	TRAIL	DR4 ve DR5	Klinik öncesi araştırma
	DR4 ve DR5'e agonist monoklonal antikorlar	DR4 ve DR5	Faz II / III
	ATRA	PML-RAR- $\alpha$	Klinikte kullanılıyor
İçsel apoptotik yolak	Arsenik trioksit	PML-RAR- $\alpha$ Mitokondri üzerinde doğrudan etki	Klinikte kullanılıyor
	G3139 (antisens terapi)	Bcl-2	Faz II / III ve klinik denemeler
	Antisens Bcl-X <sub>L</sub> , Bax ve Bcl-X <sub>S</sub>	Bcl-X <sub>L</sub> , Bax ve Bcl-X <sub>S</sub>	Klinik öncesi araştırma
Ortak yolaklar	Kaspaz aktive edicileri, Apoptin, Survivin	Kaspazlar	Klinik öncesi araştırmalar ve klinik denemeler

İleride; apoptozun moleküler mekanizmasıyla ilgili elde edilecek yeni bilgiler, kanser tiplerinde apoptotik mekanizmalarla ilişkili bilinmeyen diğer moleküllerin tanımlanması, kanser hücrelerindeki apoptoza karşı olan direnci kırabilecek yeni doğal ve kimyasal ajanların keşfedilmesi kanser hücrelerinde apoptozu indüklemeye yönelik daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

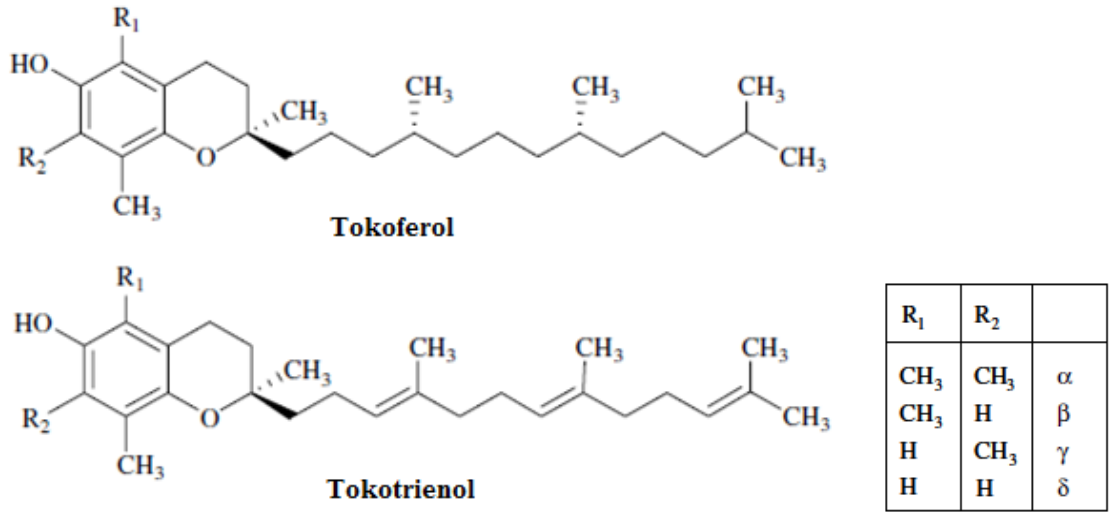


### 2.3. E VİTAMİNİ

E vitamini, 1922 yılında, sıçanlarda üreme için gerekli olan diyet faktörleri araştırılırken Evans ve Bishop tarafından keşfedilmiştir (Evans ve Bishop, 1922). Önceleri “X faktörü” olarak adlandırılan bu diyet faktörüne, 1924 yılında Sure “E vitamini” adını vermiştir (Sure, 1924). E vitamini ilk defa 1936’da izole edilmiştir. Evans ve arkadaşları buğday tohumunun yağından E vitaminin biyolojik aktivitesine sahip bir alkol izole etmişler ve buna “tokoferol” (“tocopherol”) adını vermişlerdir (Evans ve diğ., 1936).

E vitamininin doğada; 4 tanesi tokoferol, 4 tanesi de tokotrienol olmak üzere 8 farklı formu bulunmaktadır. Tokoferoller  $\alpha$ -tokoferol ( $\alpha$ -TOC),  $\beta$ -tokoferol ( $\beta$ -TOC),  $\gamma$ -tokoferol ( $\gamma$ -TOC) ve  $\delta$ -tokoferol ( $\delta$ -TOC)’dür. Tokotrienoller ise  $\alpha$ -tokotrienol ( $\alpha$ -TT),  $\beta$ -tokotrienol ( $\beta$ -TT),  $\gamma$ -tokotrienol ( $\gamma$ -TT) ve  $\delta$ -tokotrienol ( $\delta$ -TT)’dür (Constantinou ve diğ., 2008).

E vitamininin yapısında biri fenolik asit ve biri heterosiklik olmak üzere 2 halkaya sahip olan kroman bir baş ve bir ptil kuyruk bulunmaktadır. Tokoferoller doymuş ptil kuyruk taşıırken, tokotrienoller doymamış ptil kuyruk taşırlar (Şekil 2.7) (Constantinou ve diğ., 2008).



**Şekil 2.7.** Tokoferollerin ve tokotrienollerin kimyasal yapıları (Zingg, 2007).

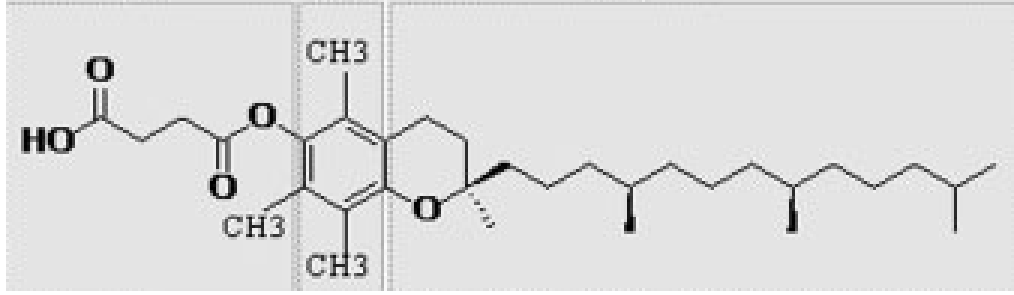
E vitamini zeytinyağında, ayçiçeği yağında, mısır ve soya fasülyesinden elde edilen yağlarda, sebze yağlarında, fındıkta, fıstıkta, palmiye yağında, yulafta, çavdarda, buğday tohumunda, arpada ve pirinç kepeğinde bulunmaktadır (Constantinou ve diğ., 2008; Zingg, 2007).

E vitamini yağda çözünen bir vitamindir. Zincir-kıran bir antioksidan olan E vitamini, lipid peroksidasyonunu ve diğer serbest radikal oluşturan reaksiyonları önler (Brigelius-Flohé ve Traber, 1999). E vitaminin insan sağlığı üzerinde çok yararlı etkileri vardır. Antioksidan özelliğinden dolayı E vitamininin oksidatif stresle ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda ve kardiyovasküler hastalıklarda potansiyel bir koruyucu etkisinin olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Ricciarelli ve diğ., 2001; Ricciarelli ve diğ., 2007). Ayrıca cilt üzerinde de koruyucu etkiye sahip olan E vitamini, bu özelliğinden dolayı kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Thiele ve Ekanayake-Mudiyanselage, 2007).

Bu doğal E vitamini formlarının yanı sıra, bunların yapısında meydana getirilen modifikasyonlar sonucu elde edilen E vitamini analogları da vardır.

### 2.3.1. $\alpha$ -Tokoferol Süksinat

$\alpha$ -Tokoferol süksinat ( $\alpha$ -TOS) (diğer adlarıyla  $\alpha$ -tokoferil süksinat,  $\alpha$ -tokoferol süksinik asit, vitamin E süksinat),  $\alpha$ -tokoferolün fonksiyonel bölgesine bir süksinil grubunun eklenmesiyle elde edilmiştir (Şekil 2.8). Bu süksinil grubu  $\alpha$ -TOS'a redoks bakımından inaktif (redoks-sessiz) ve apoptojenik bir özellik kazandırır (Wang ve diğ., 2006).



Şekil 2.8. Alfa-tokoferol süksinatın kimyasal yapısı (Constantinou ve diğ., 2008).

### 2.3.2. E Vitamini ve Kanser

E vitaminin anti-karsinojenik etkileri son yıllarda dikkatleri üzerine çeken önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. E vitaminin kanser hücreleri üzerinde gözlenen *in vitro* anti-neoplastik etkileri bunda büyük rol oynamaktadır (Constantinou ve diğ., 2008). Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçları destekleyici, toksisitesi ve yan etkileri daha az yeni ajanlara ve kemoterapötiklerin etkisini artıran ya da yan etkilerini ortadan kaldıran doğal destekleyicilere duyulan ihtiyaç bu arayışları hızlandırmıştır.

Yapılmış birçok deneysel çalışma, E vitamini formları arasında anti-kanser ajan olarak en umut verici olanın  $\alpha$ -TOS olduğunu göstermektedir (Wang ve diğ., 2006).  $\alpha$ -Tokoferol süksinatın tümörler için terapötik bir ajan olarak kullanılabileceği ilk kez Prasad ve Edwards-Prasad tarafından ortaya konulmuştur (Prasad ve Edwards-Prasad, 1982). Sonrasında yapılan *in vitro* çalışmalarda  $\alpha$ -TOS'un prostat, kolon, meme, serviks kanseri hücrelerinin, ayrıca lenfoma ve melanoma hücrelerinin büyümesinde potansiyel bir inhibitör olduğu görülmüştür (Constantinou ve diğ., 2008).

$\alpha$ -Tokoferol süksinat, kanser hücreleri üzerindeki anti-karsinojenik etkisini kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek, hücre döngüsünü ve DNA sentezini durdurarak ve apoptozu indükleyerek gösterir (Wang ve diğ., 2006).  $\alpha$ -Tokoferol süksinat, kanser hücreleri üzerinde anti-anjiyogenik (vasküler oluşumu önleyici) etkiye de sahiptir (Malafa ve diğ., 2002).

$\alpha$ -Tokoferol süksinat, kanser hücreleri üzerinde seçici toksisiteye sahiptir. Kanser hücreleri üzerinde toksik ve öldürücü etki gösteren  $\alpha$ -TOS, normal hücreler üzerinde böyle bir etkiye sahip değildir (Neuzil ve diğ., 2000). Bu durumun normal hücrelerdeki esteraz aktivitesinin kanser hücrelerindeki yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu düşünceye göre fibroblastlar, hepatositler, intestinal epitel hücreleri gibi normal hücreler  $\alpha$ -TOS'u hidrolizleyebilirken, Jurkat T lenfoma ve kolon kanseri hücreleri gibi kanser hücrelerinde düşük hidrolitik aktiviteden dolayı  $\alpha$ -TOS birikimi meydana gelir (Neuzil, 2003; Birringer ve diğ., 2003).

$\alpha$ -Tokoferol süksinat, iyonlaştırıcı radyasyonun kanser hücreleri üzerindeki etkisini destekleyici bir etkiye de sahiptir. X- ve  $\gamma$ - ışınlarıyla birlikte  $\alpha$ -TOS uygulanan nöroblastoma hücrelerinde meydana gelen büyüme inhibisyonunun, sadece x- ve  $\gamma$ - ışınları uygulanan nöroblastoma hücrelerindeki daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca  $\alpha$ -TOS'un, insan serviks kanseri hücrelerinde radyasyonun meydana getirdiği kromozom hasarını artırdığı, normal fibroblast hücrelerini ise bu hasardan koruduğu belirlenmiştir (Sarria ve Prasad, 1984; Kumar ve diğ., 2002).

### **2.3.3. E Vitamini ve Apoptoz**

E vitamini formları apoptotik açıdan farklı özellikler taşırlar. Tokoferoller grubunda;  $\gamma$ -tokoferol ve  $\delta$ -tokoferol,  $\alpha$ -tokoferolden daha büyük bir pro-apoptotik potansiyele sahiptir. Tokotrienoller grubunda ise  $\gamma$ -tokotrienol ve  $\delta$ -tokotrienol,  $\alpha$ -tokotrienole göre daha büyük bir pro-apoptotik potansiyel taşımaktadır (Constantinou ve diğ., 2008).

$\alpha$ -Tokoferol süksinat, güçlü bir apoptojenik aktiviteye sahiptir.  $\alpha$ -Tokoferol süksinatın anti-karsinojenik özelliği büyük ölçüde bu apoptojenik aktivitesinden ileri gelmektedir (Neuzil, 2003).  $\alpha$ -Tokoferol süksinat, farklı kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebilmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, çok sayıda farklı orijinli

farklı tip kanser hücrelerinin,  $\alpha$ -TOS ile muamele edildiğinde apoptoza gittiği belirlenmiştir. Buna karşın, fibroblastlar, endotel hücreleri, kardiyomiyositler, hepatositler ve düz kas hücreleri gibi normal hücreler üzerinde apoptoz indükleyici etki göstermez (Neuzil ve diğ., 2000).

$\alpha$ -TOS, kanser hücrelerinde apoptozu farklı yollar üzerinden indükler. İnsan premyelositik lösemi (HL-60) hücrelerine  $\alpha$ -TOS'un uygulandığı bir çalışmada, mitokondriden sitokrom c salınımına ve kaspaz-3 aktivasyonuna neden olarak apoptozu indüklediği görülmüştür (Yamamoto ve diğ., 2000). İnsan meme kanseri (MDA-MB-435) hücrelerine  $\alpha$ -TOS'un uygulandığı başka bir çalışmada, bu hücrelerdeki apoptoz indüksiyonunun; Bax'ın sitozolden mitokondriye translokasyonu, mitokondriden sitokrom c salınımı ile bunlara bağlı kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonu sonucu meydana geldiği görülmüştür (Yu ve diğ., 2003). İnsan mide kanseri (SGC-7901) hücrelerine  $\alpha$ -TOS'un uygulandığı diğer bir çalışmada, söz konusu hücrelerin apoptoza gittiği görülmüştür. Bu hücrelerde de apoptoz Fas sinyal yolağı (dışsal apoptotik yolak) üzerinden indüklenmektedir (Wu ve diğ., 2002).

### **3. MALZEME VE YÖNTEM**

#### **3.1. MALZEMELER**

##### **3.1.1. Kimyasallar**

Deneyleerde kullanılan kimyasal malzemeler, alfa-tokoferol süksinat (Sigma, T3126), Hoechst boyası (Sigma, Hoechst 33258), Kaspaz-3 Florometrik Analiz Kiti (Sigma, CASP3F), Kaspaz-9 Florometrik Aktivite Analiz Kiti [Chemicon (Millipore), APT172], DMEM/F12 HAM besiyeri (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium/Nutrient Mixture F-12 HAM”) (Sigma, D8900 ) ve PBS (“Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline”, pH 7.2), FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma, F7524) ve antibiyotik-antimikotik solüsyonu (Sigma, A5955)’dur.

##### **3.1.2. Besiyerleri**

Hücre kültürlerinde; streptomisin (100 U/ml), penisilin (100 µg/ml) ve amfoterisin B (0.25 µg/ml) içeren antibiyotik-antimikotik solüsyonu ile % 10 fetal sığır serumu (FBS) içeren ve pH’sı 7.4 olan DMEM/F12 HAM besiyeri kullanıldı.

##### **3.1.3. Cihazlar**

Deneyleerde kullanılan cihazlar; düzgün akışlı steril hücre kültürü kabini (Class II Laminar flow, Bilser), karbondioksitli hücre inkübatörü (Heraeus D-6450, Hanau), otoklav (Nüve, OT 012), ultrasonik su banyosu (Wisd Laboratory Instruments), spektrofotometre (Bio-Tek, µQuant), spektroflorometre (Bio-Tek, FLx800), faz kontrast invert mikroskobu (OLYMPUS CK2) ve floresan mikroskobu (Leica CTR 600)’dur.

#### **3.2. SIÇAN C6 GLİOMA HÜCRE HATTI**

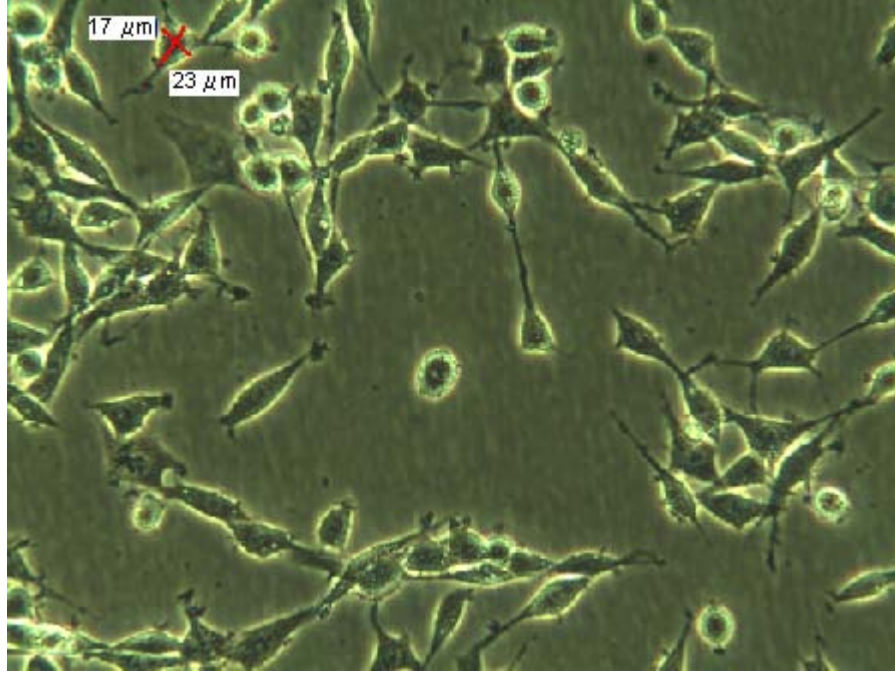
Sıçan C6 glioma hücre hattı, rastgele seçilmiş Wistar-Furth sıçanlarına N,N’-nitrozometilüre uygulanması sonucu elde edilmiştir ve ilk olarak Benda ve diğ., (1971) tarafından kullanılmıştır. Bu hücre hattının, neonatal sıçanların beynine enjekte

edildiğinde, morfolojik olarak glioblastoma multiform hücrelerine benzediği görülmüştür (Grobber ve diğ., 2002). Sıçan C6 glioma hücre hattı beyin tümörlerinin araştırılmasında model sistem olarak çok yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan C6 sıçan glioma hücreleri İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'ndan sağlandı. C6 sıçan glioma hücrelerinin altkültürlerinin yapılmasında sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı (Freshney, 2000):

1. Steril bir ortamda, 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabı içindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
2. Tripsini inhibe eden serum artıklarını ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla, 5 ml (0.2 ml/cm<sup>2</sup>) PBS, hücrelerin tutunduğu yüzeyin karşısından dikkatlice kültür kabına konuldu ve hücreler yıkandıktan sonra PBS döküldü.
3. Kültür kabı içine, yine hücrelerin tutunduğu yüzeyin karşısından 1 ml Tripsin/EDTA (etilendiamintetraasetik asit) (% 0.2 tripsin, % 0.04 EDTA) eklendikten sonra enzim solüsyonunun tüm hücre yüzeyini kaplaması sağlandı ve kültür kabı % 5 CO<sub>2</sub> ile doyurulmuş 37°C'lik hücre inkübatörüne kaldırıldı. Hücreler bir film şeklinde kültür kabından ayrılincaya kadar (yaklaşık 1 dakika) etüvde tutuldu.
4. İnkübasyon süresinin sonunda, kültür kabına 5 ml (0.2 ml/cm<sup>2</sup>), DMEM/F12 HAM besiyeri eklenip pipetaj yardımıyla hücreler birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden tamamen ayrılarak süspansiyon haline getirildi.
5. Yeni bir kültür kabında altkültürleme yapılmadan önce hücreler bir hemositometre yardımıyla sayıldı ve rutin bir altkültür için gerekli olan sayıda (1x10<sup>5</sup> hücre/ml) hücre alınarak yeni kültür kabına aktarıldı. Hücreler % 5 CO<sub>2</sub> ile doyurulmuş hücre inkübatöründe, 37°C'de üretildi ve 3 günde bir altkültürleri yapıldı.

Başlangıç hücre sayısı 1x10<sup>5</sup> hücre/ml olan 2 günlük C6 hücrelerinin faz kontrast invert mikroskoptaki görüntüsü Şekil 3.1'de görülmektedir.



**Şekil 3.1.** Başlangıç hücre sayısı  $1 \times 10^5$  hücre/ml olan 2 günlük C6 glioma hücrelerinin faz kontrast invert mikroskop altındaki görüntüsü (20X).

### 3.3. E VİTAMİNİ SOLÜSYONUNUN HÜCRELERE UYGULANMASI

Bu çalışmada, E vitamini formu olarak alfa-tokoferol süksinat ( $\alpha$ -TOS) kullanıldı. Hücrelere uygulanacak  $\alpha$ -TOS'un konsantrasyonu ve uygulama süresi seçilirken,  $\alpha$ -Tokoferol süksinatla ilgili literatürler dikkate alındı (Pekmez, 2010; Prasad ve diğ., 2003; Yamamoto ve diğ., 2000; Neuzil ve diğ., 2000; Neuzil ve diğ., 2004). Buna göre  $\alpha$ -TOS'un C6 glioma hücrelerinin % 50'sini öldüren sitotoksik dozu ( $SD_{50}$ ) olan  $50 \mu\text{M}$  (Pekmez, 2010) temel konsantrasyon olarak seçildi. Apoptotik etkinin görüldüğü en düşük ve en yüksek konsantrasyonların da belirlenebilmesi için  $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$ ,  $70 \mu\text{M}$  ve  $100 \mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlar uygulandı.

Toz halindeki  $\alpha$ -TOS, saf etanol içinde çözülerek stok  $\alpha$ -TOS solüsyonu ( $25 \text{ mM}$ ) hazırlandı ve steril edildi. Bu stoğun, yine steril bir ortamda DMEM/F12 HAM besiyeri ile dilüe edilmesiyle hücrelere uygulanacak konsantrasyonlarda ( $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$ ,  $70 \mu\text{M}$  ve  $100 \mu\text{M}$ )  $\alpha$ -TOS solüsyonları elde edildi.  $\alpha$ -Tokoferol süksinat, tasarlanan deney planlarının gerektirdiği şekilde, 24 kuyucuklu kültür kaplarında başlatılan C6 hücre kültürlerine veya  $25 \text{ cm}^2$ 'lik kültür kaplarında başlatılan C6 hücre kültürlerine uygulandı.



### 3.4. APOPTOZ ANALİZLERİ

#### 3.4.1. Nukleus Morfolojisi

Farklı konsantrasyonlarda ve farklı inkübasyon sürelerinde  $\alpha$ -TOS uygulanmış sıçan C6 glioma hücrelerinin nukleuslarında apoptoza bağlı olarak meydana gelen morfolojik değişimler Hoechst boyaması yapılarak floresan mikroskopta 40X'lik objektifle incelendi. Yöntemin uygulanmasında sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

1. Steril bir ortamda, 24 kuyucuklu kültür kaplarının kuyucuklarına, önceden steril edilmiş olan yuvarlak lamalar (22 mm'lik), her bir kuyucuğun içinde bir tane bulunacak şekilde yerleştirildi. Dört farklı inkübasyon süresi (24, 32, 40 ve 48 saat) boyunca  $\alpha$ -TOS uygulaması yapılacağından, her bir inkübasyon süresi için bir tane olmak üzere bu şekilde 4 ayrı kültür kabı hazırlandı.
2. Her bir kuyucuktaki lam üzerine, başlangıç hücre sayısı  $75 \times 10^3$  hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.
3. Hücre ekiminden sonraki ilk 24 saatin sonunda, hücrelere 5 farklı konsantrasyonda (10, 30, 50, 70 ve 100  $\mu$ M)  $\alpha$ -TOS uygulaması yapıldı. Kontrol grubu hücrelerine  $\alpha$ -TOS yerine, sadece DMEM/F12 HAM besiyeri uygulandı. Hücreler, % 5 CO<sub>2</sub> sağlayan etüvde 37°C'de inkübe edildi.
4. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri pipetle yavaşça aspire edilerek atıldı.
5. Hücreler PBS ile birer defa yıkandı.
6. PBS ile yıkama aşamasının ardından hücre fiksasyonu yapıldı. Hücrelerin tutunmuş olduğu lamellerin bulunduğu her bir kuyucuğa 1'er ml soğuk (-20°C) saf metanol eklendi. Hücreler metanol içinde -20°C'de 20 dakika bekletildi. Bu süre sonunda metanol pipetle aspire edilerek atıldı.
7. Fikse edilen hücreler Hoechst boya solüsyonuyla (% 50 PBS : % 50 gliserol içinde, 100  $\mu$ g/ml konsantrasyonda hazırlanmış) boyandı ve floresan mikroskopta 358 nm eksitasyon ve 461 nm emisyon dalga boylarında incelenerek fotoğraflandı.

#### 3.4.2. Apoptoza Giden Hücrelerin Mikroskopik Canlı Video Kaydı ("Live Cell Imaging")

Hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimlerin izlenmesi amacıyla, 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü kabına  $1 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde 8 ml hücre ekimi yapıldı. Hücre

ekiminden sonraki ilk 24 saatin sonunda hücrelere 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -TOS uygulandı ve hücreler floresan mikroskobuna bağlı, gerekli inkübasyon şartlarını (%5  $\text{CO}_2$  ve  $37^\circ\text{C}$ ) sağlayan inkübatörde 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon süresince, mikroskobun "Live Cell Imaging" programı kullanılarak, ilk 24 saat boyunca her 15 dakikada bir, sonraki 8 saat boyunca her 10 dakikada bir ve son 17 saat boyunca da her 5 dakikada bir kayda alınan kültüre ait fotoğraflar video filmi haline getirildi.

### 3.4.3. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Kontrol ve deney grubu hücrelerindeki kaspaz-3 enzim aktivitesi "Kaspaz-3 Florometrik Analiz Kiti" [Caspase 3 Fluorimetric Assay Kit, Sigma] kullanılarak belirlendi. Bu analizin dayandığı temel nokta, substrat olarak kullanılan Ac-DEVD-AMC (Asetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metil kumarin)'nin kaspaz-3 enzimi tarafından kesimi sonucu oluşan floresan ürünün [7-amino-4-metil kumarin (AMC)] florometrik olarak belirlenmesidir. Bu floresan ürünün eksitasyon dalga boyu 360 nm, emisyon dalga boyu 460 nm'dir. Kaspaz-3 enzim aktivitesinin bu kit ile belirlenmesinde sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Doksan altı kuyucuklu kültür kaplarına başlangıç hücre sayısı  $1 \times 10^5$  hücre/ml (her kuyucuktaki son hacim 200  $\mu\text{l}$ ) olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Dört farklı inkübasyon süresi (24, 32, 40 ve 48 saat) boyunca  $\alpha$ -TOS uygulaması yapılacağından, her bir inkübasyon süresi için bir tane olmak üzere bu şekilde, 4 ayrı kültür kabına hücre ekimi yapıldı.
2. Hücre ekiminden sonraki ilk 24 saatin sonunda, hücrelere  $\alpha$ -TOS (10, 30, 50, 70 ve 100  $\mu\text{M}$ ) uygulandı. Kontrol grubuna sadece DMEM/F12 HAM besiyeri uygulandı. Hücreler % 5  $\text{CO}_2$  sağlayan etüvde  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi.
3. İnkübasyon sürelerinin sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri pipetle yavaşça aspire edilerek atıldı.
4. Her bir kuyucuktaki hücrelerin üzerine 25  $\mu\text{l}$  1x lizis tamponu eklendi ve pipetaj yardımıyla hücre parçalaması yapıldı.
5. Hücrelerin parçalanmış olduğu mikroskop altında kontrol edildikten sonra her kuyucuğa, 200  $\mu\text{l}$  1x deney tamponu (kaspaz-3 substratı Ac-DEVD-AMC içeren) eklendi ve  $37^\circ\text{C}$ 'de 1.5 saat inkübe edildi.

6. İnkübasyon sonunda, çok kuyucuklu florometrik okuyucuda (FLx800, Bio-Tek) 360/460 nm'de (eksitasyon/emisyon dalga boyu) ölçüm yapıldı.
7. Elde edilen floresan değerlerinin, AMC standart grafiğine göre hesaplanması ile örneklerdeki kaspaz-3 enzimi kesimi ile açığa çıkan AMC miktarı (nmol) belirlendi. Örneklerde açığa çıkan bu değerler kullanılarak, aşağıdaki eşitlik yardımıyla örneklerdeki kaspaz-3 enzim aktivitesi hesaplandı.

$$\text{Aktivite, nmol AMC/dakika/ml} = (\text{nmol AMC} \times d) / (t \times V)$$

V: örnek miktarı (ml olarak)

d: sulandırma faktörü

t: reaksiyon süresi (dakika olarak)

Deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı ve elde edilen sonuçların ortalamaları alındı.

#### **3.4.4. Kaspaz-9 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

Kontrol ve deney grubu hücrelerindeki kaspaz-9 enzim aktivitesi “Kaspaz-9 Florometrik Aktivite Analiz Kiti” [“Caspase 9 Fluorometric Activity Assay Kit, LEHD”, Chemicon (Millipore)] kullanılarak belirlendi. Bu analiz için temel nokta, substrat olarak kullanılan LEHD-AFC (Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-triflorometil kumarin)'nin kaspaz-9 enzimi tarafından kesilmesi sonucu oluşan ürünün florometrik olarak belirlenmesidir. LEHD-AFC'nin kaspaz-9 tarafından kesilmesi sonucu serbest kalan AFC 400 nm'de eksite olur ve 505 nm'de floresan yayar. Enzim aktivitesine bağlı olarak reaksiyon karışımının floresan özelliğinde meydana gelen bu değişim, florometrede 400 nm eksitasyon ve 505 nm emisyon filtresi kullanılarak enzim aktivitesinin belirlenmesine olanak sağlar. Kaspaz-9 enzim aktivitesinin bu kit ile belirlenmesinde sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarına başlangıç hücre sayısı 1x10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde 8 ml hücre ekimi yapıldı.
2. Hücre ekiminden sonraki ilk 24 saatin sonunda, hücrelere  $\alpha$ -TOS (10, 30, 50, 70 ve 100  $\mu$ M) uygulandı. Kontrol grubuna sadece DMEM/F12 HAM besiyeri uygulandı. Hücreler % 5 CO<sub>2</sub> sağlayan etüvde 37°C'de inkübe edildi.

3. 24, 32, 40 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri 15 ml'lik tüplere alındı.
4. Kültür kabına hücrelerin bulunduğu yüzeyin karşısından dikkatlice 5 ml PBS konuldu ve hücreler yıkandıktan sonra PBS döküldü. Kültür kabına yine hücrelerin bulunduğu yüzeyin karşısından 1ml Tripsin/EDTA eklendikten sonra enzimin tüm yüzeyi kaplaması sağlandı ve kültür kabı etüvde 37°C'de yaklaşık 1 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyonun sonunda kültür kabına 5 ml DMEM/F12 HAM eklenip hücreler süspansiyon edildi ve bu süspansiyon 3. adımda 15 ml'lik tüplere alınan DMEM/F12 HAM üzerine aktararak +4°C'de 3000  $xg$ 'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant atıldıktan sonra DMEM/F12 HAM'ın tamamen uzaklaştırılması için hücre pelleti 2 ml PBS ile süspansiyon edilerek +4°C'de 3000  $xg$ 'de 10 dakika santrifüj edildi.
7. Hücrelerin yıkanması amacıyla 6. adımdaki işlem bir defa daha tekrarlandı.
8. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 100  $\mu$ l soğuk lizis tamponunda süspansiyon edildi ve içine buz atılarak soğutulmuş ultrasonik su banyosunda, 15 s sonikasyon 10 s buz üstünde bekletilerek, 15 dakika parçalamaya yapıldı.
9. Hücrelerin parçalanmış olduğu mikroskopta kontrol edildikten sonra 50  $\mu$ l hücre lizatına 2x reaksiyon tamponu (50  $\mu$ l) ve 1 mM LEHD-AFC substratı (5  $\mu$ l) eklendi ve 37°C'de 1.5 saat inkübe edildi. Hücre lizatının geri kalan kısmı protein konsantrasyon belirlemelerinde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.
10. İnkübasyon sonunda örneklerin bağıl floresan miktarları (rfu/dk) çok kuyucuklu florometrik okuyucuda 400/505 nm'de (eksitasyon/emisyon) ölçüm yapılarak belirlendi.
11. Elde edilen floresan değerleri örneklerin protein derişimlerine göre normalize edildi ve bağıl kaspaz 9 enzim aktivitesi aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplandı.

$$\text{Kaspaz 9 aktivitesi (\% Kontrol)} = (F_D / F_K) \times 100$$

$F_D$  = Deney grubuna ait bağıl floresan miktarı

$F_K$  = Kontrol grubuna ait bağıl floresan miktarı

Deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı ve elde edilen sonuçların ortalamaları alındı.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada,  $\alpha$ -TOS'un sıçan C6 glioma hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi floresan görüntüleme ve enzim analiz teknikleriyle araştırıldı.

### 4.1. APOPTOZ ANALİZLERİ

#### 4.1.1. Morfolojik Değerlendirme

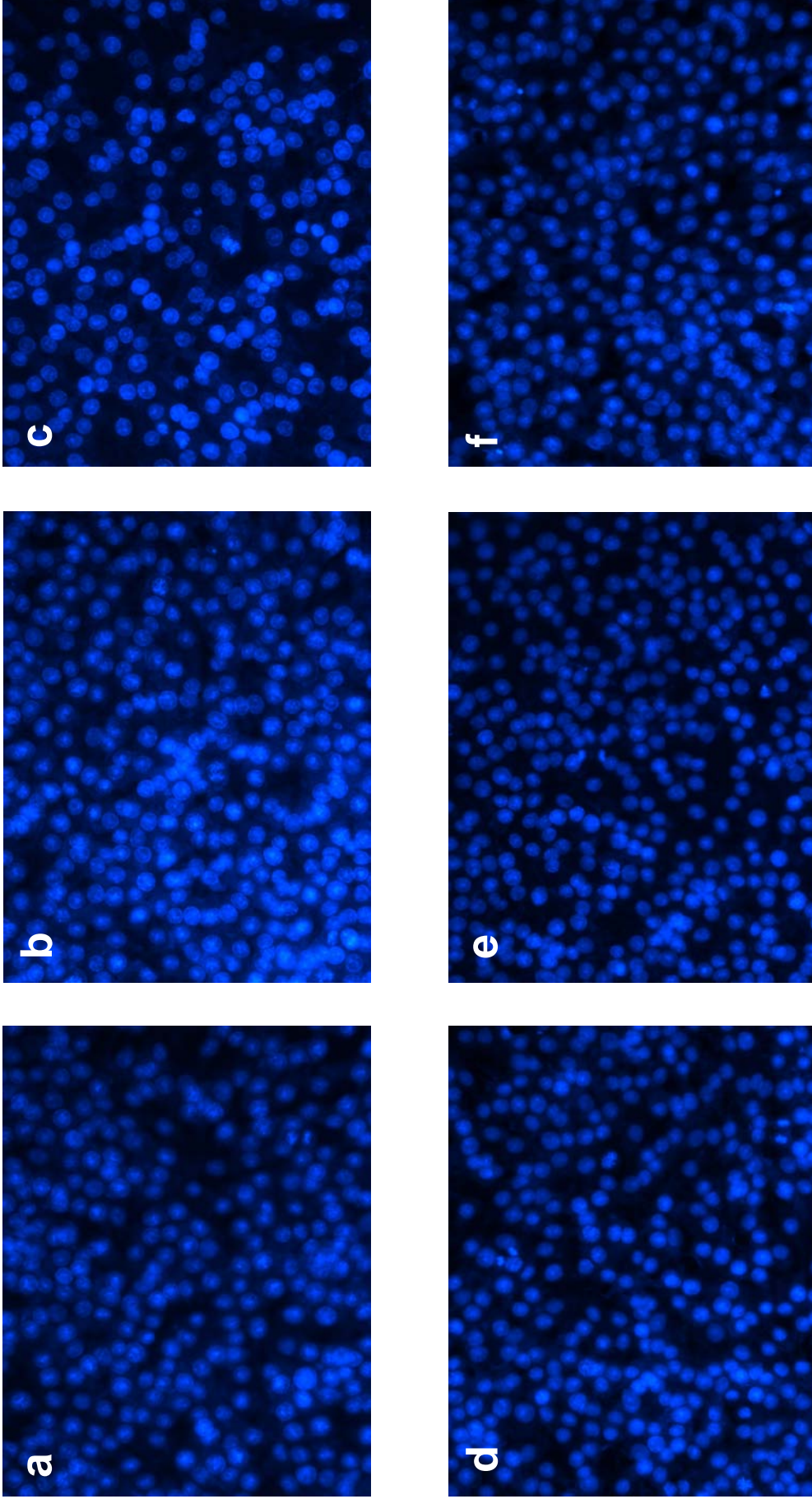
Uygulanan  $\alpha$ -TOS dozlarına ve farklı inkübasyon sürelerine göre, C6 glioma hücrelerinde apoptoza özgü morfolojik değişimlerin (nükleer kondensasyon ve apoptotik cisimciklerin oluşumu) meydana gelip gelmediği Hoechst boyaması yapılarak floresan mikroskopta incelendi.

Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de özetlendi ve örneklere ait floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.1 - 4.5'te verildi.

**Tablo 4.1.**  $\alpha$ -Tokoferol süksinatın C6 glioma hücrelerinin morfolojisinde apoptoza bağlı olarak meydana getirdiği değişiklikler

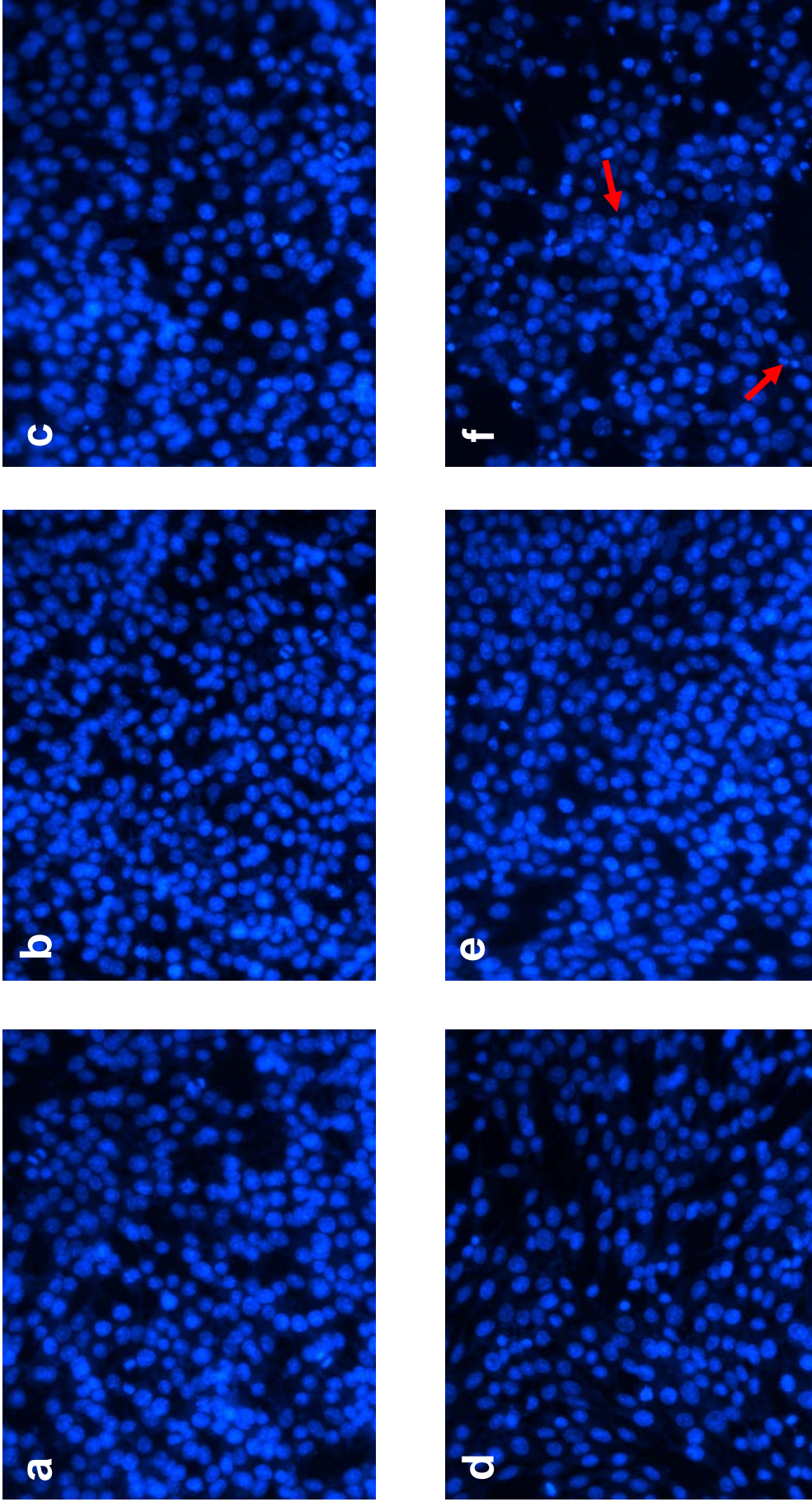
Süre (saat)	$\alpha$ -Tokoferol süksinat konsantrasyonu ( $\mu$ M)				
	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	50 $\mu$ M	70 $\mu$ M	100 $\mu$ M
24 saat	-	-	-	-	- / +
32 saat	-	-	-	-	+
40 saat	-	-	+	++	+++++
48 saat	-	-	++	+++++++	+++++++ +++++++

Uygulanan  $\alpha$ -TOS konsantrasyonlarından 100  $\mu$ M hariç hiçbirinde 24 saatlik inkübasyonlarda apoptotik morfoloji gözlenmedi. 100  $\mu$ M'lık uygulamada 24 saat sonunda, çok az sayıda hücrenin küçülmeye başladığı gözlemlendi ve bu durumun apoptoza gitme eğiliminden kaynaklanabileceği düşünüldü. Ayrıca  $\alpha$ -TOS'un 10  $\mu$ M ve 30  $\mu$ M'lık konsantrasyonları da hiçbir inkübasyon süresinde hücrelerde apoptotik morfoloji meydana getirmedi. Nükleer kondensasyona ve fragmentasyona bağlı morfolojik değişimler ilk olarak 100  $\mu$ M'lık konsantrasyon için 32 saatlik uygulamada belirlendi. 50  $\mu$ M, 70  $\mu$ M, 100  $\mu$ M'lık konsantrasyonların 40 saatlik uygulamalarında, apoptotik hücre sayısının konsantrasyon artışıyla doğru orantılı şekilde arttığı görüldü. 48 saatlik uygulamalarda da  $\alpha$ -TOS konsantrasyonundaki artışla apoptotik morfoloji gösteren hücre sayısındaki artışın kolerasyon gösterdiği gözlemlendi.



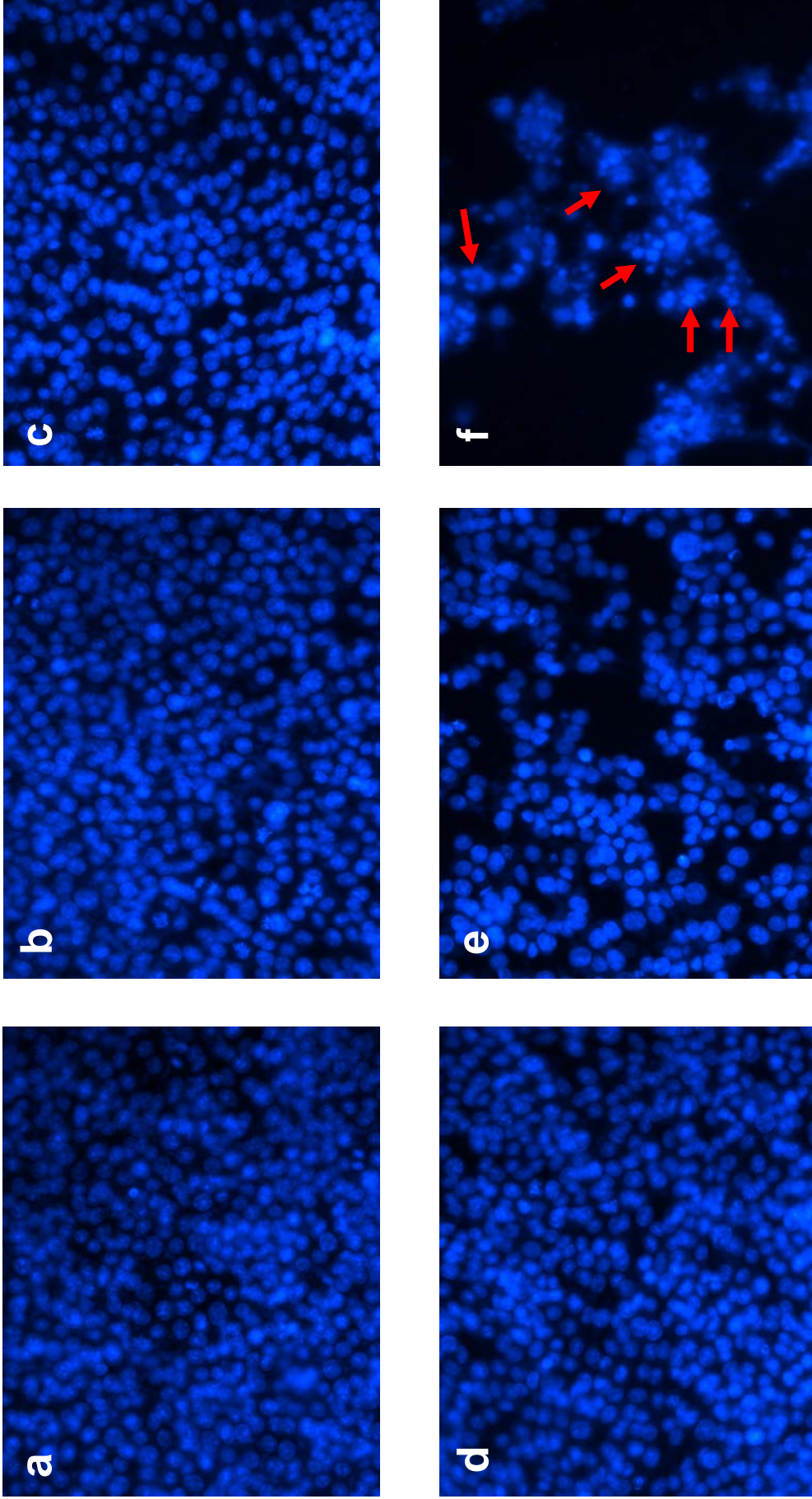
**Şekil 4.1.**  $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulanmış C6 glioma hücrelerinin 0. saatte floresan mikroskopundaki görüntüleri (40X; Hoechst).  
a) Negatif kontrol. b) 10  $\mu$ M. c) 30  $\mu$ M. d) 50  $\mu$ M. e) 70  $\mu$ M. f) 100  $\mu$ M.



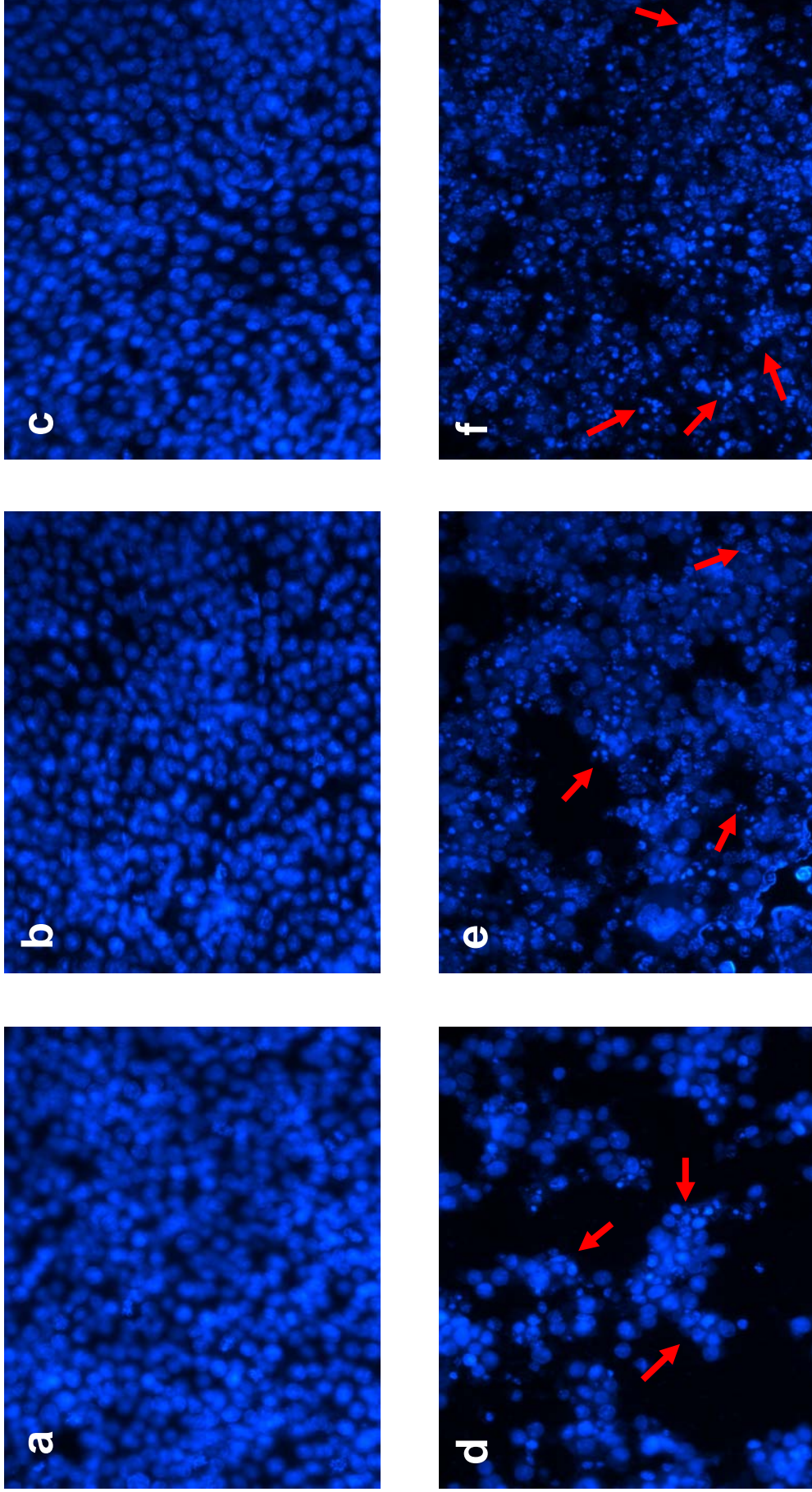


**Şekil 4.2.**  $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulananmış C6 glioma hücrelerinin 24. saatte floresan mikroskobundaki görüntüleri (40X; Hoechst) (Kırmızı ok: apoptotik hücre). a) Negatif kontrol, b) 10  $\mu$ M, c) 30  $\mu$ M, d) 50  $\mu$ M, e) 70  $\mu$ M, f) 100  $\mu$ M.



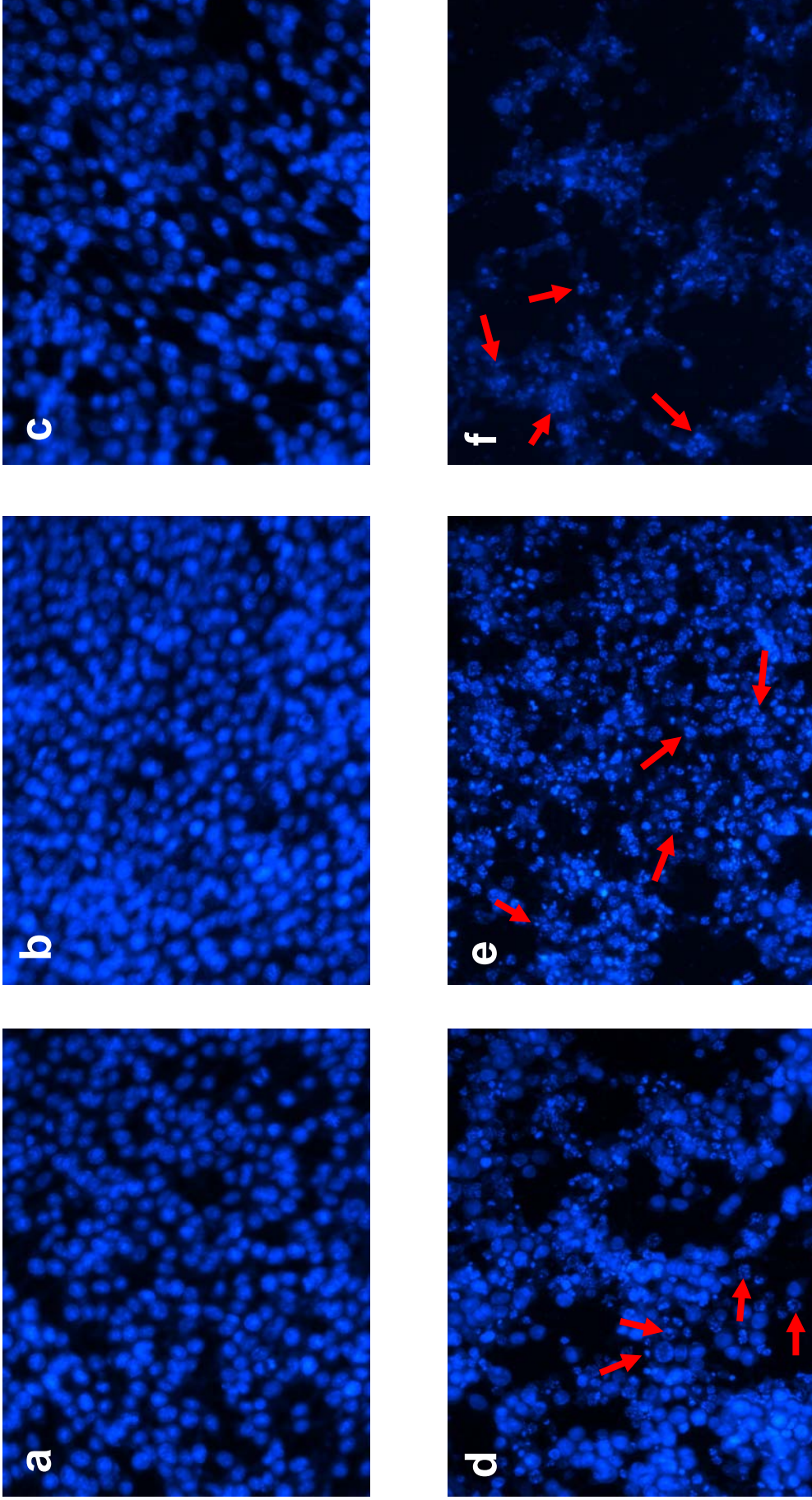


**Şekil 4.3.**  $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulananmış C6 glioma hücrelerinin 32. saatte floresan mikroskopundaki görüntüleri (40X; Hoechst) (Kırmızı ok: apoptotik hücre). a) Negatif kontrol, b) 10  $\mu$ M, c) 30  $\mu$ M, d) 50  $\mu$ M, e) 70  $\mu$ M, f) 100  $\mu$ M.



**Şekil 4.4.** α-Tokoferol süksinat uygulananmış C6 glioma hücrelerinin 40. saatte floresan mikroskopundaki görüntüleri (40X; Hoechst) (Kırmızı ok: apoptotik hücre). a) Negatif kontrol, b) 10 μM, c) 30 μM, d) 50 μM, e) 70 μM, f) 100 μM.





**Şekil 4.5.**  $\alpha$ -Tokoferol süksinatı uygulanmış C6 glioma hücrelerinin 48. saatte floresan mikroskopundaki görüntüleri (40X; Hoechst) (Kırmızı ok: apoptotik hücre). a) Negatif kontrol, b) 10  $\mu$ M, c) 30  $\mu$ M, d) 50  $\mu$ M, e) 70  $\mu$ M, f) 100  $\mu$ M.

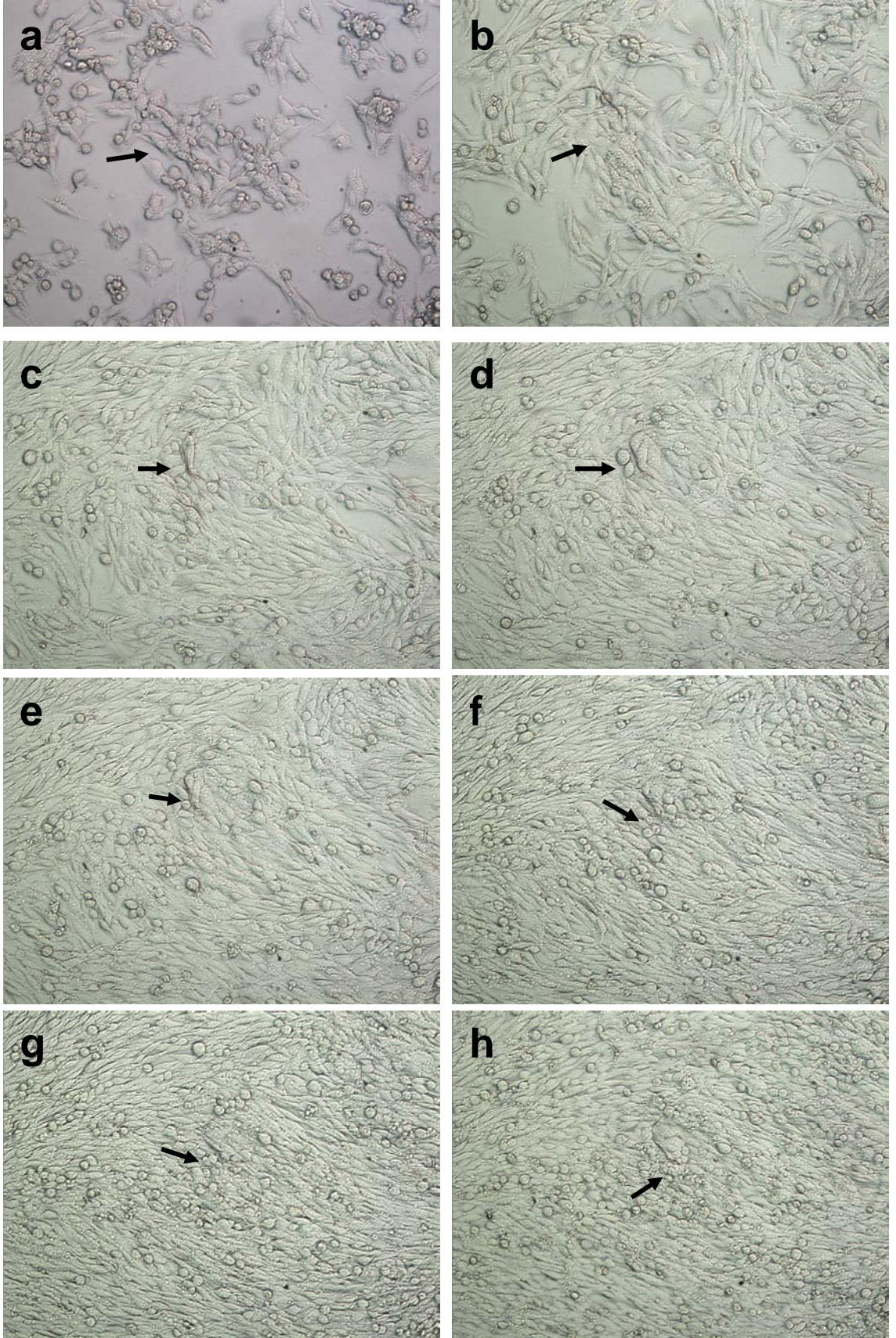
#### **4.1.2. Apoptoza Giden Hücrelerin Mikroskopik Canlı Video Görüntüleri**

Sıçan C6 glioma hücrelerine 50  $\mu$ M  $\alpha$ -TOS uygulandı ve kültür 48 saat boyunca floresan mikroskobuna bağlı hücre inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresince belirli aralıklarla fotoğraf kaydı alınarak, hücrelerde apoptoza bağlı olarak meydana gelen morfolojik değişimler gerçek zamanlı olarak tespit edildi.

İnkübasyonun ilk 24 saatinde hücrelerde hiçbir apoptotik değişikliğin meydana gelmediği, tam tersine hücrelerin bölünerek çoğalmalarına devam ettiği gözlemlendi. Yirmi dördüncü saatten itibaren hücrelerde apoptoza özgü morfolojik değişimlerin oluşmaya başladığı (hücrelerin küçüldüğü ve büzüldüğü, membran tomurcuklanmalarının oluşmaya başladığı) gözlemlendi. 40 ve 48. saatlerde ise apoptoza giden hücrelerde, tomurcukların ayrılmasıyla apoptotik cisimciklerin oluştuğu izlendi.

$\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulanmış C6 glioma hücrelerinin mikroskopik canlı video kaydıyla çekilmiş 0, 6, 16, 22, 24, 32, 40 ve 48. saatlerdeki görüntüleri Şekil 4.6'da gösterildi.





**Şekil 4.6.** 48 saat süreyle 50  $\mu\text{M}$   $\alpha\text{-TOS}$  uygulanmış C6 glioma hücrelerindeki morfolojik değişimleri gösteren video kaydı ile elde edilen fotoğraflar (20X). Oklar tek bir hücrenin a) 0., b) 6., c) 16., d) 22., e) 24., f) 32., g) 40. ve h) 48. saatlerdeki durumunu işaret etmektedir.

#### 4.1.3. Kaspaz-3 Aktivitesi

C6 glioma hücrelerine 10, 30, 50, 70 ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlarda 24, 32, 40 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri boyunca  $\alpha$ -TOS uygulaması yapıldı. Hiçbir konsantrasyon için 24 saatlik uygulamalarda kaspaz-3 aktive olmadı. 32 saatlik uygulamalarda sadece 100  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonda, 40 saatlik ve 48 saatlik uygulamalarda ise 50, 70 ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonların hepsinde kaspaz-3 aktivitesi belirlendi.

Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'de özetlendi.

**Tablo 4.2.**  $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulanmış C6 glioma hücrelerindeki kaspaz-3 aktivitesi (pikomol AMC/dakika/ml) (kontrol grubunun katı şeklinde ifade edilmiştir).

Süre (saat)	$\alpha$ -Tokoferol süksinat konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )				
	10 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	70 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
24 saat	-	-	-	-	-
32 saat	-	-	-	-	8.5
40 saat	-	-	5	6.6	4
48 saat	-	-	3.15	4.65	1.13

#### 4.1.4. Kaspaz-9 Aktivitesi

C6 glioma hücrelerine 24, 32, 40 ve 48 saatlik uygulama süreleri boyunca 10, 30, 50, 70  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlarda  $\alpha$ -TOS uygulaması yapıldı. 24 saatlik uygulamalarda hiçbir konsantrasyon kaspaz-9'u aktive etmedi. 32 saatlik uygulamalarda sadece 100  $\mu\text{M}$ 'lık  $\alpha$ -TOS konsantrasyonu kaspaz-9 aktivitesine neden olurken, 40 ve 48 saatlik uygulamalarda üç ayrı konsantrasyonun da kaspaz-9'u aktive ettiği belirlendi.

Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'te özetlendi.

**Tablo 4.3.**  $\alpha$ -Tokoferol süksinat uygulanmış C6 glioma hücrelerindeki bağıl kaspaz-9 aktivitesi (kontrol grubunun katı şeklinde ifade edilmiştir).

Süre (saat)	$\alpha$ -Tokoferol süksinat konsantrasyonu ( $\mu$ M)				
	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	50 $\mu$ M	70 $\mu$ M	100 $\mu$ M
24 saat	–	–	–	–	–
32 saat	–	–	–	–	1.18
40 saat	–	–	1.10	2.09	5.62
48 saat	–	–	1.67	7.23	12.63

Kaspaz-3 ve kaspaz-9 sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, kaspaz-3 aktivitesinin belirlendiği deney gruplarının hepsinde kaspaz-9 aktivitesinin de olduğu saptandı.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Merkezi sinir sisteminde ortaya çıkan beyin tümörleri her yaş grubunda insanda görülebilmektedir. Çocuklarda en sık görülen ikinci kanser tipi olan beyin tümörlerinin yetişkinlerdeki insidansı ilerleyen yaşla beraber artmaktadır (Louis ve diğ., 2002). Beyin tümörleri başlangıç gösterdikleri kaynağa göre primer beyin tümörleri veya sekonder beyin tümörleri olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Primer beyin tümörleri beyin hücrelerinden köken alırlar. Sekonder beyin tümörleri ise metastatik beyin tümörleridir, vücudun diğer bölgelerinde başlangıç gösterip beyine metastaz yaparlar.

Primer beyin tümörlerinin en yaygın görülen grubunu **glioma** adı verilen beyin tümörleri oluşturur. Gliomalar, glial hücrelerden köken alırlar (Lassman, 2004). Glial hücreler, beyin korunmasında ve desteklenmesinde önemli görevlere sahiptirler. Glial hücreler; beyindeki kan-beyin bariyerinin oluşturulmasına yardımcı olurlar, beyindeki nörotransmitter seviyesini kontrol ederler, nöronlara yapısal ve metabolik destek sağlarlar (He ve Sun, 2007).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yapmış olduğu merkezi sinir sistemi tümörleri sınıflandırmasına göre gliomalar, nöroepitelial tümörler grubunda yer almaktadır (DeAngelis, 2001). Gliomalar arasında en malignant olanı **glioblastoma multiform** (GBM)'dur [Dünya Sağlık Örgütü (WHO)/4. Derece]. GBM'ların karakteristik özellikleri; hücrelerin kontrol dışı proliferasyonu, yüksek anjiyogenez göstermesi, apoptoza karşı direnç göstermesi ve genomik dengesizliktir (Furnari ve diğ., 2007).

Glioblastoma multiformun tedavisinde kullanılan yöntemler hastalarda tamamen iyileşme sağlayamamaktadır. Birçok kanser türünde olduğu gibi, glioma tedavisinde de kemoterapötik ilaçları destekleyici ve aynı zamanda bu ilaçların yan etkilerini ortadan kaldıracak farklı ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. E vitamini, hem güçlü bir



antioksidan olarak hem de anti-karsinojenik etkileri açısından kanser terapisinde yardımcı ajan olarak umut vaat etmektedir.

E vitamini anti-karsinojenik etkilerini apoptoz indüksiyonuyla, kanser hücrelerinin proliferasyonunu engelleyerek, metastazı bloke ederek, kanser hücrelerini ilaçlara (5-fluorourasil, adriamisin gibi) ve hücre içi ölüm araçlarına (Fas, TRAIL gibi) duyarlı hale getirerek gösterir (Kline ve diğ., 2007).

E vitaminin anti-karsinojenik etkileriyle ilgili araştırmalarda en çok kullanılan E vitamini formu  $\alpha$ -TOS'tur.  $\alpha$ -Tokoferol süksinat,  $\alpha$ -tokoferolün süksinat esteridir ve oksijenli ortamda daha stabil olduğu için ticari ürünlerde E vitamini kaynağı olarak daha fazla tercih edilmektedir (Kline ve diğ., 2007).

$\alpha$ -Tokoferol süksinatın, E vitamininin bilinen anti-karsinojenik etkilerine ek olarak, hücre kültürü ortamında, çeşitli kemoterapötik ajanların kanser hücreleri üzerindeki büyümeyi inhibe edici etkilerini artırdığı bilinmektedir. Ayrıca  $\alpha$ -TOS'un, hipertermi (primer lokal solid tümörlerin tedavisinde kullanılan deneysel bir kanser terapisi yöntemi) ile birlikte uygulandığında, hiperterminin tümörlerdeki büyümeyi inhibe edici etkisini artırdığı görülmüştür (Prasad ve diğ., 2003).

Birçok geleneksel anti-kanser ilacı (doksorubisin veya paklitaksel gibi), hücre kültürü ortamında tümör hücrelerini ancak nanomolar konsantrasyonlarda öldürebilir ve bu konsantrasyonlar normal dokularda istenmeyen toksisiteye neden olur. Fakat  $\alpha$ -TOS, tümör hücrelerini normal dokulara zarar vermeksizin, mikromolar düzeyindeki konsantrasyonlarda bile öldürebilmektedir (Neuzil ve diğ., 2004).

$\alpha$ -Tokoferol süksinatın araştırmaların odak noktasını oluşturan bir diğer önemli özelliği de kanser hücreleri üzerindeki apoptoz indükleyici etkisidir. Genetik olarak düzenlenen programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, son yıllarda kanser araştırmalarında önem kazanan bir konu haline gelmiştir. Kanser hücrelerinde apoptozu indüklemeyi hedef alan tedavi stratejileri geliştirilmektedir (Ghobrial ve diğ., 2005). Bu anlamda, literatürde  $\alpha$ -TOS'un kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkileriyle ilgili çok sayıda bilimsel çalışma mevcuttur.

Jurkat T hücrelerine  $\alpha$ -TOS'un uygulandığı bir çalışmada,  $\alpha$ -TOS'un bu hücrelerde apoptozu, doza ve zamana bağlı bir şekilde indüklediği gözlenmiştir (Neuzil ve diğ., 1999).

$\alpha$ -Tokoferol süksinatın, uygulandığı hematopoetik kanser hücre hatlarında (U937, K-562) ve kolon kanseri hücre hatlarında (HCT-116, HCT-15) apoptozu indüklediği; buna karşın, insan deri fibroblastları ve sıçan intestinal epitel hücreleri gibi normal hücrelerde dikkate değer bir apoptotik etki yaratmadığı görülmüştür (Neuzil ve diğ., 2000)

CT-26 sıçan kolon karsinoması hücre hattına hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda  $\alpha$ -TOS'un uygulandığı bir çalışmada,  $\alpha$ -TOS'un her iki ortamda da kolon kanseri tümör dormansisini teşvik ettiği gözlenmiştir. Ayrıca *in vivo* ortamda  $\alpha$ -TOS'un kolon kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, apoptozu indüklediği ve kolon kanserinin karaciğere metastazını engellediği saptanmıştır (Barnett ve diğ., 2002).  $\alpha$ -Tokoferol süksinatın *in vitro* ortamda meme kanseri ve mide kanseri hücre hatları üzerinde de apoptotik etkisinin olduğu bilinmektedir (Wu ve diğ., 2002; Yu ve diğ., 2003).

$\alpha$ -Tokoferol süksinatın beyin tümörleri üzerindeki apoptotik etkisini inceleyen sadece bir yayına rastlanmıştır. İnsan neuroblastoma (SH-SY-5Y) hücre hattı üzerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada  $\alpha$ -TOS'un bu hücre hattında apoptotik etki gösterdiği bulunmuştur (Swettenham ve diğ., 2005).

Bu tez çalışmasında, temel olarak, farklı kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri bilinen  $\alpha$ -TOS'un, glioma hücreleri üzerindeki apoptoz indükleyici etkisi araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalar, glioma araştırmalarında model sistem olarak kullanılan sıçan C6 glioma hücre hattı ile yürütülmüştür. Literatür bilgilerine göre  $\alpha$ -TOS'un C6 glioma hücreleri üzerinde % 50 öldürücülük gösteren konsantrasyonu 50  $\mu$ M'dır (Pekmez, 2010). Bu bilgiye ve literatürdeki diğer çalışmalara (Neuzil ve diğ., 2000; Prasad ve diğ., 2003) dayanılarak, 50  $\mu$ M deneylerde kullanılacak temel konsantrasyon olarak seçilmiştir.  $\alpha$ -TOS'un apoptotik etki gösterdiği alt ve üst konsantrasyonları belirlemek için 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 70  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M'lık konsantrasyonlar da uygulanmıştır. İnkübasyon süresi olarak 24, 32, 40 ve 48 saatlik periyodlar seçilmiştir.

Öncelikle bütün konsantrasyonların, her bir inkübasyon süresindeki apoptotik etkisi, apoptoza bağlı morfolojik değişimlerin Hoechst boyama yöntemiyle floresan mikroskopunda incelenmesiyle belirlenmiştir. Ayrıca mikroskopik canlı video kaydına göre 48 saatlik 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -TOS uygulamasının C6 glioma hücrelerini apoptoza götürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca tüm deney gruplarında kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesi ölçülmüştür. Kaspaz-3 ve kaspaz-9 enzim aktivitesi sonuçları, morfolojik değerlendirme sonuçlarıyla uyumludur. Mikroskopik analiz ve kaspaz-3 enzim aktivitesi sonuçlarıyla,  $\alpha$ -TOS'un C6 glioma hücrelerinde zamana ve konsantrasyona bağlı şekilde apoptozu indüklediği kanıtlanmış; kaspaz-9 enzim aktivitesi sonuçlarıyla da apoptoz indüksiyonunun mitokondriyal yolak üzerinden gerçekleştiği belirlenmiştir.

$\alpha$ -Tokoferol süksinatın hücreler üzerinde meydana getireceği etki (farklılaşma, proliferasyonun inhibisyonu ve apoptoz gibi) uygulanan  $\alpha$ -TOS konsantrasyonuna, uygulama süresine, kanser hücrelerinin tipine ve hücre kültürü koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Tümör hücrelerinde; düşük konsantrasyonlar sadece hücre farklılaşmasına ve proliferasyonun inhibisyonuna neden olabilirken, daha yüksek konsantrasyonlar apoptozu indükleyebilmektedir (Prasad ve diğ., 2003). Bu tez çalışmasında da, artan  $\alpha$ -TOS konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak, apoptotik morfoloji gösteren hücre sayısında ve kaspaz-9 aktivitesinde artış saptanmıştır. Bu da artan  $\alpha$ -TOS konsantrasyonunun ve uzayan uygulama süresinin, C6 glioma hücrelerinde oluşan apoptotik etkiyi artırdığını göstermektedir.

İnsan neuroblastoma (SH-SY-5Y) hücre hattına 12 saat süreyle 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -TOS uygulandığında, bu hücre hattında apoptoz meydana geldiği görülmüştür (Swettenham ve diğ., 2005). Bu tez çalışmasında, 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -TOS uygulamasının C6 glioma hücrelerinde apoptozu ancak 40 saatlik uygulamayla tetikleyebildiği belirlenmiştir. Bu durum glioma hücrelerinin apoptoza gösterdiği yüksek dirençten kaynaklanıyor olabilir (Furnari ve diğ., 2007). Bu bulgu aynı zamanda, neuroblastoma (SH-SY-5Y) hücrelerinin, glioma hücrelerine göre  $\alpha$ -TOS'a karşı daha duyarlı olabileceğini düşündürmektedir.

Benzer şekilde 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -TOS'un 12 saatlik uygulama sonucu hematopoetik, meme ve kolon kanseri hücre hatlarında apoptozu indükleyiyor olması (Neuzil ve diğ., 2000), bu

hücrelerin de  $\alpha$ -TOS'a duyarlılığını ve/veya gliomaların apoptoz direncini akla getirmektedir.

Kaspaz-3, apoptoz mekanizmasının tamamlanma fazında yer alan ve apoptozun sonlandırılmasından sorumlu (sonlandırıcı) kaspazlardan biridir. Kaspaz-3 hem dışsal apoptotik yolak üzerinden hem de içsel (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden aktifleşebilir. Kaspaz-3, kromatin kondensasyonundan, DNA fragmentasyonundan ve hücre iskeletine ait proteinlerin yıkımından sorumludur (Slee ve diğ., 2001). Bu nedenle bir hücrede kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesi, o hücrenin apoptoza gittiğinin en önemli kanıtlarından biridir.

Farklı kanser hücreleri üzerinde  $\alpha$ -TOS ile yapılan çalışmalarda, apoptozun tamamlanma fazında sonlandırıcı kaspaz olarak çoğunlukla kaspaz-3'ün aktifleştiği ortaya konulmuştur (Neuzil ve diğ., 1999; Yamamoto ve diğ., 2000; Wu ve diğ., 2002; Yu ve diğ., 2003). Bu tez çalışmasında da; C6 glioma hücrelerinde  $\alpha$ -TOS'un indüklediği apoptozda kaspaz-3'ün aktifleştiğinin belirlenmiş olması, söz konusu literatür çalışmalarıyla tutarlılık göstermektedir.

Apoptoz indüksiyonunda E vitamininin başlıca hedefi mitokondriyaldir. Farklı E vitamini türevleri, tümör hücrelerinin mitokondrisini hedef alarak programlanmış hücre ölümünü tetikleyen ajanlar olan "mitocan" ailesine dahildirler (Neuzil ve diğ., 2007). Örneğin  $\alpha$ -TOS; premyelositik lösemi hücrelerinde ve insan meme kanseri MDA-MB-435 hücrelerinde apoptozu mitokondriyal yolak üzerinden indüklemektedir (Yamamoto ve diğ., 2000; Yu ve diğ., 2003).

Kaspaz-9 içsel (mitokondriyal) apoptotik yolda yer alan bir enzimdir. Apoptoza giden bir hücrede kaspaz-9 aktivitesinin varlığı, o hücrenin mitokondriyal yoldan apoptoza gitmiş olabileceğinin önemli bir göstergesidir.  $\alpha$ -Tokoferol süksinatın, premyelositik lösemi hücrelerinde, Jurkat T hücrelerinde ve meme kanseri MDA-MB-435 hücrelerinde apoptozu mitokondriyal yolak üzerinden indüklediği belirlenmiştir (Yamamoto ve diğ., 2000; Yu ve diğ., 2003). Bu tez çalışmasında da C6 glioma hücrelerinde saptanan kaspaz-9 aktivitesi,  $\alpha$ -TOS'un bu hücrelerde apoptozu mitokondriyal yolak üzerinden indüklediğini göstermektedir. Literatürdeki benzer

çalışmalar dikkate alındığında,  $\alpha$ -TOS'un mitokondriyal yolaktan apoptozu indüklemesi beklenen bir sonuçtur. Başka yolların bu indüksiyondaki rolünü ve katkısını anlamak için kaspaz-8 gibi farklı enzim aktivitelerinin de belirlenmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışması,  $\alpha$ -TOS'un, konsantrasyona ve uygulama süresine bağlı olarak C6 glioma hücrelerinde apoptozu indüklediğini ve mitokondriyal apoptotik yolk enzimlerinden kaspaz-9'u aktivelediğini ortaya koymuştur.  $\alpha$ -Tokoferol süksinatın, glioma terapisinde yardımcı bir ajan olarak kullanılması açısından önemli bir potansiyel taşıdığı gösterilmiştir. Bütün bunlara ilaveten,  $\alpha$ -TOS ile kombine potansiyel terapi stratejelerinin geliştirilebilmesi için farklı apoptotik mekanizmaların da araştırılması, tüm bulguların *in vivo* çalışmalarla ve hayvan modelleriyle desteklenmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

ASHKENAZI, A. & DIXIT, V.M., 1998, Death receptors: signaling and modulation, *Science*, 281, 1305-1308.

ASHKENAZI, A., 2008, Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19, 325-331.

BARNETT, K.T., FOKUM, F.D., MALAFA, M.P., 2002, Vitamin E succinate inhibits colon cancer liver metastases, *Journal of Surgical Research*, 106, 292-298.

BENDA, P., SOMEDA, K., MESSER, J., SWEET, W.H., 1971, Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture, *Journal of Neurosurgery*, 34 (3), 310-323.

BETTI, M., MINELLI, A., CANONICO, B., CASTALDO, P., MAGI, S., AISA, M.C., PIRODDI, M., TOMASO, V.D., GALLI, F., 2006. Antiproliferative effects of tocopherols (vitamin E) on murine glioma C6 cells: homologue-specific control of PKC/ERK and cyclin signaling, *Free Radical Biology & Medicine*, 41, 464-472.

BIRNINGER, M., EYTINA, J.H., SALVATORE, B.A., NEUZIL, J., 2003, Vitamin E analogues as inducers of apoptosis: structure-function relation, *British Journal of Cancer*, 88, 1948-1955.

BOREK, C., 2004, Dietary antioxidants and human cancer, *Integrative Cancer Therapies*, 3 (4), 333-341.

BRANDES, A.A., TOSONI, A., FRANCESCH, E., RENI, M., GATTA, G., VECHT, C., 2008, Glioblastoma in adults, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 67, 139-152.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. & TRABER, M.G., 1999, Vitamin E: function and metabolism, *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13, 1145-1155.

BRILL, A., TORCHINSKY, A., CARP, H., TODER, V., 1999, The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 16 (10), 512-519.

CAMPBELL, S.E., STONE, W.L., LEE, S., WHALEY, S., YANG, H., QUI, M., GOFORTH, P., SHERMAN, D., MCHAFFIE, D., KRISHNAN, K., 2006, Comparative effects of RRR-alpha- and RRR-gamma-tocopherol on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines, *BMC Cancer*, 6 (13).

CAMPELLO, S. & SCORRANO, L., 2009, *The Mitochondrial Pathway: Focus on Shape Changes*, YIN, X.M., DONG, Z., *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*, Humana Press, USA, pp. 151-175.

CHANG, H.Y. & YANG, X., 2000, Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), 821-846.

CONSTANTINO, C., PAPAS, A., CONSTANTINO, A.I., 2008, Vitamin E and cancer: an insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs, *International Journal of Cancer*, 123, 739-752.

CORY, S. & ADAMS, J.M., 2002, The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nature Reviews Cancer*, 2, 647-656.

DANIAL, N.N. & KORSMEYER, S.J., 2004, Cell death: critical control points, *Cell*, 116, 205-219.

DEANGELIS, L.M., 2001, Medical progress: brain tumors, *The New England Journal of Medicine*, 344 (2), 114-123.

DING, W.X. & YIN, X.M., 2009, *The Bcl-2 Family Proteins*, YIN, X.M., DONG, Z., *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*, Humana Press, USA, pp. 25-61.

ELMORE, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516.

ENARI, M., SAKAHIRA, H., YOKOYAMA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A., NAGATA, S., 1998, A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature*, 391, 43-50.

ERWIG, L.P. & HENSON, P.M.; 2008, Clearance of apoptotic cells by phagocytes, *Cell Death and Differentiation*, 15, 243-250.

EVANS, H.M., BISHOP, K.S., 1922, On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 56, 650-651.

EVANS, H.M., EMERSON, O.H., EMERSON, G.A., 1936, The Isolation from wheat germ oil of an alcohol,  $\alpha$ -tocopherol, having the properties of vitamin E, *The Journal of Biological Chemistry*, 113, 319-332.

FRESHNEY, R.I., 2000, *Culture of Animal Cells*, A Manual of Basic Technique, Wiley-Liss Press, Fourth Edition.

FURNARI, F.B., FENTON, T., BACHOO, R.M., 2007, Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment, *Genes & Development*, 21, 2683-2710.

GHAVAMI, S., HASHEMI, M., ANDE, S.R., YEGANEH, B., XIAO, W., ESHRAGHI, M., BUS, C.J., KADKHODA, K., WIECHEC, E., HALAYKO, A.J., LOS, M., 2009, Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes, *Journal of Medical Genetics*, 46, 497-510.

GHOBRIAL, I.M., WITZIG, T.E., ADJEI, A.A., 2005, Targeting apoptosis pathways in cancer therapy, *A Cancer Journal for Clinicians*, 55, 178-194.

GROBBEN B., DE DEYN, P.P., SLEGGERS H., 2002, Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion, *Cell and Tissue Research*, 310, 257-270.

GUICCIARDI, M.E. & GORES, G.J., 2009, *The Death Receptor Pathway*, YIN, X.M., DONG, Z., Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research, Humana Press, USA, pp. 119-150.

HE, F. & SUN, Y.E., 2007, Glial cells more than support cells?, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 661-665.

HOLLAND, E.C., 2000, Glioblastoma multiforme: the terminator, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (12), 6242-6244.

HORVITZ, H.R., 1999, Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Cancer Research*, 59, 1701-1706.

HOVES, S., TRAPANI, J.A., VOSKOBOINIK, I., 2010, The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways, *Journal of Leukocyte Biology*, 87, 237-243.

JEONG, S.Y. & SEOL, D.W., 2008, The role of mitochondria in apoptosis, *BMB Reports*, 41 (1), 11-22.

KANG, M.H. & REYNOLDS, C.P., 2009, Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy, *Clinical Cancer Research*, 15 (4), 1126-1132.

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.

KERR, J.F.R., WINTERFORD, C.M., HARMON, B.V., 1994, Apoptosis its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer*, 73, 2013-2026.

KING, K.L. & CIDLOWSKI, J.A., 1998, Cell cycle regulation and apoptosis, *Annual Review of Physiology*, 60, 601-617.

KLINE, K., LAWSON, K.A., YU, W., SANDERS, B.G., 2007, Vitamin E and cancer, *Vitamins and Hormones*, 76, 435-461.



KUMAR, B., JHA, M.N., COLE, W.C., BEDFORD, J.S., PRASAD, K.N., 2002, D-Alpha tocopheryl succinate (vitamin E) enhances radiation-induced chromosomal damage levels in human cancer cells but reduces it in normal cells, *Journal of the American College of Nutrition*, 21 (4), 339-343.

LASSMAN, A.B., 2004, Molecular biology of gliomas, *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 4, 228-233.

LI, L.Y., LUO, X., WANG, X., 2001, Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, *Nature*, 412, 95-99.

LIEBERMAN, J. & FAN, Z., 2003, Nuclear war: the granzyme A-bomb, *Current Opinion in Immunology*, 15, 553-559.

LOO, G., SAELENS, X., GURP, M., MACFARLANE, M., MARTIN, S.J., VANDENABEELE, P., 2002, The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet, *Cell Death and Differentiation*, 9, 1031-1042.

LOUIS, D.N., POMEROY, S.L., CAIRNCROSS, J.G., 2002, Focus on central nervous system neoplasia, *Cancer Cell*, 1, 125-128.

MAJNO, G. & JORIS, I., 1995, Apoptosis, oncosis, and necrosis an overview of cell death, *American Journal of Pathology*, 146 (1), 3-15.

MALAFA, M.P., FOKUM, F.D., SMITH, L., LOUIS, A., 2002. Inhibition of angiogenesis and promotion of melanoma dormancy by vitamin E Succinate, *Annals of Surgical Oncology*, 9 (10), 1023-1032.

MAREK, C.J. & ERWIG, L.P., 2009, *Clearance of Apoptotic Cells-Mechanisms and Consequences*, YIN, X.M., DONG, Z., *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*, Humana Press, USA, pp. 261-282.

MARTINEZ, R., SETIEN, F., VOELTER, C., CASADO, S., QUESADA, M.P., SCHACKERT, G., ESTELLER, M., 2007, CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme, *Carcinogenesis*, 28 (6), 1264-1268.

MATÉS, J.M. & SÀNCHEZ-JIMÉNEZ, F.M., 2000, Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32, 157-170.

MATTSON, M.P., 2000, Apoptosis in neurodegenerative disorders, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1, 120-130.

NEUZIL, J., SVENSSON, I., WEBER, T., WEBER, C., BRUNK, U.T., 1999,  $\alpha$ -tocopheryl succinate-induced apoptosis in Jurkat T cells involves caspase 3 activation, and both lysosomal and mitochondrial destabilisation, *FEBS Letters*, 445, 295-300.

NEUZIL, J., WEBER, T., GELLERT, N., WEBER, C., 2000, Selective cancer cell killing by  $\alpha$ -tocopheryl succinate, *British Journal of Cancer*, 84 (1), 87-89.

NEUZIL J., 2003, Vitamin E succinate and cancer treatment: a vitamin E prototype for selective antitumor activity, *British Journal of Cancer*, 89, 1822-1826.

NEUZIL, J., TOMASETTI, M., MELLICK, A.S., ALLEVA, R., SALVATORE, B.A., BIRRINGER, M., FARISS, M.W., 2004, Vitamin E analogues: a new class of inducers of apoptosis with selective anti-cancer effects, *Current Cancer Drug Targets*, 4, 355-372.

NEUZIL, J., TOMASETTI, M., ZHAO, Y., DONG, L.F., BIRRINGER, M., WANG, X.F., LOW, P., WU, K., SALVATORE, B.A., RALPH, S.J., 2007, Vitamin E analogs, a novel group of “mitocans”, as anticancer agents: the importance of being redox-silent, *Molecular Pharmacology*, 71 (5), 1185-1199.

O'DAY, D.H., 2006, *Animated Cell Biology Apoptosis* [online], <http://www.utm.utoronto.ca/~w3cellan/apoptosis.html> [Ziyaret Tarihi: 17 Temmuz 2011].

OHGAKI, H. & KLEIHUES, P., 2005, Epidemiology and etiology of gliomas, *Acta Neuropathologica*, 109: 93-108.

OPFERMAN, J.T., 2008, Apoptosis in the development of the immune system, *Cell Death and Differentiation*, 15, 234-242.

PEKMEZ, M., 2010, *Glioma Hücrelerinde İndometasinin Meydana Getirdiği Moleküler Hasarlar Üzerine E Vitamininin Etkileri*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

PRASAD, K.N., EDWARDS-PRASAD, J., 1982, Effects of tocopherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture, *Cancer Research*, 42,550-554.

PRASAD, K.N., KUMAR, B., YAN, X.D., HANSON, A.J., COLE, W.C., 2003,  $\alpha$ -Tocopheryl succinate, the most effective form of vitamin E for adjuvant cancer treatment: a review, *Journal of the American College of Nutrition*, 22 (2), 108-117.

REED, J.C., 2008, Bcl-2 family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects, *Blood*, 111, 3322-3330.

RICCIARELLI, R., ZINGG, J.M., AZZI, A., 2001, Vitamin E 80<sup>th</sup> anniversary: a double life, not only fighting radicals, *IUBMB Life*, 52, 71-76.

RICCIARELLI, R., ARGELLATI, F., PRONZATO, M.A., DOMENICOTTI, C., 2007, Vitamin E and neurodegenerative diseases, *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 591-606.

RIEDL, S.J. & SCOTT, F.L., 2009, *Caspases: Activation, Regulation, and Function*, YIN, X.M., DONG, Z., *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*, Humana Press, USA, pp. 3-24.

ROSHAL, M., ZHU, Y., PLANELLES, V., 2001, Apoptosis in AIDS, *Apoptosis*, 6, 103-116.

SAKAHIRA, H., ENARI, M., NAGATA, S., 1998, Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature*, 391, 96-99.

SAKAI, M., OKABE, M., TACHIBANA, H., YAMADA, K., 2006, Apoptosis induction by  $\gamma$ -tocotrienol in human hepatoma Hep3B cells, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 672-676.

SARASTE, A. & PULKKI, K., 2000, Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovascular Research*, 45, 528-537.

SARRIA, A. & PRASAD, K.N., 1984, dI- $\alpha$ -Tocopheryl succinate enhances the effect of  $\gamma$ -irradiation on neuroblastoma cells in culture, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 175, 88-92.

SAVILL, J. & FADOK, V., 2000, Corpse clearance defines the meaning of cell death, *Nature*, 407, 784-788.

SHI, Y., 2009, *Structural Biology of Programmed Cell Death*, YIN, X.M., DONG, Z., *Essentials of Apoptosis: A guide for Basic and Clinical Research*, Humana Press, USA, pp. 95-118.

SINGH, S. & DIKSHIT, M., 2007, Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide, *Brain Research Reviews*, 54, 233-250.

SLEE, E.A., ADRAIN C., MARTIN, S.J., 2001, Executioner caspases-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (10), 7320-7326.

SUN, S.Y., HAIL, N., LOTAN, R., 2004, Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention, *Journal of the National Cancer Institute*, 96 (9), 662-672.

SURE, B., 1924, Dietary requirement for reproduction. II. The existence of a specific vitamin for reproduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 58, 693-709.

SWETTENHAM, E., WITTING, P.K., SALVATORE, B.A., NEUZIL, J., 2005,  $\alpha$ -Tocopheryl succinate selectively induces apoptosis in neuroblastoma cells: potential therapy of malignancies of the nervous system?, *Journal of Neurochemistry*, 94, 1448-1456.

TAYLOR, R.C., CULLEN, S.P., MARTIN, S.J., 2008, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 231-241.

THIELE, J.J. & EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S., 2007, Vitamin E in human skin: organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology, *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 646-667.

THORNBERRY, N.A. & LAZEBNIK, Y., 1998, Caspases: enemies within, *Science*, 281, 1312-1316.

THORBURN, A., 2004, Death receptor-induced cell killing, *Cellular Signalling*, 16, 139-144.

TRAPANI, J.A. & SMYTH, M.J., 2002, Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway, *Nature Reviews Immunology*, 2, 735-747.

WANG, X., 2001, The expanding role of mitochondria in apoptosis, *Genes & Development*, 15, 2922-2933.

WANG, X.F., DONG, L., ZHAO, Y., TOMASETTI, M., WU, K., NEUZIL, J., 2006, Vitamin E analogues as anticancer agents: lessons from studies with  $\alpha$ -tocopheryl succinate, *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 675-685.

WILLINGHAM, M.C., 1999, Cytochemical methods for the detection of apoptosis, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47 (9), 1101-1109.

WORTH, A., THRASHER, A.J., GASPAR, H.B., 2006, Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype, *British Journal of Haematology*, 133, 124-140.

WU, K., LI, Y., ZHAO, Y., SHAN, Y.J., XIA, W., YU, W.P., ZHAO, L., 2002, Roles of Fas signaling pathway in vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells, *World Journal of Gastroenterology*, 8 (6), 982-986.

YAMAMOTO, S., TAMAI, H., ISHISAKA, R., KANNO, T., ARITA, K., KOBUCHI, H., UTSUMI, K., 2000, Mechanism of  $\alpha$ -tocopheryl succinate-induced apoptosis of promyelocytic leukemia cells, *Free Radical Research*, 33, 407-418.

YOULE, R.J. & STRASSER, A., 2008, The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 47-59.

YU, W., SANDERS, B.G., KLINE, K., 2003, RRR- $\alpha$ -tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria, *Cancer Research*, 63, 2483-2491.

YU, W., PARK, S.K., JIA, L., TIWARY, R., SCOTT, W.W., LI, J., WANG, P., SIMMONS-MENCHACA, M., SANDERS, B.G., KLINE, K., 2008, RRR- $\gamma$ -tocopherol induces human breast cancer cells to undergo apoptosis via death receptor 5 (DR5)-mediated apoptotic signaling, *Cancer Letters*, 259 (2), 165-176.

ZHANG, A., WU, Y., LAI, H.W.L., YEW, D.T., 2004, Apoptosis- a brief review, *Neuroembryology*, 5 (3), 47-59.

ZIEGLER U. & GROSCURTH, P., 2004, Morphological features of cell death, *News in Physiological Sciences*, 19, 124-128.

ZINGG, J.M., 2007, Vitamin E: an overview of major research directions, *Molecular Aspects of Medicine*, 28, 400-422.

## ÖZGEÇMİŞ

01.01.1984 tarihinde Ankara'da doğdum. Bahariye İlköğretim Okulu'nda ilköğrenimimi tamamladım. Lise öğrenimimi gördüğüm Kadıköy Anadolu Lisesi'nden 2004 yılında mezun oldum. Aynı yıl, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yükseköğrenimime başladım ve 2008 yılında mezun oldum. Aynı sene, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitimime başladım.