

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

RHO KİNAZ VE SİKLOOKSİJENAZ İNHİBİTÖRLERİ İLE
SİKLOFOSFAMİD KOMBİNASYONLARININ ÇEŞİTLİ TÜMÖR
HÜCRE SERİLERİNE ETKİLERİ

Ebru DERİCİ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

MERSİN-2007

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**RHO KİNAZ VE SİKLOOKSİJENAZ İNHİBİTÖRLERİ İLE
SİKLOFOSFAMİD KOMBİNASYONLARININ ÇEŞİTLİ TÜMÖR
HÜCRE SERİLERİNE ETKİLERİ**

Ebru DERİCİ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE
TTB (ED) 2006-1 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....

MERSİN-2007

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Rho Kinaz ve Siklooksijenaz İnhibitörleri ile Siklofosfamid Kombinasyonlarını Çeşitli Tümör Hücre Serilerine Etkileri” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:...../...../2007

Prof. Dr. M. Emin ERDAL
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Osman DEMİRHAN
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Ayla ÇELİK
Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulununtarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince, bıkmadan gösterdiği bilimsel yol gösterici tutumu ile bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yetişmemde kuşkusuz en büyük emeği olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ'e;

Bu çalışma için bölüm olanaklarını kullanmam konusunda ve tez izleme komitesindeki katkılarından dolayı anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a;

Lisans eğitimime başladığım zamandan itibaren desteğini her zaman hissettiğim hocam Sayın Doç. Dr. Etem AKBAŞ'a;

Tezimin başlangıcından itibaren desteğini benden esirgemeyen, fikirleri ile bana yol gösteren ve bu çalışma için gerekli laboratuvar koşullarını sağlayan Farmakoloji anabilim dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR'a;

Bu çalışmadaki deneysel sürecin her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, destek ve yapıcı eleştirileri ile bana yol gösteren Dr. A. Ata ÖZÇİMEN'e;

Bu çalışmam sırasında fikirleri ve bölüm olanaklarından yararlanmam konusundaki katkılarından dolayı Biyokimya anabilim dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Lülüfer TAMER, Sayın Doç. Dr. Gülçin ESKANDARİ, Sayın Doç. Dr. Burak ÇİMEN'e ve Biyokimya anabilim dalı merkez laboratuvarında görevli Sayın Kimyager Cemil GÜLÜM'e;

Bu çalışmanın şekillenmesinde fikirleri ile bana yol gösteren Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Öznur DÜZOVALI'ya;

Tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN'e ve Arş. Gör. İter HELVACI'ya;

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, yardım ve arkadaşlıkları ile desteklerini her zaman hissettiğim asistan arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Dr. R. Nalan TİFTİK, Arş. Gör. A. Hakan KURT ve tüm mesai arkadaşlarıma;

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışmam sırasında da her zaman yanımda ve bana destek olan anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Apoptoz	4
2.1.1. Tanım ve Tarihçe.....	4
2.1.2. Apoptoz Mekanizmaları.....	5
2.1.2.1. Mitokondri/Sitokrom–c aracılı apoptoz.....	9
2.1.2.2. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi.....	10
2.1.2.3. Endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptoz.....	12
2.1.3. Apoptozun Genetik Kontrolü ve Antiapoptotik/Proapoptotik Proteinler..	12
2.1.4. Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler..	14
2.1.5. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar	16
2.1.6. Apoptozun saptanmasında kullanılan yöntemler.....	18
2.1.7. Apoptoz ve Kanser.....	23
2.1.7.1. Kanser Tedavisi ve Kemoterapötikler.....	24
2.2. Rho kinaz yolağı.....	27
2.3. Nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar (NSAİİ).....	29
2.3.1. COX Enzim İnhibitörleri.....	32
2. 4. Hücre Kültürü.....	33
2.4.1. Hücre Kültürünün Kullanım Alanları.....	35
2.4.2. Hücre Kültürlerinin Avantaj ve Dezavantajları.....	36
2.4.3. Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları.....	37
2.5. Akım Sitometre ve Kullanım Alanları.....	39

3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	43
3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar.....	43
3.1.2. İlaç ve Sitotoksisite Deneyinde Kullanılan Kimyasallar.....	44
3.1.3. Gen Ekspresyonu Saptanmasında Kullanılan Kimyasallar.....	44
3.1.4. Protein Ekspresyonu Saptanmasında Kullanılan Kimyasallar.....	45
3.1.5. Akım Sitometre’de Kullanılan Kimyasallar.....	46
3.1.6. Kullanılan Çözeltilerin İçerikleri.....	46
3.2. Kullanılan Yöntemler.....	49
3.2.1. Hücre Kültürü.....	50
3.2.2. <i>In vitro</i> Sitotoksisite Deneyi.....	52
3.2.3. Gen Ekspresyonu Deneyleri.....	52
3.2.3.A. E.Z.N.A. Total RNA Kiti ile RNA izolasyonu.....	55
3.2.3.B. First Strand cDNA Sentez Kiti ile cDNA Eldesi.....	55
3.2.3.C. Realtime Revers Transkriptaz RT-PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi.....	56
3.2.4. Protein Ekspresyonu Deneyleri	
3.2.4.A. Protein Eldesi.....	57
3.2.3.B. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	57
3.2.3.C. Western Blot Analizi.....	58
3.2.5. Akım Sitometre Deneyleri.....	61
3.3. İstatistiksel Analizler.....	62
4. BULGULAR	64
4.1. Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 İçin Gen Ekspresyonu Bulguları.....	64
4.2. Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 İçin Protein Ekspresyonu Bulguları.....	71
4.3. Akım Sitometri Bulguları.....	73
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
7. KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	96

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Kaspazların aktivasyonu	7
Şekil 2.2: Apoptozdaki sinyal yolları	9
Şekil 2.3: Apoptozom kompleksi	10
Şekil 2.4: TNF aracılı apoptoz	11
Şekil 2.5: Bcl-2 ailesi ve apoptoz ilişkisi	13
Şekil 2.6: Apoptozdaki morfolojik değişiklikler	14
Şekil 2.7: ROCK1 ve ROCK2'nin moleküler yapısı	28
Şekil 2.8: Prostaglandin sentez basamakları	31
Şekil 2.9: K-562 hücre hattı	34
Şekil 2.10: SK-N-MC hücre hattı	35
Şekil 2.11: Akım sitometre cihazının işleyiş şeması	41
Şekil 3.1: Neuber-hemositometrede hücre sayımı	51
Şekil 3.2: TaqMan sisteminde kullanılan prob	54
Şekil 3.3: Proben tek sarmal hale getirilen kalıp DNA'ya bağlanması.....	54
Şekil 3.4: Raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması	54
Şekil 3.5: Western blot işleminin şematik görünümü	60
Şekil 3.6: AnnexinV-FITC ile fosfatidil serin ilişkisi	62
Şekil 4.1: K-562 hücre hattında, 24 saat sonunda kaspaz-3 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.....	64
Şekil 4.2: K-562 hücre hattında, 24 saat sonunda kaspaz-8 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.....	65
Şekil 4.3: K-562 hücre hattında, 24 saat sonunda GAPDH geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.....	65
Şekil 4.4: K-562 hücre hattında, 24. saatte kaspaz-3 geni için protein ekspresyonu bantları.....	71
Şekil 4.5: K-562 hücre hattında, 48. saatte kaspaz-3 geni için protein ekspresyonu bantları.....	72
Şekil 4.6: SK-N-MC hücre hattında, 24. saatte kaspaz-3 geni için protein ekspresyonu bantları.....	72

Şekil 4.7: SK–N–MC hücre hattında, 48. saatte kaspaz–3 geni için protein ekspresyonu bantları.....	73
Şekil 4.8: K–562 hücrelerinde, canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi (negatif ve pozitif kontrol).....	74
Şekil 4.9: K–562 hücrelerinde, canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi (C6Y5 grubu).....	74
Şekil 4.10: K–562 hücrelerinde, canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi (C6 grubu).....	74
Şekil 4.11: K–562 hücrelerinde, canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi (Y5 grubu).....	75
Şekil 4.12: K–562 hücrelerinde, canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi (C7 grubu).....	75
Şekil 4.13: K–562 hücrelerinde, canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi (N7 grubu).....	75
Şekil 4.14: K–562 hücrelerinde, canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi (N8 grubu).....	76
Şekil 4.15: K–562 hücrelerinde, canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi (N8Y5 grubu).....	76
Şekil 4.16: K–562 hücrelerinde, canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi (N7Y5 grubu).....	76
Şekil 4.17: K–562 hücrelerinde, canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi (C7Y5 grubu).....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: İnsan kaspaz ailesi.....	5
Çizelge 2.2: Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması.....	17
Çizelge 2.3: COX-1 ve COX-2 arasındaki farklılıklar.....	32
Çizelge 2.4: Hücre kültürü besiyerinin bileşenleri.....	39
Çizelge 4.1: K-562 hücre hattında kaspaz-3 geni için 24. saatte E değeri ort.....	66
Çizelge 4.2: K-562 hücre hattında kaspaz-3 geni için 48. saatte E değeri ort.....	67
Çizelge 4.3: K-562 hücre hattında kaspaz-8 geni için 24. saatte E değeri ort.....	67
Çizelge 4.4: K-562 hücre hattında kaspaz-8 geni için 48. saatte E değeri ort.....	68
Çizelge 4.5: SK-N-MC hücre hattında kaspaz-3 geni için 24. saatte E değeri ort.....	69
Çizelge 4.6: SK-N-MC hücre hattında kaspaz-3 geni için 48. saatte E değeri ort.....	69
Çizelge 4.7: SK-N-MC hücre hattında kaspaz-8 geni için 24. saatte E değeri ort.....	70
Çizelge 4.8: SK-N-MC hücre hattında kaspaz-8 geni için 48. saatte E değeri ort.....	70
Çizelge 4.9: K-562 hücre hattında 24. saatteki canlı hücre ort.....	77
Çizelge 4.10: K-562 hücre hattında 24. saatteki erken apoptotik hücre ort.....	78
Çizelge 4.11: K-562 hücre hattında 24. saatteki geç apoptotik hücre ort.....	78
Çizelge 4.12: K-562 hücre hattında 24. saatteki nekrotik hücre ort.....	79
Çizelge 4.13: K-562 hücre hattında 48. saatteki canlı hücre ort.....	79
Çizelge 4.14: K-562 hücre hattında 48. saatteki erken apoptotik hücre ort.....	80
Çizelge 4.15: K-562 hücre hattında 48. saatteki geç apoptotik hücre ort.....	80
Çizelge 4.16: K-562 hücre hattında 48. saatteki nekrotik hücre ort.....	81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIF:	Apoptoz–indükleyici faktör
APAF–1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör–1
APS:	Amonyumperoksodisülfat
CAD:	Kaspazın etkinleştirdiği deoksiribonükleaz
cDNA:	Komplementer deoksiribonükleik asit
COX:	Siklooksijenaz
CP:	Geçiş noktası
DD:	Ölüm bölgesi
DISC:	Ölüm başlatan sinyal kompleksi
DNA:	Deoksiribonükleik asit
E:	Ekspresyonların rölatif oranı
EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
ER:	Endoplazmik retikulum
FADD:	Fas ile ilişkili ölüm bölgesi
FasL:	Fas ligand
GAPDH:	Gliseraldehidfosfat dehidrogenaz
GTP:	Guanozin trifosfat
IAP:	İnhibitör apoptoz proteini
ICAD:	Kaspazla–aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü
NSAİİ:	Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar
PBS:	Fosfat tampon çözeltisi
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PG:	Prostaglandin
RNA:	Ribonükleik asit
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
TBS:	Tris tamponu
TBS–T:	Tween içeren tris tamponu

TNF: Tumor nekroz faktör
TNFR: Tumor nekroz faktör reseptörü
TRADD: TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgesi
TRAF: TNF reseptörü ile ilişkili faktör

ÖZET

Rho Kinaz ve Siklooksijenaz İnhibitörleri ile Siklofosfamid Kombinasyonlarının Çeşitli Tümör Hücre Serilerine Etkileri

Apoptoz programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır. Yapım ve yıkım yani apoptoz arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozun lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogenezinde katkıda bulunur. Apoptozun yavaşladığı durumlarda otoimmün hastalıklar ve kanser ortaya çıkmaktadır. Kanser, hücrelerin proliferasyon ve diferansiyasyon mekanizmalarındaki bozulma ile ortaya çıkmaktadır. Farklı birçok kanser çeşidinde siklofosfamid yaygın olarak kullanılan bir alkilleyici ajandır.

Rho GTPaz'lar hücre büyümesi, gelişmesi, apoptoz, tümörigenezis ve metastaz gibi çeşitli hücre fonksiyonlarında görevli olan proteinlerin bir ailesidir. Siklooksijenazlar (COX), araşidonik asitten prostaglandinlerin ve diğer bazı eikozanoidlerin oluşmasını katalize ederler. Rho GTPaz'lar, NF- κ B bağımlı mekanizma ile epitel hücrelerde COX-2 ekspresyonunu indükler. COX-2 inhibitörleri, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak bir antianjiogenik ajan olarak kullanılmakta ve apoptozu indüklemektedir.

Bu çalışmada insan nöroblastoma SK-N-MC ve insan kronik miyeloid lösemi K-562 hücre hatlarında Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632, spesifik COX-2 inhibitörü olan niflumik asit ve siklofosfamid maddelerinin, apoptoz ve dolayısıyla tümör regresyonuna etkileri araştırılmıştır. Oluşturulan deney gruplarında, apoptotik genler olan kaspaz-3 ve kaspaz-8 için gen ve protein ekspresyonu düzeylerindeki değişiklikler, ayrıca akım sitometrik analizler ile canlılık ve apoptoz oranları incelenmiştir.

K-562 hücre hattında kaspaz-3 geni için negatif kontrole göre N7, C7, C6, Y5, N8Y5 ve C7Y5 gruplarındaki ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir

artış saptanmıştır. K-562 hücre hattında kaspaz-8 geni için negatif kontrole göre tüm gruplarda ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. SK-N-MC hücre hattında kaspaz-3 geni için negatif kontrole göre N8, N8Y5 ve N7Y5 gruplarındaki ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. SK-N-MC hücre hattında kaspaz-8 geni için negatif kontrole göre N8 grubundaki ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır.

Çalışılan her iki hücre hattında da kaspaz-3 ve kaspaz-8 proteinleri için negatif kontrol, N8Y5 ve N7Y5 gruplarında ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Çalışılan diğer gruplar için herhangi bir sonuç elde edilemediğinden dolayı değerlendirmeye alınamamıştır. Akım sitometrik analizler sonucunda, K-562 hücre hattında 24. saatte canlı hücre grubunda N8Y5 ve N7Y5; erken apoptotik hücre grubunda N8Y5; geç apoptotik hücre grubunda N8, N8Y5 ve C6Y5; nekrotik hücre grubunda ise N7 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır. 48. saatte negatif kontrole göre sadece erken apoptotik hücre grubunda N8, N7, C6, Y5, N8Y5, N7Y5, C7Y5 ve C6Y5 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgular, Rho kinaz ve COX inhibitörü ile siklofosfamid kombinasyonlarının, apoptozu kısmen de olsa indükleyebileceğine ve tümör regresyonuna katkıda bulunabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Kanser hücre serileri, apoptoz, Y-27632, niflumik asit, siklofosfamid

ABSTRACT

The Effects of Rho kinase and cyclooxygenase inhibitors and their combinations with cyclophosphamide in various tumor cell lines

Apoptosis is a process of programmed cell death mechanism. Anabolism and catabolism or apoptosis is balanced. Loss its equilibrium opposed or favor to apoptosis to give help pathogenesis of many disease. Autoimmune disease and cancer appear to regression of apoptosis. Cancer exists of damaged cell proliferation and differentiation mechanism. Cyclophosphamide is an alkylating agent widely used in many cancer types.

Rho GTPases are a multimember family of proteins involved in diverse cellular functions that relate to cell growth, development, apoptosis, tumorigenesis, and metastasis. Cyclooxygenase (COX) catalyses the conversion of arachidonic acid to prostaglandins and certain eicosanoids. Rho GTPases induce cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in epithelial cells by a NF- κ B-dependent mechanism. COX inhibitors use antiangiogenic agent and induce apoptosis in vivo and in vitro.

In this study we investigated the effects of Rho kinase inhibitor Y-27632, specific COX-2 inhibitor niflumic acid and cyclophosphamide on apoptosis and tumor regression in human neuroblastoma SK-N-MC and human chronic myeloid leukemia K-562 cell lines. In experiment groups analyzed gene and protein expression level of caspase-3 and caspase-8 and cell viability and apoptosis by flow cytometrically.

We observed the significantly increase in caspase-3 gene expression level compared negative control in N7, C7, C6, Y5, N8Y5 and C7Y5 groups and caspase-8 gene expression levels increase all experiment group compare negative groups in K-562 cell lines. Besides we demonstrated the significantly increase in caspase-3 gene expression level compared negative control in N8, N8Y5 and N7Y5 groups and

caspase-8 gene expression levels increase in N8 group compare negative groups in SK-N-MC cell lines.

We did not find any difference each cell lines between negative controls, N8Y5 and N7Y5 groups in expression levels in caspase-3 and caspase-8 proteins ($p>0.05$). Other all groups could not evaluate because of the absence of the western blotting result. We demonstrated that significantly increase in N8Y5 and N7Y5 groups to viable cell portion; in N8Y5 group to primer apoptotic portion; in N8, N8Y5 and C6Y5 groups to secondary apoptotic portion; in N7 group to necrotic portion by flow cytometric analyses.

In conclusion our observation indicates that rho kinase and COX inhibitors and cyclophosphamide combination induce apoptosis partly and conduce to tumor regression.

Key Words: Cancer cell lines, apoptosis, Y-27632, niflumic acid, cyclophosphamide

1. GİRİŞ

Apoptoz, klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozdan birçok özelliği açısından oldukça farklı bir programlanmış hücre ölümüdür. Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz apoptozla vücuttan uzaklaştırılarak yerine yenileri yapılmaktadır. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptoz) arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozun lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogenezinde katkıda bulunur, bu nedenle apoptoz organizmada doğru bir şekilde işlemelidir, olmaması gerekirken gerçekleşen apoptoz veya hızlanmış ya da tam tersine yavaşlamış apoptoz organizma için tehlikelidir. Apoptozun gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü ve ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken; apoptozun yavaşladığı hastalıklara örnek olarak otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir (1,2,3,4).

Kanser, tüm ırk ve yaş gruplarında insanları etkileyen bir hastalıktır ve “Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu”nun verilerine göre, ülkemizde gerçekleşen ölümlerde kalp–damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Temel olarak kanser, hücrelerin proliferasyon ve diferansiyasyon mekanizmalarındaki bozulma ile ortaya çıkmaktadır. Kanserli bir hücrede apoptotik mekanizma bozulmuştur ve hücre ölümsüz hale gelmiştir. Kanserde vücudun diğer bölgelerine yayılmadan erken tedavi önemlidir. Kanser tanısı ne kadar erken konursa, tedavisi o kadar erken başlar ve erken başlanan tedavi ile başarıya ulaşma şansı da o kadar yüksek olur (5).

Kanser tedavisi cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi ve biyolojik tedavi olmak üzere dört ana gruba ayrılır. Birçok kanser için cerrahi olarak çıkarılma eğer mümkünse kalıcı tedavi sağlanmaktadır. Eğer kanser metastaz yapmış ise kemoterapi veya radyoterapi kullanılmaktadır (6).

Kemoterapi tüm kanser tiplerinde temel tedavi şekli olarak önemini korumaktadır. İlaçla tedavinin amacı, proliferasyonu önlemek ve kanser hücrelerini

öldürmektir. Normal dokuya zarar vermeden kanser hücrelerini öldüren ideal bir kanser ilacı bulunmamaktadır. Tedavi için ilaçların seçimi, toksisitelerine karşı elde edilen yararlıklarının kıyaslandığı terapötik indeks aralıkları hesaplanarak yapılmaktadır. Günümüzde kullanılan kemoterapötikler; DNA'yı etkileyenler (alkilleyici ajanlar), mikrotübülleri etkileyenler ve hormon benzeri reseptörleri etkileyenler olmak üzere üç genel kategoride gruplandırılırlar (6,7,8).

Alkilleyici ilaçların en fazla kullanılanı siklofosfamiddir. Akut ve kronik lenfositik lösemi, Hodgkin-dışı lenfomalar, pediatrik solid tümörler, meme, over, baş-boyun kanserleri gibi hem hematolojik hem de solid tümörlerin tedavisinde başarılı bulunmuştur (6,7)

Rho GTPaz'lar hücre büyümesi, gelişmesi, apoptoz, tümör oluşumu ve metastaz gibi çeşitli hücre fonksiyonlarda görevli olan proteinlerin bir ailesidir. Rho proteinleri NF- κ B, E2F ve Stat3a gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri aracılığı ile transkripsiyonu düzenlerler (9).

Siklooksijenazlar (COX), araşidonik asitten prostaglandinlerin ve diğer bazı eikozanoidlerin oluşmasını katalize ederler. Farklı genler tarafından sentezlenen COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki izoformu olduğu gösterilmiştir. Her iki enzim de hücrelerde membranlara yerleşmiştir. Membranda çeşitli faktörlerin etkisiyle fosfolipidlerden koparılan araşidonik asidi metabolize ederler. COX-1 ve COX-2 arasındaki en önemli fark, COX-1'in esas olarak yapısal olmasıdır. COX-2 ise bir çeşit reaktif protein sayılabilir ve üretildiği hücrelerde sentezini stimüle eden bir uyarı yoksa sentezi duraklar. Bu nedenle COX-2 uyarılabilen bir enzimdir (7).

Rho GTPazlar, NF- κ B bağımlı mekanizma ile epitel hücrelerde COX-2 ekspresyonunu uyarır. Kolon, meme, pankreas, akciğer ve baş-boyun skuamoz hücreli karsinomayı içeren çeşitli insan tümörlerinde, COX-2 proteininin yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir (9,10,11).

Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) özellikle artrit, osteoartrit ve benzeri romatizmal hastalıklar gibi genellikle inflamasyona bağlı ve uzun süreli analjezik ilaç verilmesini gerektiren durumlarda yararlıdırlar; bağımlılık yapmamaları, antiinflamatuvar etkilerinin bulunması ve terapötik etkilerine karşı tolerans oluşmaması bu grup ilaçların terapötik değerini arttırır (12). Son yıllarda yapılan çalışmalar, NSAİİ ile kanser insidansının azalması arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Bu konu ile ilgili olarak özellikle kolorektal ve meme kanserlerini önlediğine ilişkin veriler yayınlanmış olmakla birlikte, yeni yapılan çalışmalarda diğer malignan hastalık tiplerinde de NSAİİ'lerin benzer etkilerinin olduğu gösterilmiştir (13).

NSAİİ, etkilerini COX enzim inhibisyonu sonucu prostaglandin oluşumunu inhibe ederek gösterirler. Tümörlerde COX-2'nin yüksek ekspresyonunun, anjiogenezisi uyardığı gösterilmiştir. Anjiogenezis ise, kanserlerin invaziv forma geçişinde ve metastazdaki temel basamaktır. COX-2'nin yüksek orandaki ekspresyonu, apoptoza olan direnci arttırmaktadır. Bu direnç, COX-2'nin bir ürünü olan prostaglandin E2'nin yüksek seviyede olmasına yanıtta ortaya çıkan ve antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'nin üretimini artırması ile gerçekleşir. Birçok kanser türünde COX-2'nin yüksek oranda ekspresyonu, hastalığın ilerlemesi ve kötü prognoz ile ilişkilidir. COX-2 inhibitörlerinin, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak bir antianjiogenik ajan olduğu ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (14,15,16,17).

Bu çalışmada insan nöroblastoma SK-N-MC ve lösemi K-562 hücre hattında, son yıllarda çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak kullanılan Rho kinaz ve COX inhibitörleri ile siklofosamid kombinasyonlarının, apoptoz üzerindeki etkilerinin *in vitro* araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. APOPTOZ

2.1.1. Tanım ve Tarihçe

Yüksek organizmalarda hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Klasik hücre ölümü *nekroz* olarak adlandırılır. Şiddetli bir travma, zararlı bir uyarı ile meydana gelir ve genellikle gruplar halinde hücreleri etkiler. Hücre ölümünün diğer şekli olan *apoptoz*, genellikle tek tek hücreleri etkiler, birçok fizyolojik ve patolojik koşulda ortaya çıkar ve genellikle inflamatuvar yanıt söz konusu değildir (1).

Apoptoz, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Hücrenin yaşam süresi, hücre tipine göre değişmektedir, örneğin; barsak hücreleri 3–5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürken, derinin epidermal hücreleri 20–25 günlük bir süre sonunda ölmektedirler, işte bu hücre ölümleri apoptozla gerçekleşir. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli “fizyolojik hücre ölümü” olarak da adlandırılır (1,2,3).

Fizyolojik olarak oluşan hücre ölümü uzun yıllardır bilinmesine rağmen “*apoptosis*” terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar tarafından kullanılmıştır. Eski Yunancada “*apo*” (ayrı) ve “*ptosis*” (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılan bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi kuruyarak vücudu terk etmesi ve arkadan gelen hücrelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, Yunan tarihçisi James Cormack’ın önerisiyle “apoptoz” olarak adlandırılmıştır (2,3).

Wyllie, 1980 yılında deneysel apoptozu, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA’sının

elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir. 1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozu seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptoza yönlendirdiğini bildirmiştir. Böylece apoptozun genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır (1).

Apoptotik yol çok sayıda fizyolojik, adaptif ve patolojik olayda kullanılır. Embriyogenez sırasında normal gelişim sağlanabilmesi amacıyla, daha önce oluşan hücrelerin bir kısmı apoptoza gitmektedir. Özellikle sinir sisteminin ve immün sistemin gelişimi, intrauterin gelişimi sırasında el ve ayak parmakları arasındaki hücrelerin yıkılması, böbrek taslaklarının dejenerasyonu gibi olaylarda apoptoz önemli rol oynamaktadır. Erişkinlerde hormon yetmezliğine bağlı olarak gelişen organ regresyonunda örneğin; menstruasyonda endometrial hücre yıkımı, menopozda ovaryum follüküllerinin atrezisi gibi durumlarda apoptoz rol oynamaktadır. Ayrıca proliferasyona uğrayan hücre topluluklarında (örn; barsak kript epiteli), tümörlerin regresyona gittikleri dönemde ve çeşitli viral hastalık durumlarında da apoptoz olmaktadır. Bunun yanı sıra hücrelerde hasar oluşturan çeşitli etkenler normalde nekroza neden olurken düşük dozlarda apoptoz oluşturabilmektedir. Örneğin: Isı, radyasyon, anti kanser ilaçlar ve hipoksi gibi (1,2,3).

2.1.2. Apoptoz Mekanizmaları

İç ve dış sinyallerle apoptoz tetiklendiğinde hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara **kaspaz (CASPASE; Cysteine-containing ASPartate specific proteASEs)** adı verilmektedir, bunlar sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağımlı kırarlar. Memelilerde şimdiye kadar 14 tane kaspaz tespit edilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1: İnsan kaspaz ailesi

Kaspazlar	Alternatif İsimleri
Kaspaz-1	ICE
Kaspaz-2	ICH-1
Kaspaz-3	CPP32, Yama, Apopain
Kaspaz-4	ICErel-II, TX, ICH-2
Kaspaz-5	ICErel-III, TY
Kaspaz-6	Mch2
Kaspaz-7	Mch3, ICE-Lap3, CMH-1
Kaspaz-8	FLICE, MACH, Mch5
Kaspaz-9	ICE-LAP6, Mch6
Kaspaz-10	Mch4, FLICE 2
Kaspaz-11	ICH-3
Kaspaz-12	
Kaspaz-13	ERICE
Kaspaz-14	MICE

Sağlıklı hücrelerde kaspazlar, enzimatik olarak inaktif ve aktif forma göre daha uzun bir polipeptid zincir olarak bulunurlar. Buna “zimogen form” denir. Kaspazlar biyolojik fonksiyonlarına göre 3 ana grupta incelenmektedir (18).

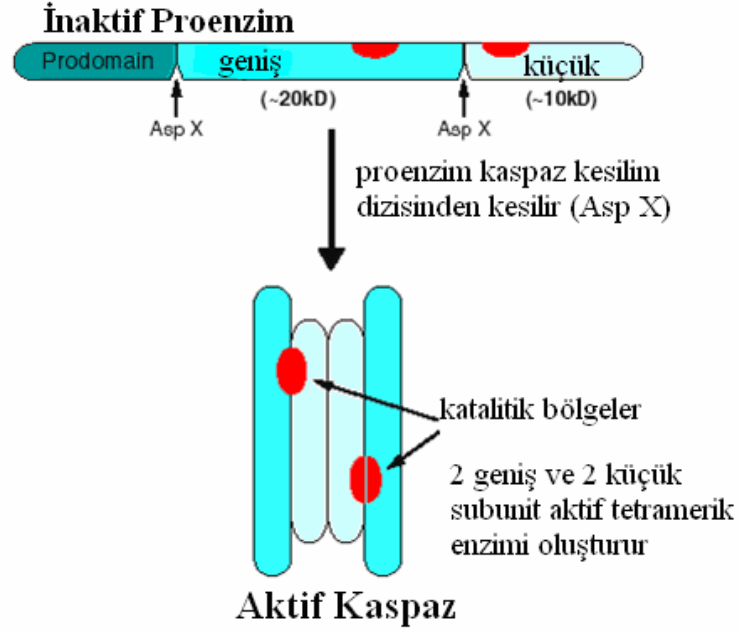
a) Sitokin aktivasyonu yapanlar: Kaspaz-1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14'ü içermektedir. Sitokin sekresyonu ve inflamasyondan sorumludurlar. Ayrıca kaspaz-1, 4, 5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler.

b) Apoptozu başlatanlar: Kaspaz-2, 8, 9 ve 10'u içermektedir.

c) Apoptozu yürütenler (efektör grup): Kaspaz-3, 6 ve 7'yi içermektedir (18,19,20).

Aktif kaspazların 3 boyutlu yapısı tespit edilmiş olup 2 heterodimer, 2 geniş subunit tarafından çevrelenmiş 2 komşu küçük subunitle karşı yönde bir tetramer oluşturur (18). Her bir heterodimer substratın bağlanması ve katalizi için gerekli küçük ve geniş subunitler içerir (Şekil 2.1).

Kaspazların en az 3 yolla aktive edilebildiği gösterilmiştir. Bunlar; **otoaktivasyon, transaktivasyon ve non-kaspaz proteazları ile proteoliz**'dir. Prokaspazlar düşük fakat saptanabilir bir proteolitik aktiviteye ve belli koşullar altında otoaktivasyon potansiyeline sahiptir. Yabancıl tip kaspazların aşırı salınımı ile prokaspaz-8 veya prokaspaz-9 uzun subunitleri arasındaki protein etkileşimi aracılığıyla oligomerler oluşturulur. Prokaspazların oligomerizasyonu otoaktivasyon için gereklidir. Başlangıç kaspazları bir kez aktive olduğunda diğer prokaspazları transaktive eder. Kaspaz aktivasyonu için diğer bir mekanizma da non-kaspaz proteazları ile doğrudan proteolizdir (19,20,21).



Şekil 2.1: Kaspazların aktivasyonu (18).

Kaspazların görev yapabilmesi için öncelikle Fas reseptörünün ligandı ile bağlanması ve kompleks oluşturması gereklidir. Bu kompleksin oluştuğu ve **ölüm bölgesi (DD; Death Domain)** olarak adlandırılan bölgede **Fas ile ilişkili ölüm bölgesi'nin (FADD; Fas Associated Death Domain)** oluşumu tetiklenir. Bu protein bu bölgeye kaspazların yığılmasını sağlar. Ayrıca kaspazlar hücre içinde artan kalsiyum

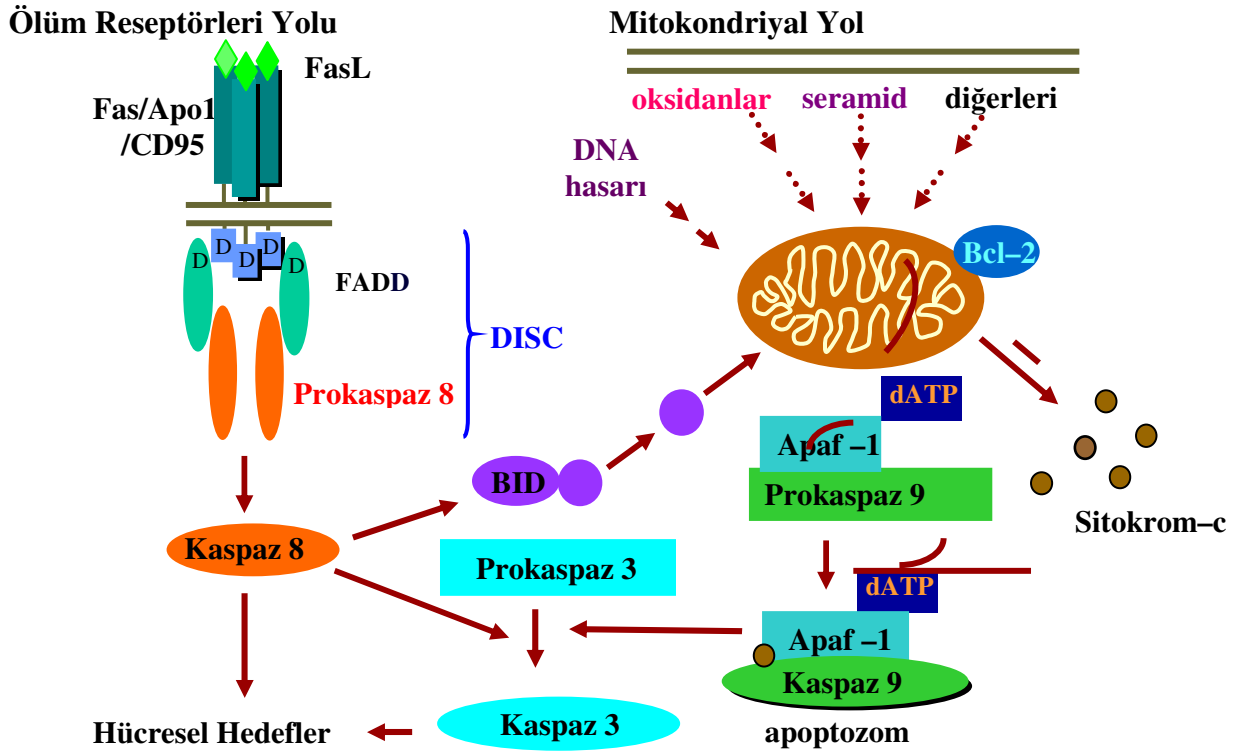
(Ca²⁺) iyonları tarafından aktif hale getirilirler. Bu aşamadan sonra da apoptoz sürecinde yaşanan reaksiyonlar gerçekleşir (4).

Bir kaspazın aktive olması diğerlerinin de aktive olmasını sağlar. Örneğin; kaspaz-8 mitokondriden sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınmasını sağlar. Bu olay diğer bir kaspaz enziminin aktivasyonu için gereklidir. Sitokrom-c mitokondriden salındıktan sonra **apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1)** denilen aktivatör moleküle bağlanır. Bu sitokrom-c + APAF-1 kompleksi prokaspaz-9'un aktive olmasını sağlar (22,23).

Apoptozun indüklenmesinde temel olarak 3 sinyal yolu saptanmıştır (Şekil 2.2).

Bunlar;

1. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptoz
2. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi
3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptoz

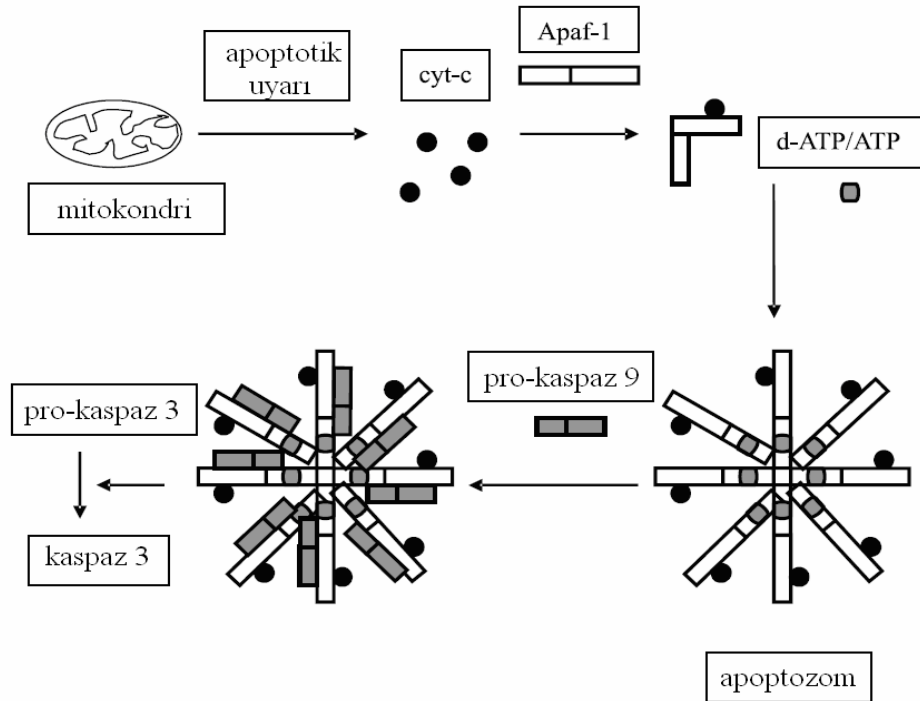


Şekil 2.2: Apoptozdaki sinyal yolları (24).

2.1.2.1. Mitokondri/Sitokrom-c aracılı apoptoz

Apoptozu başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Sitokrom-c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteinidir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptoz sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi, apoptoz yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom-c, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde, **apoptoz-indükleyici faktör** (AIF, Apoptosis-Inducing Factor) ile birlikte mitokondriden sitoplazmaya salınır. Sitokrom-c sitoplazmik protein olan APAF-1'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla "**apoptozom**" adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar (Şekil 2.3). Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, **kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü**'nü (ICAD, Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease) inaktifleştirir. Böylece

ICAD'nün bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD, Caspase-Activated Deoxyribonuclease) serbestleşir ve bu da apoptozun karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Buraya kadar olan mekanizma kaspaz-bağımlı apoptozu gösterir, oysa kaspaz-bağımsız apoptozun varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptoz yine mitokondriden salıverilen bir faktör olan AIF'ün etkisiyle gerçekleştirilir. Fakat AIF'ün etkilediği nükleazın ne olduğu henüz bilinmemektedir (24,25,26,27,28,29).

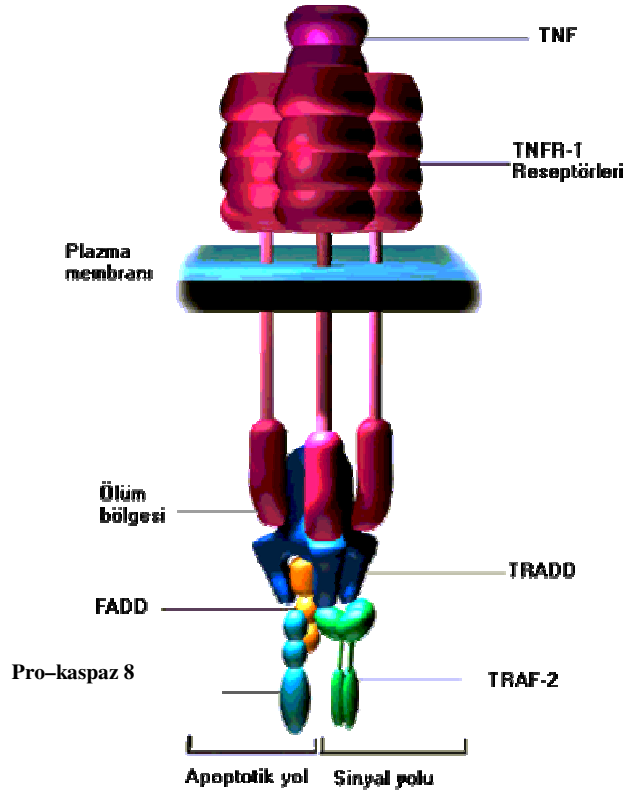


şekil 2.3: Apoptozom kompleksi (25).

2.1.2.2. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi

Apoptoz, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve **tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR)**'nün ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde ve miyokarda bulunur, ilgili ligandına **Fas ligand**

(FasL) denir. FasL, **tümör nekroz faktör (TNF)** ailesinin bir üyesidir. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein:protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ölüm bölgeleri (DD), **TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgesi (TRADD, TNFR-1 Associated Death Domain)** ve **Fas ile ilişkili ölüm bölgesi (FADD, Fas Associated Death Domain)** ile interaksiyona girerek **ölüm başlatan sinyal kompleksi**'ni (**DISC Death Inducing Signal Complex**) oluşturur (Şekil 2.4). Bu ölüm kompleksi ise prokaspaz-8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar (4,24).



Şekil 2.4: TNF aracılı apoptoz (24).

2.1.2.3. Endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptoz

Son zamanlarda kaspaz-12'ye bağımlı endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptotik yol tanımlanmıştır. Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozdan farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. ER stresinin, hücre ölümünü tetiklediği ve çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptoz için esas teşkil eden bir kaspazdır. Kalsiyum seviyeleri ile kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi sonucunda prokaspaz-12 aktiflenir. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir, kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (18,30).

2.1.3. Apoptozun Genetik Kontrolü ve Antiapoptotik/Proapoptotik Proteinler

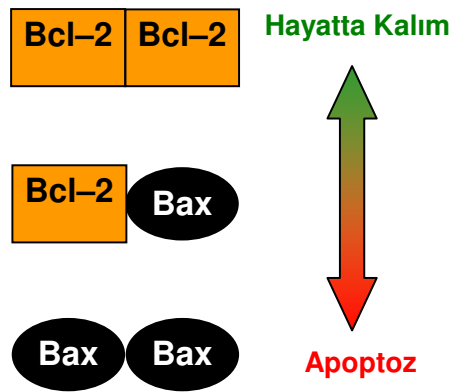
Protoonkogenler normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında **onkogen** adını alırlar. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirirler. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise tümör baskılayıcı genlerdir. Omurgalılarda apoptozu düzenleyen genler **p-53**, **c-myc** ve **bcl-2** ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (1,18).

p-53: Normal işlev gören **yabanıl tip** p-53 geni, hücrede apoptozu kolaylaştırır. DNA hasarı olduğu zaman S fazına geçişi bloke eder. DNA tamiri için zaman kazanılır, eğer tamir mümkün değilse hasarlanmış hücreler apoptozla yok edilir. Mutasyona uğramış p-53 geni apoptozun indüklenmesinde etkisizdir ve kanserlerin yarısında tespit edilmiştir.

c-myc: Bir transkripsiyon faktörü olan c-myc proteini ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyonuna ya da apoptoza girmesine neden

olur. c-myc protoonkogeni bir hücrenin büyümesini programlar ve ikinci bir onkogenle engellenirse, hücre intihar yolunu seçer. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durur, her ikisi de yeterli ise çoğalma olur, c-myc olduğu halde büyüme faktörleri yoksa apoptoz görülür (18).

Bcl-2 Ailesi: Apoptotik kaskadın kontrolündeki en önemli gruptur, ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur, bu gruplardan biri **pro-apoptotik** yani apoptozu indükleyici etkiye sahipken diğeri **anti-apoptotik** apoptozu baskılayıcı etkiye sahiptir. Pro- ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik bcl-2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri: bcl-2, bcl-X1, Mcl-1 iken, pro-apoptotik olanları ise: bax, bcl-Xs, Bad, Bim, Bak ve Bid'dir. Bax, bad ve bid normalde hücrelerde sessiz "latent" halde bulunurlar (Şekil 2.5). Bu proapoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesini sağlarlar. Bcl-2'nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozu baskılayabildiği bulunmuştur (28,31).



Şekil 2.5: Bcl-2 ailesi ve apoptoz ilişkisi (28).

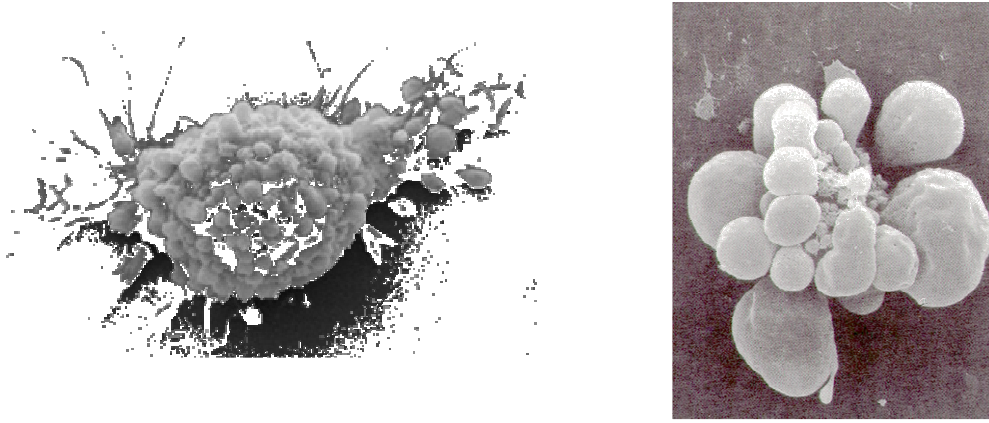
XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP: Antiapoptotik protein ailesinden **apoptoz protein inhibitörleri (IAP, Inhibitor of APoptosis)** omurgalı ve omurgasızlarda bulunmuş olup,

bunlar programlanmış hücre ölümünün negatif regülatörleridir. Bazı memeli homologları; XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Bruce, Survivin, pIAP olarak tanımlanmıştır. Bunların çoğu hücre ölümünü kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'a direkt olarak bağlanıp onları inhibe ederek gerçekleştirirler. Apoptoz protein inhibitörleri, kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler (18).

2.1.4. Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler

a) Morfolojik Değişiklikler

Apoptoza uğrayan hücreler, özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler, su kaybederek küçülür ve büzülürler. Membranlar bütünlüklerini korurlar, organeller genel olarak sağlamdır. Sitoplazmada yüzeye paralel yerleşmiş mikofilament kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Bu genişlemelerin sitoplazmadaki suyun endoplazmik retikuluma geçmesi ile oluştuğu düşünülmektedir. Dilatasyona uğrayan sisternalar hücrenin yüzeyi ile birleşerek yüzeyde krater manzarası oluşturur. Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar. En önemli değişiklikler çekirdekte izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, değişik şekil ve büyüklüklerde çöker, çekirdek de hücre gibi büzülür. Bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nükleer porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara **apoptotik cisim** adı verilir (Şekil 2.6). İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur, bazılarında çekirdek parçaları da mevcuttur (1,18,32).



Şekil 2.6: Apoptozdaki morfolojik değişiklikler (18).

b) Biyokimyasal Değişiklikler

Kromatin değişikliklerinin başlamasından kısa süre önce kalsiyumun sitoplazma içi miktarında hafif artma görülür. Bu artış, bazı sessiz enzimleri aktive ederek çeşitli yapısal değişikliklere yol açar. Kalsiyuma bağlı endonükleaz ve transglutamaz bu enzimler arasındadır. Çekirdek değişikliklerine endojen kalsiyum–magnezyum bağımlı nükleazların aktivasyonu neden olur. Bu nükleazlar bazı hücrelerde sürekli olarak bulunurken, bazılarında apoptozdan önce görülürler. Nükleozomlar arasında kromatini bölerler ve apoptotik hücre DNA'sını, uzunluğu 180–200 baz çifti ve katları olan parçalara ayırırlar. Bu parçalar agaroz jel elektroforezinde apoptoza özgü merdiven görünümünü oluşturur (1,2,3).

Apoptotik hücre yüzeyinde beliren yeni moleküler yapıların fagositik hücreler tarafından tanınması sonucu fagositoz görülür. Normalde hücre membranında gizlenmiş ya da korunmuş durumda bulunan N–asetilglukozamin gibi şeker molekülleri, apoptozda görülen membran değişiklikleri sonucu açığa çıkar ve makrofajların yüzeyindeki reseptörler tarafından tanınırlar. Apoptoz sırasında hücre membranındaki fosfolipid dağılımı da değişir. Hücre membranının iç yüzeyinde bulunan negatif yüklü fosfotidilserin, membranın dış yüzeyine çıkar. Fosfolipid dağılımındaki bu değişiklik sonucu, kolektin gibi çeşitli çözünür proteinlerin apoptotik hücre membranına

bağlandığı ayrıca, mitokondri yerleşimli kardiyolipinin de yine membranda bulunduğu saptanmıştır. Bütün bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilmelerini ve fagositozlarını sağlamaktadır (1,2,3).

c) Fagositoz

Ölüm mekanizması nasıl olursa olsun, ölü hücrelerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Gerek nekroz gerekse apoptozda ölü hücre fagositozla ortadan kaldırılır. Apoptoz sırasındaki hücre zarı değişimleri komşu hücrelerin ölü hücreyi fagosite etmesi için gerekli tüm uyarıları verecek şekilde düzenlenir. Oluşan apoptotik hücreler, hücreler arası alana dağılırlar veya lümene dökülürler. Dokuda 4–9 saat tanınabilir halde kalan apoptotik hücreler daha sonra fagozomlar içinde birkaç saat kadar görülebilir, sonra da sindirilemeyen materyal olarak kalırlar. Apoptotik cisimlerin makrofajlar tarafından tanınmasında, fibronektin benzeri bir serum proteini olan ve doku hücrelerinin birbirine bağlanmasını kolaylaştırdığı bilinen vitronektin reseptörünün rol oynadığı belirlenmiştir. Apoptotik cisimlerin makrofajlarca tanınmasında rol oynayan diğer reseptörler; trombospondin reseptörleri olan α vB ve CD–36 ile fas reseptörüdür. Apoptozda izlenen hücre zar değişiklikleri, apoptotik hücre zarındaki bu moleküller aracılığı ile makrofajlara ve çevre hücrelere iletilerek hücrenin fagositozuna yol açar (1,18).

2.1.5. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar

Nekroz fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Diğer bir ifadeyle apoptoz hem sağlıklıta hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır. Apoptoz morfolojik olarak özgündür. Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür (cell shrinkage). Nekrozda kromatin şekli hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır (kromatin agregasyonu) ve kondanse olur. Nekrotik hücrenin

plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler (membrane blebs) oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nükleus, veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozda plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama salınması sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa apoptozda apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz (Çizelge 2.2) (33).

Çizelge 2.2: Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması (33).

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZ
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stres	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stres
Morfolojik özellikler	Hücre membran bütünlüğünün kaybı Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı, membranda cepciklerinin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Hücrenin intakt mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon homeostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4°C 'de gerçekleşebilir DNA rasgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4°C'de gerçekleşmez DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven paterni) Prelitik DNA fragmentasyonu (erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

2.1.6. Apoptozun saptanmasında kullanılan yöntemler

Apoptozu saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında apoptoz terimi ilk kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (aktif kaspaz-3 tayini gibi) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir (1,2). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler şu şekilde sınıflandırılabilir;

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. İmmünohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmünolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri

1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

1.1. Işık mikroskobu kullanımı

Hematoksilen boyama: Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay olanı hematoksilen ile boyamadır. Hematoksilin ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir ve hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Hematoksilin boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir.

Giemsa boyama: Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada da olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (18).

1.2. Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı

Floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI, propidium iyodür) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Floresan sistemler ışık mikroskobuna göre çok daha pahalıdır. Fakat eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır (1,2).

1.3. Elektron mikroskobu

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptozda en değerli yöntem olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği bir yöntemdir. Üstelik subcellüler detaylar (örn. mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) da incelenebilir (18).

1.4. Faz kontrast mikroskobu

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, flask veya plakelerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları substratumdan ayrılacakları için besiyeri içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler (18).

2. İmmünohistokimyasal yöntemler

2.1. Anneksin V Yöntemi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS

molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS'ler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (1,2,18).

2.2. TUNEL Yöntemi

DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozun varlığı bu metotla saptanabilir (1,2,18).

2.3. M30 Yöntemi

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitel kaynaklı dokulardır (1,2,18).

2.4. Kaspaz-3 Yöntemi

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak bu bilirse apoptotik hücreler bu metotla tespit edilebilirler (1,2,18).

3. Biyokimyasal Yöntemler

3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptozda DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internukleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü oluşur. Bu bulgu apoptozun karakteristik özelliğidir ve nekrozda görülmez. O yüzden apoptozu nekrozdan ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (1,2,18).

3.2. “Western” Blotting

Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının ya da kırılıp kırılmadıklarının saptanması mümkündür. Sitokrom-c'nin mitokondriden çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metodla belirlenebilir. Ancak sitokrom-c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom-c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılır (1,2,18).

3.3. Akım “Flow” Sitometre

Akım sitometre yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikör kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun saptanmasında kullanışlı bir yöntemdir. İki farklı şekilde uygulanmaktadır:

- a) Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,
- b) Anneksin V kullanılarak.

Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemlerinin kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarının kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptoz lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu tayin edilir. İkincisinde, floresan mikroskopuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınır (1).

4. İmmunolojik Yöntemler

4.1. ELISA

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (1).

4.2. Florimetrik Yöntem

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu flasklara hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (1).

5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

DNA mikroçip teknolojisi henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir fakat tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin tespiti mümkün

olabilecektir. Böylece, apoptoza özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır (1).

2.1.7. Apoptoz ve Kanser

Apoptoz/proliferasyon dengesindeki bozulma tümör gelişiminde rol oynamaktadır. Apoptoz mekanizmasının tetiklenememesi (p53 gen defektleri) veya mekanizmanın herhangi bir basamağında meydana gelen değişiklik (Bcl-2'nin artışı, Fas gen defektleri gibi) tümör gelişiminde rol almaktadır. Ayrıca tümör hücrelerinin doğal immün mekanizmalarla ortadan kaldırılamamasının da tümör gelişiminde özellikle de tümör hücrelerinin yayılımında önemli olduğu düşünülmektedir. Genellikle tümör hücreleri sitotoksik T lenfositler veya natural killer hücreler tarafından Fas/FasL bağımlı apoptoz yoluyla ortadan kaldırılır. Fakat tümör hücrelerinin, tam ters bir biçimde immün sistemden kaçabildiği de bilinmektedir (35). Malign hücrelerin, konak immünitesinden kaçışı ve sitotoksik immün sistem hücrelerinin tümör hücreleri tarafından ortadan kaldırılması kanser gelişimi ve progresyonu açısından çok önemlidir. Bu olgularda tümör hücrelerinin, ölüm faktörü üreterek (FasL) sitotoksik T lenfositlerde ve NK hücrelerde apoptozu başlattığı düşünülmektedir. Tümör hücrelerinin apoptoza rezistans geliştirmesinin sebebi olarak sitoplazmik membranda FasL artışı ve Fas reseptör düzeyinde azalmanın yanında, başka potansiyel mekanizmalar da tanımlanmıştır. Bunlardan biri de gen defektleridir. Apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonlarının ya da mutasyonlarının değerlendirilmesi tedaviye yanıtı ve/veya yaşam süresini tahmin ettirebilir. Kanser hücreleri, apoptoz karşıtı olan *bcl-2*, *c-myc* gibi sağkalım genlerini aşırı derecede eksprese ederek ölümden sorumlu genleri baskırlar (36). *Survivin* ve *bcl-2* proteinlerinin aşırı ekspresyonları tümör prognozu ile ilişkilendirilmiştir. *Survivin*'in aşırı ekspresyon düzeyleri nöroblastom ve kolon kanserlerinde ileri evre ve kötü prognozla ilişkilidir. Bazı B hücre lösemileri ve lenfomaları, prostat tümörleri ve nöroblastomlarda *bcl-2* proteinini aşırı düzeyde eksprese ederler. Alınması gereken ölüm sinyalleri de böylece önlenir (37,38).

2.1.7.1. Kanser Tedavisi ve Kemoterapötikler

Kanser tedavisi dört ana gruba ayrılır; cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi ve biyolojik tedavidir. Birçok kanser için cerrahi olarak çıkarılma eğer mümkünse kalıcı tedavi sağlanmaktadır. Eğer kanser metastaz yapmış ise kemoterapi veya radyoterapi kullanılmaktadır (39).

Kemoterapi, özellikle çoğalan hücelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasal, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi şeklidir ve tüm kanser tiplerinde temel tedavi şekli olarak önemini korumaktadır. Normal dokuya zarar vermeksizin kanser hücrelerini öldüren ideal bir kanser ilacı bulunmamaktadır. Klinik kullanım için ilaçların seçimi, toksisitelerine karşı elde edilen yararlıklarının kıyaslandığı terapötik indeks aralıkları hesaplanarak yapılmaktadır (40).

Antikanser tedavide sıklıkla kullanılan ilaçların pek çoğu DNA ve RNA sentezini bozarak etki etmektedir. Flouraurasil, metotreksat, merkaptopürin ve tiyoguanin gibi antimetabolitler ya nükleotid öncüllerinin sentezinin bozmakta ya da DNA'ya bağlanmaktadır. Alkilleyici ajanlar kovalent bağlarla DNA'ya bağlanıp DNA'yı zedelemektedirler. Topoizomerazların DNA eşleşmesi, kopyalanması ve tamirinde önemli rolü vardır. Antrasiklinler ve epifillotoksinler DNA'nın yeniden bağlanmasını engellerler. Vinkristin, vinblastin ve paklitaksel gibi ilaçlar tübülün fonksiyonunu bozarak eşleşen kromozomların iğ iplikçikleri tarafından hücre kutuplarına çekilmesine engel olurlar (41).

Hücrenin yaşam döngüsünün kontrolünde bozulma kanser patogenezindeki temel mekanizmalardan birisidir. Normal hücrelerin yaşam döngüsünde G1, S, G2 ve M fazları vardır. Tüm bu fazlarda negatif kontrol mekanizması çalışır. Hücrenin G1 fazından M fazına geçişini kontrol eden ana faktör "hücrenin gardiyanı" adı ile tanımlanan p53 proteindir. DNA'nın zedelenmesi durumunda p53 zedeli DNA'daki hasarın durumuna göre hücreye farklı sinyaller verir. Hasar tamir edilebilecek kadar küçükse hücreyi mitozdan çıkararak tamir edilmesine zaman tanır. Eğer hasar büyükse o zaman hücreye intihar (apoptoz) sinyali verir. Diğer taraftan kemoterapötiklerle

zedelenmiş hücreye sağlam p53'ün apoptoza gidiş sinyali göndermesi gerekirken defektif genin bu sinyali göndermemesi tümöral hücrede apoptozu önler ve hücre yaşamaya devam eder. Moleküler değişikliklerin hücre döngüsünün kontrolünü nasıl değiştireceğini bilmek zordur. Mutasyonlar bazen kemoterapötiklere duyarlık kazandırırken, bazen de direnç gelişmesinden sorumludurlar (39).

Kemoterapötik ilaçları etkilerine göre iki grupta inceleyebiliriz:

1– Hücre siklusuna bağımlı ilaçlar

- *S fazına dönük ilaçlar (Antimetabolitler):* Hücre metabolizmasını ve DNA sentezini bozarak etki ederler. Metotreksat, 5-Flourourasil, sitarabin, prokarbazin, 6-tiyoguanin, 6-merkaptopürin gibi.
- *M fazına dönük ilaçlar (Bitki alkaloidleri):* Ana hücreden iki yavru hücre oluşmasını engellerler. Vinkristin, vinblastin bu gruptandır.
- *G2 fazına dönük ilaçlar (Antitümör antibiyotikler):* RNA, DNA ve protein sentezini etkilerler. Bleomisin, aktinomisin–D, daunorubisin gibi.

2– Hücre siklusuna bağımsız ilaçlar

- *Alkilleyici ajanlar:* Hücre çekirdeğini, DNA ve RNA sentezini etkilerler. Hızlı çoğalan hücrelerin ölümüne yol açarlar. Azotlu hardallar, sisplatin, siklofosamid, prokarbazin gibi
- *Hormonlar:* Tümör ortamını değiştirerek büyüme ve çoğalmayı engellerler, protein sentezini bloke ederler. Estrojenler, kortikosteroidler gibi.
- *Antibiyotikler:* DNA replikasyonunu bozarlar. Adriamisin gibi.

Kemoterapötik ilaçlar kimyasal yapıları ve hücre aktivitesine göre 6 sınıfa ayrılmaktadırlar:

1. Alkilleyici ajanlar: Sitotoksik etkileri, bünyelerindeki elektrofilik alkil kökü ile hedef makromoleküllerin nükleofilik parçasının geri dönüşsüz bir kombinasyon yapması ile olmaktadır. Bu gruptaki ilaçlar arasında, busülfan, karboplatin,

karmustin, klorambusil, siklofosfamid, dakarbazin, ifosfamid, lomustin, azotlu hardallar ve prokarbazin yer almaktadır (39).

2. Antimetabolitler: Hücrenin normal metabolitleri ile benzerlik gösterdiklerinden onların yerine, enzimler için benzerlik gösterdikleri metabolitlerin yerine geçer veya aynı rolü alarak aktiviteyi bloke eder, azaltır ya da makromoleküllerin içine girerek, fonksiyonu olmayan bir makromolekül yaratırlar. Bu grupta; sitarabin, metotreksat, 6–merkaptopürin, 6–tiyoguanin yer almaktadır (39).

3. Bitki alkaloidleri: Podofilotoksinler’den ve vinka alkaloidlerinden semisentetik olarak elde edilen ilaçlardır. Hücre bölünmesini mitoz safhasında durdururlar. Bu grupta; vinkristin, vinblastin, etoposid, teniposid yer almaktadır (39).

4. Antitümör antibiyotikler: Hücrede DNA ve RNA transkripsiyonunu durdurup, dokularda uzun süre kaldıklarından DNA sentezi boyunca hücre ölümüne yol açarlar. Radyasyonla birlikte verildiklerinde toksisiteyi arttıırırlar. Aktinomisin–D, adriamisin, bleomisin, epirubisin, idarubisin bu gruptadırlar (39).

5. Kortikosteroidler: Kortikosteroidler pasif difüzyonla hücre içine girip, glukokortikoid reseptörleri ile bağlanarak çekirdeğe geçer, DNA ile bağlanıp transkripsiyon olayını bozarlar (39).

6. Diğer çeşitli yapıda ilaçlar: L–Asparajinaz bu grupta yer almaktadır. *Escherichia coli* kültürlerinden elde edilen bir enzimdir. Blastik hücrelerde DNA ve RNA sentezini inhibe eder (39).

Alkilleyici ilaçların en fazla kullanılanı siklofosfamiddir. Akut ve kronik lenfositik lösemi, Hodgkin–dışı lenfomalar, pediatrik solid tümörler, meme, over, baş–boyun kanserleri gibi hem hematolojik hem de solid tümörlerin tedavisinde başarılı bulunmuştur (42,43).

Siklofosfamid, iltihabı azaltan ve bağışıklık sistemini baskılayan immünoşüpresif bir ilaçtır. DNA sentezini değiştirerek hücrelerin çoğalmasını engelleme yoluyla etki eder. Bu nedenle kan hücreleri, saç kökleri ve bağırsak mukoza hücreleri gibi çok aktif çoğalan hücreler (üremek için yeni DNA yapması gerekenler) üzerine daha etkilidirler. Lenfositler siklofosfamidden en çok etkilenenlerdir ve bunların sayısı ve işlev açısından değişiklikleri bağışıklık sisteminin baskılandığını gösterir. Siklofosfamid, çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmak üzere ortaya çıkmıştır (43).

2.2. Rho kinaz yolağı

Rho, Rac1 ve Cdc42'yi içeren Rho GTPaz ailesi proteinleri adezyon, motilite, proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptoz gibi değişik hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli roller oynar. Monomerik GTPaz'ların Ras süperfamilyasının Rho subfamilyası üyesi olan küçük GTPaz Rho, agonist stimülasyonu ile indüklenen Ca^{2+} sensitizasyonundan sorumludur ve myozin fosfataz aktivitesini inhibe ederek fonksiyon gösterir (44,45,46).

Küçük molekül ağırlıklı G proteinleri (20–40 kDa) monomerik yapıda GTP–bağlayan proteinlerdir. Ökaryotlarda 100 den fazla küçük G proteinleri tanımlanmıştır. Bu büyük aile yapısal olarak en az beş alt aileye ayrılır. Bunlar:

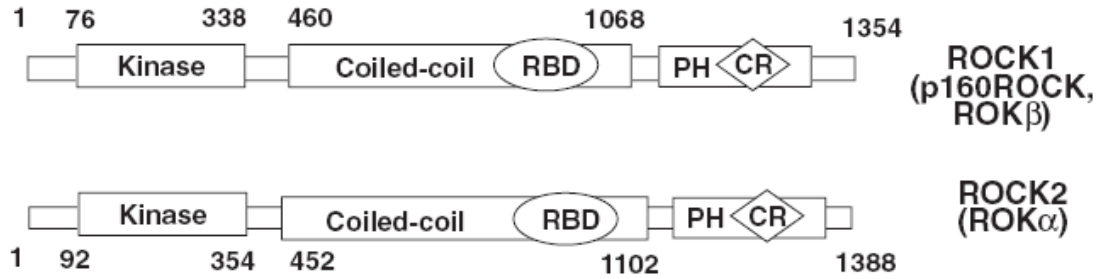
- 1.Ras ailesi
- 2.Rho ailesi (en az 14 üyesi tanımlanmıştır)
- 3.Rab ailesi
- 4.Sar1/Arf ailesi
- 5.Ran ailesi

Rho geni ilk olarak 1985'de bir Ras homoloğu olarak klonlanmış ve bunu kısa süre sonra üç insan homoloğu RhoA, RhoB, RhoC izlemiştir. RhoA, Ras süperfamilyasının küçük bir G proteinidir. Aktif bir GTP bağlı form ile inaktif GDP

bağlı form arasında gider gelir. RhoA hücre iskeleti organizasyon, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve gen regülasyonu gibi farklı hücrel fonksiyonlar için gerekmektedir. RhoA ve onun alt efektörü Rho kinaz (ROCK) vasküler endotel disfonksiyonuna aracılık eden önemli sinyal transdüksiyon mekanizmalarıdır (47,48,49).

ROCK çeşitli kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar ile kanser tedavisinin önemli bir terapötik hedefidir. Bu protein kinazın aktivitesi GTP-Rho proteinleri ile stimüle edilir. Çok sayıda Rho kinaz substratı tanımlanmıştır; bunlar myozin hafif zincir fosfatazın myozin bağlayıcı alt ünitesi, myozin hafif zinciri, adducin (adducin), intermediyer filamentler, ERM (ezrin-radiksin-moesin) ve kofilini içerir (50,51,52,53).

Rho kinazlar serin/treonin protein kinazlardır. Bir amino-terminal katalitik kinaz bölgesi, Rho-GTP bağlanan bir kıvrılmış sarmal bölgesi ve sisteinden zengin bir parça ile ayrılmış C-terminal plekstrin homoloji bölgesi içerirler (Şekil 2.7) (52).



Şekil 2.7: ROCK1 ve ROCK2'nin moleküler yapısı (52).

Rho kinaz enzimini inhibe eden ajanlar arasında, Y-27632 (*trans*-4-[(1*R*)-1-aminoetil]-*N*-4-piridinilsikloheksankarboksamid dihidroklorid), fasudil (HA-1077), hidroksifasudil, Y-32885, Y-39983, H-1152P, SLx-2119, azabenzimidazolaminofurazanlar (GSK-269962A ve SB772077 gibi) ve Wf-536 gibi bir çok madde bulunmaktadır (52).

Son zamanlarda elde edilen veriler, RhoB'nin proapoptotik fonksiyonunu tartışmaktadır. RhoB, normal hücre döngüsünden çıkma potansiyeli olan ve böylece kansere neden olabilecek hasar görmüş hücreleri apoptoza doğru yönlendirebilir. Tümörün hücre döngüsünde yer alan yapışkanlık, göç, yayılma ve apoptotik süreçten kaçış gibi özelliklerin Rho GTPaz aktivitesiyle ilişkili olduğu düşünölmektedir (52).

Diğer taraftan Rho/Rho kinaz yolağının aktivasyonu, tümör hücre invazyonuna neden olmaktadır. Bu yolağı inhibe eden fasudilin insan ve sıçan tümör modellerinde tümör progresini azalttığı bildirilmiştir (46). Rho proteinleri, aktin reorganizasyonunda, hücre hareketi ve migrasyonunda, hücrelerin birbirlerine ve matrikse olan adezyonunda, hücre siklusunun düzenlenmesinde, gen ekspresyonlarında ve apoptozda anahtar rol oynamaktadırlar. Bütün bu fonksiyonlar, kanser gelişmesi ve progresi için oldukça önemlidir (52, 54, 55,56).

2.3. Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)

Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) semptomatik, iltihap giderici (anti inflamatuvar), ateş düşürücü (anti piretik) ve ağrı kesici (analjezik) ilaçlardır. NSAİİ'lar genelde anti-romatizmal ilaç olarak bilinirler. Prostaglandin (PG) sentetaz enzimini bloke ederek etki gösterirler (57).

NSAİİ'lar iki yolla etki göstermektedir:

1. Siklooksijenaz (COX)
2. Lipoksijenaz

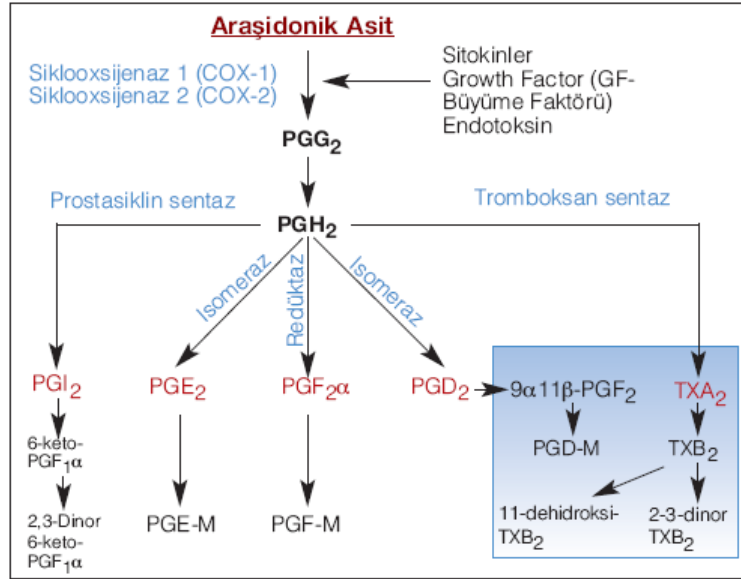
COX enzim aktivitesi ile membran fosfolipitlerinden prostaglandin sentezine giden yol kontrol edilmekte olup bu enzimin NSAİİ ile inhibisyonu yoluyla prostaglandin sentezi, lipoksijenaz yolu ile ise lökotrienlerin sentezi inhibe edilmektedir. İnflamasyonun inhibisyonunda klasik NSAİİ'ların baskıladığı başlıca yol COX inhibisyonudur (7,57).

NSAİİ'ların genel etki mekanizmaları şu şekilde sınıflandırılabilir;

1. COX inhibisyonu, prostaglandin sentezinin baskılanması
2. Lipoksijenaz inhibisyonu, lökotrien sentezinin baskılanması
3. Süperoksit üretiminin baskılanması
4. Lizozomal enzim salınımının baskılanması
5. Hidrojen peroksit yapımının inhibisyonu
6. Hücre membranında fosfolipaz-C aktivitesinin inhibisyonu
7. Kıkırdak metabolizmasına etki, kondroprotektif ya da kondrodestrüktif etki
8. Lenfoit transformasyonu ve DNA sentezinin azaltılması
9. Santral analjezik etki
10. Bradikine bağlı inflamatuvar olayların baskılanması
11. Plazma proteinlerinden antiinflamatuvar etkili peptit oluşturulması
12. Nötrofil agreasyonu ve aktivasyonu için gerekli olan sinyallerin inhibisyonu
13. Granülosit-monosit migrasyonu ve fagositozunun inhibisyonu

Prostaglandinler (PG) pek çok hücre ve organizmada oluşur, etkileri karmaşıktır ve diğer pek çok etken dışında hedef hücrelere de bağlıdır. PG, kısa ömürlü bileşiklerdir ve normal hücrel reaksiyonlarda lokal hormon olarak rol oynarlar fakat özellikle inflamasyon gibi patolojik koşullarda miktarında artış gözlenmektedir (57).

“Prostaglandin H sentaz” olarak da bilinen “siklooksijenaz” enzimi (COX; Cyclooxygenase), araşidonik asiti hidrolitik olarak fosfolipidlerden ayırarak prostaglandin ve tromboksanlara dönüştürür. Prostaglandin ve tromboksan, mide, plateletler, böbrek ve barsakların fizyolojik regülasyonunu sağlarlar (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Prostaglandin sentez basamakları (57).

Siklooksijenaz enziminin iki farklı gen tarafından kodlanan ve farklı fizyopatolojik olaylarca indüklenen 2 alt grubu bulunmaktadır:

1. Siklooksijenaz-1: Birçok dokuda yapısal olarak bulunur ve genelde homeostazisi düzenleyici özelliktedir. Trombositler, böbrekler, mide ve damar endoteli de dahil olmak üzere tüm doku hücrelerinde bulunur. Aktivitesi genelde sabittir ve bazı nadir durumlarda artış gösterir. COX-1 70 kd ağırlığındadır ve 9. kromozomda bulunan bir gen tarafından kodlanmaktadır (58,59).

2. Siklooksijenaz-2: Molekül ağırlığı COX-1 ile eşit olup 1. kromozomdaki bir gen tarafından kodlanmaktadır. Aminoasit dizilimi yaklaşık %70 oranında COX-1 ile benzerlik gösterir. Normal koşullarda endotel dışındaki bölgelerdeki aktivitesi çok düşüktür. Ancak COX-2 geni inflamasyon başta olmak üzere birçok durumda indüklenebilir. Sitokinler ve büyüme faktörleri bu enzimin aktivasyonunu arttırlar (60). Bazal koşullarda sadece beyin ve böbrekte COX-2 aktivitesi saptanırken, inflamatuvar süreçlerde özellikle sinoviyal sıvılarda COX-2 aktivitesinde belirgin artış olmaktadır. Böbrekteki etkisi COX-1'e benzerlik göstermektedir (Çizelge 2.3). Kolorektal adenom ve karsinomlarda COX-2 ekspresyonu artmaktadır (61, 62, 63, 64, 65).

Çizelge 2.3: COX-1 ve COX-2 arasındaki farklılıklar

COX-1	COX-2
Prostaglandin endoperoksit H sentaz 1 (PGHS-1)	Prostaglandin endoperoksit H sentaz 2 (PGHS-2)
Konstitüsyonel	İndüklenebilir
Tüm dokularda	Beyin, böbrek, gonadlar, ince barsak, trakeal epitel
Normal fizyolojik fonksiyonlar	İnflamatuvar hastalık
Renal kan akımı	Kolorektal, meme, baş-boyun, pankreas, mide,
Gastrik mukozal integrasyon	prostat kanserleri

2.3.1.COX Enzim İnhibitörleri

Günümüzde 3 tip COX inhibitörü mevcuttur. Bunlar;

1. Aspirin: Hem COX-1 hem de COX-2'yi inhibe eder. Ancak COX-1 enzimine daha selektiftir. Özellikle düşük dozlarda trombositlerdeki COX-1 enzimini geri dönüşümsüz olarak bloke eder. Bu etkisi nedeniyle kardiyoprotektif olarak sıklıkla tercih edilir (66).

2. Nonspesifik NSAİİ'lar: Hem COX-1 hem de COX-2 enzimini değişik derecelerde, düşük selektivite ile inhibe ederler.

3. Selektif COX-2 inhibitörleri (koksibler): Bu grup ilaçlar NSAİİ'lar ile aynı analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkinlikte olan fakat COX-1 üzerine etkileri olmadığı için gastrik yan etkileri minimal olan ilaçlardır.

COX-2 inhibitörleri, NSAİİ ilaçlar için yeni kullanım alanları açmaktadır. Meme kanseri, mide kanseri, kolorektal kanserler ve Alzheimer gibi hastalıklarda COX-2'nin arttığı gösterilmiştir ve bu durumlarda COX-2 inhibitörlerinin fayda sağlayabileceği düşünülmektedir (67,68,69,70).

2. 4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, bir organ veya dokudan alınan küçük bir parçanın, uygun fizikokimyasal ve biyolojik işlemler sonucu *in vitro* koşullarda üretilmesi işlemidir. Hücre kültürü ile ilgili çalışmalar 1907 yılında Ross Harrison'un kurbağa embriyolarında yapmış olduğu çalışmalara dayanır. İlerleyen yıllarda uygun kültür besi ortamlarının geliştirilmesi ve besi ortamının içine antibiyotik eklenmesi kontaminasyon sorununu çözmüş ve bu teknolojinin, hastalıkların patogenezinin araştırılmasında, ilaç denemelerinin ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde birinci basamak çalışma içine girmesinin yolunu açmıştır (34,71,72).

Hücre kültürleri kaynaklarına ve büyüme biçimlerine göre sınıflandırılırlar._

1. Kaynaklarına göre;

Primer kültürler: Hücre ya da doku izole edildikten sonra yapılan ilk kültüre primer kültür denir. Primer kültürde hücre soyu sonludur yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölürlür. Bu nedenle primer hücrelerle belirli bir sayıda pasajlama yapılabildiğinden deneyler bu dönemde yapılmalıdır.

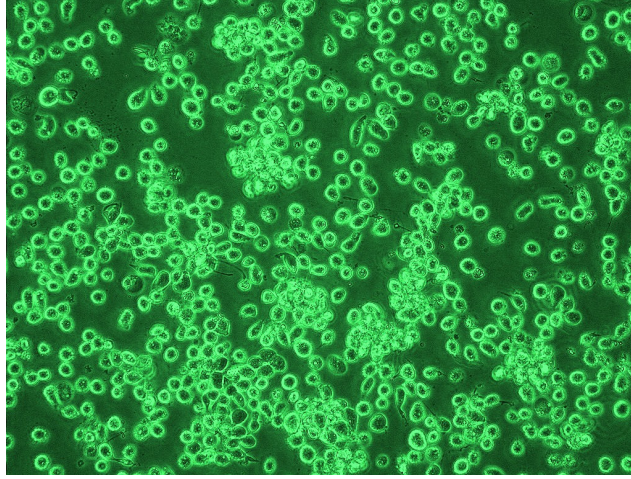
Hücre hatları (Cell line'lar): Primer kültürden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden ya da kimyasal ajanlar ya da virüsler eklenerek insan eliyle oluşturulurlar. Tümör dokusundan alınan hücrelerden de elde edilirler. Hücre hatları primer kültürden şu özellikleri ile farklılık gösterirler;

- Kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri,
- Büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim duymaları,
- Çoğalmak için bir zemine tutunma gereksinimlerinin daha az olması,
- Sonsuz çoğalma yetenekleri (bu özellikleri ile tümör hücrelerine benzerler).

2. Büyüme biçimlerine göre;

Süspansiyon kültürler: Kan, dalak, kemik iliği ve olgunlaşmamış hücreler bu şekilde kültüre edilirler. Bu kültürler kültür kabına yapışma göstermezler.

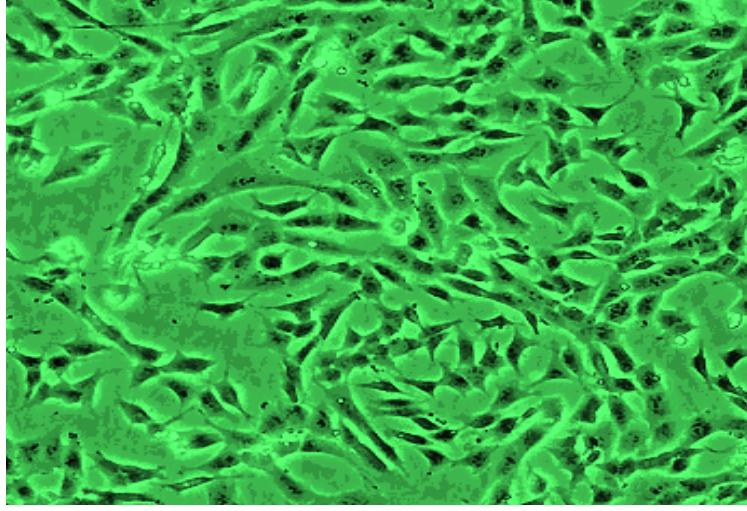
K-562 Hücre hattı: İlk kez 1975 yılında Lozzio BC ve Lozzio BB tarafından Beyaz ırktan 53 yaşındaki kronik myeloid lösemi hastası bir kadından geliştirilmiştir. Süspanse halde bulunan kültür içindeki hücreler oval ve yuvarlak görünümündedirler (Şekil 2.9) (73).



Şekil 2.9: K-562 hücre hattı (10x büyütme).

Monolayer (tutunarak büyüyen) kültürler: Ekdoderm ve endodermden oluşan hücreler (fibroblast ve epitel hücreleri) ekstrasellüler matrix olarak adlandırılan ve kollagen, fibronectin, laminin, proteoglikanlar gibi makromoleküllerin bir karışımı olan kompleks bir yapı üzerinde bu yapıdaki moleküllerle membran reseptörleri aracılığı ile etkileşerek büyürler. Bu etkileşimi sağlayan membran proteinlerinin en önemlileri integrin adlı heterodimerik proteinlerdir (34,72).

SK-N-MC Hücre Hattı: İlk kez 1971 yılında J.L. Biedler ve ekibi tarafından Beyaz ırktan 14 yaşındaki nöroblastoma hastası bir kız çocuğundan geliştirilmiştir. İnsan nöroblastoma hücre hattı olup morfolojik olarak aderent, bir yüzeye tutunarak büyüyen fibroblast benzeri hücrelerdir (Şekil 2.10) (32).



Şekil 2.10: SK-N-MC hücre hattı (10x büyütme).

2.4.1. Hücre Kültürünün Kullanım Alanları

Günümüzde hücre kültürlerinin çok yaygın kullanım alanları vardır. Hemen her alanda bu tür çalışmalara rastlamak mümkündür (72). Bunları şu şekilde özetleyebiliriz;

1. Viral aşılar ve viral teşhis
2. Monoklonal antikorlar ile antikor üretimi
3. İnterferon ve enzim üretimi
4. Hücre içi aktivite ölçümü
5. DNA, RNA replikasyonu araştırması ve protein sentezi
6. İnterlökin gibi immunoregülatörlerin üretimi
7. Hormon üretimi
8. Büyüme faktörlerinin üretimi
9. Sinyal iletim mekanizması ve hücre haberleşmesi
10. Somatik gen tedavisi
11. Tümör aşıları
12. Canlı hücrelerin grefting amaçlı olarak kullanılması
 - a. Eritrositlerin organizma dışında transfüzyon amacıyla kullanılması
 - b. Kanser tedavisinde kemik iliğinin kullanılması
 - c. Parkinson Hastalığı'nın tedavisinde beyin hücrelerinin kullanılması

- d. Organizma dışında hücre modifikasyonu
13. Kompleks üç boyutlu dokular (yapay deri, kıkırdak ve karaciğer üretimi)
14. Sitogenetik analiz
15. Genetik manüplasyon ve immortalizasyon.

2.4.2. Hücre Kültürlerinin Avantaj ve Dezavantajları

Avantajları:

1. Hücre kültürü ortamında fizikokimyasal çevre ve buna bağlı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilir. Sıcaklık, pH, ozmotik basınç, O₂ ve CO₂ kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültüründe daha kolay sağlanırken, canlı vücudunda sabit bir çevreyi oluşturarak birtakım testleri yapmak daha zordur.
2. Örneğin homojenitesinin kontrolü sağlanabilir. Doku örnekleri çoğunlukla heterojendir. Ancak, bir-iki pasaj sonra kültüre edilmiş hücreler, homojen hale gelirler. Hücrelerin homojenitesi, elde edilen ürünlerin homojenitesi açısından son derece önemlidir.
3. Hücre kültürleri ekonomiktir. *In vivo* sistemlerde test için canlı organizmaya verilen maddenin bir kısmı çeşitli yollarla dışarıya atılacak, bir kısmı da organizmanın bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılacaktır. Bu koşullarda canlı bir organizmada, verilen maddenin ancak % 10'una bir cevap alınabilirken, hücre kültürlerinde bu oran % 90'lara kadar çıkabilecektir.
4. Hücre kültürlerinin bir diğer avantajı da ürün eldesinde endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilmesidir. Son yıllarda geliştirilen teknikler ile bu, çok daha kolay başarılabilmektedir.

Dezavantajları:

1. Primer kültür ile başladığımızda birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşır ve bir miktar ölüm her zaman gerçekleşir. Yani hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusudur.
2. Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğu için, primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkiler.
3. Deneyim çok önemli bir faktördür. *In vitro* çalışmalarda sterilite, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik inceleme bir uzmanlığı gerektirir.
4. Hücre kültürleri ekonomik gibi görünmesine rağmen aslında ekonomik değildir. Çünkü kullanılan hücre üretme vasatları ve diğer malzemeler son derece pahalıdır. Buna karşın elde edilen ürünün saf olması son derece önemli bir avantajdır. Ancak son yıllarda bu teknolojinin gelişmesi, kullanılan malzemelerin geliştirilmesine ve giderek daha da ucuzlamasına olanak tanımaktadır (74).

2.4.3. Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli donanımdaki araç-gereçler, laminar akımlı kabin, karbon dioksit (CO₂) etüvü, faz kontrast mikroskop, hücreleri saklama ve koruma için sıvı azot tankı ve hücrelerin üremek için tutunma ve hareketlerine olanak sağlayacak toksik olmayan, biyolojik olarak *inert* ve optik olarak saydam, tek kullanımlık steril plastik kaplardır (74).

Laminar akımlı kabinler partikül filtresine sahiptirler. Bu kabinler dikey ya da yatay olabilirler, dikey olanlarında süzülen hava kabinin üstünden çıkarken yatay olanlarında kullanıcı bölgesinden yatay olarak dışarı üfürülmektedir. Kabinlerin kullanım öncesi UV (*ultraviyole*, morötesi) ışıkla sterilizasyonu sağlanmalıdır. Hücreler yaklaşık olarak % 5 CO₂ içeren ortamda üretildikleri için CO₂ etüvlerinden

yararlanılmaktadır. Hücreleri gözlemek için de faz kontrast mikroskoplar kullanılır (72,74).

Kültürler günlük olarak kontrol edilmelidir. Besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu gözlemlenmelidir. Kültürde hücreler; hücre tipine, ekilme yoğunluğuna, ortamın yoğunluğuna ve daha önceki işlemlere bağlı olarak önce sessiz (inaktif) ya da “**lag fazı**” denilen bir döneme girerler. Bunu, en yüksek metabolik aktivitenin gözlemlendiği “**log fazı**” yani logaritmik artış (üreme) dönemi izler. Bundan sonra da hücreler hücre sayısının sabit kaldığı “**plato fazı**” yani bir durağan evreye girer (tüm üreme yüzeyleri kaplanmıştır). Hücrelerin nüfus yoğunluğu üremeyi baskıladığı zaman besiyerinden alınır (harvesting). İdeal olanı hücrelerin durağan evreye girmeden önce kültürden alınmalarıdır. Hücrelerin kültür kabından alınmaları için değişik yöntemler kullanılabilir:

Mekanik: Bir spatül kullanarak hücreler yüzeyden fiziksel olarak ayrılabilir. Ancak hızlı bir yöntem olmasıyla birlikte bu yöntemde hücreler zarar görebilirler. Bu nedenle ancak hücre canlılığının önemli olmadığı koşullarda bu yöntem tercih edilebilir.

Proteolitik enzimler: Tripsin, kollajenaz ya da pronaz genellikle EDTA ile kombine edildiğinde hücrelerin üreme yüzeyinden ayrılmasına neden olur. Bu yöntem de hızlı ve güvenilir olmasına karşın hücre yüzeyine zarar verebilir. Proteolitik reaksiyon serum içeren tam kültür ortamının katılmasıyla hızlı bir biçimde sona erdirilebilir.

EDTA: Tek başına EDTA kullanılarak da hücreler yüzeyden ayrılabilir.

Kültür ortamı (besiyeri) için gereken bileşenler ve üreme gereksinimleri Çizelge 2.4’de özetlendiği gibi sağlanmalıdır. Kültür kapları CO₂ etüvüne (37°C; % 5 CO₂) konduğu zaman gaz giriş çıkışı için kapların ağzı hafif açık olmalıdır. Ayrıca ortamın nemli olması ve görünür ışıktan sakınılması da gereklidir. Hücre kültürü çalışmalarında

da tüm laboratuvar çalışmalarında olduğu gibi güvenlik önlemlerine dikkat edilmelidir (74).

Çizelge 2.4: Hücre kültürü besiyerinin bileşenleri (memeli hücresi için).

Amino asitler	Vitaminler	Tuzlar	Diğerleri	Proteinler (serum yerine)
Arjinin Sistin Glutamin Histidin İzolösin Lösin Lizin Metiyonin Fenilalanin Treonin Tryptofan Tirozin Valin	Biotin Kolin Folat Nikotinamid Pantotenat Pridoksal Tiamin Riboflavin	NaCl KCl NaH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ CaCl ₂ MgCl ₂	Glukoz Penisilin Streptomisin Fenol kırmızısı Tam serum	İnsülin Transferrin Büyüme faktörleri

Hazırlanması zor, son derece titizlik gerektiren ve hassas çalışmaları içeren hücre kültür teknolojisi, bugün birçok alanda uygulanabilmesi nedeniyle büyük öneme sahiptir. Günümüzde çok sayıda insan, organ kayıplarının ya da çeşitli organların fonksiyonel bozukluğunun sonuçlarına maruz kalmaktadır. Bunların tedavisindeki alternatif çözümlerden birisi de doku ve organ transplantasyonlarının yapılmasıdır. Doku mühendisliğindeki gelişmeler ile bu artık bütün bir organ ya da dokunun transplantasyonu yerine, izole edilen fonksiyonel hücrelerin doğrudan veya çeşitli polimerik matrisler içinde canlıya implantasyonu şeklinde olmaktadır. Bütün bu yapıların elde edilebilmesi, hücre kültürü teknolojisindeki gelişmeler ile olabilmektedir (72,74,75).

2.5. Akım Sitometre ve Kullanım Alanları

Akım sitometre sistemleri hücrelerin yüzeyi ya da içindeki yapıların (antijen, reseptör vb.) boyut, granülarite ve floresan gösterme özelliklerini saptamakta kullanılan

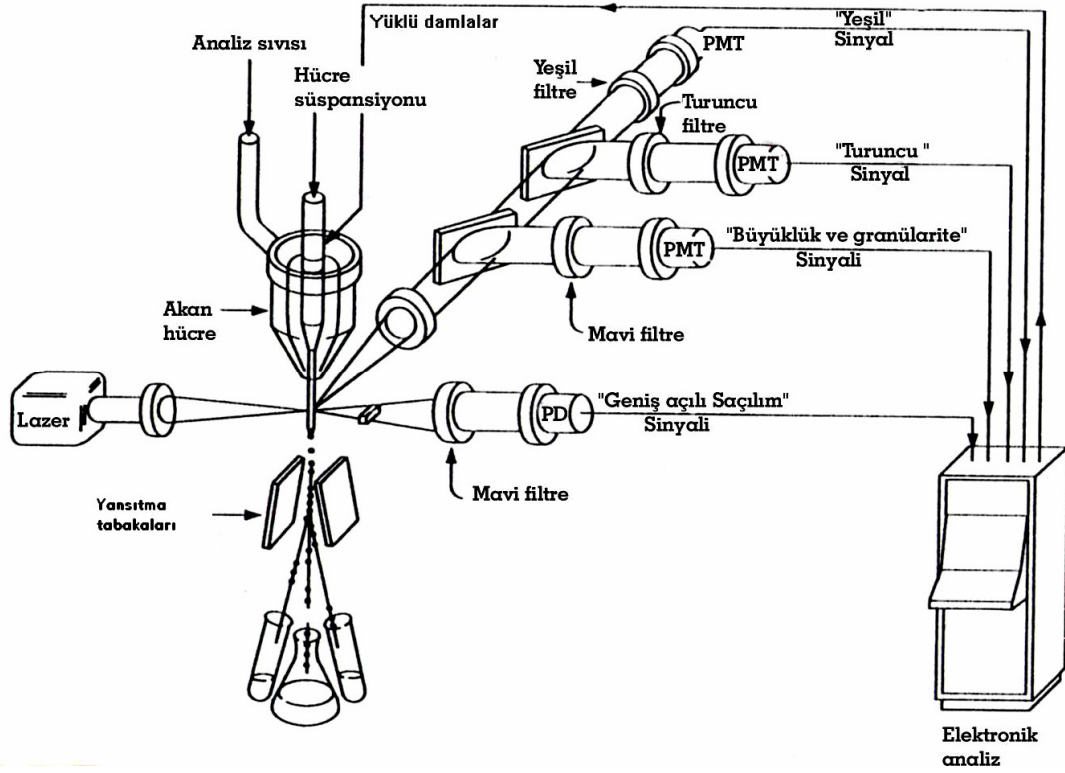
bir sistemdir. Bu sistem, bir kanalda hareket eden çok sayıda hücrenin büyüklük, granül içeriğini ve aldığı floresan yoğunluğunu çok hızlı bir şekilde nitel ve nicel olarak ölçmektedir. Hücreler akım sitometrede ölçüm öncesi floresan işaretli moleküller ile boyanırlar ve “Fosfat Tampon Çözeltisi” (PBS) gibi bir sıvı içerisinde cihaza okutulur. Bu floresan moleküller, lazer ışını absorbe ederek uzun dalga boyunda ışın saçarlar. Saçılan ışınlar değişik ayna ve filtre sistemlerinin yardımıyla detektörlerle toplanır ve optik sinyaller alınır. Bu optik sinyaller elektronik sinyallere dönüştürülerek bilgisayara aktarılır ve değişik hücrelerin sayısal analizi yapılır (34).

Akım sitometre, çok sayıda hücrenin kısa sürede sayılmasını sağlaması, aynı anda birçok parametreyi objektif bir şekilde ölçebilmesi nedeni mikroskop kullanımı ile karşılaştırıldığında birçok avantaj sağlayan bir ölçüm sistemidir (34).

1934 yılında Andrew Moldaven isimli araştırmacının "akım boyunca kan hücrelerinin sayımı" tekniğini pekiştirmesi ile başlayan tarih süreci hızlı adımlarla gelişmiş ve günümüzde hücrelerin tek tek araştırılması aşamalarına kadar geliştirilmiştir (76).

Akım sitometre, akım sistemi, lazer ışık kaynakları, optik, elektronik ve bilgisayar sistemi olmak üzere dört bileşenden oluşur. Akım sistemi, örnek sıvının “hidrodinamik odaklama” ilkesine göre aktığı sistemdir. Bu sistem ile hücreler akım odası denilen ana bölüme gelirler ve burada lazer ışını ile karşılaşırlar. Lazerler tek renkli ışık kaynaklarıdır. Akım sitometrede en çok kullanılan lazer ışık kaynağı “Argon iyon lazer” dir. Bunlar, 488 nm dalga boyunda ışın yayar ve birçok florokrom tarafından emilir. Optik filtreler, belirli dalga boyundaki ışınların geçmesini sağlarken, belirli dalga boyunun altındaki ya da üstündekilerin geçmesini engellerler. “Dichroic filtre” ve “Band-pass filtre” olmak üzere iki tip filtre vardır. Dichroic filtreler, kısa dalga boyundaki ışınları ayırıp, uygun detektöre gönderirken, daha uzun dalga boyundakilerin geçmesine izin verirler. Band-pass filtreler, spesifik dalga boyundaki ışınların geçmesini sağlarlar. Elektronik sistemde, her hücreden saçılan ışınların sinyalleri elektronik voltaj atımlarına çevrilir ve her sinyalin yükseklik, alan, genişlik boyutları depo edilen dijital sinyallere dönüştürülür (Şekil 2.11). Bilgisayar sisteminde,

optik ve elektronik sistemce saçılan ışınlar ve floresan, elektrik sinyallere çevrilir ve bu bilgi dijital bilgiye çevrilerek bilgisayarda analiz edilmek üzere depolanır (34, 76).



Şekil 2.11: Akım Sitometre cihazının işleyiş şeması (34).

Günümüzde, akım sitometre birçok tıp alanında rutin olarak kullanılmaktadır. Işık mikroskopunda bir defada 100–1.000 hücre yaklaşık 5 dakikada incelenebilirken, akım sitometrede 1.000–1.000.000 hücre bir dakika gibi kısa bir sürede incelenebilmektedir. Bu veriler ışığında günümüzde akım sitometre pek çok araştırmada kullanılmaktadır. Akım sitometrenin kullanım alanları arasında immünofenotipleme, DNA analizi, hücre proliferasyonu ve apoptozun incelenmesi, RNA ve protein içerik analizi, membran permeabilite ve potansiyellerinin değerlendirilmesi sayılabilmektedir. Bunlardan başka akım sitometre ile ilaç alım ölçümleri ve mikroorganizma tayini yapılabilmekte, ayrıca intrasellüler açıdan kalsiyum iyon tetkikleri, pH ölçümleri,

glutasyon analizi ve virüs ile viral ürün tayinleri de son yıllarda akım sitometrenin önem kazandığı başlıklar olarak karşımıza çıkmaktadır (76).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Ankara Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (HÜKÜK) sağlanan insan nöroblastomaya özgül SK–N–MC hücre hattı ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalından sağlanan insan kronik myeloid lösemi hücre hattı olan K–562 kullanıldı.

Bu hücrelerde sitotoksiteyi göstermek için belirli doz ve sürelerde Rho kinaz inhibitörü olan Y–27632, COX–2 inhibitörü olan niflumik asit ve siklofosfamid uygulandı ve **tripan blue canlılık testi** (Tyripan Blue Exclusion) yöntemi ile canlılık deneyi yapıldı. Kontrol ve etken madde verilmiş hücrelerden total RNA izole edildi ve kaspaz–3, kaspaz–8 ve gliseraldehidfosfat dehidrogenaz (GAPDH housekeeping gen) gen ekspresyonları, **Realtime online Revers Transkriptaz RT–PCR** ile saptandı ve GAPDH'a oranlanarak ekspresyonların relatif oranları belirlendi. Aynı genler için **Western Blot** yöntemi ile protein ekspresyonları saptandı. Erken ve geç apoptozu göstermek için **Annexin–V FITC** kiti ile akım sitometrik çalışmalar yapıldı.

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar

RPMI–1640 hücre besi yeri ortamı (Biological Industries 01–106–1B)

DMEM hücre besi yeri ortamı (Biological Industries 01–053–1A)

Tripsin EDTA (Sigma T4049)

Fötal dana serumu (Biochrom AG S0115)

L–Glutamin (Biochrom AG K0282)

Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin (Biological Industries 03–033–1C)

DiMetil Sülfoksit (Sigma D8418)

3.1.2. İlaç ve Sitotoksisite Deneyinde Kullanılan Kimyasallar

Y-27632 (Tocris Bioscience 1254)

(*trans*-4-[(1*R*)-1-aminoetil]-*N*-4-piridinilsikloheksankarboksamid dihidroklorid)

Kimyasal Formülü: $C_{14}H_{21}N_3O \cdot 2HCl \cdot H_2O$

Moleküler Ağırlık: 338.28

Niflumik Asit (Sigma N0630)

Kimyasal Formülü: $C_{13}H_9F_3N_2O_2$

Moleküler Ağırlık: 282.22

Siklofosfamid (Sigma C7397)

Kimyasal Formülü: $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$

Moleküler Ağırlık: 279.10

Tripan Mavi Boyası (Sigma T8154)

Etanol (Fluka 02851)

3.1.3. Gen Ekspresyonu Saptanmasında Kullanılan Kimyasallar

E.Z.N.A. Total RNA Kit (Omega R6834-01)

First Strand cDNA Sentez Kiti (New England Biolabs E6500S)

LightCycler TaqMan Master (Roche 04535286001)

LightCycler h-GAPDH Housekeeping Gen Seti (Roche 03261883001)

Primerler:

Kaspaz 8 Forward 5'-AGGGCTCAAATTTCTGCCTAC-3'

Reverse 5'-GGCACTGGCTGTTTGCTT-3'

Kaspaz 3 Forward 5'–CTGGTTTTCGGTGGGTGT–3'

Reverse 5'–CAGTGTTCTCCATGGATACCTTTATT–3'

GAPDH Forward 5'– TGCACCACCAACTGCTTA–3'

Reverse 5'– GGATGCAGGGATGATGTTC–3'

Problar:

Kaspaz–8 UPL Prob 29 (Roche Universal ProbeLibrary 04687612001)

Kaspaz–3 UPL Prob 34 (Roche Universal ProbeLibrary 04687671001)

3.1.4. Protein Ekspresyonu Saptanmasında Kullanılan Kimyasallar

Akrilamid/bisakrilamid % 30'luk solüsyonu (Sigma A3574)

Amonyumperoksodisülfat (APS; Merck 1.01200.1000)

Anti Aktin (Sigma A5060)

Anti Kaspaz–3 (Sigma C9598)

Anti Kaspaz–8 (Sigma C2976)

Bromfenol Blue (Sigma B0126)

Coomasive Blue (Sigma B0149)

Enhanced Kemiluminesans ECL Plus Western Blot Deteksiyon Kiti (Amersham Biosciences, Freiburg Germany)

Glisin (Merck 5.00190.1000)

Horseshoe peroksidaz (HRP; Sigma A8592)

Merkaptoetanol (Merck 1.15433.0050)

Metanol (Riedel–de Haën 34906)

Protein Assay Dye Reagent (Biorad 500–0006)

Röntgen Film Developer Solüsyon (General Rapid Medical)

Röntgen Film Fixer Solüsyon (General Rapid Medical)

Sığır Serum Albumin (BSA; Sigma A2058)

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS; Sigma L4509)

Sodyum Klorid (Riedel–de Haën 13565)

Temed (Merck 1.10732.0100)

Tris HCL (Serva 37180)
Trizma Base (sigma T6066)
Tween 20 (Merck 8.22184.0500)
Yağsız Süt Tozu (Nestle)

3.1.5. Akım Sitometre’de Kullanılan Kimyasallar

Anneksin-V FITC Apoptoz Tespit Kiti I (BD Pharmingen 556547)
PBS Tablet (Amresco E404)

3.1.6. Kullanılan Çözeltilerin İçerikleri

Lizis Tamponu

Tris HCl (78.8 mg)
SDS (10 mg)
Distile su (50 ml)

Bradfort Solüsyonu

Protein assay solüsyonu (2 birim)
Distile Su (7 birim)

Örnek Tamponu (2x)

0.5 M Tris HCl (pH 6.8; 2.5 ml)
%10’luk SDS (4 ml)
Gliserol (2 ml)

Merkaptoetanol (0.2 mM)

Bromfenol blue (0.2 mg)

% 10'luk Akrilamid (SDS-PAGE) Jel

Distile Su (1.25 ml)

% 30 Akrilamid (1.565 ml)

1.5 M Tris HCL (pH 8.8; 1.165 ml)

% 10 SDS (pH 7.2; 46.87 µl)

% 10 APS (17.5 µl)

Temed (3 µl)

Üst Jel (SDS-PAGE)

Distile Su (2.38 ml)

% 30 Akrilamid (520 ml)

1.5 M Tris HCL (pH 8.8; 390 µl)

% 10 SDS (pH 7.2; 65 µl)

% 10 APS (50 µl)

Temed (6 µl)

Yürütme Tamponu (10x)

Trizma base (3.03 g)

Sodyum Klorid (8 g)

Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır ve pH 7.5'e ayarlanır.

Yürütme Tamponu (kullanım)

10x Yürütme tamponu (100 ml)

Distile Su (900 ml)

Elektroblot Tamponu

10x Yürütme tamponu (100 ml)

Distile Su (900 ml)

Metanol (200 ml)

% 10 Amonyumperoksodisülfat (APS)

APS (100 mg)

Distile su (1 ml)

% 10 Sodyum dodesil Sülfat (SDS)

SDS (10 g)

Distile su (90 ml)

Tris Tamponu (TBS)

Trizma Base (3.03 g)

Sodyum Klorid (8 g)

Distile su (1lt)

Tween İçeren Tris Tamponu (TBS-T)

Tris Tamponu (1 lt)

Tween 20 (2 ml)

Bloklama Solüsyonu

TBS-T (100 ml)

Yağsız Süt Tozu (5 g)

Coomasive Blue

Coomasive Blue (0.1 g)

Metanol (50 ml)

Asetik Asit (10 ml)

Distile Su (40 ml)

3.2.Kullanılan Yöntemler

Bu araştırmada kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

- 10^{-4} M– 10^{-8} M derişimler arasında Y–27632, niflumik asit ve siklofosfamid uygulaması yapılması için SK–N–MC ve K–562 hücreleri laboratuvar şartlarında çoğaltıldı.
- Y–27632, niflumik asit ve siklofosfamid'in sitotoksik etkisi için *Tripan mavisi boyama* yöntemi kullanılarak SK–N–MC ve K–562 hücrelerinin canlılık testi yapıldı.
- Etkin ve toksik olmayan dozun saptanmasından sonra belirlenen gruplara ilaç uygulaması yapıldı. 24 ve 48 saat sonunda kaspaz–3 ve kaspaz–8 gen ekspresyonu için total RNA eldesi ve bunu takiben cDNA eldesi yapıldı. Protein ekspresyonu için total protein eldesi yapıldı.
- Deney grupları şu şekilde oluşturuldu;
 1. N8: niflumik asit 10^{-8} M
 2. N7: niflumik asit 10^{-7} M
 3. C7: siklofosfamid 10^{-7} M
 4. C6: siklofosfamid 10^{-6} M

5. Y5: Y-27632 10^{-5} M
6. N8Y5: niflumik asit 10^{-8} M / Y-27632 10^{-5} M kombinasyonu
7. N7Y5: niflumik asit 10^{-7} M / Y-27632 10^{-5} M kombinasyonu
8. C7Y5: siklofosfamid 10^{-7} M / Y-27632 10^{-5} M kombinasyonu
9. C6Y5: siklofosfamid 10^{-6} M / Y-27632 10^{-5} M kombinasyonu
10. NK: Negatif kontrol
11. PK: Pozitif kontrol

- SK-N-MC ve K-562 hücrelerinde apoptozu göstermek için, *anneksin V boyama* tekniği ile akım sitometrik inceleme çalışmaları yapıldı.
- Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Statistica v7.0, SPSS for Windows v11.5 ve Scion Image for Windows v4.0 paket programlarındaki *Kruskal Wallis*, *Dunn*, *tek yönlü varyans analizi (ANOVA)*, *Dunnet _t* ve *Bonferroni* testleri kullanıldı.

3.2.1. Hücre Kültürü

Bu araştırmada kullanılan SK-N-MC ve K-562 hücreleri, hücre kültüründe çoğaltılarak laboratuvar şartlarına uyumu sağlandı. Belirlenen deney grupları oluşturulduktan sonra *Tripin mavisi boyama* yöntemi kullanılarak sitotoksosite deneyleri yapıldı.

Hücrelerin Besiyeri Ortamı

RPMI-1640 hücre besi yeri ortamı	100 ml
DMEM hücre besi yeri ortamı	100 ml
Fötal dana serumu	% 15
Penisilin	10.000 U/ml
Streptomisin	10 mg/ml
Amfoterisin-B	0.025 mg/ml
L-Glutamin	0.3 g/L

Hücrelerin Fiziksel Ortam Şartları

Sıcaklık	37 °C
pH	7.0–7.4
CO ₂	% 5

Hücrelerin Bölünme ve Pasaj Zamanları

SK–N–MC: 1:3 pasaj 3–4 günde bir Tripsin–EDTA ile

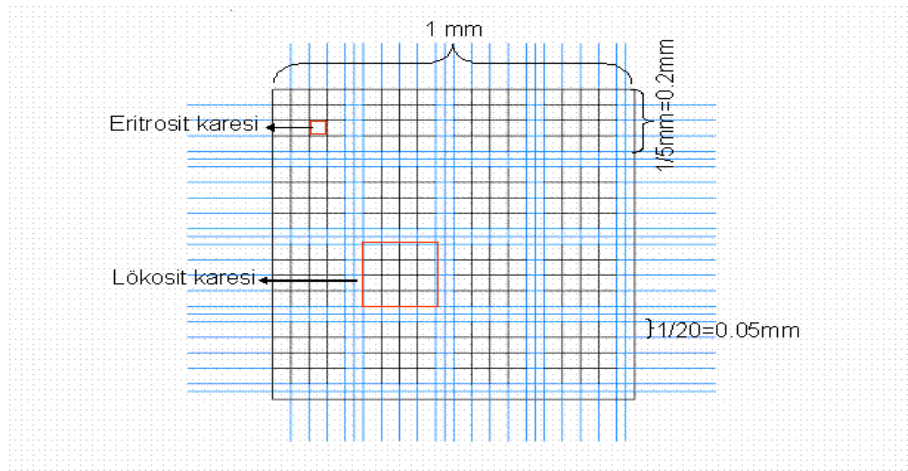
K–562: 1:3 pasaj 2 günde bir

Üreme Ortamı

T3 (25ml) ve T4 (75ml) ortam kapları,

4, 6 ve 24 kuyucuklu ortam kapları

Hücrelerin Sayımı: Hücreler 1:1 oranında taze besi yeri ortamı/PBS ile seyreltildikten sonra Neuber–hemositometreye alındı. Hemositometredeki dört karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra çıkan sayı Dilüsyon Etkeni x 10⁴ ile çarpılıp 1 ml’deki hücre sayısı (hücre/ml) bulundu (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Neuber–Hemositometrede hücre sayımı (77).

3.2.2. *In vitro* Sitotoksosite Deneyi

24 kuyucuklu kaplara 1×10^5 hücre/1ml olacak şekilde Y-27632, niflumik asit ve siklofosamid değişik dilüsyonlarda (10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M) eklenerek 12, 24, 36 ve 48 saatlik sürelerdeki toksisite Tripan mavisini boyası ile belirlendi. İnkübasyon sonrası hücreler 1:1 oranında (hücre süspansiyonu:tripan mavi boyası) seyreltildiler ve *Neuber Lamı*'nda ışık mikroskopunda sayıldılar. Tripan mavisini alan hücreler ölü olduğundan, maviye boyanmış ve boyanmamış hücrelerin sayımı ile sitotoksosite belirlendi. Çıkan sayı (dilüsyon faktörü $\times 10^4$) ile çarpılıp ölü ve canlı hücrelerin yüzde değerleri bulundu. % 70 ve üzerinde canlılık saptanan gruplar deney grubuna dahil edildi.

Ölü hücrelerin yüzdesi: Tripan mavisini alan hücreler/Tüm hücreler $\times 100$

3.2.3. Gen Ekspresyonu Deneyleri

DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan bir yöntemdir. Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real-time PCR, geleneksel PCR'ın uygulama alanlarını arttırırken PCR'la ilişkili pek çok laboratuvar sorununa da çözüm getirmiştir. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir (78).

Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta,

kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir (79, 80).

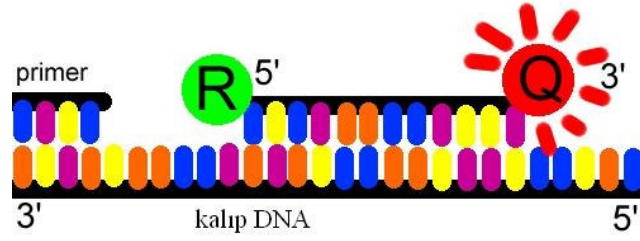
TaqMan Gen Ekspresyon Master hassas bir şekilde formüle edilmiş, yüksek duyarlılıkta, rutin ve araştırma amaçlı kantitatif uygulamalarda kullanılabilen bir Real-time PCR sistemidir. Düşük düzeyde ekspresyonu yapılan genlerin araştırılmasında, hedef ve referans genlerin dupleks PCR uygulaması sonrasında, benzer DNA veya RNA dizilerinin karşılaştırılması ile kullanılmaktadır (81).

TaqMan sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probonun 5' ucunda raportör florokrom (Reporter, R; 6-karboksiflorescein=6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (Quencher, Q; 6-karboksi-tetrametil-rodamin=TAMRA) bulunmaktadır (Şekil 3.2). Prob tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanmaktadır (Şekil 3.3). Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik aside bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5' → 3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur (Şekil 3.4). Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır. Kalıp DNA'ya hibridizasyondan sonra yansıtılan Floresan Light Cycler cihazı ile ölçülür. Aynı bir PCR'da yapılan aynı cDNA preparasyonu kullanılarak gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kodlayan mRNA housekeeping gen olarak kullanılır. Bunun ürünü, RNA kontrolü ve rölatif kantitasyon için kullanılır. Her bir örneğin kantitasyonu, örneğin floresan rezonans enerjisi Light Cycler Kantitasyon Software'ı (LCQuant, Roche Diagnostics) kullanılarak ölçülür. Bakılacak örnekte, ilgili gen mRNA miktarının ölçülmesi için rölatif kantitasyon kullanılır. Amplifiye edilen DNA'nın kantitasyon analizi, kantitasyon software (Relative Quantification software Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ile hesaplanmaktadır. PCR sırasında elde edilen amplikonlar, doğrudan Light Cycler cihazında, logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirilmektedir.

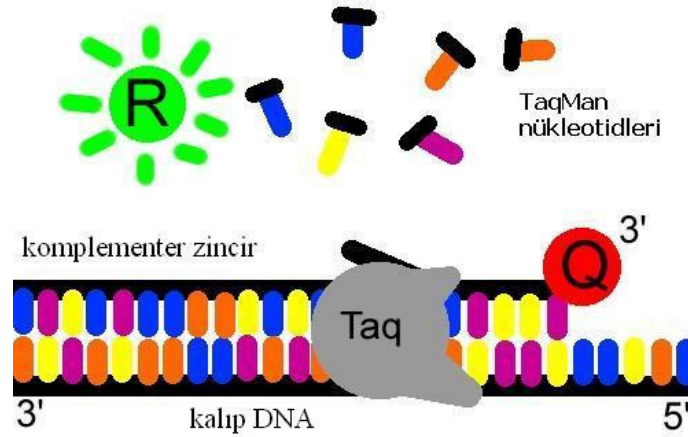
Çalışılan örnekteki geçiş noktasına (CP; Crossing Point) göre DNA'nın rölatif miktarı kantitasyon software tarafından belirlenmektedir (82,83, 84).



Şekil 3.2: TaqMan sisteminde kullanılan prob (84).



Şekil 3.3: Probu tek sarmal hale getirilen kalıp DNA'ya bağlanması (84).



Şekil 3.4: Raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması (84).

3.2.3.A. E.Z.N.A. Total RNA Kiti ile RNA izolasyonu

Her bir deney grubundaki SK–N–MC ve K–562 hücrelerine, kit içerisinde mevcut olan TRK tamponu (350 µl) eklendi. Bunun üzerine eşit hacimde % 70'lik etanol eklenerek vortekslendi. Örnekler, kit içerisinde mevcut olan HiBind RNA Spin tüpüne alınarak 10.000xg de 1 dakika santrifüj edildi. İkişer kez RNA yıkama tamponu ile aynı süre ve hızlarda santrifüjlendikten sonra süpernatant, temiz ependorf tüplere alındı. 50 µl dietilpirokarbonatlı su eklenerek santrifüj edildi ve RNA'nın çözülmesi için 50 °C'de 15 dakika bekletildi. Elde edilen RNA'nın 20 µl'si saflığının ölçülmesi için –20 °C'ye alınırken, kalanı cDNA eldesi için –80 °C'de saklandı.

Elde edilen RNA'nın miktar ve saflığının tespit edilmesi için spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Bunun için, 20 µl örnek alınıp quartz tüp içinde distile su ile hacmi 2 ml'ye tamamlandı ve iyice karıştırıldı. Spektrofotometrenin ayarı yapıldıktan sonra küvet içindeki karışımın 260 ve 280 nm'deki optik dansite değerleri ölçüldü. 260 ve 280 nm'deki optik dansite değerlerinin oranı hesaplanarak RNA'nın saflığı hesaplandı. Aşağıdaki formüller kullanılarak elde edilen RNA'nın konsantrasyonu, miktarı ve saflığı belirlendi.

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Okunan OD değeri} \times 0.05 \times 100 \text{ (sulandırma katsayısı)}$$
$$\text{Saflık} = 260 \text{ nm OD değeri} / 280 \text{ nm OD değeri}$$

3.2.3.B. First Strand cDNA Sentez Kiti ile cDNA Eldesi

Elde edilen RNA örneklerinden 5 µg/ml olacak şekilde alınarak üzerine 2 µl kit içerisinde bulunan random primer, 4 µl nükleotid karışımı ve 9 µl distile su eklenerek 70 °C'de 5 dakika bekletildi. Süre sonunda bu karışımın üzerine 2 µl revers transkriptaz tamponu, 1 µl RNase inhibitörü ve 1 µl revers transkriptaz enzimi eklenerek 42 °C'de 1 saat inkübe edildi. Enzim inaktivasyonu için 95 °C'de 5 dakika bekletilen örnekler, analizi yapılana kadar –20 °C'de saklandı.

3.2.3.C. Realtime Revers Transkriptaz RT-PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi

Elde edilen cDNA örneklerinden kaspaz-3, kaspaz-8 ve gliseraldehidfosfat dehidrogenaz (GAPDH housekeeping gen) gen ekspresyonları Real-Time online Revers Transkriptaz RT-PCR ile Light Cycler Real-Time PCR (Roche, Almanya) cihazı ile belirlendi. Her bir gruptan elde edilen geçiş noktası değeri (CP), GAPDH'a oranlanarak ekspresyonların rölatif oranı (E değeri; efficiency) saptandı. Pozitif ve negatif kontrole göre örneklerin E değeri karşılaştırılarak gen ekspresyon düzeyi belirlendi. E değeri şu şekilde hesaplandı;

$$E = 2^{-(\text{örnek CP değeri} / \text{housekeeping CP değeri})}$$

Realtime PCR reaksiyonu kaspaz-3 ve kaspaz-8 için şu şekilde yapıldı;

1 örnek için	
Su	10.4 µl
UPL Prob (10 µM)	0.2 µl
Primer (forward)	0.2 µl
Primer (reverse)	0.2 µl
TaqMan master	4 µl
cDNA	5 µl

Realtime PCR reaksiyonu GAPDH için şu şekilde yapıldı;

1 örnek için	
Su	8.6 µl
MgCl ₂	2.4 µl
Deteksiyon karışımı	2 µl
Master karışımı	2 µl
cDNA	5 µl

PCR koşulları Light Cycler cihazı ile şu şekilde sağlandı;

95 °C	10 dakika	1 siklus	
95 °C	10 saniye		↑ 45 siklus ↓
45 °C	20 saniye		
72 °C	1 saniye		
40 °C	30 saniye	1 siklus	

3.2.4. Protein Ekspresyonu DeneYleri

3.2.4.A. Protein Eldesi

SK–N–MC ve K–562 hücrelerinden protein eldesi için belirlenen deney gruplarındaki her bir örneğin üzerine 150 µl kaynar lizis tamponu eklendi. Aderent olan SK–N–MC hücrelerini içeren flasklar hücre sıyırıcı (cell scraper) ile iyice sıyırılarak ependorf tüplerine alındı. Süspansen olan K–562 hücreleri ise direk ependorf tüplere alınarak 5 dakika kaynatıldı. Vortekslenen ependorflar 13.000 rpm’de +4°C’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar temiz bir ependorfa alınarak –20 °C’de saklandı. Elde edilen proteinin 10 µl’si protein tayini için ayrı bir ependorfa alındı.

3.2.4.B. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Oldukça duyarlı olan bu yöntem (5–100 µg/ml); organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk oluşturmasını esas alır. Mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik amino asitler ve aromatik amino asitler) önemlidir. Yöntemde temel alınan olgu, boya normal şartlarda 465 nm’de maksimum absorpsiyon verirken, protein ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon vermesidir (85, 86).

Standart olarak kullanılmak üzere 1 mg/ml sığır serum albumin (BSA) hazırlandı. Standartlar için; 0, 10, 20, 30, 50, 75, 100 µl standart solusyonu (BSA) içeren ikişer adet ependorfun üzerleri distile su ile 100'er µl'ye tamamlandı. Ölçülecek olan örnekler de yine çift olarak hazırlandı ve 100'er µl'ye tamamlandı. Standart ve örnekler üzerine 1'er ml bradfort solüsyonu eklenerek vortekslendi. 595 nm'ye ayarlı spektrofotometrede kör tüpüne karşı örnekler okutuldu. Daha sonra elde edilen absorbansların her örnek için ayrı ayrı ortalamaları alınarak Prism programında µl deki protein miktarları belirlendi.

3.2.4.C. Western Blot Analizi

SK-N-MC ve K-562 hücrelerinden elde edilen protein karışımında hedef protein olan kaspaz-3 ve kaspaz-8'in varlığını göstermek amacıyla özel bir protein-protein hibridizasyon tekniği olan Western-Blotlama yöntemi kullanıldı.

Öncelikle proteinler, örnek tamponu ile 1/1 oranında karıştırıldıktan sonra 5 dakika kaynatıldı. Kaynatılarak denatüre edilen proteinler örnek tamponu içeriğindeki SDS yardımı ile negatif yükle yüklenir ve hidrofobik etkileşimleri bozularak lineer hale gelirler. Tamamen negatif yüklenen proteinler elektroforez sırasında katottan anoda doğru hareket ederler. Eşit miktarlarda protein % 10'luk sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS-PAGE) jele yüklenerek yürütme tamponu ile elektroforeze tabi tutuldu (120 volt, 2 saat) ve jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlandı.

Poliakrilamid jel matriksi farklı büyüklükte porlar içerir, bu nedenle protein karışımı jele yüklenip elektroforez uygulandığında; proteinlerin bu kanallardan geçiş hızı tamamen büyüklüklerine bağlıdır. Küçük proteinler jelde hızlı, büyük proteinler yavaş ilerleyebilirler (72). Jelde büyüklüklerine göre ayrılan ve bantlar oluşturan proteinler elektrotransfer tekniği ile PVDF bir membrana aktarıldı.

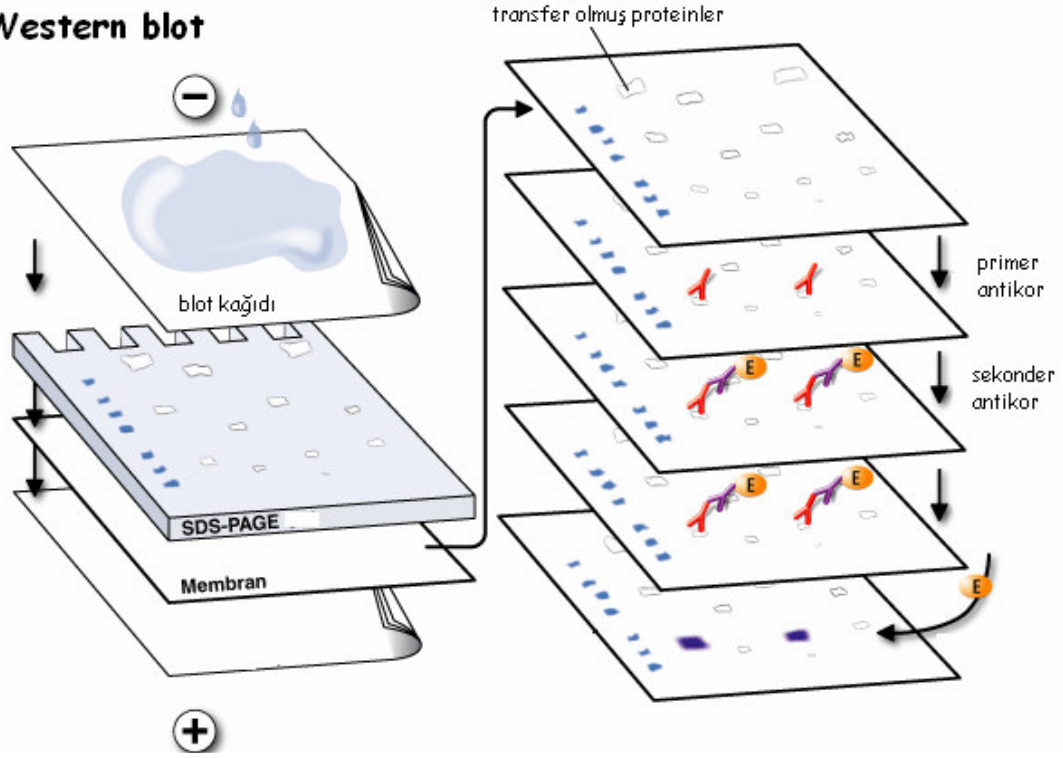
Elektrotransfer işlemi için geniş iki adet borcam alındı; bunlardan birine 4 adet sünger yerleştirildi ve üzerlerine borcamı kaplayacak şekilde elektroblot tamponu

eklendi. Diğer borcama borcamın tabanını kaplayacak Şekilde elektorblot tamponu ilave edildi. Daha sonra 4 adet filtre kağıdı ve 2 adet PVDF membran kesilip gerekli ölçölere getirildi. Membranlar birkaç saniye metanol ile ıslatıldıktan sonra elektroblot içeren borcama kondu. Süresi dolmuş olan elektroforez kabı alınarak cam plaklar cihazdan ęıkarıldı. ęıkarılan cam plakaların arası bisturi yardımıyla açıldı. Jel uygulamaya başlandığı yön tarafından alt kenar ucundan belirteğ olmak üzere küçük bir paręa kesildi. Üst jel ve kenarlar kesilerek atıldı. Jel pastör pipeti yardımıyla sürekli olarak elektroblot tamponu ile ıslatılarak cam plakanın üzerinden kaydırılarak ęıkarıldı ve içerisinde membranın da bulunduğu elektroblot tamponu içeren borcama alındı.

Mini Trans–blot elektroforetik transfer aleti hazırlandı. Islak sünger sandviğ aletinin beyaz yüzü üzerine kondu. Islak süngerin üzerine 1 adet ıslak filtre kağıdı kondu. Islak filtre kağıdının üzerine membran ve membranın üzerine jel kondu. Jel pipet ile düzleştirildi ve jelin üzerine tekrar 1 adet filtre kağıdı kondu. Sonra sünger konur ve sandviğ aleti kapatılarak transblot kutusuna yerleştirildi. Bu yerleştirme yapılırken aletin kırmızı (anod) kısmına sandviğ aletinin beyaz kısmının gelmesine dikkat edilmelidir. Daha sonra aynı işlem diğer jel için de yapılarak ikinci panel de alete aynı Şekilde yerleştirildi. Kutu elektroblot tamponu ile dolduruldu. Üzeri kapatılarak fişleri takıldı ve buzdolabına yerleştirilerek güç kaynağına bağlandı. 90 miliamperde bir gece (16 saat) transfer yapıldı (Şekil 3.5).

Elektroblotting aleti açıldı ve membranlar alınarak, iğlerine 10 ml TBS–T solüsyonu konmuş plastik kaplarda ęalkalayıcıda iyice ıslatıldı. Sonra kaplardaki TBS–T boşaltıldı ve membranların üzerini tam kaplayacak Şekilde bloklama solüsyonu ilave edilerek 1 saat bloklama işlemine tabi tutuldu. Bu sayede membranların proteinsiz kısımlarının spesifik olmayan bir proteinle tutunması sağlanarak protein yapıda olan primer antikoru bir sonraki aşamada membrana non–spesifik bağlanması engellenmiş oldu.

Western blot



Şekil 3.5: Western blot işleminin şematik görünümü (87).

Bir saatlik bu bloklama işleminden sonra membranlar 3 kez 10'ar dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandıktan sonra kaspaz-3, kaspaz-8 ve aktin enzimlerine özgü antikorlar ile 1:2000 dilüsyonda 2 saat muamele edildi. Böylelikle primer antikor membrana bağlı olan hedef protein kaspazlar ile bağlanmış oldu. Bu işlem sonrasında da membranlar tekrar TBT-T solüsyonu ile 3 defa 10'ar dakika yıkandı.

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra membranlar bu kez HRP (horseradish peroksidaz) bağlı sekonder antikor ile (1:1000 dilüsyonda) 1 saat muamele edildi ve böylece sekonder antikorun gidip primer antikora bağlanması gerçekleştirilmiş oldu. Bunun ardından membranlar tekrar 3 kez 10'ar dakika TBS-T içeren solüsyon ile yıkandı.

Daha sonra membranlar ECL (enhanced chemiluminescence) Plus Kit (Amersham Biosciences, Freiburg Germany) görüntüleme solüsyonu ile 10 dakika karanlıkta muamele edildi. Çeşitli sürelerde medikal röntgen filme basılarak Röntgen

Film Developer Solüsyon ve Röntgen Film Fikser Solüsyonlardan geçirilerek görüntülendi.

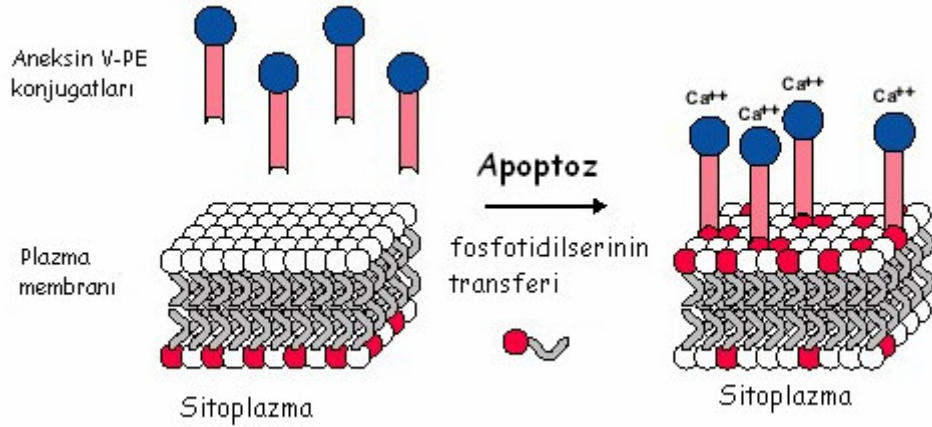
3.2.5. Akım Sitometre Deneyleri

Apoptozun ölçülmesinde akım sitometre kullanımının iki temel amacı vardır:

1. Hücre ölümünde rol oynayan moleküler ve işlevsel mekanizmaların aydınlatılması,

2. Ölü hücrelerin miktarının tayini, apoptoz ve nekroz ile oluşan ölümlerin ayırt edilebilmesi (34).

Annexin V FITC, apoptoza gitmekte olan hücreleri ayırt eder. Apoptozun erken evrelerinde, hücrelerin zar yapısı bozulmaya başlar. Hücre zarı iç kısmında bulunan fosfatidil serinler, zar dışına çıkarlar. Ortamda Ca^{2+} varlığında anneksin V, fosfatidil serin ile bağlanır. Annexin V'in fosfatidil serine yüksek ilgisi vardır. Propidyum iyodid ise canlılık için standart bir akım sitometre probudur. Canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırır. Hücre zarı korunmuş canlı hücreler propidyum iyodidi geçiremezler. Zar yapıları bozulduğunda propidyum iyodid, hücre içine kolayca girer ve DNA ya bağlanır. Hücreler annexin V-FITC ve propidyum iyodid ile negatif boyanırsa, bu onların sağlıklı olduklarını işaret eder. Annexin V-FITC pozitif, propidyum iyodid negatif boyanan hücreler, erken apoptoza gitmekte olduklarını göstermektedirler. Hücreler, hem anneksin V-FITC hem de propidyum iyodid pozitif boyanırsa, geç apoptoza ya da nekroza gitmektedirler (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: AnnexinV-FITC ile Fosfatidil Serin ilişkisi (88).

K-562 hücreleri, ilaç uygulamalarını takiben 10^5 - 10^6 hücre/ml olacak şekilde süspanse hale getirildi. Süspanse hale gelen hücreler soğuk PBS çözeltisi ile yıkanıp, üstteki sıvı atıldıktan sonra geriye kalan çökelti, Annexin-V FITC Apoptoz Tespit Kiti içerisindeki bağlanma çözeltisi ile seyreltildi. Tüpler buz üzerinde tutuldu. 490 µl hücre süspanسیونuna 5 µl kullanıma hazır *Annexin-V FITC* ve 5 µl *Propidyum İyodid* eklendi. Bu solüsyon hafifçe karıştırıldı. Tüpler buz üzerinde 15-20 dakika karanlıkta inkübe edildi. Hücre örnekleri BD Akım Sitometre cihazında analiz edildi.

3.3. İstatistiksel Analizler

Gen ekspresyonu deneyleri üçer, protein ekspresyonu deneyleri dörder, akım sitometrik analizler ise ikişer kez tekrarlandı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi.

Gen ekspresyonu deneyleri için, en az iki grup arasında, saat değerleri bakımından herhangi bir farklılık olup olmadığını tespit etmek için *Kruskal Wallis* testi, anlamlı bulunan sonuçlar için de bu farklılığın hangi gruplar arasında anlamlı olup olmadığını belirlemek için de *Dunn* testi kullanıldı. Gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda negatif kontrol grupları baz alınarak, diğer gruplar ile karşılaştırıldı.

Yapılan analizde kontrol grupları ve diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını tespit etmek için *Dunnet _t* testi kullanıldı. Yapılan istatistiksel çalışmada 1. tip hata miktarı olarak $\alpha = 0,05$ belirlenmiş ve her çalışmadan elde edilen anlamlılık değerleri ile (p) karşılaştırılmıştır.

Protein ekspresyonu sonucu elde edilen bantların analizi için *tek yönlü varyans analizi (ANOVA)* ve *Dunnet _t* testi kullanıldı.

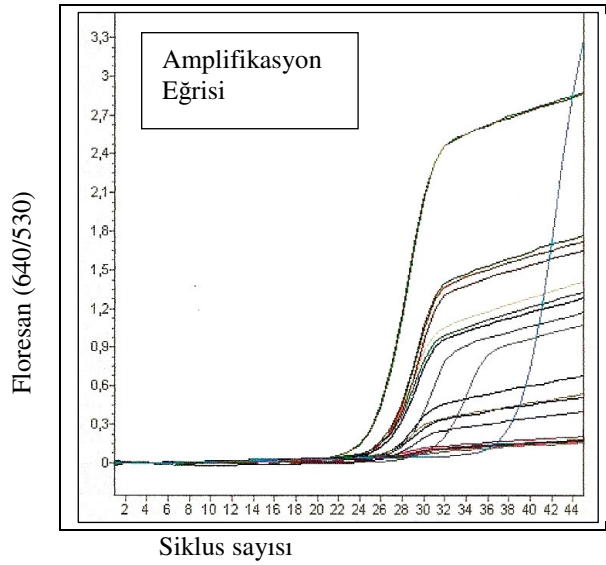
Akım Sitometre deneyleri için, kontrol grupları ve diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını tespit etmek için *Dunnet _t* testi kullanıldı. Tüm gruplar kendi aralarında canlılık oranı değişkenleri açısından karşılaştırılırken, öncelikle *tek yönlü varyans analizi (ANOVA)* kullanılarak en az iki grup arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığı incelendi. Anlamlı çıkan değişkenler için farklılıkların hangi değişken grupları arasında anlamlı olup olmadığını tespit etmek içinse *Bonferroni* testi kullanıldı.

Yapılan analizlerde Statistica v7.0, SPSS for Windows v11.5 ve Scion Image for Windows v4.0 paket programları kullanılmıştır.

4. BULGULAR

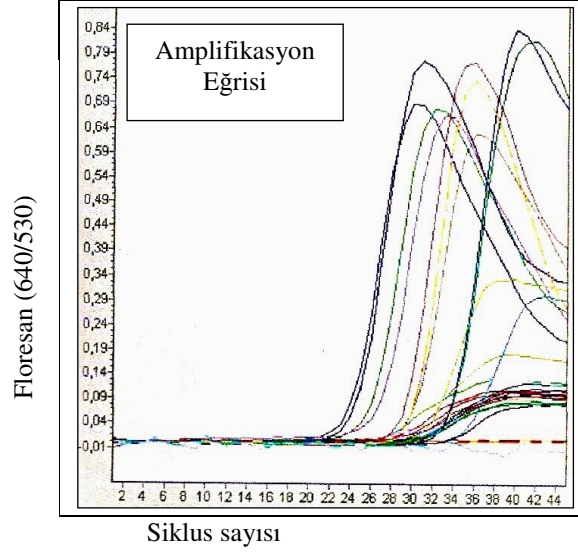
4.1. Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 İçin Gen Ekspresyonu Bulguları

SK-N-MC ve K-562 hücre hatları laboratuvar şartlarında kültüre edilip, deney grupları oluşturuldu. Hücre hatlarının 24. ve 48. saat sonunda, apoptotik genler olan kaspaz-3 ve kaspaz-8 genlerinin amplifikasyon durumu araştırıldı. K-562 hücre hattı için çalışılan tüm grupların 24. saatte kaspaz-3 geni için amplifikasyon eğrisi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



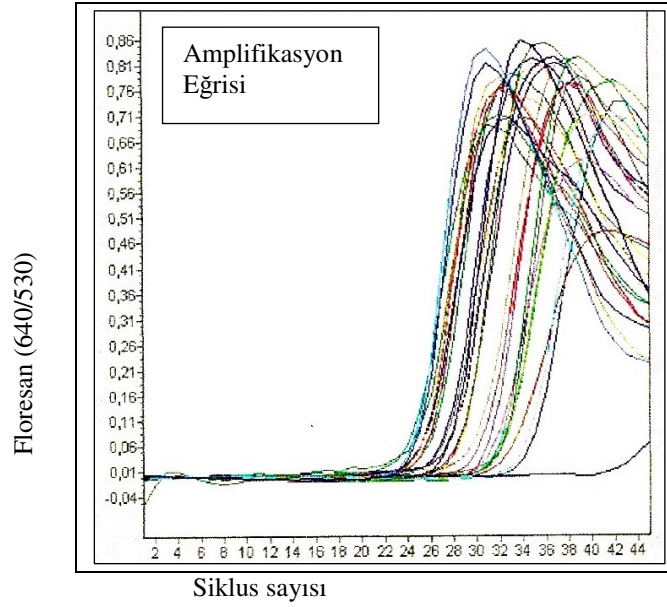
Şekil 4.1: K-562 hücre hattında 24 saat sonunda kaspaz-3 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.

K-562 hücre hattında çalışılan tüm grupların 24. saatte kaspaz-8 geni için amplifikasyon eğrisi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2: K-562 hücre hattında 24 saat sonunda kaspaz-8 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.

K-562 hücre hattında çalışılan tüm grupların 24. saatte housekeeping gen olan GAPDH geni için amplifikasyon eğrisi ise Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3: K-562 hücre hattında 24 saat sonunda GAPDH geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.

Çalışılan tüm gruplarda, ekspresyon oranları negatif kontrol baz alınarak hesaplanmıştır. Negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösteren gruplara ait p değerleri (*) ile gösterilmiştir.

K-562 hücre hattında kaspaz-3 geni için 24. saatte N7Y5, N8 grubu dışında tüm gruplarda negatif kontrole göre bir ekspresyon artışı saptanmıştır. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gruplar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1: K-562 hücre hattında kaspaz-3 geni için 24. saatte ekspresyon oranı (E) değeri ortalamaları. N8: niflumik asit 10^{-8} M, N7: niflumik asit 10^{-7} M, C7: siklofosfamid 10^{-7} M, C6: siklofosfamid 10^{-6} M, Y5: Y-27632 10^{-5} M, N8Y5: niflumik asit 10^{-8} M / Y-27632 10^{-5} M kombinasyonu, N7Y5: niflumik asit 10^{-7} M / Y-27632 10^{-5} M kombinasyonu, C7Y5: siklofosfamid 10^{-7} M / Y-27632 10^{-5} M kombinasyonu, C6Y5: siklofosfamid 10^{-6} M / Y-27632 10^{-5} M kombinasyonu, NK: negatif kontrol, PK: pozitif kontrol.

Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
N8	3	0.4601	0.0031	0.0010	1.000
N7	3	0.5224	0.0075	0.0634	0.000*
C7	3	0.4954	0.0078	0.0363	0.000*
C6	3	0.4874	0.0019	0.0284	0.000*
Y5	3	0.5000	0.0069	0.0409	0.000*
N8Y5	3	0.5236	0.0020	0.0646	0.002*
N7Y5	3	0.4465	0.0047	-0.0125	0.154
C7Y5	3	0.5046	0.0040	0.0456	0.000*
C6Y5	3	0.5321	0.0036	0.0731	0.092*
NK	3	0.4590	0.0048		
PK	3	0.5460	0.0156		

K-562 hücre hattında kaspaz-3 geni için 48. saatte N8, C6, Y5, N8Y5 ve C6Y5 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon artışı saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2: K-562 hücre hattında kaspaz-3 geni için 48. saatte E değeri ortalamaları.

Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
N8	3	0.5224	0.0041	0.0548	0.000*
N7	3	0.4506	0.0054	-0.0169	0.127
C7	3	0.4763	0.0086	0.0087	0.800
C6	3	0.4954	0.0039	0.0278	0.003*
Y5	3	0.5249	0.0109	0.0573	0.000*
N8Y5	3	0.4943	0.0079	0.0266	0.004*
N7Y5	3	0.4720	0.0114	0.0044	0.998
C7Y5	3	0.4763	0.0057	0.0087	0.803
C6Y5	3	0.5023	0.0040	0.0347	0.000*
NK	3	0.4676	0.0049		
PK	3	0.5497	0.0133		

K-562 hücre hattında kaspaz-8 geni için 24. saatte çalışılan tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon artışı saptanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3: K-562 hücre hattında kaspaz-8 geni için 24. saatte E değeri ortalamaları.

Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
N8	3	0.4146	0.0028	0.0578	0.000*
N7	3	0.5034	0.0034	0.1466	0.000*
C7	3	0.3771	0.0030	0.0203	0.024*
C6	3	0.4081	0.0107	0.0512	0.000*
Y5	3	0.4023	0.0016	0.0455	0.000*
N8Y5	3	0.4234	0.0100	0.0665	0.000*
N7Y5	3	0.5165	0.0114	0.1596	0.000*
C7Y5	3	0.4205	0.0100	0.0636	0.000*
C6Y5	3	0.4146	0.0000	0.0578	0.000*
NK	3	0.3568	0.0051		
PK	3	0.4333	0.0091		

K-562 hücre hattında kaspaz-8 geni için 48. saatte N8, N7, C6, Y5, N8Y5 ve N7Y5 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon artışı saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4: K-562 hücre hattında kaspaz-8 geni için 48. saatte E değeri ortalamaları.

Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
N8	3	0.4130	0.0189	0.0511	0.000*
N7	3	0.4548	0.0018	0.0929	0.000*
C7	3	0.3789	0.0069	0.0171	0.205
C6	3	0.4052	0.0086	0.0433	0.000*
Y5	3	0.4818	0.0038	0.1200	0.000*
N8Y5	3	0.3843	0.0139	0.0225	0.046*
N7Y5	3	0.4273	0.0061	0.0654	0.000*
C7Y5	3	0.3737	0.0025	0.0118	0.607
C6Y5	3	0.3627	0.0095	0.0008	1.000
NK	3	0.3618	0.0071		
PK	3	0.4446	0.0154		

SK-N-MC hücre hattında kaspaz-3 geni için 24. saatte N8, N8Y5 ve N7Y5 gruplarında negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon artışı saptanmıştır. C6, Y5 ve C6Y5 gruplarında ise negatif kontrole göre ekspresyon oranlarında bir azalma olduğundan dolayı, bu gruplara ait p değerleri anlamlı olarak kabul edilmemiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5: SK–N–MC hücre hattında kaspaz–3 geni için 24. saatte E değeri ortalamaları.

Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
N8	3	0.5189	0.0116	0.0468	0.000*
N7	3	0.4863	0.0033	0.0142	0.114
C7	3	0.4774	0.0038	0.0053	0.960
C6	3	0.4263	0.0029	-0.0458	0.000
Y5	3	0.4254	0.0090	-0.0467	0.000
N8Y5	3	0.4919	0.0019	0.0198	0.011*
N7Y5	3	0.5011	0.0020	0.0290	0.000*
C7Y5	3	0.4807	0.0019	0.0086	0.616
C6Y5	3	0.4654	0.0049	-0.0066	0.857
NK	3	0.4721	0.0159		
PK	3	0.5756	0.0023		

SK–N–MC hücre hattında kaspaz–3 geni için 48. saatte çalışılan tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon artışı saptanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6: SK–N–MC hücre hattında kaspaz–3 geni için 48. saatte E değeri ortalamaları.

Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
N8	3	0.4763	0.0056	0.0739	0.000*
N7	3	0.4527	0.0047	0.0503	0.000*
C7	3	0.4931	0.0034	0.0907	0.000*
C6	3	0.4719	0.0018	0.0695	0.000*
Y5	3	0.4383	0.0030	0.0359	0.000*
N8Y5	3	0.4393	0.0046	0.0369	0.000*
N7Y5	3	0.4485	0.0035	0.0461	0.000*
C7Y5	3	0.4548	0.0018	0.0524	0.000*
C6Y5	3	0.4622	0.0018	0.0598	0.000*
NK	3	0.4024	0.0042		
PK	3	0.4496	0.0047		

SK–N–MC hücre hattında kaspaz–8 geni için 24. saatte N8 ve C7Y5 gruplarında negatif kontrole göre ekspresyon artışı olmasına karşın, sadece N8 grubunda bu artış

istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer gruplarda ise ekspresyon oranlarında negatif kontrole göre azalma saptanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7: SK–N–MC hücre hattında kaspaz–8 geni için 24. saatte E değeri ortalamaları.

Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
N8	3	0.5236	0.0075	0.0202	0.003*
N7	3	0.4920	0.0104	-0.0114	0.179
C7	3	0.4601	0.0084	-0.0433	0.000
C6	3	0.4527	0.0018	-0.0507	0.000
Y5	3	0.4454	0.0047	-0.0580	0.000
N8Y5	3	0.4590	0.0048	-0.0444	0.000
N7Y5	3	0.4413	0.0030	-0.0621	0.000
C7Y5	3	0.5093	0.0053	0.0058	0.859
C6Y5	3	0.4676	0.0067	-0.0358	0.000
NK	3	0.5034	0.0034		
PK	3	0.4840	0.0019		

SK–N–MC hücre hattında kaspaz–8 geni için 48. saatte N8, N7 ve Y5 gruplarında, negatif kontrole göre ekspresyon oranında artış saptanmıştır. Diğer gruplarda ise ekspresyon oranlarında negatif kontrole göre azalma saptanmıştır (Çizelge 4.8).

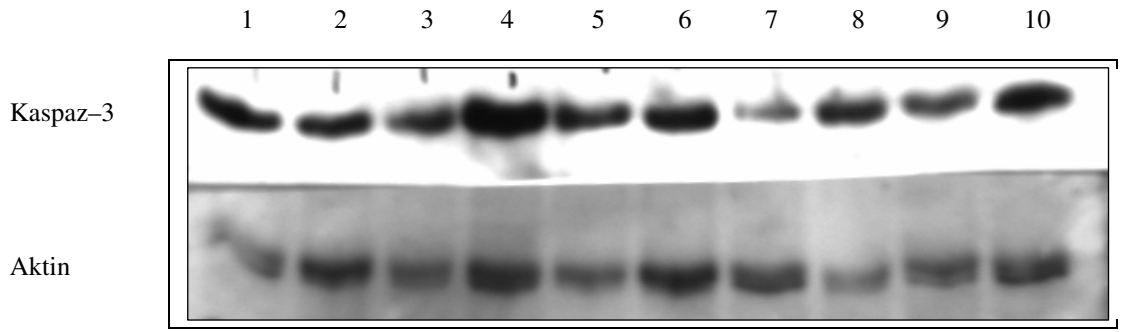
Çizelge 4.8: SK–N–MC hücre hattında kaspaz–8 geni için 48. saatte E değeri ortalamaları.

Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	E Değeri Ortalaması	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
N8	3	0.5285	0.0036	0.0673	0.000*
N7	3	0.4741	0.0019	0.0129	0.002*
C7	3	0.4444	0.0030	-0.0167	0.000
C6	3	0.4061	0.0048	-0.0550	0.000
Y5	3	0.4774	0.0019	0.0162	0.000*
N8Y5	3	0.4558	0.0018	-0.0349	0.000
N7Y5	3	0.4099	0.0043	-0.0512	0.000
C7Y5	3	0.3996	0.0069	-0.0615	0.000
C6Y5	3	0.3685	0.0000	-0.1222	0.000
NK	3	0.4611	0.0048		
PK	3	0.4908	0.0039		

4.2. Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 İçin Protein Ekspresyonu Bulguları

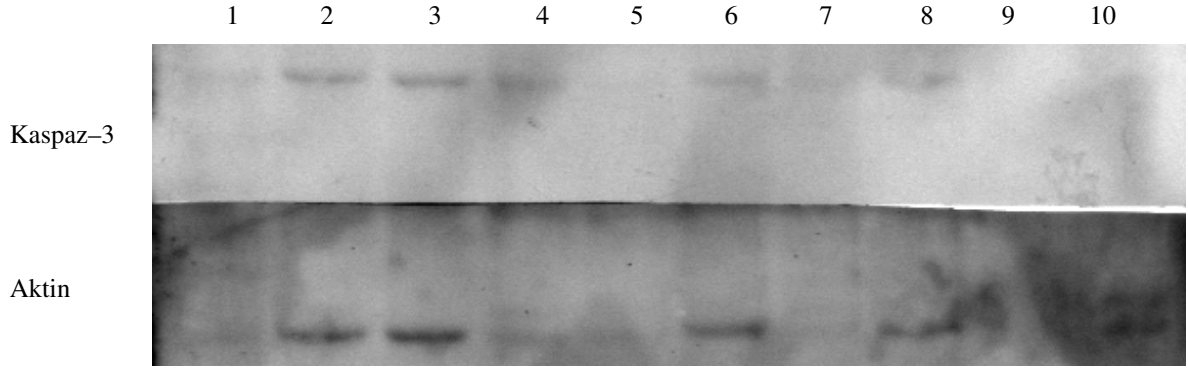
SK-N-MC ve K-562 hücre hatları laboratuvar şartlarında kültüre edilip, deney grupları oluşturuldu. 24. ve 48. saat sonunda kaspaz-3 ve kaspaz-8 proteinleri için ekspresyon değerleri araştırıldı. Her grupta sonuç elde edilememesine karşın, sonuç elde edilen gruplara ait veriler aşağıdaki Őekillerde gösterilmiştir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7).

K-562 hücre hattı için NK, N8Y5 ve N7Y5 gruplarına ait 24. saat kaspaz-3 ve aktin proteini bantları Şekil 4.4'de gösterilmektedir. Bantlar arası gözlenen farklılıklar Scion Image for Windows v4.0 paket programında değerlendirilmiş ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).



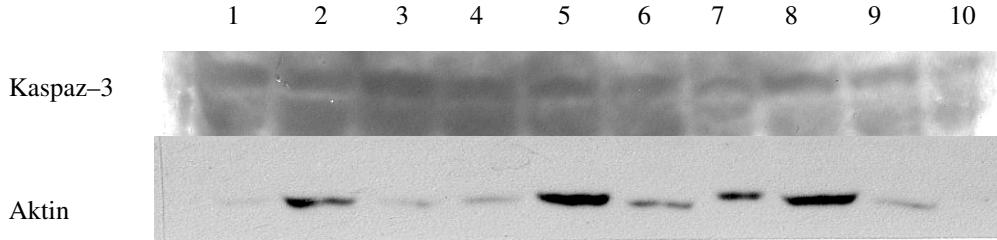
Şekil 4.4: K-562 hücre hattında 24. saatte kaspaz-3 geni için protein ekspresyonu bantları. 1, 4, 7 ve 10 nolu sütunlar NK; 2, 5 ve 8 nolu sütunlar N8Y5; 3, 6 ve 9 nolu sütunlar ise N7Y5 grubunu göstermektedir.

K-562 hücre hattı için NK, N8Y5 ve N7Y5 gruplarına ait 48. saat kaspaz-3 ve aktin proteini bantları Şekil 4.5'de gösterilmektedir. Çalışılan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).



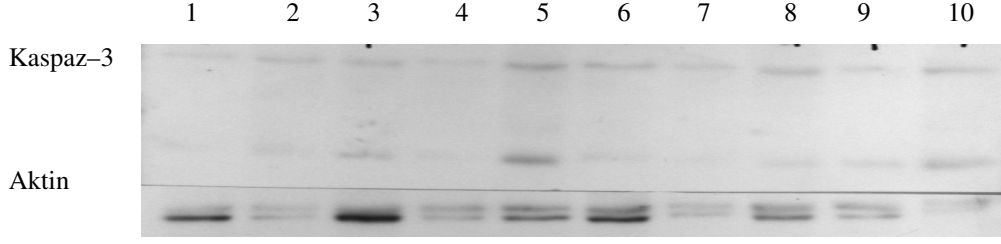
Şekil 4.5: K-562 hücre hattında 48. saatte kaspaz-3 geni için protein ekspresyonu bantları. 1, 4, 7 ve 10 nolu sütunlar NK; 2, 5 ve 8 nolu sütunlar N8Y5; 3, 6 ve 9 nolu sütunlar ise N7Y5 grubunu göstermektedir.

SK-N-MC hücre hattı için NK, N8Y5 ve N7Y5 gruplarına ait 24. saat kaspaz-3 ve aktin proteini bantları Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Çalışılan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.6: SK-N-MC hücre hattında 24. saatte kaspaz-3 geni için protein ekspresyonu bantları. 1, 4, 7 ve 10 nolu sütunlar NK; 2, 5 ve 8 nolu sütunlar N8Y5; 3, 6 ve 9 nolu sütunlar ise N7Y5 grubunu göstermektedir.

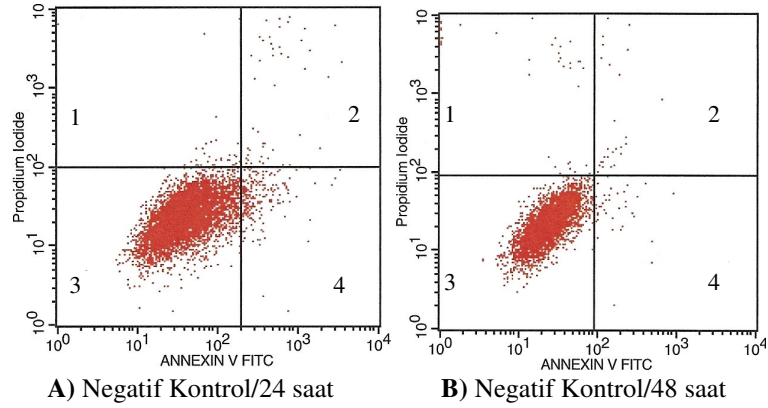
SK-N-MC hücre hattı için NK, N8Y5 ve N7Y5 gruplarına ait 48. saat kaspaz-3 ve aktin proteini bantları Şekil 4.7'de gösterilmektedir. Çalışılan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

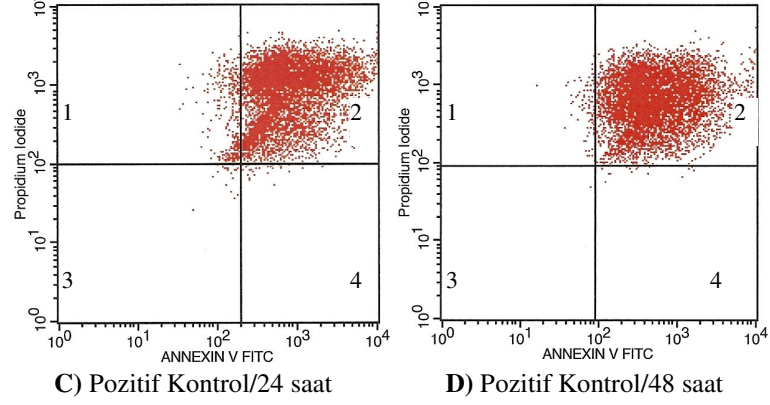


Şekil 4.7: SK-N-MC hücre hattında 48. saatte kaspaz-3 geni için protein ekspresyonu bantları. 1, 4, 7 ve 10 nolu sütunlar NK; 2, 5 ve 8 nolu sütunlar N8Y5; 3, 6 ve 9 nolu sütunlar ise N7Y5 grubunu göstermektedir.

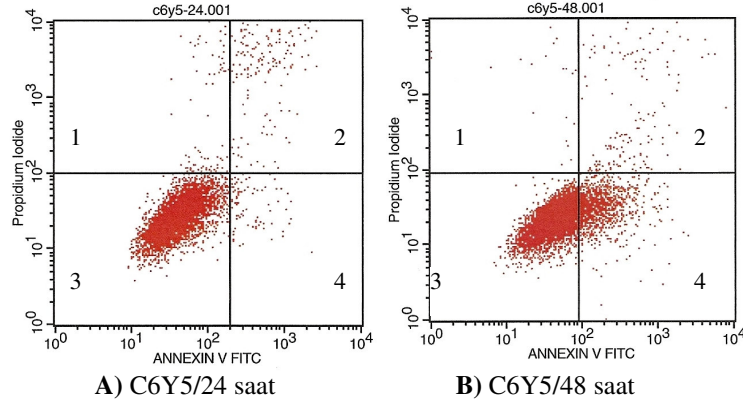
4.3. Akım Sitometri Bulguları

K-562 hücre hatları laboratuvar şartlarında kültüre edilip, deney grupları oluşturuldu. 24. ve 48. saat sonunda hücrelerin canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları akım sitometrik olarak değerlendirildi. SK-N-MC hücre hattı aderent olduğundan ve deney sırasında hücreleri kabın yüzeyinden kaldırma sırasında da ölüm gerçekleştiğinden dolayı bu hücre hattı akım sitometrik çalışma grubuna dahil edilememiştir.

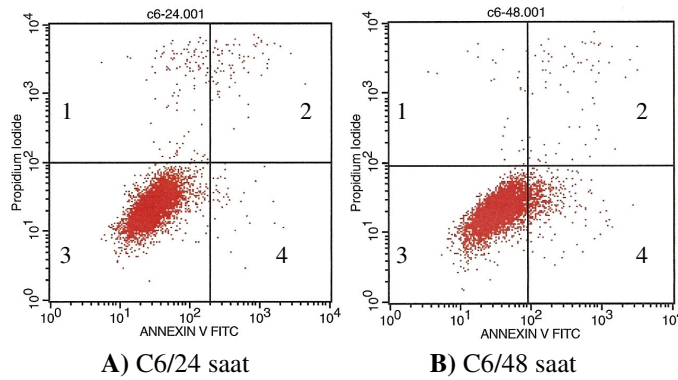




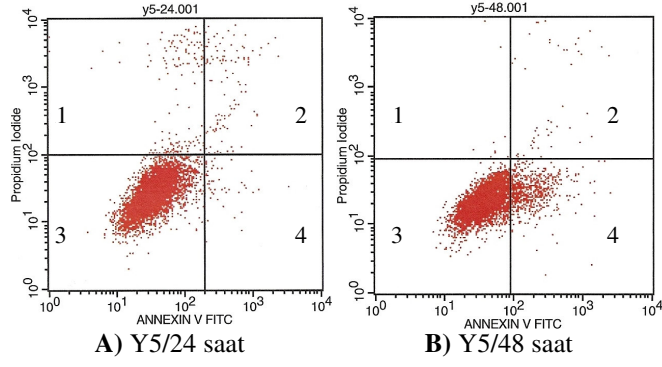
Şekil 4.8: K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** Negatif Kontrol/24 saat **B)** Negatif Kontrol/48 saat **C)** Pozitif Kontrol/24 saat ve **D)** Pozitif Kontrol/48 saat. 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan erken apoptoz, 2 nolu alan geç apoptoz ve 1 nolu alan ise nekrozu göstermektedir.



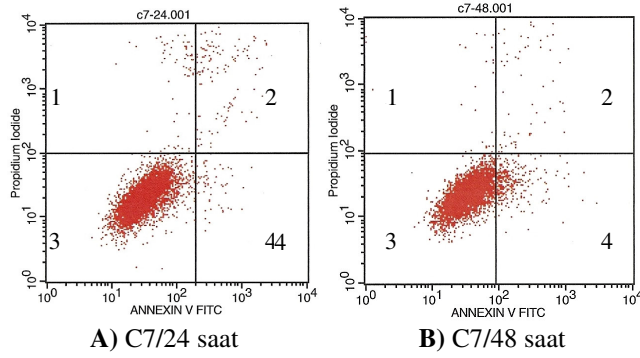
Şekil 4.9: K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** C6Y5/24 saat; **B)** C6Y5/48 saat. 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan erken apoptoz, 2 nolu alan geç apoptoz ve 1 nolu alan ise nekrozu göstermektedir.



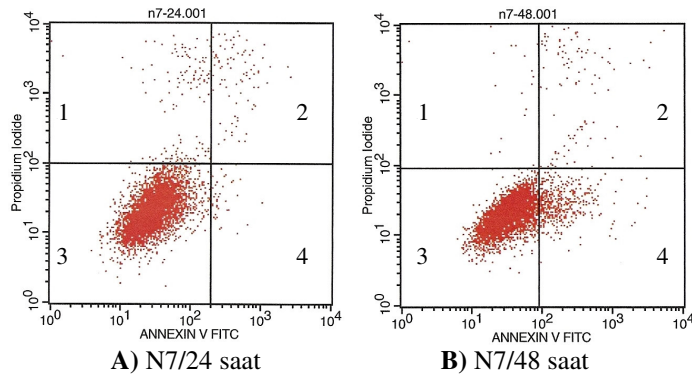
Şekil 4.10: K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** C6/24 saat; **B)** C6/48 saat. 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan erken apoptoz, 2 nolu alan geç apoptoz ve 1 nolu alan ise nekrozu göstermektedir.



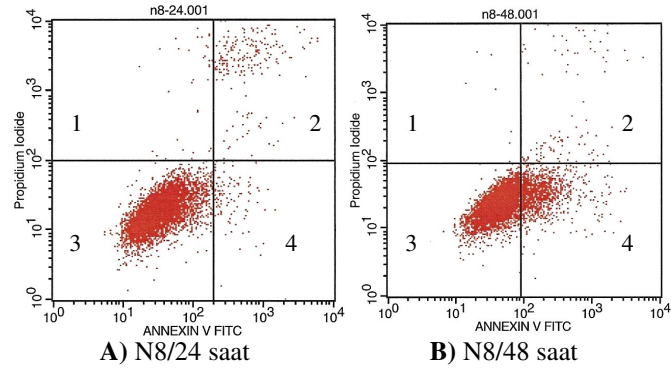
Şekil 4.11: K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** Y5/24 saat; **B)** Y5/48 saat. 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan erken apoptoz, 2 nolu alan geç apoptoz ve 1 nolu alan ise nekrozu göstermektedir.



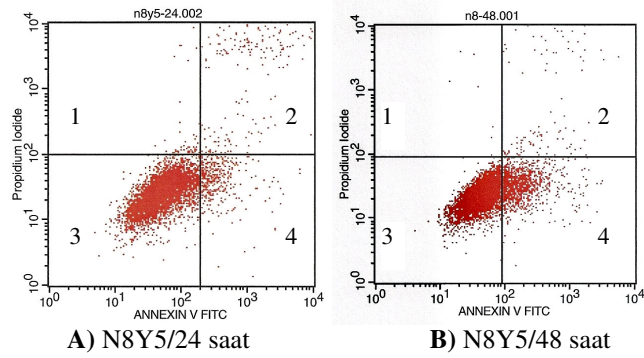
Şekil 4.12: K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** C7/24 saat; **B)** C7/48 saat. 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan erken apoptoz, 2 nolu alan geç apoptoz ve 1 nolu alan ise nekrozu göstermektedir.



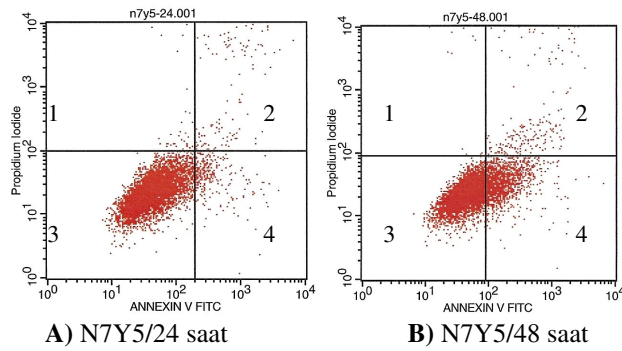
Şekil 4.13: K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** N7/24 saat; **B)** N7/48 saat. 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan erken apoptoz, 2 nolu alan geç apoptoz ve 1 nolu alan ise nekrozu göstermektedir.



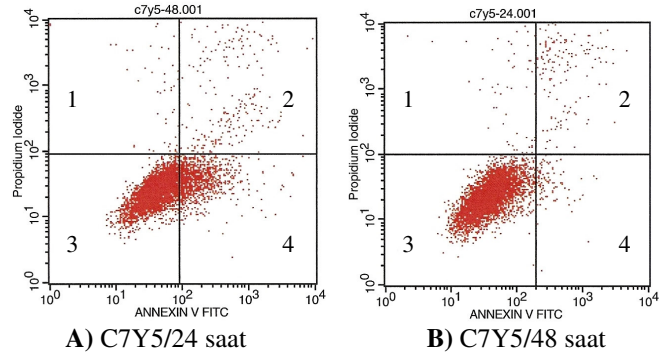
Şekil 4.14: K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** N8/24 saat; **B)** N8/48 saat. 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan erken apoptoz, 2 nolu alan geç apoptoz ve 1 nolu alan ise nekrozu göstermektedir.



Şekil 4.15: K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** N8Y5/24 saat; **B)** N8Y5/48 saat. 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan erken apoptoz, 2 nolu alan geç apoptoz ve 1 nolu alan ise nekrozu göstermektedir.



Şekil 4.16: K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A)** N7Y5/24 saat; **B)** N7Y5/48 saat. 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan erken apoptoz, 2 nolu alan geç apoptoz ve 1 nolu alan ise nekrozu göstermektedir.



Şekil 4.17: K-562 hücrelerinde canlılığın ve apoptozun akım sitometrik olarak değerlendirilmesi **A) C7Y5/24 saat; B) C7Y5/48 saat.** 3 nolu alan canlı, 4 nolu alan erken apoptoz, 2 nolu alan geç apoptoz ve 1 nolu alan ise nekrozu göstermektedir.

K-562 hücre hattında 24. saatteki ortalama canlı hücre yüzdesi negatif kontrole göre karşılaştırılmış; N8Y5 ve N7Y5 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9: K-562 hücre hattında 24. saatteki canlı hücre ortalaması.

	Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	Ortalama Hücre Yüzdesi	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
Canlı Hücre	N8	2	95.6750	0.6293	-1.4500	0.569
	N7	2	96.0250	0.3747	-1.1000	0.826
	C7	2	95.5850	1.6475	-1.5400	0.504
	C6	2	96.2450	0.5303	-0.8800	0.942
	Y5	2	95.8900	0.3252	-1.2350	0.732
	N8Y5	2	89.9750	0.3464	-7.1500	0.000*
	N7Y5	2	94.0300	0.0989	-3.0950	0.027*
	C7Y5	2	95.7800	0.0565	-1.3450	0.649
	C6Y5	2	95.0100	0.3252	-2.1150	0.193
	NK	2	97.1250	1.4354		
	PK	2	0.4100	0.1555		

K-562 hücre hattında 24. saatteki ortalama erken apoptotik hücre yüzdesi negatif kontrole göre karşılaştırılmış ve N8Y5 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10: K-562 hücre hattında 24. saatteki erken apoptotik hücre ortalaması.

	Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	Ortalama Hücre Yüzdesi	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
Erken Apoptotik Hücre	N8	2	1.3400	0.1838	-0.5000	0.985
	N7	2	0.5050	0.0777	-1.3350	0.287
	C7	2	0.8150	0.0070	-1.0250	0.565
	C6	2	0.6450	0.1343	-1.1950	0.399
	Y5	2	1.0200	0.4808	-0.8200	0.783
	N8Y5	2	6.0700	0.4101	4.2300	0.000*
	N7Y5	2	3.7900	0.1555	1.9500	0.053
	C7Y5	2	1.6100	0.1697	-0.2300	1.000
	C6Y5	2	1.3600	0.0848	-0.4800	0.989
	NK	2	1.8400	1.3859		
	PK	2	0.4050	0.0636		

K-562 hücre hattında 24. saatteki ortalama geç apoptotik hücre yüzdesi negatif kontrole göre karşılaştırılmış; N8, N8Y5 ve C6Y5 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11: K-562 hücre hattında 24. saatteki geç apoptotik hücre ortalaması.

	Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	Ortalama Hücre Yüzdesi	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
Geç Apoptotik Hücre	N8	2	2.5600	0.3535	1.9800	0.008*
	N7	2	1.0900	0.1697	0.5100	0.913
	C7	2	1.6900	0.1697	1.1100	0.213
	C6	2	1.0250	0.0636	0.4450	0.959
	Y5	2	1.0850	0.6151	0.5050	0.917
	N8Y5	2	2.9150	0.3747	2.3350	0.002*
	N7Y5	2	1.7250	0.0919	1.1450	0.189
	C7Y5	2	1.9200	0.0989	1.3400	0.093
	C6Y5	2	2.4500	0.2262	1.8700	0.012*
	NK	2	0.5800	0.0707		
	PK	2	93.8850	1.0818		

K-562 hücre hattında 24. saatteki ortalama nekrotik hücre yüzdesi negatif kontrole göre karşılaştırılmış ve N7 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12: K-562 hücre hattında 24. saatteki nekrotik hücre ortalaması.

	Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	Ortalama Hücre Yüzdesi	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
Nekrotik Hücre	N8	2	0.4300	0.0990	-0.020	1.000
	N7	2	2.3800	0.6223	1.930	0.034*
	C7	2	1.9100	1.4708	1.460	0.150
	C6	2	2.0850	0.4596	1.635	0.088
	Y5	2	2.0050	0.1909	1.555	0.113
	N8Y5	2	1.0450	0.3748	0.595	0.927
	N7Y5	2	0.4550	0.0354	0.005	1.000
	C7Y5	2	0.6900	0.1273	0.240	1.000
	C6Y5	2	1.1800	0.0141	0.730	0.810
	NK	2	0.4500	0.0283		
	PK	2	5.3050	0.8556		

K-562 hücre hattında 48. saatteki ortalama canlı hücre yüzdesi negatif kontrole göre karşılaştırılmış olup tüm gruplarda bir azalma saptanmıştır (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13: K-562 hücre hattında 48. saatteki canlı hücre ortalaması.

	Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	Ortalama Hücre Yüzdesi	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
Canlı Hücre	N8	2	86.1850	1.0535	-12.6600	0.000
	N7	2	91.2150	0.6717	-7.6300	0.007
	C7	2	94.8800	1.1738	-3.9650	0.266
	C6	2	92.9200	0.3677	-5.9250	0.040
	Y5	2	89.6550	0.3889	-9.1900	0.001
	N8Y5	2	80.2650	0.5161	-18.5800	0.000
	N7Y5	2	77.4000	1.9940	-21.4450	0.000
	C7Y5	2	75.1850	4.7588	-23.6600	0.000
	C6Y5	2	78.4500	1.0748	-20.3950	0.000
	NK	2	98.8450	0.2474		
	PK	2	0.0350	0.0070		

K-562 hücre hattında 48. saatteki ortalama erken apoptotik hücre yüzdesi negatif kontrole göre karşılaştırılmış ve C7 grubu dışındaki tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14: K-562 hücre hattında 48. saatteki erken apoptotik hücre ortalaması.

	Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	Ortalama Hücre Yüzdesi	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
Erken Apoptotik Hücre	N8	2	12.2700	0.9192	11.8650	0.000*
	N7	2	6.1850	0.4454	5.7800	0.007*
	C7	2	3.7300	1.3717	3.3250	0.182
	C6	2	5.5800	0.6505	5.1750	0.016*
	Y5	2	9.1350	0.8838	8.7300	0.000*
	N8Y5	2	17.8800	0.7071	17.4750	0.000*
	N7Y5	2	19.8650	1.5627	19.4600	0.000*
	C7Y5	2	18.8300	1.9091	18.4250	0.000*
	C6Y5	2	18.7000	0.7495	18.2950	0.000*
	NK	2	0.4050	0.1343		
	PK	2	0.5050	0.2899		

K-562 hücre hattında 48. saatteki ortalama geç apoptotik hücre yüzdesi negatif kontrole göre karşılaştırılmış ve tüm gruplarda artış saptanmış olmasına karşın bu artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15: K-562 hücre hattında 48. saatteki geç apoptotik hücre ortalaması.

	Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	Ortalama Hücre Yüzdesi	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
Geç Apoptotik Hücre	N8	2	1.2100	0.0424	0.8250	1.000
	N7	2	1.4500	0.0989	1.0650	1.000
	C7	2	0.7900	0.1131	0.4050	1.000
	C6	2	0.8550	0.1060	0.4700	1.000
	Y5	2	0.7100	0.0282	0.3250	1.000
	N8Y5	2	1.3600	0.3252	0.9750	1.000
	N7Y5	2	2.4250	0.6434	2.0400	0.979
	C7Y5	2	4.5350	1.7748	4.1500	0.522
	C6Y5	2	2.1800	0.2121	1.7950	0.992
	NK	2	0.3850	0.0495		
	PK	2	98.2700	0.1555		

K-562 hücre hattında 48. saatteki ortalama nekrotik hücre yüzdesi negatif kontrole göre karşılaştırılmıştır. N8 ve N7Y5 grupları dışında tüm gruplarda bir artış olmasına karşın bu artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16: K-562 hücre hattında 48. saatteki nekrotik hücre ortalaması.

	Grup Adı	Örnek Sayısı (N)	Ortalama Hücre Yüzdesi	Standart Sapma	Ortalama Fark	p değeri
Nekrotik Hücre	N8	2	0.3350	0.0919	-0.030	1.000
	N7	2	1.1500	1.2162	0.785	1.000
	C7	2	0.6000	0.3111	0.235	1.000
	C6	2	0.6500	0.3818	0.285	1.000
	Y5	2	0.5000	0.5233	0.135	1.000
	N8Y5	2	0.4950	0.5162	0.130	1.000
	N7Y5	2	0.3100	0.2121	-0.055	1.000
	C7Y5	2	1.4550	1.0677	1.090	0.997
	C6Y5	2	0.6750	0.5303	0.310	1.000
	NK	2	0.3650	0.1626		
	PK	2	1.1900	0.1273		

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada insan nöroblastoma SK-N-MC ve insan kronik miyeloid lösemi K-562 hücre hatlarında Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632, COX-2 inhibitörü olan niflumik asit ve siklofosfamid, apoptoza etkileri araştırıldı. Oluşturulan deney gruplarında, apoptotik genler olan kaspaz-3 ve kaspaz-8 için gen ve protein ekspresyonu düzeylerindeki değişiklikler, ayrıca akım sitometrik analizler ile canlılık ve apoptoz oranları incelendi.

Her iki hücre hattında da apoptozda rol oynayan genler olan kaspaz-3 ve kaspaz-8 genlerinin Y-27632, niflumik asit ve siklofosfamid gruplarında ekspresyon düzeylerinde artış saptanmıştır. Bu durum protein ekspresyonu ile desteklenmek istenmesine karşın, net veriler elde edilemediğinden dolayı, protein ekspresyonu bulguları değerlendirme dışı tutulmuştur. Ancak akım sitometrik analizler ile gen ekspresyonu bulgularımız desteklenmiş olup, kullandığımız maddelerin hücreleri apoptoza götürdüğüne işaret etmektedir.

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada, çeşitli hücre gruplarında COX-2 ekspresyonunun apoptozu baskıladığı gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde COX-2'nin antiapoptotik etkisini göstermeye yönelik giderek artan deliller mevcuttur. Rat intestinal epitel hücrelerinde (RIE) COX-2 ekspresyon artışının, Bcl-2 protoonkogeninin ekspresyonunun artışı sonucu gerçekleştiği ve bu durumun da apoptoz inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Aynı zamanda kanser hücrelerinin invaziv yeteneğinin, COX-2 aracılığı ile düzenlenebileceği gösterilmiştir (89, 90,91).

İnsan kolon kanseri hücrelerinde selektif COX-2 inhibitörü olan NS-398'in, anjiyogenezisi inhibe ettiği ve COX-2 inhibitörlerinin kanser önleme ve tedavisinde güçlü bir ajan olabileceği gösterilmiştir (91). NSAİİ kullanımının, kolorektal kanseri oluşma riskini % 50'ye kadar azalttığı bulunmuştur (89). Bu ilişkinin COX-2 inhibisyonu üzerinden olduğu düşünülmektedir, çünkü kanserli kolon bölgesinde belirgin bir COX-2 aktivitesi artışı olduğu gösterilmiştir. Bu ilişkinin doğruluğunu araştırmak üzere yapılan bir çalışmada, yüksek seviyede COX-2 aktivitesi içeren insan

kolon kanser hücreleri farelere implante edilmiş ve farelere selektif COX-2 inhibitörü başlandığında tümör gelişiminin % 85-90 oranında azaldığı gösterilmiştir (92,93,94).

İnsan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerine, COX-2 inhibitörü olan selekoksib'in etkilerinin araştırıldığı *in vitro* bir çalışmada, selekoksib'in sadece kanser hücrelerinin büyümesini değil aynı zamanda anjiyogenik yolağı da baskıladığı gösterilmiştir (95). Bir diğer çalışmada ise COX-2 inhibisyonunun, endometriyal kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (61).

Nöroblastoma tedavisinde COX inhibitörlerinin kullanımının, mitokondriyal yolak aracılığı ile kaspaza bağımlı apoptoz mekanizmasını indüklediği gösterilmiştir (96). Bizim bulgularımız literatür ile uyumlu olup, COX-2 inhibisyonunun apoptoza götürdüğünü doğrulamaktadır.

Özefagus kanseri ile ilgili bir çalışmada selektif COX-2 inhibitörlerinin, Fas reseptörlerinin ekspresyonunu arttırabileceği ve apoptoz ile hücre proliferasyonunu etkileyerek özefagus kanserini inhibe edebileceğini göstermiştir. Epidemiyolojik ve klinik deneyler bu bulguları desteklemektedir. Ayrıca çok kullanılan bir NSAİİ inhibitörü olan aspirinin on yıldan daha uzun süre günde bir kez alınmasının, özefagus kanserine yakalanma riskini % 40 oranında azalttığı gösterilmiştir (97).

Gastrik kanserlerin % 49'unda COX-2'nin yüksek oranda ekspresse edildiği gösterilmiştir ve bu nedenle gastrik karsinogenezde COX-2 inhibisyonunun olası terapötik hedef olabileceği ileri sürülmüştür (98). Yapılan deneysel bir çalışmada 100 gastrik kanserli hastada ve 7 farklı gastrik kanser hücre hattında COX-2 ekspresyonu değerlendirilmiş, normal kontrollere göre kıyaslandığında hem hasta grubunda hem de hücre hatlarında COX-2'nin yüksek oranda ekspresse edildiği gösterilmiştir. Deneysel bulgular apoptoz, hücre siklusunun kontrolü, hücre proliferasyonu ve anjiyogenezi içeren hücresel olaylarda COX-2'nin anahtar rol oynayabileceğini onaylamaktadır (99).

Meme, akciğer, mesane, prostat kanserleri ile hepatoselüler karsinomada da COX-2'nin yüksek oranda ekspresse edildiğini gösteren birçok çalışma mevcuttur.

Ancak hematolojik malignansilerde COX-2 ekspresyonu tam olarak aydınlatılamamıştır. Kronik lenfositik lösemi ve akut myeloid lösemi hücre hattında aspirin gibi non-spesifik COX-2 inhibitörlerinin, kaspaz aktivasyonu yolu ile apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Antrasiklinler ile bu ajanların sinerjik etkileri, lösemilerin tedavisinde yeni bir potansiyel mekanizmayı düşündürmektedir (16,17,41,100,101,102).

Bunun yanı sıra yapılan birçok çalışma NSAİİ'lerin çeşitli maddelerle kombinasyonunun, bu ilaçların antikanser etkinliğini arttırdığını göstermiştir. COX-2 inhibitörü olan selekoksib ile siklofosamid kombinasyonunun, kolon kanser modelinde yüksek oranda antitümoral etkisinin olduğu gösterilmiştir. Benzer bir çalışmada kolorektal kanserde NSAİİ ve diflorometilornitin kombinasyonunun, NSAİİ'nin tek başına kullanıldığındaki etkisinden daha fazla bir antitümör etki göstermiştir. Diğer bir çalışmada da NSAİİ ve epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR)-kinaz inhibitörü kombinasyonunun fare modelinde polip oluşumunu % 95 oranında azalttığı saptanmıştır (15,41).

Rho, Rac1 ve Cdc42'yi içeren Rho GTPaz ailesi proteinleri, adezyon, hücre hareketi, proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptoz gibi çeşitli hücrel olayların kontrolünden sorumludur. Rho'nun en iyi karakterize edilmiş olan efektörü, Rho ile ilişkili protein kinaz (ROCK)'dır (45).

Son yıllarda yapılan birçok çalışma ROCK'un çeşitli kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar ile kanser tedavisinde önemli bir terapötik hedef olduğunu göstermiştir. Hayvan hastalık modellerinde ve hücre sinyal yolağında ROCK'un rolünü incelemek için ROCK'un iki selektif inhibitörü olan Y-27632 ve fasudil kullanılmış ve ROCK inhibisyonunun çok önemli bir terapötik potansiyel olduğu açığa çıkarılmıştır. Diğer taraftan Rho/Rho kinaz yolağının aktivasyonunun, tümör hücre invazyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu yolağı inhibe eden fasudilin, insan ve sıçan tümör modellerinde tümörün ilerlemesini azalttığı bildirilmiştir (46).

Bir diğer Rho inhibitörü olan *Clostridium botulinum* eksoenzim C3 ile yapılan bir çalışmada, rat hepatik stella hücreleri üzerine C3'ün etkileri araştırılmıştır. C3,

kaspaz-3 aktivitesini arttırdığı, ancak apoptozda çok önemli rolü olan p53 tümör supresör geninin protein seviyesi üzerine herhangi bir etki göstermediği saptanmıştır. Aynı çalışmada bizim kullandığımız Rho inhibitörü olan Y-27632 de kullanılmış ve C3 ile paralel şekilde kaspaz-3 aktivitesinde artış saptanmıştır (45,55,103,104).

Apoptozda Rho sinyal yolağının rolünü inceleyen bir diğer çalışmada, ROCK'un apoptotik hücrenin fragmentasyonu ve fagositozunda temel rol oynayabileceği gösterilmiştir. Benzer bir çalışmada da insan solunum yollarındaki epitel hücreler kültüre edilmiş ve bu hücrelerde Rho kinaz inhibisyonunun aktin hücre iskeletini bozarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (53).

Rho GTPaz'ların ekspresyon seviyesinin malignansilerde sıklıkla arttığına ilişkin pek çok çalışma mevcuttur. Aynı zamanda genel olarak Rho ailesi proteinlerinin, DNA hasarı oluşturan ajanlara karşı hücrel hassasiyeti arttırdığı gösterilmiştir. Rho proteinlerinin inhibisyonunun, yeni antikanser ilaçların gelişimi için ümit vaat eden hedefler gibi görüldüğü düşünülmektedir (45).

Kemik iliği transplantasyonu öncesinde, lösemi ve solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve kemoterapötik madde olan siklofosamid, alkilleyici bir ajandır. Bünyesindeki elektrofilik alkil kökü ile DNA'ya kovalent olarak bağlanarak DNA'nın yapısını bozar. DNA yapısı bozulan hücrenin apoptozu gitmesini sağlayarak etki gösterir (6,7,39). Küçük hücreli olmayan akciğer tümörlerinde yapılan bir çalışmada, cisplatin, topotekan ve siklofosamid gibi antikanser ilaçların apoptozu indüklediği gösterilmiştir (105).

Bizim çalışmamızdan elde edilen veriler bu bulgular ile uyumlu olup, farklı doz ve kombinasyonlarda uygulanan siklofosamidin, SK-N-MC ve K-562 hücrelerini apoptozu götürdüğü saptanmıştır.

Kemoterapide majör problem normal hücreler ve kanser hücrelerinin aynı şekilde toksik etkiye maruz kalmasıdır. Bu durum tedavinin başarısını azaltmaktadır (39). Konvansiyonel kemoterapiye alternatif olarak kaspaz inhibitörleri kullanılarak

kaspaz aktivitesinin düzenlenmesi, tedavide kullanılabilir iyi bir stratejiyi oluşturmaktadır. Bu stratejinin önemli bir ayağını ölüm–reseptör kompleksinin aktivasyonu içerir. Bu yolla başlatıcı kaspazlar direk yolla uyarılır. Bu stratejide keşfedilmeyi bekleyen en önemli sorun selektif kanser hücresi reseptörlerini tanıtabilmektir (106).

Apoptoz regülasyonunun bozulmasının, hepsinde olmasa da önemli bir kısmında, malign hastalıkların oluşumunda en az artmış proliferasyon kadar büyük önem taşıdığı açıktır (107). Ayrıca, radyasyonun da dahil olduğu çoğu kemoterapötik ajanların apoptozu indüklediği bilinmekte (108,109) olup, apoptoz ve malignite birbiriyle çok sıkı ve kompleks bir ilişkidir. Böylece, apoptozun hücre siklusuyla olan ilişkisi de göz önüne alındığında apoptoz, hücre siklusu ve kemoterapi üçlüsü arasındaki interaksyonlarının, kanser hastalarının gerek prognozunu gerekse tedaviye yanıtını belirleyeceğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda literatürler ile uyumlu olarak, COX–2 ve Rho kinaz inhibisyonunun apoptozu arttırdığı gösterilmiştir. Kanser tedavisindeki amaçlardan biri, kanser hücrelerinin apoptoza gitmesini sağlamaktır (96,110). Kullandığımız maddeler bu amaca uygun olarak apoptozu tetiklemektedir. Bunun yanı sıra yapılan akım sitometrik analizler sonucu erken ve geç apoptotik düzeylerde artış olması bu tezimizi desteklemektedir.

Hücrelerin davranış biçimlerinin hücre kültürü ortamında farklı, organizmalarda ait oldukları dokuda farklı olduğu gerçeğinden hareketle, araştırmalarda kullanılan deneysel modellerin, toksisite yaratarak oluşturulan hücre kültürü modellerinden hayvan modellerine doğru kayması, Y–27632, niplumik asit ve siklofosfamid maddelerinin apoptoza olan etkilerinin aydınlatılmasında daha net yanıtlar bulunmasını sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgular, Rho kinaz ve COX inhibitörü ile siklofosamid kombinasyonlarının, apoptozu kısmen de olsa indükleyebileceğine ve tümör regresyonuna katkıda bulunabileceğine işaret etmektedir.

Doku homeostazı, hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümü arasındaki uyumlu ilişkiye bağlıdır. Apoptozun önemi, çeşitli biyolojik olaylarda gereksiz, hasarlı ya da zararlı hücrelerin inflamatuvar yanıt olmaksızın yok edilmesini sağlamasından ve organizmanın iç dengesinin devamlılığına katkıda bulunmasından ileri gelmektedir. Canlı doku ortamında hücrelerin tek tek iz bırakmaksızın silindiği fizyolojik bir ölüm şekli olan apoptoz ilgi çekici olduğu kadar insanlardaki önemli patolojilerin tedavisi açısından da umut verici bir mekanizmadır. Bu süreçte, kaspaz ailesi üyeleri ve Bcl-2/Bax ailesindeki genlerin ekspresyonları önemli yer tutmaktadır. Bu konu ile ilgili yoğun araştırmaların sürmesi, tıpta pek çok soruna yanıt getireceği inancını desteklemektedir. Son yıllarda kanserde NSAİİ tedavisi ve Rho kinaz inhibisyonu, alternatif terapötik stratejiler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu stratejilerin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması, kanserde yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesine ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu (Erişim Tarihi: 10.12.2005).
2. **Öztürk F.** Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2002**; 9(2):143–148.
3. **Öniz H.** Apoptoz: ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Hast Derg*, **2004**; 14(1):1–20.
4. **Erdoğan BB, Uzaslan EK.** Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, **2003**; 4:165–174.
5. <http://www.turkcancer.org> (Erişim Tarihi: 18.12.2005).
6. **Harrison İç Hastalıkları Prensipleri.** Editör Sağlık Y. Nobel Tıp Kitapevleri, **2004**; 491–547.
7. **İnsan Biyokimyası.** Editörler Onat T, Emerk K, Sözmen EY. Palme yayıncılık, **2002**; 547–586.
8. **Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji.** Editör Kayaalp O. Hacettepe-Taş Kitapçılık. 10. Baskı, **2002**; 960–994/1439–1463.
9. **Benitah SA, Valeron PF, Lical JC.** ROCK and nuclear factor- κ B–dependent activation of cyclooxygenase-2 by Rho GTPases: effects on tumor growth and therapeutic consequences. *Molecular Biology of the Cell*, **2003**; 14:3041–3054.
10. **Moore M, Marroquin BA, Gugliotta W, Tse R, White SR.** Rho kinase inhibition initiates apoptosis in human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **2004**; 30:379–387.
11. **Cardone RA, Bagorda A, Bellizzi A, Busco G, Guerra L, Paradiso A, Casavola V, Zaccolo M, Reshkin SJ.** Protein kinase A gating of a pseudopodial-located RhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines. *Molecular Biology of the Cell*, **2005**; 16:3117–3127.
12. **Baron JA, Sandler RS.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annual Review of Medicine*, **2005**; 51:511–523.
13. **Peregi D, Lishneri M.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of cancer. *Journal of Internal Medicine*, **2005**; 258:115–123.
14. **Maier TJ, Schilling K, Schmidt R, Geisslinger G, Grösch S.** Cyclooxygenase–2 (COX–2) dependent and independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, **2004**; 67:1469–1478.

15. **Richter M, Weiss M, Weinberger I, Fürstenberger G, Marian B.** Growth inhibition and induction of apoptosis in colorectal tumor cells by cyclooxygenase inhibitors. *Carcinogenesis*, **2001**; 22(1):17–25.
16. **Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G.** Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *Faseb J*, **2001**; 15:2057–2072.
17. **Hawk ET, Viner JL, Dannenberg A, Dubois RN.** COX–2 in cancer—a player that’s defining the rules. *Journal Of The National Cancer Institute*, **2002**; 94(8):545–546.
18. **Antar V.** Bir Genel Kaspaz İnhibitörü Olan Qvd-Oph’nin Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi. Uzmanlık tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul, **2005**.
19. **Kumar S.** Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, **2006**; 1–12.
20. **Prior PF, Salvesen GS.** The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.*, **2004**; 384:201–232.
21. **Calvo MG, Peterson EP, Rasper DM, Vaillancourt JP, Zamboni R, Nicholson DW, Thornberry NA.** Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death And Differentiation*, **1999**; 6:362–369.
22. **Timmer JC, Salvesen GS.** Caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, **2007**; 14:66–72.
23. **Kumar S.** Caspases and their many biological functions. *Cell Death and Differentiation*, **2007**; 14:1–2.
24. <http://www.vhsd.org/docs/Apoptosis-CPE-01042004.ppt> (Erişim Tarihi: 09.03.2007)
25. **Mohamad N, Gutiérrez A, Núñez M, Cocca C, Martín G, Cricco G, Medina V, Rivera E, Bergoc R.** Mitochondrial apoptotic pathways *Biocell*, **2005**; 29(2):149–161.
26. **Gren D, Kroemer G.** The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in Cell Biology*, **1998**; 8:267–271.
27. **Adrain C, Martin SJ.** The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences*, **2001**; 26(6):390–397.
28. **Er E, Oliver L, Cartron P, Juin P, Manon S, Vallette FM.** Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **2006**; 1757:1301–1311.

29. **Ekert PG, Vaux DL.** The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Current Opinion in Cell Biology*, **2005**; 17:626–630.
30. **Rao RV, Hermel E, Obregon SC, Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. *The Journal Of Biological Chemistry*, **2001**; 276(36):33869–33874.
31. **Virkkajarvi N, Paakkö P, Soini Y.** Apoptotic index and apoptosis influencing proteins Bcl-2, Mcl-1, Bax and caspases 3, 6 and 8 in pancreatic carcinoma. *Histopathology*, **1998**; 33:432–439.
32. **Biedler JL, Helson L, Spengler BA.** Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research*, **1973**; 33:2643–2652.
33. **Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabaib VL.** Necrosis: a specific form of programmed cell death?. *Experimental Cell Research*, **2003**; 283:1–16.
34. **Özçimen A.** Steroid'in HL-60 (İnsan Akut Miyeloid Lösemi) hücre hattında, apoptoz ve farklılaşma üzerindeki etkisi. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı, Ankara **2005**.
35. **Lozano G, Elledge SJ.** p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature*, **2000**; 404(6773):24–25.
36. **Carr AM.** Cell cycle, piecing together the p53 puzzle. *Science*, **2000**; 287(5459):1765–1766.
37. **Curtin, JF, Cotter TG.** Apoptosis: Historical perspectives. *Assays Biochem*, **2003**; 39:1–10.
38. **Jaattela M.** Multiple cell death pathways as regulators of tumor initiation and progression, *Oncogene*, **2004**; 449(2):175–185.
39. **Akyol H.** Kemoterapinin temel ilkeleri. *XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı*, **2004**; 159–163.
40. **Rao CV, Reddy BS.** NSAIDs and Chemoprevention. *Current Cancer Drug Targets*, **2004**; 4:29–42.
41. **Jalving M, Koornstra JJ, De Jong S, De Vries EG, Kleibeuker JH.** Review Article: The potential of combinational regimen with non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention of colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, **2005**; 21:321–339.

42. **Jones BA, Gores GJ.** Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol*, **1997**; 273:1174–88.
43. **Gastman BR.** Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck*, **2001**; 23:409–25.
44. **Tapon N, Hall A.** Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, **1997**; 9:86–92.
45. **Fritz G, Kaina B.** Rho GTPases: Promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Current Cancer Drug Targets*, **2006**; 6:561–571.
46. **Ying H, Biroc SL, Li WW, Alicke B, Xuan JA, Pagila R, Ohashi Y, Okada T, Kamata Y, Dinter H.** The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Mol Cancer Ther*, **2006**; 5(9):2158–64.
47. **Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K.** Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *The Journal Of Biological Chemistry*, **1996**; 271(34):20246–20249.
48. **Orlando KA, Stone NL, Pittman RN.** Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Experimental Cell Research*, **2006**; 312:5–15.
49. **Orlando KA, Pittman RN.** Rho kinase regulates phagocytosis, surface expression of GlcNAc, and Golgi fragmentation of apoptotic PC12 cells. *Experimental Cell Research*, **2006**; 312:3298–3311.
50. **Miñambres R, Guasch RM, Perez-Aragó A, Guerri C.** The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes. *Journal of Cell Science*, **2006**; 119:271–282.
51. **Song Y, Hoang BQ, Chang DD.** ROCK-II-Induced Membrane blebbing and chromatin condensation require actin cytoskeleton. *Experimental Cell Research*, **2002**; 278:45–52.
52. **Shi J, Wei L.** Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch. Immunol. Ther. Exp*, **2007**; 55:1–15.
53. **Büyükafşar K, Akça T, Nalan Tiftik R, Sahan-Firat S, Aydın S.** Contribution of Rho-kinase in human gallbladder contractions. *Eur J Pharmacol*, **2006**; 540(1–3):162–7.
54. **Somlyo AP, Somlyo AV.** Signal transduction by G proteins, Rhokinase and protein phosphatase to smooth muscle and nonmuscle myosin II. *Journal of Physiology*, **2000**; 522(2):177–185.
55. **Santos MF, McCormack SA, Guo Z, Okolicany J, Zheng Y, Johnson LR, Tigyi G.** Rho Proteins play a critical role in cell migration during the early phase of mucosal restitution. *J. Clin. Invest*, **1997**; 100:216–225.

56. **Boettner B, Aelst LV.** The role of Rho GTPases in disease development. *Gene*, **2002**; 286:155–174.
57. www.pediatric-rheumatology.printo.it (Erişim Tarihi: 01.07.2007).
58. **Fitzgerald GA, Patrono C.** The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase–2. *N Eng J Med*, **2001**; 345:433–42.
59. **Wong E, Huang J, Tagari P, Riendeau D.** Effects of COX–2 inhibitors on aortic prostacyclin production in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, **2001**; 157:393–402.
60. **Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter KC, Quan H, Gertz BJ, FitzGerald GA.** Effects of specific inhibition of cyclooxygenase–2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther*, **1999**; 289:735–41.
61. **McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA.** Systemic biosynthesis of prostacyclin by COX–2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX–2. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1999**; 96:272–77.
62. **Lee SH, Sooyola E, Chanmugan P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D.** Selective expression of mitogen inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, **1992**; 267(36):25934–38.
63. **Sheng H, Shao J, Dixon DA, Williams CS, Prescott SM, DuBois RN, Beauchamp RD.** Transforming growth factor B1 enhances Ha-ras induced expression of COX–2 intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. *J Biol Chem*, **2000**; 275(9):6628–35.
64. **Bakhle YS, Botting RM.** Cyclooxygenase–2 and its regulation in inflammation. *Mediators Inflamm*, **1996**; 5:305–23.
65. **Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P.** Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase–2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1999**; 91(25):12013–17.
66. **Ashktorab H, Dawkins FW, Mohamed R, Larbi D, Smoot DT.** Apoptosis induced by aspirin and 5-Fluorouracil in human colonic adenocarcinoma cells. *Digestive Diseases and Sciences*, **2005**; 50(6):1025-1032.
67. **Kohli M, Yu J, Seaman C, Bardelli A, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C, Zhang L.** Smac_Diablo-Dependent apoptosis induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) in colon cancer cells. *PNAS*, **2004**; 101(48):16897–16902.
68. **Dormond O, Foletti A, Paroz C, Rüegg C.** NSAIDs inhibit α V β 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nature Medicine*, **2001**; 7(9):1041–1047.

69. **Dial EJ, Doyen JR, Lichtenberger LM.** Phosphatidylcholine-associated nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit DNA synthesis and the growth of colon cancer cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*, **2006**; 57:295–300.
70. **Gao J, Niwa K, Sun W, Takemura M, Lian Z, Onogi K, Seishima M, Mori H, Tamaya T.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit cellular proliferation and upregulate cyclooxygenase-2 protein expression in endometrial cancer cells. *Cancer Sci*, **2004**; 95:901–907.
71. http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Culture/Key_Resources/ECACC_Handbook.html (Erişim Tarihi: 12.01.2006).
72. **Tiftik RN.** Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe Rho/Rho-kinaz yolağı ve nitrik oksid ilişkisi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin, **2005**.
73. **Lozzio CB, Lozzio BB.** Human chronic myelogenous leukemia cell-Line with positive philadelphia chromosome. *Blood*, **1975**; 45(3):321–334.
74. **Uçar F ve Ovalı E.** Hücre Kültüründe Temel İlkeler, Hücre Kültüründe Temel İlkeler Uygulamalı *Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı-1*, **2003**.
75. <http://www.research.umbc.edu/~jwolf/method5.htm> (Erişim Tarihi: 12.01.2007).
76. **Dalva K.** Hematoloji’de Akım Sitometri Kullanımı. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu Ders Notları, 73–86.
77. <http://www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem2/dersler/d2fizyoderbas.htm>(Erişim Tarihi:12.09.2007)
78. **Bustin SA.** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal Of Molecular Endocrinology*, **2002**; 29:23–39.
79. <http://www.gene-quantification.info> (Erişim Tarihi:12.07.2007).
80. <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/realtimempcr.html> (Erişim Tarihi:12.07.2007).
81. <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp> (Erişim Tarihi:12.07.2007).
82. <http://dna-9.int-med.uiowa.edu/realtime.htm> (Erişim Tarihi:12.07.2007).
83. <http://probes.invitrogen.com/handbook/boxes> (Erişim Tarihi:12.07.2007).

84. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimepcr.htm> (Erişim Tarihi:12.07.2007).
85. http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/BioRad_proteinassay(Erişim Tarihi:12.07.2007).
86. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html> (Erişim Tarihi:12.07.2007).
87. <http://www.chemicon.com/resource/ANT101/a2B.asp> (Erişim Tarihi:12.07.2007).
88. http://www.bdbiosciences.ca/canada/pharmingen/product_pages/annexinv (Erişim Tarihi:12.07.2007).
89. **Monnier Y, Zaric J, Rüegg C.** Inhibition of angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: from the bench to the bedside and back. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, **2005**; 4:31–38.
90. **Ashkenazi A, Dixit VM.** Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, **1999**; 11:255–260.
91. **Dubois RN.** New paradigms for cancer prevention. *Carcinogenesis*, **2001**; 22(5):691–692.
92. **Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A.** Up-regulation of cyclooxygenase–2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, **1994**; 107:1183–87.
93. **Sheehan KM, Sheehan K, Donoghue DP.** The relationship between cyclooxygenase–2 expression and colorectal cancer. *JAMA*, **1999**; 282:1254–58.
94. **Sheng H, Shao J, Kirkland SC.** Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase–2. *J Clin Invest*, 1997;99:2254–59.
95. **Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P.** Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclooxygenase–2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells *Breast Cancer Research*, **2005**; 7:422–435.
96. **Johnsen JI, Lindskog M, Ponthan F, Pettersen I, Elfman L, Orrego A, Sveinbjornsson B, Kogner P.** NSAIDs in neuroblastoma therapy. *Cancer Letters*, **2005**; 228:195–201.
97. **Pereg D, Lishner M.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of cancer. *Journal of Internal Medicine*, **2005**; 258:115–123.

98. **Soung YH, Lee JW, Kim SY, Jang J, Park YG, Park WS, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH.** Caspase-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res*, **2005**; 65(3):815–21.
99. **Monroe DG, Berger RR, Sanders MM.** Tissue-Protective effects of estrogen involve regulation of caspase gene expression. *Molecular Endocrinology*, **2002**; 16(6):1322–1331.
100. **Haynes A, Shaik MS, Chatterjee A, Singh M.** Formulation and evaluation of aerosolized celecoxib for the treatment of lung cancer. *Pharmaceutical Research*, **2005**; 22(3):427–39.
101. **Parashar B, Shankar SL, O'Guin K, Butler J, Vikram B, Shafit-Zagardo B.** Inhibition of human neuroblastoma cell growth by CAY10404, a highly selective COX-2 inhibitor. *Journal of Neuro-Oncology*, **2005**; 71:141–148.
102. **Ujibe M, Kano S, Osanai Y, Koiwai K, Ohtake T, Kimura K, Uwai K, Takeshita M, Ishikawa M.** Octylcaffate induced apoptosis in human leukemia U937 cells. *Biol Pharm Bull*, **2005**; 28(12):2338–2341.
103. **Tosello-Tramont A, Nakada-Tsukui K, Ravichandran KS.** Engulfment of apoptotic cells is negatively regulated by rho-mediated signaling. *The Journal Of Biological Chemistry*, **2003**; 278(50):49911–49919.
104. **Takai Y, Sasaki T, Matozaki T.** Small GTP-Binding Proteins. *Physiological Reviews*, **2001**; 81(1):153–208.
105. **Ferreira CG, Span SW, Peters GJ, Kruyt FA, Giaccone G.** Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Cancer Res*, **2000**; 60(24):7133–41.
106. **Callus BA, Vaux DL.** Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death and Differentiation*, **2007**; 14:73–78.
107. **Liebermann DA, Hoffman B.** Differentiation primary response genes and proto-oncogenes as positive and negative regulators of terminal hematopoietic cell differentiation. *Stem Cells*, **1994**; 12(4):352–69.
108. **Vrdoljak E, Bill CA, Stephens LC, van der Kogel AJ, Ang KK, Tofilon PJ.** Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in vitro. *Int J Radiat Biol*, **1992**; 62(4):475–80.
109. **Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV.** Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, **1994**; 73(8):2013–26.
110. **Tonini GP, Pistoia V.** Molecularly guided therapy of neuroblastoma: a review of different approaches. *Current Pharmaceutical Design*, **2006**; 12(18): 2303–17.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında İzmir’de doğdu. İlköğrenimini Kastamonu, ortaokul ve lise öğrenimini Mersin’de tamamladı. 1998 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2000 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik bölümünde Yüksek Lisans Öğrencisi olarak Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. 2003 yılından itibaren doktora eğitimi devam etmektedir. Yabancı dili İngilizcedir.