



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KARACİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA R-547 İSİMLİ
SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRÜNÜN HÜCRE
ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BETÜL HACIOĞLU

**DANIŞMAN
PROF.DR. SELDA KABADERE**

2018



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KARACİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA R-547 İSİMLİ
SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRÜNÜN HÜCRE
ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BETÜL HACIOĞLU

**DANIŞMAN
PROF.DR. SELDA KABADERE**

2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Betül HACIOĞLU'nun Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Karaciğer Kanseri Hücre Hattında R-547 İsimli Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörünün Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih
04.06.2018

Üye: Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP

Üye: Prof. Dr. Selda KABADERE

Üye: Doç. Dr. Gökhan KUŞ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/06/2018 tarih ve 1178/5820 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Kanser, Türkiye ve dünyada ölüm oranı yüksek olan bir hastalıktır. Hepatoselüler karsinoma (HSK), hepatositlerden köken alır, kanser bağlantılı ölümlerde 3. sıradadır. Son yıllarda yeni tedavi yöntemleri ve anti kanser ilaçlar geliştirmek amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Hücre bölünmesini ve kontrol noktalarında düzenleyici görevi olan siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri de bu yönüyle kanser araştırmalarında yol gösterici fikirler vermektedir.

Çalışmamızda, apoptoz mekanizmaları ve hücre canlılığı üzerine etkileri bulunan CDK inhibitör sınıfına ait R-547 isimli ilacın, HSK'lı hücre soylarında hücre canlılığı ve hücre ölümüne olan etkisini detaylı olarak ortaya koymak amaçlandı. Bu sebeple insan karaciğer dokusu kaynaklı hepatosellüler karsinomalı HepG2 hücre soyu ve sıçan karaciğer dokusu kaynaklı hepatosellüler karsinomalı hücre soyu olan H-4-IIE kullanıldı. Her iki hücre soyu da (Hep G2 ve H-4-IIE) 24 ve 48 saat boyunca 0,1, 1, 10, 50, 100 μM 'lık dozlarda R-547 ilacı ile muamele edildi ve hücre canlılıkları MTT testi ile belirlendi. Sonuçlar pozitif kontrol olarak alınan antikanser ilaç olan Cisplatin'in etkileri ile karşılaştırıldı. Hep G2 hücre soyunda R-547 ilacı uygulanan doz ve zaman aralıklarında beklenen etki görülemediği için deneylere H-4-IIE hücreleri ile devam edildi. Etkili olduğu düşünülen dozlar ile akım sitometri, hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimlerin tespiti için konfokal mikroskop ve geçirimli elektron mikroskop yöntemleri uygulandı. Hep G2 hücrelerinde 24 saat boyunca uygulanan 0,1, 1, 10, 50, 100 μM R-547 ilaç dozlarında hücrelerin yaşam oranı sırası ile %101, %94, %93, %89, %79 ($p<0,001$) iken 48 saat boyunca %92, %101, %53,6 ($p<0,01$), %47,4 ($p<0,001$), %41 ($p<0,001$) oldu. H-4-IIE hücrelerinde 24 saat boyunca uygulanan 0,1, 1, 10, 50, 100 μM R-547 ilaç dozlarında hücrelerin yaşam oranı sırası ile %90, %80 ($p<0,01$), %63 ($p<0,001$), %47 ($p<0,001$), %43 ($p<0,001$) iken 48 saat boyunca aynı ilaç dozları ile muamele edilen hücre yaşam oranları sırasıyla %96, %85 ($p<0,01$), %46 ($p<0,001$), %44 ($p<0,001$), %45 ($p<0,01$) oldu. H-4-IIE hücrelerinde 24 saatlik ilaç muamelesi sonuçlarına göre 10 ve 50 μM dozlar ile yapılan akım sitometri analizi ile apoptotik değerler (kontrol %4,1) %38, %45 (her ikisi için $p<0,05$) olarak tespit edildi.

Sonuçlara göre, R-547 isimli CDK inhibitörünün hücre bölünmesini durdurucu etkisinin Cisplatin'den daha etkili olduğu gözlemlendi. 10 ve 50 μM akım sitometri sonuçlarına göre de apoptozu uyarmaktadır. R-547 ilacını 24 saatte, 10 ve 50 μM dozlarda uygulayarak yapılan konfokal ve Transmission Electron Microscopy (TEM) yöntemlerinin sonuçlarına göre de hücrelerde morfolojik olarak şekil değişikliği, hücre içeriğinde değişiklikler ve hücre ölümü gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: R-547, hepatosellüler karsinoma, H-4-IIE, HepG2, MTT, apoptoz, akım sitometri, konfokal mikroskopi, geçirimli elektron mikroskopi (TEM).



SUMMARY

Cancer is a disease that has high mortality rate in Turkey and in the world. Hepatocellular carcinoma (HCC) is derived from hepatocytes and it is the 3rd cancer related death type. Recently, there are many studies about developing new drugs and new therapy methods. Cyclin dependent kinase inhibitors, regulate the cell cycle and check points, give some guiding ideas for cancer studies.

In this study, we aimed to determine the possible effect of R-547 which is a member of cyclin kinase inhibitor family on on growth and apoptotic mechanisms of Hep G2, derived from human and H4IIE derived from rat HCC. Both cell lines were exposed to 0,1, 1, 10, 50, 100 μ M of R-547 for 24 and 48 hours. Also compared the results with the effects of Cisplatin as a positive control. We determined in vitro survival rate with MTT assay, apoptosis with flow cytometry, morphological changes with confocal microscopy and transmission elektron microscopy (TEM). After 24 h culturing at 0,1, 1, 10, 50, 100 μ M doses of R-547, the corresponding percentages of live Hep G2 cells were 101, 94, 93, 89 and %79 ($p < 0,001$), respectively. The corresponding percentages of alive Hep G2 cells were 92, 101, 53,6 ($p < 0,01$), 47,4 ($p < 0,001$), and 41 ($p < 0,001$) %, respectively, for 48 hours. After 24 h culturing at the same doses of R-547, the corresponding percentages of live H-4-IIE cells were 90, 80 ($p < 0,01$), 63 ($p < 0,001$), 47 ($p < 0,001$) and 43 ($p < 0,001$) % respectively. The corresponding percentages of alive H4IIE cells were 96, 85 ($p < 0,01$), 46 ($p < 0,001$), 44 ($p < 0,001$) and 45 ($p < 0,01$) %, respectively, for 48 hours. Because R-547 was not affect the cell survival of Hep G2 cells for 24 hours, experiments for flow cytometry, confocal and transmission elektron microscopies were continued with H4IIE cells. The rates of early apoptotic H-4-IIE cells were about 38 and 45 ($p < 0,05$ for both) % after applications of 10 and 25 μ M R-547 after 24 h (control: 4,1%), respectively.

According to our results, it is clear that R-547 has a growth inhibitory action than cisplatin. Also, R-547 had apoptotic effect on H-4-IIE cells for 24 hours. According to the confocal and Transmission Electron Microscopy (TEM) results, morphological changes has seen inside and outside the H-4-IIE cells.

Key words: R-547, hepatocellular carcinoma, H-4-IIE, MTT, apoptosis, flow cytometry, confocal microscopy, TEM.

İçindekiler

ÖZET.....	iii
SUMMARY	v
Tablolar Dizini	viii
Şekiller Dizini	ix
Simge ve Kısaltmalar Dizini	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Karaciğerin Anatomik ve Fizyolojik Yapısı.....	3
2.2 Hepatoselüler Karsinoma	4
2.3 HSK Tedavisinde R-547 CDK İnhibitörü Kullanımı	7
2.4 Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Cisplatin.....	8
2.5 Kanser ve Hücre Döngüsü İlişkisi.....	9
2.6 Apoptoz Mekanizması ve Kanser.....	13
2.6.1 Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz) Nedir?	13
2.6.2 Apoptoz ve Nekrozda Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler.....	14
2.6.3 Apoptoz Mekanizması ve Düzenlenmesi	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1 HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN YAPILMASI	21
3.2 HÜCRE KÜLTÜRÜ İÇİN YAPILAN HAZIRLIKLAR.....	21
3.3 HÜCRELERİN EKİMİ VE YAŞATILMASI.....	22
3.4 DENEYDE KULLANILAN GRUPLAR.....	22
3.4.1 HepG2 ve H-4-IIE Hücre Hatlarında R-547 İlaç Grupları	22
3.4.2 H-4-IIE ve Hep G2 Hücre Hatlarında Cisplatin Grupları.....	23
3.5. HÜCRE CANLILIĞI VE APOPTOZU BELİRLEME YÖNTEMLERİ.....	23
3.5.1 Tripan Mavisini İle Boyama Yöntemi.....	23
3.5.2 MTT Yöntemi	24
3.5.3 Apoptoz Ölçümü- Akım Sitometri Yöntemi	25
3.6 HÜCRELERDEKİ MORFOLOJİK DEĞİŞİMLERİ İNCELEME YÖNTEMLERİ 26	
3.6.1 Konfokal Mikroskopisi İle Hücredeki Morfolojik Değişimlerin	
İncelenmesi.....	26
3.6.2 Transmission Electron Microscopy (TEM) İle Hücrelerdeki Morfolojik	
Değişimlerin İncelenmesi	26
3.7 İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	27
4. BULGULAR	28
4.1 MTT Yöntemi Bulguları	28
4.1.1 Cisplatin'in Hep G2 Hücrelerine 24 Saat ve 48 Saat Süre İle	
Uygulanması.....	28
4.1.2 Cisplatin' in H-4-IIE Hücrelerine 24 Saat ve 48 Saat Süre İle	
Uygulanması.....	29
4.1.3 R-547 İlacının Hep G2 Hücrelerine 24 Saat ve 48 Saat Süre İle	
Uygulanması.....	29

4.1.4 R-547 İlacının H-4-IIE Hücrelerine 24 Saat ve 48 Saat Süre İle Uygulanması.....	30
4.2 R-547 İLACININ H-4-IIE HÜCRELERİNDE APOPTOTİK ETKİSİ VE AKİM SİTOMETRİK DEĞERLENDİRİLMESİ	33
4.3 R-547 İLACI UYGULANAN H-4-IIE HÜCRELERİNDE MEYDANA GELEN MORFOLOJİK DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ	38
4.3.1 Konfokal Mikroskopi İle R-547 İlacının H-4-IIE Hücrelerinde Meydana Getirdiği Morfolojik Değişikliklerin İncelenmesi	38
4.3.2 Transmission Electron Microscopy (TEM) İle R-547 İlacının H-4-IIE Hücrelerinde Meydana Getirdiği Morfolojik Değişikliklerin İncelenmesi ..	46
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	63
Özgeçmiş.....	68

Tablolar Dizini

Tablo 2.2.1 Hepatoselüler karsinoma tedavi seçenekleri.....	6
Tablo 4.1.1 Cisplatin ile muamele edilmiş H-4-IIE ve Hep G2 hücre soylarında canlılık yüzdeleri.....	33
Tablo 4.1.2 R-547 ile muamele edilmiş H-4-IIE ve Hep G2 hücre soylarında canlılık yüzdeleri.....	34
Tablo 4.2.1 Normalite testi sonuçları.....	36
Tablo 4.2.2 Parametrik olmayan Kruskal Wallis Test Sonuçları.....	36
Tablo 4.2.3 R-547 ilacının H-4-IIE hücre soyunda canlılık, apoptoz ve ölüm üzerine etkisi.....	37

Şekiller Dizini

Şekil 2.1.1	Karaciğerin Ön ve Arka Görünüşü.....	3
Şekil 2.1.2	Karaciğerin morfolojik ve histolojik yapısı.....	4
Şekil 2.2.1	Hepatoselüler karsinoma patogenezi.....	5
Şekil 2.2.3	Makroskopik karaciğer metastazı.....	7
Şekil 2.2.4 a)	İntravenöz madde verilmesiyle yapılmış karın BT inceleme.	7
Şekil 2.2.4 b)	İntravenöz madde verilmeden yapılmış karın BT inceleme.....	7
Şekil 2.3.1	R-547 'nin kimyasal formülü.....	8
Şekil 2.4.1	Cisplatin'in kimyasal formülü.....	8
Şekil 2.5.1	Siklin bağımlı kinazların fonksiyonları.....	10
Şekil 2.5.2	Hücre Döngüsünün Siklin Bağımlı Kinazlar Tarafından Düzenlenmesi	11
Şekil 2.5.3	Normal ve tümörlü hücre proliferasyonunda CDK/ Siklin kompleksleri.....	12
Şekil 2.5.4	Retinoblastoma Protein Yolağını Etkileyen Faktörler ve Fonksiyonları.....	13
Şekil 2.6.2.1	Apoptoz süreci ve morfolojik değişimler.....	15
Şekil 2.6.3.2.1	Apoptoz yolağının ekstrinsik, intrinsik ve granzim yolağı ile düzenlenmesi.....	19
Şekil 4.1.1.1	Cisplatin ilacının 5, 10, 25, 50, 100 µM' lık dozlarının 24 saat ve 48 saat boyunca muamele edilmesinin Hep G2 hücre canlılığına olan etkisi.....	31
Şekil 4.1.1.2.1	Cisplatin ilacının 5, 10, 25, 50, 100 mikromolarlık dozlarının 24 saat ve 48 saatlik muamelesinin H4iIE hücre canlılığı üzerine olan etkisi.....	31

Şekil 4.1.1.3.1 R-547 ilacının 0,1, 1, 10, 50, 100 mikromolarlık dozlarının 24 saat ve 48 saat muamelesinin H4iiE hücre canlılığı üzerine etkisi.....	32
Şekil 4.1.1.4.1 R-547 ilacının 0,1, 1, 10, 50, 100 mikromolarlık dozlarının 24 saat ve 48 saat muamelesinin H4iiE hücre canlılığı üzerine etkisi.....	33
Şekil 4.2.1 (a-d) H-4-IIE hücre soyunda kontrol, DMSO, 10 µM, 50 µM R-547 muamelesi sonucunda 24 saatte oluşan hücre yüzdeleri.....	35
Şekil 4.2.2 R-547 İlacının H-4-IIE hücrelerinde canlılık üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.2.3 R-547 ilacının H-4-IIE hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.2.4 R-547 ilacının H-4-IIE hücrelerinde ölüm üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.3.1.1 a) 24 saat inkübasyonun ardından kontrol grubu hücrelerinin konfokal mikroskopi görüntüleri.....	41
Şekil 4.3.1.1 b) 24 saat inkübasyonun ardından kontrol grubu hücrelerinin konfokal mikroskopi görüntüleri.....	41
Şekil 4.3.1.1 c) 24 saat inkübasyonun ardından kontrol grubu hücrelerinin konfokal mikroskopi görüntüleri.....	41
Şekil 4.3.1.1 d) 24 saat inkübasyonun ardından kontrol grubu hücrelerinin konfokal mikroskopi görüntüleri.....	41
Şekil 4.3.1.1 e) 24 saat inkübasyonun ardından kontrol grubu hücrelerinin konfokal mikroskopi görüntüleri.....	41
Şekil 4.3.1.1 f) 24 saat inkübasyonun ardından kontrol grubu hücrelerinin konfokal mikroskopi görüntüleri.....	41
Şekil 4.3.1.1 g) 24 saat inkübasyonun ardından kontrol grubu hücrelerinin konfokal mikroskopi görüntüleri.....	41
Şekil 4.3.1.1 h) 24 saat inkübasyonun ardından kontrol grubu hücrelerinin konfokal mikroskopi görüntüleri.....	41

Şekil 4.3.1.2 a) 10 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	41
Şekil 4.3.1.2 b) 10 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	41
Şekil 4.3.1.2 c) 10 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	42
Şekil 4.3.1.2 d) 10 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	42
Şekil 4.3.1.2 e) 10 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	43
Şekil 4.3.1.2 f) 10 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	43
Şekil 4.3.1.2 g) 10 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	43
Şekil 4.3.1.2 h) 10 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	43
Şekil 4.3.1.2 ı) 10 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	44
Şekil 4.3.1.2 j) 10 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	44
Şekil 4.3.1.3 a) 50 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	44
Şekil 4.3.1.3 b) 50 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	44
Şekil 4.3.1.3 c) 50 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	45
Şekil 4.3.1.3 d) 50 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	45
Şekil 4.3.1.3 e) 50 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	46
Şekil 4.3.1.3 f) 50 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.....	46
Şekil 4.3.2.1 a) Kontrol grubu H-4-IIE hücreleri.....	47
Şekil 4.3.2.1 b) Kontrol grubu H-4-IIE hücreleri.....	47
Şekil 4.3.2.1 c) Kontrol grubu H-4-IIE hücreleri.....	48
Şekil 4.3.2.1 d) Kontrol grubu H-4-IIE hücreleri.....	48

Şekil 4.3.2.1 e) Kontrol grubu H-4-IIE hücreleri.....	48
Şekil 4.3.2.1 f) Kontrol grubu H-4-IIE hücreleri.....	48
Şekil 4.3.2.2 a) 10 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	49
Şekil 4.3.2.2 b) 10 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	49
Şekil 4.3.2.2 c) 10 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	50
Şekil 4.3.2.2 d) 10 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	50
Şekil 4.3.2.2 e) 10 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	50
Şekil 4.3.2.2 f) 10 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	50
Şekil 4.3.2.2 g) 10 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	52
Şekil 4.3.2.2 h) 10 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	52
Şekil 4.3.2.3 a) 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	52
Şekil 4.3.2.3 b) 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	52
Şekil 4.3.2.3 c) 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	52
Şekil 4.3.2.3 d) 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	52
Şekil 4.3.2.3 e) 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	53
Şekil 4.3.2.3 f) 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	53
Şekil 4.3.2.3 g) 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	53
Şekil 4.3.2.3 h) 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.....	53

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

- R-547 : Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
- Hep G2 : İnsan hepatoselüler karsinoma hücre soyu
- H4IIE : Rat hepatoselüler karsinoma hücre soyu
- HSK : Hepatoselüler Karsinoma
- μM : Mikro molar
- Cisplatin : Antikanser ilacı
- MTT : 3-(4,5-dimetitiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid
- DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
- FCS : Fetal dana serumu (Fetal calf serum)
- DMSO : Dimetilsülfoksit
- HBSS : Hank's balanced salt solution
- CDK : Siklin bağımlı kinaz
- CDKI : Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
- DNA : Deoksiribonükleik asit
- FITC : Floresan izotiyosiyanat
- TEM : Transmissiion Electron Microscopy

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser son yıllarda Türkiye ve dünyada ölümlere sebep olan hastalıkların başında gelmektedir. Kanser kontrolsüz hücre çoğalma bozukluğu olup morfolojik hücresel değişimlere, apoptoz mekanizmasının düzensiz hale gelmesine, anjiojenez ve metastaza neden olmaktadır (Cheng v.d., 2016). Cerrahi girişimler, radyoterapi ve kemoterapi kanser tedavisi için ana modellerdir. Son yıllarda özellikle son fazlar için birçok antikanser ilaç geliştirme çalışmaları yapılmaktadır (Zhou v.d., 2016). Kanserın moleküler mekanizmalarını anlamak ve çeşitli ajanlarla kanserleşmiş hücreleri öldürmek araştırmaların temel amacıdır (Desphande v.d., 2005). Tedavi yaklaşımları içerisinde hücre döngüsü ve mekanizmalarını anlayarak döngüde oluşan bozuklukları hedef alarak çalışmalar yapmak, kanser araştırmalarında önemli bir yere sahiptir. Hücre döngüsünde ve kontrol noktalarında görevli olan siklin bağımlı kinazlar ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri kanser tedavisinde önemlidir. Çünkü hücre döngüsünün düzenli çalışmasında farklı, siklin ve siklin bağımlı kinaz komplekslerine ihtiyaç duyulmaktadır (Choi and Yoo, 2012).

Siklin bağımlı kinazlar (CDK) serin treonin protein kinaz ailesindedir. Siklin ve (CDK) heterodimerik kompleksler hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev almaktadır. Siklin D-CDK 4/6 ve Siklin E-CDK 2 hücre döngüsünde G₁ fazından S fazına geçişte retinoblastoma (RB) protein yolağını kullanarak görev yapmaktadır. Siklin A-CDK1/2 ve Siklin B-CDK 1 kompleksleri S fazı ve G₂/M geçişleri için görev alırken, CDK 5 glukoz alım düzenlenmesinde görevlidir. CDK 7-Siklin H ve Siklin T ve CDK 9 ise RNA polimerazın fosforilasyonunda görevlidir. Bu şekilde hücresel olayların düzenlenmesinde görevli yirmiyeye yakın CDK bulunmaktadır. CDK inhibitörleri ise ilaç araştırma ve geliştirme için önemli ajanlardır ve apoptozu uyararak kanser hücrelerinin hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Latif v.d., 2016).

Hepatosellüler karsinoma (HSK) kanser bağlantılı ölümlerin üçüncü sırasında yer alan ve dünya çapında önemli yere sahip malign solid tümörlü bir hastalıktır. Hastalığa bağlı karaciğerin fonksiyonlarını yitirmesi ve siroz ile ilişkili olması HSK'nın tedavisini diğer kanser türlerine göre zorlaştırmaktadır. Günümüzde tedavi yaklaşımı olarak cerrahi en iyi girişim olmasına karşın HSK'lı hastaların %20'si cerrahi işlemler için uygun olmamaktadır. Bu da HSK için ilaç geliştirmeyi önemli hale getirmiştir. Apoptoza karşı direnç göstermesi antikanser tedavinin etkinliğini engelleyen önemli bir zorluktur. Bu yüzden dirençli tümörlü hücrelerin ölümünü arttıran yenilikçi bileşiklerin geliştirilmesi son derece önemli bir adım haline gelmiştir (Zhang v.d., 2012).

Hücre ölümü genellikle tip 1 grubundaki apoptoz ve tip 2 grubundaki otofaji ve nekroz olarak bilinmektedir. Apoptoz yani tip 1 hücre ölümü hücre büzülmesi, DNA yoğunlaşması ve fragmantasyonu, membran tomurcuklanması, apoptotik cisim oluşumu ile karakterize edilmektedir. Ölüm reseptörleri ya da mitokondrideki yolaklar ile kaspaz aktivasyonu göstermektedir (Mei-Ying Xu ve Yeong Shik Kim, 2014).

Araştırmamızda insan karaciğer dokusu kaynaklı Hep G2 ve sıçan karaciğer dokusu kaynaklı HSK'lı H-4-IIE hücre soylarının kullanılmasına karar verildi. R-547 ilacı, hücre döngüsü düzenlenmesinde transkripsiyonda pozitif düzenleyici olarak görev alan CDK ve Siklin komplekslerini baskılamaktadır. CDK 1/Siklin B, CDK 2/Siklin E, CDK 4/Siklin D1 inhibisyonunu sağlamaktadır. Hücre döngüsü sırasında fazlarda ve faz arası geçişlerde RB yolağını kullanarak RB fosforilasyonunu azaltmaktadır. HSK'da CDK inhibitörü olan ve henüz aydınlatılmamış olan R-547 isimli ilacın etkisini ortaya koymayı amaçladık.

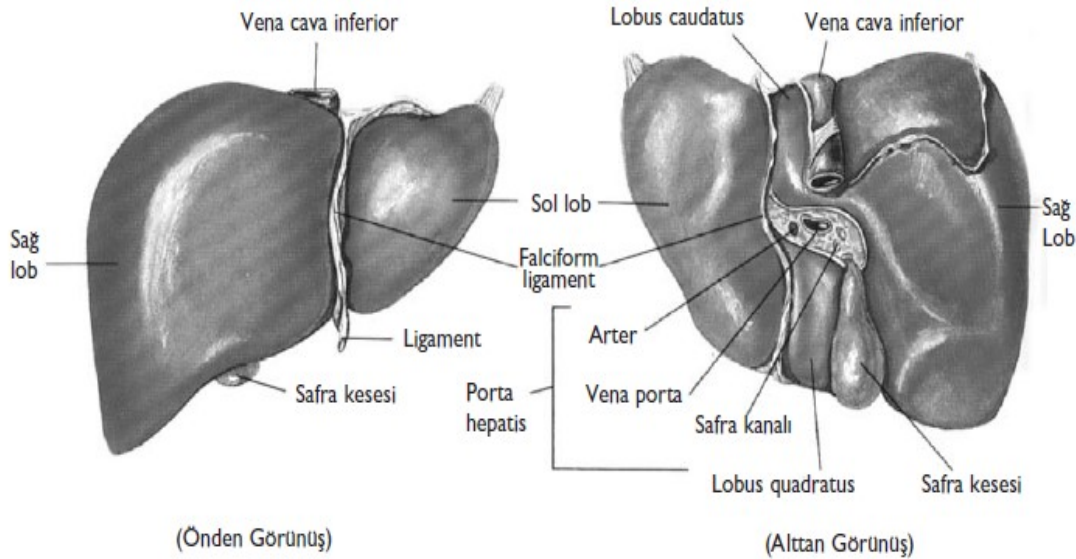
Bu bilgiler ışığında hücre kültürü kullanılarak, daha önce bu ilacın etkisi ortaya konmamış olan Hep G2 ve H-4-IIE hücre soylarında çeşitli zaman ve doz aralıklarında R-547 ilacının hücre canlılığı ve apoptoz üzerindeki olası etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

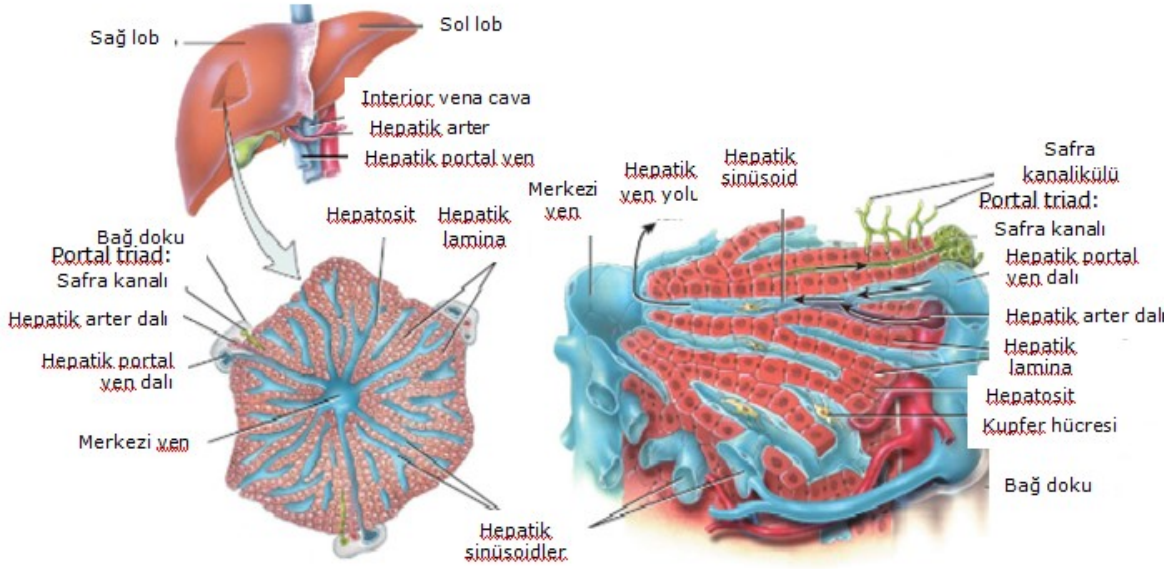
2.1 Karaciğerin Anatomik Ve Fizyolojik Yapısı

Karaciğer vücudumuzda bulunan en büyük bezlerdendir ve hacim olarak büyük bir organdır. Lokasyon olarak üst karın bölgesinin sağında ve bağırsakların üzerinde yer almakta olup fibröz kapsül ile çevrilmiştir. İki lobdan oluşmaktadır ve hepatik arter ile portal ven sisteminden kan akımı gerçekleşmektedir. Vücuttaki diğer organ ve sistemlerin görevlerini yerine getirebilmesi için karaciğer önemli bir göreve sahiptir. Sindirim ve dolaşım sistemi arasında bağlantılar kurmaktadır; kanı temizlemektedir; toksik maddeleri zararsızlaştırmaktadır; besin dönüşümü ve depolanmasını sağlamaktadır, ince bağırsaklara safra salınımını gerçekleştirmektedir, plazma proteinleri salgılamaktadır, karbohidrat metabolizması ve yağ metabolizmasını düzenlemektedir (Granit, Deniz, 2015).

Bunun yanı sıra vitamin A, vitamin D ve B12'yi depo etmektedir, koagülasyon faktörlerinin yapımında görevlidir ve kanın pıhtılaşma mekanizmasını düzenlemektedir, demirin ferritin şeklinde depo edilmesini sağlamaktadır (Çapan, Z., Yalçın, Ö.F., 2010). Zengin kan akımı sayesinde kanserleşen karaciğer hücrelerinin metastatik kolay yayılımını sağlamaktadır (Şekil 2.1.1 ve Şekil 2.1.2).



Şekil 2.1.1 Karaciğerin Ön ve Arka Görünüşü (Tunçel, Neşe v.d., 2000).

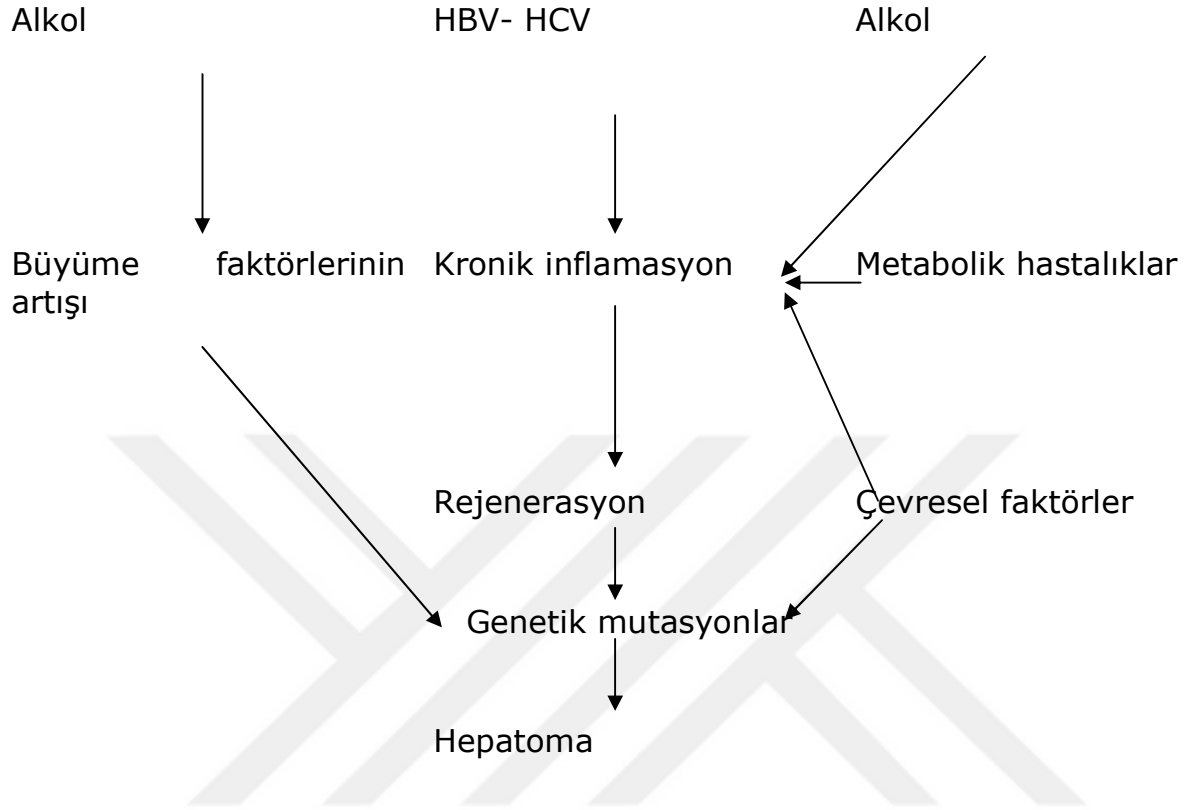


Şekil 2.1.2 Karaciğerin morfolojik ve histolojik yapısı (Tortora, Gerard,J., Derrickson, Bryan, 2008).

2.2 Hepatoselüler Karsinoma

HSK, hepatositlerden köken alan ve dünyada en yaygın görülen kanser türlerinden biridir. Kanser bağımlı ölümlerin 3. sırasında yer almaktadır. 50 yaşın üzerindeki erkeklerde kadınlara oranla daha fazla görülmektedir. HSK'lı hastaların yaklaşık %80'i Asya ve Afrika ülkelerindedir. HSK'nın risk faktörleri arasında kronik viral hepatit B (HBV), hepatit C (HCV) enfeksiyonu, alkol bağımlılığı, tütün ve tütün mamulleri kullanımı, aflatoksin yer almaktadır (Vatan, P. , v.d., 2013). Bunların yanı sıra kronikleşmiş siroz, obezite, karaciğer yağlanması, diabetes mellitus, alfa-1-antitripsin eksikliği de risk faktörleri arasındadır (Buendia, M. Annick, 2000). Kronik HBV ve HCV enfeksiyonu dünya çapında HSK oluşumunun önemli risk faktörüdür. HSK gelişirken semptomların belirgin olmaması hastalığın teşhisini zorlaştırmaktadır (Şekil 2.2.1).

Agresif tümürlü bir hastalık olduğundan hastaların sağkalım süresi yalnızca birkaç yıl olmaktadır (Vatan,P., v.d., 2013). HSK'lı hastaların yaklaşık %70'e yakını için bu süre 5 yıldır (Wang, Fan v.d., 2012). Hastalığın tedavisi tümör büyüklüğü ve bulunduğu evreye bağlıdır, yüksek dereceli tümörler kötü prognozla sonuçlanmaktadır.



Şekil 2.2.1 Hepatoselüler karsinoma patogenezi (Taş, Adnan, 2010).

Cerrahi, HSK için temel tedavi yöntemlerinden biridir; diğer taraftan karaciğer transplantasyonu tedavi için bir fikir oluşturmaktadır (Vatan,P.,v.d., 2013). Günümüzde karaciğer transplantasyonu en etkili yöntem olarak görülmektedir (Zhang, Jun-Fang, v.d., 2006). HSK'lı hastaların cerrahi tedavi uygunluğu %20 civarındadır (Zhang, C., Z., 2012).

Cerrahi dışında transkatater uygulaması, arteriyel kemoembolizasyon tedavisi de bir seçenektir. Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi sıkça uygulanan methodlardır. Ancak radyoterapi ve kemoterapi beklenen sonuçları vermeyen bir tedavi seçeneğidir. Kemoterapi ve kullanılan ilaçların etkileri tipik olarak hepatik ve sistemik toksisiteye bağlı olarak sınırlıdır. Bu ajanlar HSK hücre ölümünü gerçekleştirirken hastaları çeşitli yan etkilere maruz bırakmaktadır (Vedantham, Kumar, 2011, Kang, H., v.d., 2010). Bu yüzden HSK daha etkili ve daha az toksik etkiler barındıracak tedavilere ihtiyaç duymaktadır (Tablo 2.2.1) (Vatan, P. ,v.d. , 2013).

Apoptozun uyarıldığı antikanser ilaçların keşfi umut vaat etmektedir (Şekil 2.2.3 ve Şekil2.2.4.) (Yuan, Shu-Lan, v.d., 2004).

Tablo 2.2.1. Hepatoselüler karsinoma tedavi seçenekleri (Taş, Adnan, 2010).

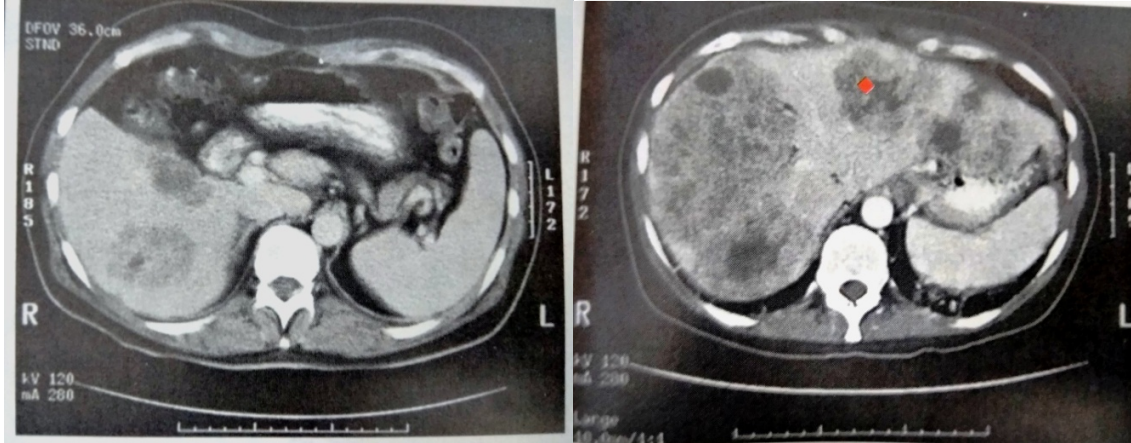
Cerrahi tedavi
Karaciğer transplantasyonu Rezeksiyon
Perkütan girişimler
Alkol ablasyonu Radyofrekans termal ablasyon
Transarteriyel girişimler
Embolizasyon Kemoembolizasyon Kemoperfüzyon
Radyoterapi
Kemoterapi
Gen ve immünoterapi



Şekil 2.2.3 Makroskopik karaciğer metastazı (Robins ve Cotran, 2009).

a)

b)

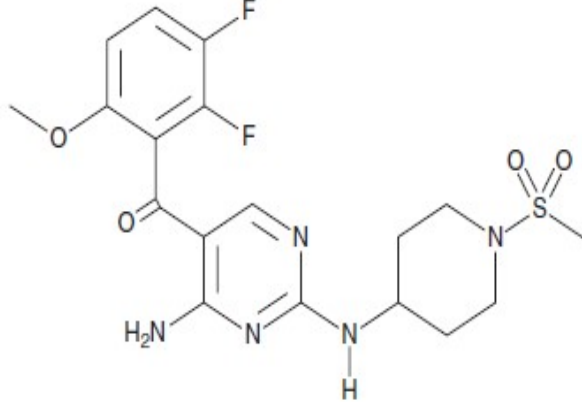


Şekil 2.2.4 a ve b: İntravenöz madde verilmesiyle (a), madde verilmeden (b) yapılmış karın BT inceleme (Robins ve Cotran, 2009).

2.3 HSK Tedavisinde R-547 CDK İnhibitörü Kullanımı

ATP yarışmalı CDK inhibitörü olan R-547 CDK 1/Siklin B, CDK 2/Siklin E, CDK 4/Siklin D1 inhibisyonunu gerçekleştirirken hücre döngüsünü G1 ve G2 fazları geçişinde durdurmaktadır (Şekil 2.3.1). Retinoblastoma (RB) yolağını kullanarak RB proteininin fosforilasyonunu azaltarak apoptozu uyarmakta ve kanser hücre ölümüne sebep olmaktadır. R-547, in vitro ve in

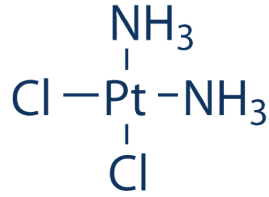
vivo şartlarda, faz I çalışmaları sırasında solid tümör tedavisi için umut vaat edici bir molekül olmaktadır (De Pinto, 2006).



Şekil 2.3.1 R-547'nin kimyasal formülü.

2.4 Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Cisplatin

Cisplatin (CDDP), çeşitli kanser tiplerinin tedavisi sırasında kemoterapide kullanılan bir ilaçtır (Şekil 2.4.1). DNA sentezini inhibe ederek kanser hücrelerini öldürmektedir. Cisplatin bağlantılı DNA hasarı çeşitli yolları uyararak apoptoz ile hücre ölümünü gerçekleştirmektedir (Kishimoto v.d, 2016, Zhou, v.d., 2010).



Şekil 2.4.1 Cisplatin'in kimyasal formülü.

2.5 Kanser ve Hücre Döngüsü İlişkisi

Hücre içeriğinin iki katına çıkması, yüksek bir metabolik aktivite ve çeşitli mekanizmalarla kontrol edilerek yavru hücrelere dengeli bir şekilde aktarılmasına hücre döngüsü adı verilmektedir (Güneş, 2003).

Organizmaların normal gelişmesi ve yaşamını sürdürebilmesi vücutta belirli bir denge ile sağlanmaktadır. Genlerin kontrolü altında hücre döngüsü devam eder ya da bazı genler aşırı hücre bölünmesini engellerler (Ustaoğlu, M.Ali, 2009). Böylece homeostazis gerektiği gibi, hücre çoğalması, hücrelerin gelişiminin durdurulması ve apoptozis ile denge halinde sürdürülmektedir (Cabadak, Hülya, 2008)

DNA'nın replikasyonu ve proliferasyonu için hücre döngüsünün farklı aşamalarında durdurucu etkiler gösteren mekanizmalar iç ve dış uyanlarla aktivite göstermektedir. Bu süreç düzenli ve dengeli bir şekilde ilerlemektedir (Funk, Oliver, 2005).

Çok hücreli organizmalarda hücre döngüsü çoğalma, büyüme, yara iyileşmesi ve birçok fizyolojik, biyokimyasal süreçlerin devam etmesi açısından oldukça önemlidir.

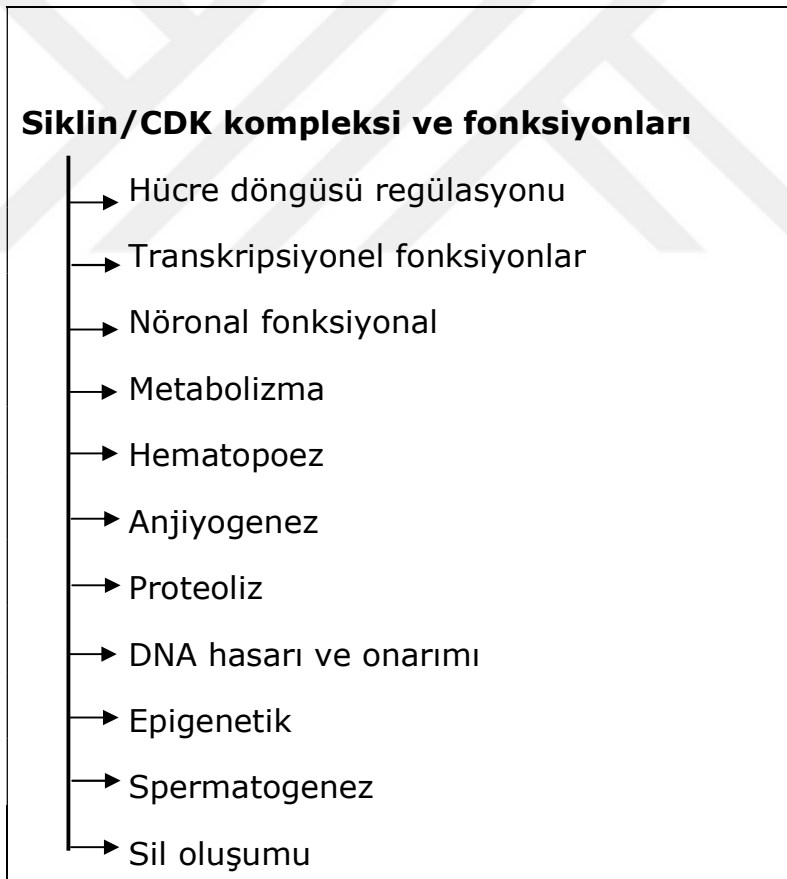
Hücre döngüsü fonksiyonel olarak dört fazdan oluşmaktadır: Yüksek metabolik aktivitenin olduğu ve DNA'nın replike edildiği S Fazı, DNA ve hücresel komponentlerin iki kardeş hücreye ayrıldığı M Fazı, mitoz sonrası ve S fazı öncesi hücrelerin biyokimyasal ve fizyolojik görevlerini yerine getirmek için gerekli maddeleri sentezlediği ve bir sonraki döngüde DNA replikasyonu için yaptığı hazırlıkları içeren G1 Fazı, hücrelerin mitoz bölünme hazırlıklarını gerçekleştirdiği G2 Fazı (Martinez, Conception Sanchez, v.d., 2015, Shackelford, R., E., v.d., 1999).

Mitoz bölünme için gereken uyanların eksikliği ya da oluşan hasarların tamir edilmesi amacı ile hücrelerin geri dönüşümlü olarak geri çekildiği dinlenme fazı ise G0'dır (Desphande v.d., 2015).

Farklılaşması, bölünmesi sona ermiş ya da yaşlanmış hücreler geri dönüşümsüz olarak geri çekilebilirler. Bu evrede hücre döngüsü siklin bağımlı kinazlar olan CDK'lar ve düzenleyici eşleri olan siklinler tarafından düzenlenmektedir (Gareth ve Stoeber, 2011).

Siklin bağımlı kinazlar (CDK), serin/treonin protein kinaz ailesi üyesidirler. Hücre döngüsü düzenlenmesinde ve transkripsiyonunda çok

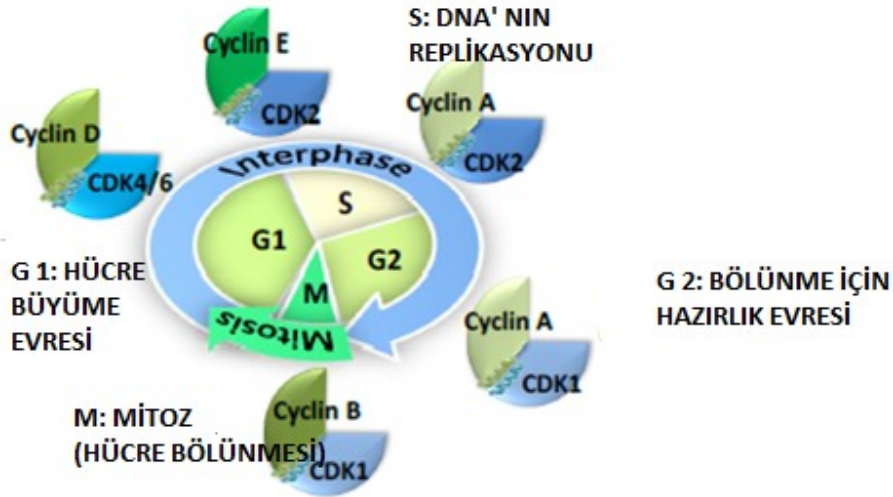
önemli görevleri vardır. CDK'lar hücre bölünmesi regülasyonunda görevli olan ve transkripsiyon düzenlenmesinde görev yapan CDK'lar olmak üzere iki gruba ayrılarak incelenebilir: Hücre döngüsü regülasyonunda CDK1, CDK2, CDK 3, CDK 4 ve CDK 6 görev alırken transkripsiyon düzenlenmesi sırasında CDK 7, CDK 9, CDK 11, CDK 13 görev yapmaktadır. Bunların yanı sıra CDK 5 ve CDK 10 nöronal düzenlemeyi sağlarken, CDK 11 ve CDK 12 RNA uç birleştirmesi sırasında görev almaktadır (Martinez, Conception Sanchez, v.d., 2015). Ökaryotik hücrelerde protein kinazlar fosforilasyon mekanizması aracılığı ile hücre sinyal, hücresel aktiviteler, büyüme ve gelişme ve homeostazın dengeli bir şekilde sürdürülmesi için görev yapan proteinlerdir (Şekil 2.5.1) (Mariule, G., Belmont,P., 2014).



Şekil 2.5.1 Siklin bağımlı kinazların fonksiyonları (Peyressatre, M. v.d., 2015).

Belirgin bir şekilde aktivitesi bozulmuş olan CDK-siklin kompleksleri hücre döngüsü sırasında kontrol edilemezse malign hücre oluşumu gözlenmektedir. Malign hücrelerde CDK'ların inhibisyonu kanserleşmeye karşı savunma mekanizması geliştirmektedir. Günümüzde bu savunma sırasında görev yapan CDK inhibitörleri çeşitli insan kanserlerinin tedavisi için geliştirilmektedir (Zhou, v.d. ,2016). CDK inhibitörleri katalitik ATP alt üniteleriyle sıkı bir ilişki içinde olan ATP yarışmalı ve ATP ile yarışmalı olmayan iki grup olarak karşımıza çıkmaktadır (Mariule, G., Belmont, P., 2014).

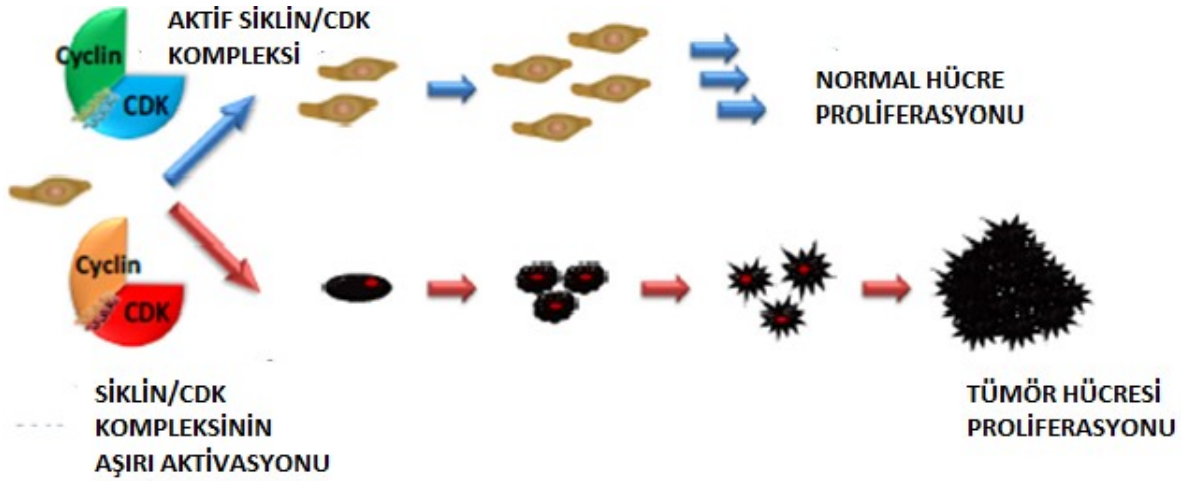
Hücre döngüsü G1 evresinde, CDK 4/Siklin D ve CDK 6/Siklin D kompleksleri döngünün sonlandırılmasını düzenlemektedirler. S fazı CDK 2/Siklin A kompleksi ile başlamakta, CDK1/Siklin B kompleksi ise G2 fazını ve mitoz fazının başlangıcını düzenlemektedir (Şekil 2.5.2).



Şekil 2.5.2 Hücre Döngüsünün Siklin Bağımlı Kinazlar Tarafından Düzenlenmesi (Peyressatre, M., v.d. , 2015).

Hücre döngü mekanizmasının düzenlenememesinin altında kontrolsüz hücre bölünmesi yatmaktadır. Bu da malign fenotiple karakterize edilmektedir (Williams ve Stoeber, 2012). Normal fizyolojik koşullarda CDK/Siklin aktivasyonu sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Protoonkogenlerin mutasyonları, CDK/Siklin komplekslerinin ve proteinlerin aşırı ifadenmesine sebep olarak kontrol noktalarının inaktivasyonu ile

birlikte hücre döngüsünün inhibisyonuna sebep olmaktadır (Şekil 2.5.3) (Peyressatre, Marion, v.d. , 2015).

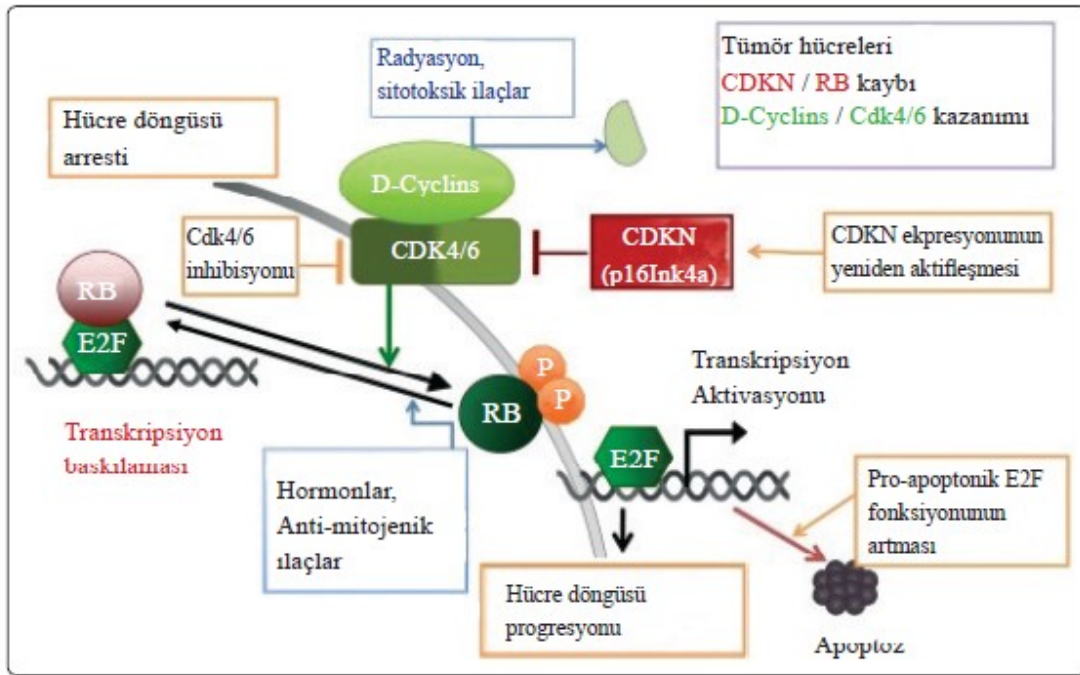


Şekil 2.5.3 Normal ve tümürlü hücre proliferasyonunda CDK/Siklin kompleksleri (Peyressatre, M., v.d. , 2015).

Hücre döngüsünün her bir fazı ve fazlar arası geçişler kontrol noktaları adı verilen sensör mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Kontrol noktaları ile hücre döngüsünde olayların bir denge içinde ve eksiksiz bir şekilde devam etmesi sağlanmaktadır. Kontrol noktaları anormal ve tamamlanamamış bir döngüsel olay tespit ederse (örn. DNA hasarı) efektörlere sinyal taşır ve hücre döngüsünde oluşan aksaklıkları gidermek adına döngüyü durdurmaktadır. Efektör proteinler hücre döngüsünü geri dönüşümlü bir şekilde düzenleyen CDK inhibitörlerini (CDKI) içermektedir. G1 evresinin duraksaması CDK4 ve CDK6'yı inhibe eden Ink 4 ailesi [INK4A (p16), INK4B (p15), INK4C (p18) ve INK4D (p19)] üyeleri ya da CDK2 aktivitesini baskılayan Cip/ Kip ailesi (p21, p27, p57) üyeleri aracılığı ile düzenlenmektedir (Williams ve Stoeber, 2012). Mitojenler, CDK tarafından uyarılan G1-S faz geçişini RB proteininin fosforilasyonunu uyararak E2F ailesinin transkripsiyon faktörleri ile arasındaki etkileşimin bozulmasına neden olmaktadır. Kanser hücrelerinde RB proteinlerinin fosforilasyonu genellikle kusurlu bir durum olup mitojenlerin yokluğunda dahi E2F bağımlı G1-S gen ekspresyonu ile son bulmaktadır.

Çeşitli tümörler, ligandlar ve HER2/ErbB2/neu gibi reseptör mutasyonu veya HER2 gen amplifikasyonu ile Ras-Raf-MAP kinaz ya da P13K-Akt sinyal yollarının her seviyesinde oluşan mutasyonlar sonucunda ortaya

çıkabilmektedir (Siklin D1 VE CDK 4 gen amplifikasyonu). Anormal sinyallerin alınması ile RB'yi fosforlayan ve transkripsiyon aktivitesini engelleyen CDK-Siklin kompleksleri uyarılmaktadır. RB fosforilasyonu onkolojik sinyal yolları için ipucu vermektedir, p15, p16, cp27 CDK inhibitör genlerinin etkinliğini kaybetmesi de hücre döngüsünde aksaklıklar oluşturarak tümör oluşumuna ve genomik dengenin kaybolmasına neden olmaktadır. p21 geninin hücre döngüsü sırasındaki aktivasyonu ile p53 arasında bir ilişki vardır (Şekil 2.5.4) (Williams ve Stroeber, 2012).



Şekil 2.5.4 Retinoblastoma Protein Yolağını Etkileyen Faktörler ve Fonksiyonları (Akdeniz, D. , 2014).

2.6 Apoptoz Mekanizması ve Kanser

2.6.1 Programlanmış hücre ölümü (apoptoz) nedir?

Apoptoz genellikle tip I programlanmış hücre ölümü ile bilinir ve hücre büzülmesi, DNA yoğunlaşması, fragmentasyonu, membran blebbingi, hücre iskeletinin depolimerizasyonu, apoptotik cisim oluşumu ile karakterize edilmektedir. Ölüm reseptörleri ya da mitokondriyal yollar boyunca kaspaz aktivasyonu göstermektedir (Xu, Mei-Ying, Kim, Yeong, S., 2014). Gelişmiş organizmalarda yaşamın başlangıcından itibaren hücrelerde hücre çoğalma ve ölüm mekanizmaları belirli bir denge ve uyum içerisindedir. Fizyolojik

olarak programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptotik hücre ölümü, temel ve klinik tıp bilimleri, biyoloji bilimi için son yıllarda ilgi çekici bir konu haline gelmiştir (Solakoğlu, Zeynep, 2009). DNA'nın çeşitli sebeplerle hasar görmesi, hücre ölüm reseptörlerinden ya da mitokondriyal yolaklardan gelen sinyaller hücrenin sağ kalımı ya da ölüm kararını vermesi açısından oldukça önemlidir (Solakoğlu, Z., 2009). Kısaca apoptoz hücrelerde çeşitli sebeplerle oluşan hasarlara, yaşlı hücrelere veya zararlı hücre yapılarına karşı verilmiş fizyolojik bir cevaptır (Sjöström, Johanna, Makela, Tomi, 2006).

2.6.2 Apoptoz ve nekrozda meydana gelen morfolojik değişiklikler

Hücre ölümünün iki ayrı çeşidi olarak apoptoz ve nekroz karşımıza çıkmaktadır. Apoptotik hücreler fagositoz yolu ile etkin bir şekilde uzaklaştırılmaz ise ikincil olarak nekroza başvurulur. Akut hücre hasarından kaynaklanan travmatik hücre ölümünün bir formu olan nekroza kıyasla apoptoz, bir organizmanın yaşamı boyunca devam eden düzenlenmiş ve sürekli kontrol edilen bir sürecidir (Ankıt, 2017).

Enerji bağımlı ve aktif olması, inflamasyon sürecine girmemesi, tek bir hücreyi etkilemesi yönü ile nekrozdaki ayrılmaktadır. Nekroz ise enerjiye bağımlı değildir ve hücre sel solunumu inhibe etmektedir. Bunun yanı sıra hücreleri grup olarak etkilerken, hücre membranının ve hücre içeriğinin bozularak stoplazma içine dağılmasına ve hücrenin hacimsel olarak şişmesine neden olmaktadır. Daha sonra hücrenin patlaması ve proteolitik enzimlerin hücreler arası boşluğa sızması ile sonuçlanmaktadır. Nekroz sırasında hücre inflamasyonu uyarılmaktadır (Sjöström, Johanna, Makela, Tomi, 2006).

Apoptoza uğrayan hücrelerde biyokimyasal ve fizyolojik birçok süreçle birlikte çeşitli morfolojik değişimler meydana gelmektedir ki; bu da apoptoz hakkında bilgi vermektedir:

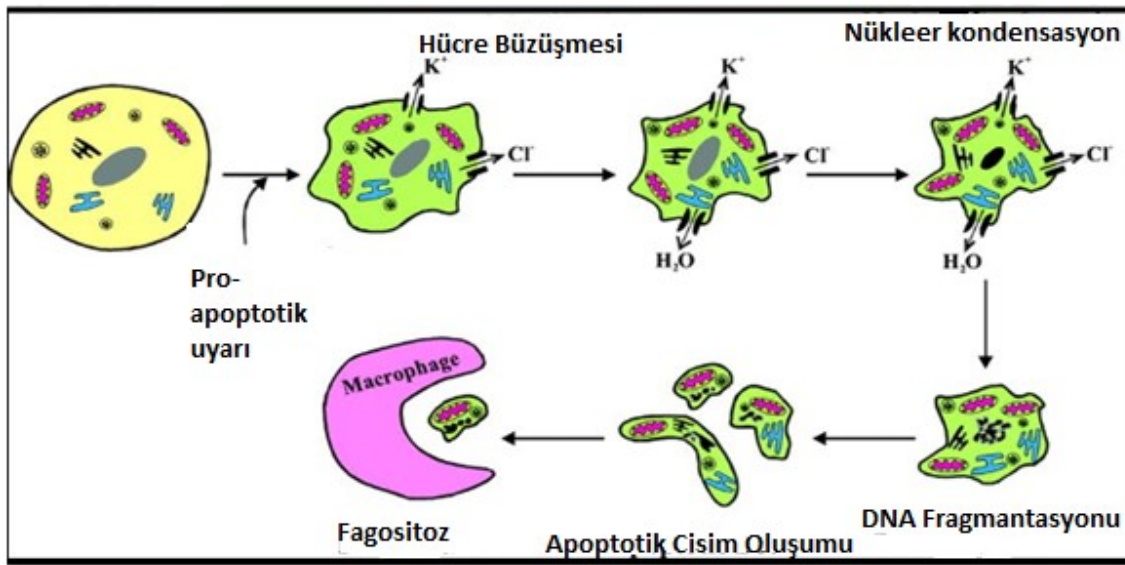
Normal fizyolojik koşullarda bir denge halinde devam eden hücre içi ve hücreler arası sodyum, potasyum, klor iyon geçişi apoptoz ile birlikte bu dengeyi kaybetmektedir (Akşit, H., Bildik, A., 2008).

Hücre membranının yapısı bozularak transglutaminaz enzimi etkisi ile hücre zarında tomurcuklanma ve parçalanma gözlenmektedir. Hücre şekli büzülüp, hacim olarak küçülmektedir. Çevre ve komşu hücrelerle olan teması ortadan kalkmaktadır.

Membranda içeriden dışarıya doğru fosfatidil serin geçişi olmakta, hücre içinde Ca^{+2} iyonları artmaktadır. Çekirdek ve sitoplazmada oluşan

yoğunlaşma ile birlikte kromatin agregasyonu gözlenmektedir. Bu da ip merdiven kromatin (ladder) yapısını oluşturmaktadır. Hücrenin parçalanıp içeriğinin bozulması ile apoptotik cisimler oluşmaktadır.

Hücre membran asimetrisinin bozulması ile apoptotik cisimler inflamasyon ve sitokinleri uyarmadan makrofaj ya da komşu hücrelerce fagositoz olayı ile yok edilmektedir (Tomatır, A., G., 2003, Fernald ve Kurokawa, 2013). Şekil 2.6.2.1'de apoptoz sürecinde oluşan olaylar ve morfolojik değişimler verilmektedir:



Şekil 2.6.2.1 Apoptoz süreci ve morfolojik değişimler. (Ankıt, 2017).

2.6.3 Apoptoz mekanizması ve düzenlenmesi

Apoptoz mekanizması oldukça karmaşık olan enerji bağımlı kaskadların moleküler olaylarını içermektedir. Birbiri ile bağlantılı olarak gerçekleşen iki ana apoptoz yolağı vardır: İlki ekstrinsik ya da ölüm reseptörleri yolağı, diğeri ise intrinsik ya da mitokondriyal yolaktır. Bu iki yolağın yanı sıra T hücreleri aracılığı ile gerçekleşen ve sitotoksik etkili perforin-granzim bağımlı yolak da vardır (Ankıt, 2017, Sjöström, Johanna, Makela, Tomi, 2006). Bu yolaklar birbirlerine yakından bağımlı olarak çalışmakta; genellikle ölüm reseptörleri aracılı uyarılar ile başlatılan mitokondriyal yolakla daha da güçlü hale gelmektedir (Ankıt, 2017). Hem intrinsik hem de ekstrinsik yolda kaspazlar görev yapmaktadır (Coşkun ve Özgür, 2011).

2.6.3.1 İntrensik ya da mitokondriyal yolak

İntrensik sinyal yolları apoptozu başlatan ve hücre içindeki hedefler üzerinde doğrudan etki ederek mitokondriyal yolağı uyararak reseptör aracılı olmayan uyarılar içermektedir. Uyarılar pozitif ve negatif sinyal oluşumu ile intrinsik yolağı uyarılmaktadır. Negatif sinyaller hücre ölümünü baskılayabilecek bazı büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin yokluğu ya da eksikliği ile birlikte apoptozu uyarılmaktadır. Pozitif sinyaller ise sınırlandırılmış olmasa da radyasyon, toksinler, hipoksi, hipotermi, pH azalması, hücre içi kalsiyum düzeyi, oluşan DNA hasarı, viral enfeksiyonlar ve serbest radikallerle apoptozu uyarılmaktadır. Mitokondri ise tüm hücrelerin yaşamı için oldukça önemlidir; mitokondri olmaksızın oksijenli hücre solunum mekanizma hasarı gözlenmekte ve hücre hızlıca ölmektedir. Apoptotik proteinler mitokondriyi değişik yollarla etkilemektedir; mitokondrielerde şişme, membran porları ve mitokondri membran permeabilitesinde değişim ile birlikte apoptotik sinyaller devreye girerek apoptoz başlatılmaktadır (Ankıt, 2017).

2.6.3.2 Ekstrinsik ya da ölüm reseptörleri yolağı

Ölüm reseptörleri ya da ekstrinsik apoptoz yolağı, büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, mitokondride matriks ayrılması, sitokin aracılı ölüm gibi hücre dışı olaylar tarafından uyarılmaktadır. Ekstrinsik yolak, tümör nekroz faktörü (TNF), Fas Ligand (Fas-L), ya da TNF ile ilgili apoptoz uyarıcı ligandlar (TRAIL ya da Apo2L) gibi ölüm ligandları kaspaz-8 ve kaspaz-10 ile birlikte ölüm uyarıcı sinyal kompleks DISC'i uyararak uygun reseptör ile etkileşime girdiğinde, sırası ile TNF reseptörü, Fas reseptörü, KILLER/DR4 ve DR5 süreci başlatılmaktadır. Bu durum hücre canlılığı ve metabolizma için esansiyel olan proteinlerin kırılması ile sonuçlanmakta, intrinsik ya da mitokondriyal yollar için DNA hasarı, osmotik stres gibi hücre içi problemlere neden olmaktadır. Bu yolak Bcl-2 ailesi proteinleri ile sürdürülmektedir. Bcl-2/Bax gen ailesi üyeleri apoptozun düzenlenmesinde ve tümör patogeneğinde son derece önemli bir role sahiptir. Bcl-2 ailesinin 20 üyesi tanımlanmıştır. Bu gen ailesine ait pro ve anti apoptotik proteinler büyüme faktörü kısıtlaması, hipoksi, radyasyon, UV ve antikanser ilaç gibi çeşitli apoptotik uyarıcılar için hassasiyetle hücre direncini yönetmektedirler. Apoptotik sinyallere cevaben Bcl-2 ailesi üyesinden pro-apoptotik olan Bax proteini aracılığı ile mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirerek sitokrom C salınımına ve kaspaz aktivasyonuna neden olmaktadır. Pro-apoptotik Bax proteini en çok çalışılan Bcl-2 ailesi üyesidir (Sjöström, Johanna, Makela, Tomi, 2006; Fernald, Kaleigh v.d., 2013; Reed, J.C., 2000).

Apoptoz mekanizması düzenlenirken birçok aracı görev yapmaktadır. Bunlar arasında hücre içinde artışı ile birlikte, hücre ölümünde görevli enzimleri aktive eden Ca^{+2} , hücre proliferasyonu ve hücre ölümünde görevli transkripsiyon düzenleyen protein C-myc, hem aktivatör hem de inhibitör olarak apoptozda görev alan Bcl-2 proteinleri, seramid, p-53 transkripsiyon faktörü, granzim-perforin sistemi proteinleri yer almaktadır (Dinçel ve Kul, 2016).

a. TNF aracılı düzenleme

TNF- α makrofajlar aracılığı ile üretilen bir sitokin olup apoptozu uyarmaktadır. TNF- α 'nın insanlarda bulunan iki reseptörü vardır: TNFR 1 ve TNFR 2. TNF- α , TNFR 1'e bağlanarak zarlar arası proteinlerin TNF reseptörü ile ilişkili olan ölüm domaini TRADD ve Fas ile ilişkili ölüm domaini olan FADD aracılığı ile kaspaz aktivasyonuna yol açan yolağın başlamasını sağlar. C1p1/2, TRAF2'ye bağlanarak TNF- α sinyalini, FLIP'de kaspaz-8 aktivasyonunu inhibe etmektedir. Bu reseptörün bağlanması dolaylı olarak hücre sağ kalımı ve enflamatuar yanıtları veren transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır.

TNFR 1 kaspazdan bağımsız olarak da apoptozu uyarabilmektedir. TNF- α ve apoptoz ilişkisi özellikle otoimmün hastalıklarda olmak üzere birçok hastalığın aydınlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Ankıt, 2017).

b. Fas aracılı düzenleme

Fas reseptörü birinci apoptoz sinyali, CD95, Apo-1 olarak bilinir. Fas ligandı olan FasL'yi bağlayan TNF ve kaspaz-F ailesinin transmembran proteinidir. Fas ve FasL birleşimi FADD, kaspaz-8 ve kaspaz-10'u içeren hücre ölümü uyarıcı kompleksin (DISC) oluşumu ile sonuçlanır. Kaspaz-8'i aktive ederek apoptozu uyarırken Fas-DISC mitokondriden ve güçlenmiş kaspaz-8 aktivasyonundan pro-apoptotik faktörlerin salınımını uyarır. FasL ifadesinin upregulasyonu apoptozdan kaçan tümör hücrelerinde bulunmaktadır (Ankıt, 2017; Sjöström, Johanna, Makela, Tomi, 2006).

c. Tümör protein p-53 (TP-53)

Hücre döngüsü kontrol noktalarında ve apoptozda görevli olan transkripsiyon faktörü P-53, kimyasal duyarlılığı olan bir aracıdır. Hücrede DNA hasarı sırasında hücre döngüsünde görev alarak ya hasarı onarmakta ya da apoptozu uyararak döngüyü G1 fazında durdurmaktadır (Tomatır,G., 2003, Sjöström,Johanna, Makela, Tomi, 2006).

Eğer DNA hasarı onarılamayacak durumda ise Bax, Apaf-1, Fas proteinlerinin yapımını uyarmakta ve Bcl-2 ve Bcl-x L proteinlerinin inhibisyonu sağlanarak hücrenin ölümü için apoptoz uyarılmaktadır (Coşkun ve Özgür, 2011).

d. Perforin/Granzim yolağı

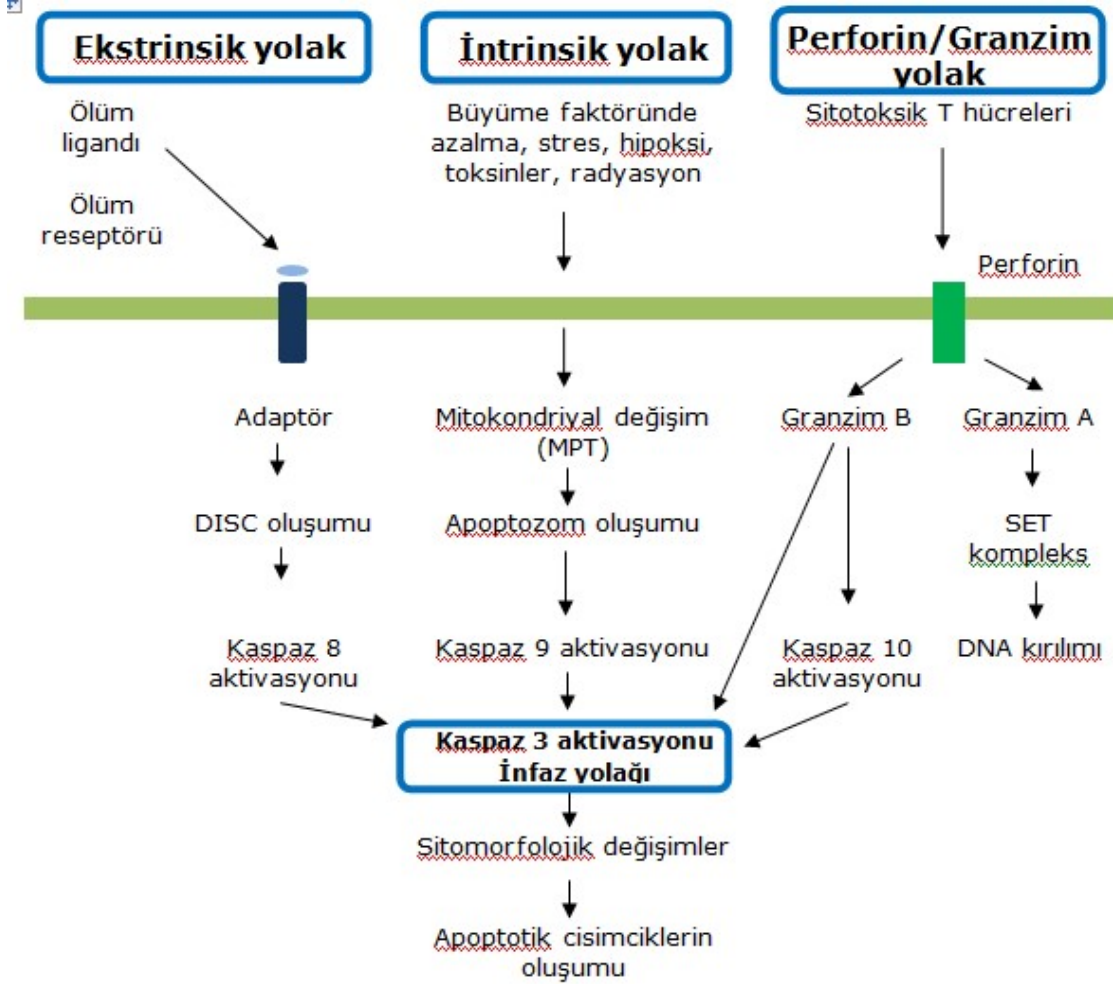
Sitotosik T hücreleri ve doğal katil olarak bilinen NK hücrelerinin sitoplazmalarında bulunan salgı granüllerinde lokalize olan granzim ve perforinler, enfeksiyon ya da oluşan tümör hücrelerinin apoptozunda görev almaktadır. T hücresi aracılık ederek, CTL reseptörüne bağlanarak kompleks oluşturan hedef hücre üzerinde por oluşumunu sağlarlar. Serin proteaz grubundan olan granzim B ve A tümör hücreleri ve virüsle enfekte olmuş hedef hücrede delik oluşturarak, pordan serbestleşerek pro-kaspaz aktivasyonu ile birlikte apoptozu başlatmaktadır (Tomatır, G., 2003).

e. Kaspazlar

Kaspazlar, pro-kaspaz formlarda sitoplazmada yer almaktadırlar ve aktif merkezlerinde sistein bulunduğundan sistein proteaz adını almaktadırlar. İnaktif formda olduklarından ancak proteolitik olarak aktive olurlar ve kaspaz aktivasyon serilerini oluştururlar. Kaspazlar, 3 grup olarak sınıflandırılmaktadırlar:

- 1) Başlatıcı Kaspaz Grubu** (Kaspaz 2, 8, 9, 10)
- 2) Efektör Kaspaz Grubu** (Kaspaz 3, 6, 7)
- 3) Enflamatuar Kaspaz Grubu** (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14)

Hasar görmüş olan DNA'nın tamirinde ve replikasyonunda görev almaktadırlar ve gerekli enzimleri inaktive etmektedirler. Hücre iskeletini oluşturan aktin, laminin gibi proteinleri yıkarak hücrenin normal şeklinin bozulmasına ve hücre membranında tomurcuklanmaya neden olurlar (Coşkun ve Özgür, 2011). Sitokrom-c+Apaf 1+ATP'den oluşan apoptozom kompleksi, inaktif form olan pro-kaspaz 9'u aktif kaspaz 9'a dönüştürerek efektör kaspazlar olan 3 ve 7'yi çekirdeğe gidebilmesi için aktive eder. Aktif kaspaz 3 deoksiribonükleaz inhibitörü olan ICAD'ı etkisiz hale getirir ve deoksiribonükleaz CAD'ı serbest hale getirir. Kromatin kondensasyonu ile birlikte DNA kırıkları meydana gelir. Hasara uğramış olan DNA Poli ADP Riboz Polimeraz Proteini (PARP) ile DNA kırıklarının onarılmasını sağlar ve apoptoz süresince endonükleazların inhibisyonunu sağlar. DNA'da oluşan hasarın düzeltilmesi için ayrıca DNA Topoizomeraz II görevlidir. Apoptoz sürecinde kaspazlar tarafından inhibe edilmektedir (Şekil 2.6.3.2.1) (Dinçel ve Kul, 2016).



Şekil 2.6.3.2.1 Apoptoz yolağının ekstrinsik, intrinsik ve granzim yolağı ile düzenlenmesi (Ankıt, 2017).

2.6.3.3. Apoptoz ve hastalıkların tedavisi

Apoptoz mekanizmasının baskılanması ya da uyarılması ile birçok hastalığın tedavisi sağlanabilmektedir. Otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi hastalıkların tedavisinde apoptozdan kaçınılırken, kanser tedavisi ve patojenik enfeksiyonlarda apoptozun uyarılması klinikte oldukça yaygın kullanılmaya başlanan

yöntemlerdir (Solakoğlu, Z. , 2009). Radyasyonun yanı sıra çoğu hormonal ve sitotoksik tedaviler tamir edilemeyen hücrenel hasarlar sonucunda kanser hücrelerinde apoptozu uyarmaktadır (Sjöström, Johanna, Makela, Tomi, 2006). Günümüzde yapılan çalışmalarla apoptoz mekanizmasına duyulan merakla birlikte hastalıkların tedavisi için apoptoz umut ışığı olmuştur.



3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hücre Kültürünün Yapılması

Hücre kültürü, günümüzde, bilimsel araştırmalarda çok yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Çağımızın en büyük sorunlarından biri olan kanser araştırmalarında, ilaç denemelerinde, hücre içi ve hücreler arası sinyal yolaklarının açıklanmasında, fizyolojik süreçlerin ve fizyopatolojik olayların aydınlatılmasında, moleküler çalışmalarında, hücrelerin oluşumu, çoğalması ve ölüm olaylarının belirlenmesinde kullanılan başlıca yöntemlerden birisidir.

Hücre kültürü temelde hiperoksit bir ortam olup, hücreler genellikle %5 CO₂, %95 O₂ içeren ve 37°C sıcaklığın olduğu ortamlarda in vitro gelişme göstermektedir. Büyüme, gelişme ve farklılaşma süreçleri bu ortama uyum sağlamaktadır. Çalışmamızda iki farklı hücre hattı kullanılmıştır. Bunlar insan karaciğer kanser hücre soyu olan Hep G2 ve sıçan karaciğer kanseri hücre soyu olan H-4-IIE'dir. Hep G2, insan karaciğer dokusu kaynaklı hepatosellüler karsinomalı, epitelyal morfoloji gösteren ve adherent büyüyen hücre soyudur (Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ayşe Tansu Koparal'ın armağanıdır). H-4-IIE, sıçan (*Rattus norvegicus*) karaciğer dokusu kaynaklı, epitelyal morfoloji gösteren, adherent büyüyen, hepatomalı hücre soyudur (ATCC, American Type Culture Collection'dan satın alınmıştır).

3.2 Hücre Kültürü İçin Yapılan Hazırlıklar

Steril ve sıvı olarak satın alınan Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi. Fetal Dana Serum (Fetal Calf Serum= FCS, Sigma) ve penisilin + streptomisin (Sigma) buldukları şişelerden daha küçük steril şişelere hacimleri daha az olacak şekilde bölündü ve buzdolabında - 20°C'de muhafaza edildi. Toz halinde, ilgili firmadan temin edilen R-547 (Cayman) buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi. R-547 ilacı için talimatlara uygun şekilde, çözücü olarak dimetil sulfoksit (DMSO, Sigma) kullanıldı. Deneyler sırasında stoğumuz 25 µM olacak şekilde taze olarak ve oda sıcaklığında muhafaza edilen DMSO ile çözümlere hazırlandı ve belirlenen konsantrasyonları elde etmek için de uygun deneysel hesaplamalar yapılarak hücre hatlarına aşağıda belirtilen dozlar uygulandı.

3.3 Hücrelerin Ekimi Ve Yaşatılması

Daha sonra kullanılmak üzere sıvı nitrojen içerisinde muhafaza edilen H-4-IIE ve Hep G2 hücre hatları, nitrojen tanklarından çıkarılarak oda sıcaklığında birkaç dakika beklendi. Hücreler çözüldükten sonra DMEM, %10 FCS ve %1 penisilin + streptomisin karışımı içeren besiyeri içerisinde 1000 devir/dakikada, 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan supernatant atılarak dondurma işlemi sırasında kullanılan DMSO böylece uzaklaştırılmış oldu. Santrifüj tüpünde kalan hücre solüsyonunun 25 cm²'lik flasklara ekimi yapıldı. Ekim yapılan flasklar hücrelerin büyüme ve gelişmesi için gerekli olan 37°C, %5 CO₂ ve %100 nem koşullarını sağlayan inkübatöre yerleştirildi. İnkübatörde bulunan flasklar, kuluçka dönemi boyunca laboratuvarımızda bulunan alttan aydınlatmalı (inverted) ışık mikroskobu (Olympus) ile hücre çoğalma ve gelişmesi yönünden kontrol edildi. Hücrelerin fizyolojik ve biyokimyasal aktiviteleri göz önünde bulundurularak hücrelerin düzenli olarak beslenmesi sağlandı. Bunun için eskiyen besiyerleri steril pipet yardımı ile çekilerek yerine penisilin + streptomisin, FCS ve DMEM karışımı olan besiyeri konuldu. Hücreler büyüene dek 2-3 günde bir bu işlem tekrar edildi. Hücrelerin flask tabanını %85-90 civarında kaplamasıyla birlikte 75 cm²'lik flasklara alındı ve hücre sayısının yeterli miktara ulaşması beklendi. Hücreler gerekli sayıya ulaştığında ilaç denemeleri için deneye alındı.

3.4 Deneyde Kullanılan Gruplar

Çalışmamızda R-547 isimli CDK baskılayıcısının H-4-IIE ve insan Hep G2 hücreleri üzerine olası etkilerini değerlendirebilmek için 0,1, 1, 10, 50 ve 100 µM dozları 24 ve 48 saat süreyle deneye tabi tutuldu. Diğer yandan pozitif kontrol olarak, bilinen bir antikanser ilaç olan cisplatinin 5, 10, 25, 50, 100 µM dozları 24 ve 48 saat olmak üzere deneye tabi tutuldu. Deney sonrası hücre canlılığı 3-(4,5-Dmethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thyazoly blue (MTT) testi ile belirlendi. Sonuçlar tek tek değerlendirildiğinde daha ileri çalışmalara H-4-IIE hücre hattı ile devam edilmeye karar verildi.

R-547 ilacı ile muamele edilen H-4-IIE hücre hattı MTT testinin ardından etkisi gözlenen dozlarda akım sitometri, ardından konfokal mikroskop ve Transmission Electron Microscopy (TEM) görüntüleme teknikleri ile destekleyecek şekilde incelendi. Deney sırasında oluşturulan deney grupları aşağıda verimiştir:

3.4.1 HepG2 ve H-4-IIE hücre hatlarında R-547 ilaç grupları

Kontrol Grupları: Hücrelere 24 ve 48 saat süresince yalnızca besiyeri uygulandı (n=16).

DMSO Grupları: Çözücü olarak kullanılan DMSO 24 ve 48 saat uygulandı (n=16).

R-547 Grupları: 0,1, 1, 10, 50 ve 100 µM R-547 ile 24 ve 48 saat tedavi edildi (n= 16).

3.4.2 H-4-IIE ve Hep G2 hücre hatlarında Cisplatin grupları

Kontrol Grupları: Hücrelere 24 ve 48 saat süresince yalnızca besiyeri uygulandı (n=16).

DMSO Grupları: Çözücü olarak kullanılan DMSO 24 ve 48 saat uygulandı (n=16).

Cisplatin Grupları: 5, 10, 25, 50 ve 100 µM cisplatin 24 ve 48 saat süreyle uygulandı (n=16).

3.5. Hücre Canlılığı Ve Apoptozu Belirleme Yöntemleri

3.5.1 Tripan mavisi ile boyama yöntemi

Yapılacak in vitro çalışmalar için hedeflenen sayıda hücre elde etmek, hücre canlılığını belirlemek oldukça önemlidir. Hücre ekimi sonrasında, hücrelerin büyüme ve gelişimi düzenli bir şekilde takip edilmelidir. Ekim yapılan flask tabanını hücreler %85-90 oranında kapladığında deneye almak üzere hücrelerin canlılığı ölçülebilmektedir. Hücre canlılık oranının ölçülebildiği yöntemlerden birisi Tripan mavisi yöntemidir ve bu yöntemle 1 ml'deki canlı hücre sayısı belirlenebilmektedir. Canlı olan ve hücre zarı hasar görmemiş hücreler Tripan mavisi ile boyanmamakta, boya hücrenin içine girmemektedir. Canlı olmayan hücreler boyayı absorbe etmekte ve Tripan mavisi ile mavi renk boyanmaktadırlar.

Çalışmamız sırasında kullanmış olduğumuz H-4-IIE ve HepG2 hücreleri yeterli oranda çoğaldığında canlılıklarını ölçmek için Tripan mavisi yöntemi kullanıldı. Öncelikle flasklarda bulunan besiyeri pipetle çekilerek atıldı ve proteinleri ortamdan uzaklaştırmak için Ca^{+2} ve Mg^{+2} ihtiva etmeyen Hank's Balanced Salt Solüsyonu (HBSS, Sigma) ile flasklar hafifçe sallanarak yıkandı. Kalan hücreler tabandan uzaklaştırılmak için %0,25'lik tripsin -EDTA (Sigma) ile muamele edilerek 37°C'de 5 dakika beklendi. Ardından santrifüj tüpü içerisine tripsin miktarının yaklaşık iki katı miktarda besiyeri eklenerek tripsinin etkisi uzaklaştırıldı. 1200 devir/dakika, 4°C ve 5 dakika olmak üzere

santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Geriye kalan hücre solüsyonu pipetaj ile homojen hale getirildi ve 0,2 ml hücre solüsyonundan küçük steril bir şişe içerisine alınarak, üzerine 0,3 ml HBSS, 0,5 ml Tripan mavisi konuldu ve hafifçe dairesel hareketlerle çalkalandı. 5 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra CEDEX marka hücre sayım cihazının sayım kasetine 10 µl olacak şekilde örnek konularak hücre canlılık durumu belirlendi ve hücre sayımı yapıldı.

3.5.2 MTT yöntemi

Tripan mavisi yöntemi ile 1 ml'deki hücre sayısı belirlenen H-4-IIE ve Hep G2 hücreleri her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu deney kaplarına ekilerek 24 saat tabana tutunmaları için süre verildi. Ardından R-547 ilacı ve pozitif kontrol olarak seçilen Cisplatin yukarıda belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat olmak üzere uygulandı. Her doz için toplamda 16 kuyucuk olacak şekilde 3 adet 96 kuyucuklu deney kabı kullanıldı. 24 ve 48 saatlik ilaç uygulama süresinin sonunda 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) yöntemi ile hücrelerin yaşam oranları belirlendi (Mossmann, 1983).

MTT yöntemi ile uygulanan ilaçların hücre üzerindeki sitotoksik etkisini gösterebilmek mümkündür. Ölü ya da ölmek üzere olan hücrelerde mitokondri enzimleri aktif olmadığından canlılığın devamı, hücresel aktivite, büyüme ve gelişme için kullanılması gereken enerji sağlanamamaktadır. Bundan dolayı bu yöntemde mitokondri enzim substratı olan tetrazolium tuzları hücrelere verilerek renge dayalı olarak spektrofotometrik analiz yapılmaktadır. MTT solüsyonlarında bulunan tetrazolium halkası canlı hücre mitokondrielerindeki dehidrogenaz enzimleri ile parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşmaktadır. Kısacası sağlam hücre mitokondrisi sarı-soluk renkli MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayarak koyu mavi-mor renkli formazana indirgemektedir. Sonuçta canlı ve mitokondri enzimleri aktif hücreler mor renkte boyanırken, ölü hücreler boyanmamaktadır (Freshney, RI, 2000).

Çalışmamızda MTT (Sigma) boyası, şeffaf Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Sigma) ile çözülerek 0,22 µm steril mikrofiltreden geçirildi. Her bir kuyucuk için 25 µl MTT çözeltisi eklenerek 37°C'de 3-4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar boşaltılarak her bir kuyucuğa 8 kanallı pipet yardımı ile 100'er mikrolitre DMSO konuldu. 5 dakika karanlık ortamda hafifçe sallanarak beklendi ve 550 nm dalga boyunda oluşan formazan boya Bio Tek marka spektrofotometrede okundu. Kuyucuklarda okunan optik yoğunluk kontrol hücrelerine göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Formül:

Her bir kuyucuktaki ilaç verilen hücre absorbanısı x 100
Kontrol hücrelerinin ortalama absorbanısı

3.5.3 Apoptoz ölçümü- akım sitometri yöntemi

Hücre zarının sitoplazma tarafında bulunan lipidlerden biri olan fosfotidil serin, hücre uyarısı sonucu, apoptozun erken döneminde hücre zarının dış yüzeyine sıçramaktadır. Anneksin V, sıçrama sonucu dış yüzeye yerleşen fosfotidil serine bağlanan bir proteindir. Bu protein FITC adı verilen floresan bir boya ile işaretlenerek apoptoza giren hücreler görünür hale getirilmektedir. Anneksin V, nekrotik hücrelere de bağlanabildiğinden ayrıca ikinci boya olarak propidyum iyodür (PI) kullanılmaktadır. Buna göre canlı hücrelerde PI ve FITC boyanması gözlenmemektedir [FITC (-)/PI (-)]. Erken apoptotik hücrelerde [FITC (+)/PI (-)] olurken nekrotik ya da geç apoptotik hücrelerde [FITC (+)/PI (+)] olarak gözlemlenmektedir.

Tripan mavisi yöntemi ile ml'deki hücre sayısı belirlenen H-4-IIIE hücreleri apoptoz ölçümü deneyleri için hücre sayıları 1×10^6 olacak şekilde 25 cm²'lik flaslara ekim yapılarak 24 saat inkübe edildi. Kontrol, DMSO, 10 ve 50 µM R-547 olacak şekilde 24 ve 48 saat ilaç ya da kontrol grubu için sadece besiyeri uygulaması yapıldı. Çalışmamızda apoptotik etkiyi ortaya koymak için Anneksin V apoptoz ölçüm kiti (İnvitrogen) kullanıldı. Apoptoz ölçüm işlemlerinde ticari olarak satılan kitin önerdiği yöntem kullanıldı. Kısaca, bekleme süresinin ardından flaslardaki hücrelerin kullanıldığı besiyerleri uygun etiketlenmiş olan 15 ml tüplere aktarıldı. Flask tabanında kalan hücreler %0,25'lik Tripsin-EDTA ile 5 dakika muamele edildi ve hücrelerin tabandan ayrılması sağlandı. Tabandan ayrılan hücreler de isimlendirilmiş tüplere ilave edildi ve 4°C, 5 dakika, 1200 devir/dakikada ve santrifüj edildi. Tüplerin dibinde 2 ml kalacak şekilde supernatantlar pipet yardımı ile çekilerek atıldı. 1 ml'deki hücre sayısı Tripan mavisi yöntemi uygulanarak belirlendi. 2 defa soğuk fosfat tuz solüsyonu (Phosphate buffered saline, PBS, Sigma) ile yıkanan hücreler her yıkamanın ardından 1200 devir/dakika, 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldıktan sonra dipte kalan hücre solüsyonu bağlama solüsyonu (binding buffer) ile kit talimatlarına uygun olarak sayıca 1×10^6 olacak şekilde ayarlandı. 2 ml'lik viallere 5 µl FITC-Anneksin V ve 10 µl PI konuldu. 100 µl hücre solüsyonları da vial cidarlarından dikkatli bir şekilde eklendi. İyice ve hassas şekilde karışması sağlanarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından viallere 400 µl Anneksin V bağlama solüsyonu konuldu. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarına Eskişehir Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Laboratuvarında ACURY BD markalı akım sitometri cihazı ile devam edilerek sonuçlara ulaşıldı.

3.6 Hücrelerdeki Morfolojik Değişimleri İnceleme Yöntemleri

Çalışmamızın bu aşamasında 10 ve 50 μM dozlarında R-547 ile muamele edilen H-4-IIE hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişikliklerin gözlenmesi amacı ile konfokal mikroskopi ve geçirimli elektron mikroskopi (TEM, Transmission Elektron Microscopy) yöntemlerinden yararlanıldı.

3.6.1 konfokal mikroskopi ile hücredeki morfolojik değişimlerin incelenmesi

Konfokal mikroskop yüksek ışık çözünürlüğü ile hücre yapısının net bir şekilde görüntülenmesine olanak tanımaktadır. DNA'ya bağlanabilen, hücrenin kromatini ve çekirdeğini, hücre iskeletini görünür hale getiren acridine orange gibi çeşitli floresan boyalar kullanılmaktadır. Böylece morfolojik değişimler kolayca gözlenebilmektedir.

Konfokal mikroskopi için görüntülemeye kullanılacak olan 6 kuyucuklu plakaya kontrol, 10 ve 50 μM şeklinde etiket yapılarak her bir kuyucuğa steril lameller yerleştirildi. Tripan mavisi yöntemi ile ml'deki hücre sayısı belirlenen H-4-IIE hücreleri, steril lameller üzerine her bir kuyucuğa 150.000 hücre olacak şekilde uygun hesaplar yapılarak 5 ml içinde ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Kontrol ve ilaç dozları için 2'şer kuyucuk kullanıldı. Kontrol grubunda sadece besiyeri kullanılırken, 10 ve 50 μM R-547 grubunda hesaplandığı şekilde ilaçlar eklendikten sonra 24 saatlik inkübasyon süresi için inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon süresi dolan H-4-IIE hücrelerinden kullanılan besiyeri pipet yardımı ile uzaklaştırılarak soğuk fosfat tuz solüsyonu (Phosphate buffered saline, PBS, Sigma) ile yıkandı ve ardından gluteraldehid ile fikse edildi. Fiksasyon sonrası hücreler tekrar soğuk PBS ile yıkanarak acridine orange ve falloidin boya ile ikili şekilde boyandı. Bu işlemlerin ardından Eskişehir Anadolu Üniversitesi bünyesindeki Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM)'da bulunan Leica SP5 markalı konfokal mikroskop ile hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.6.2 Transmission electron microscopy (tem) ile hücrelerdeki morfolojik değişimlerin incelenmesi

Geçirimli elektron mikroskobu, yüksek ayırma gücü ile hücrelerin ince yapılarının görüntülerinin oluşturulmasına ve incelenmesine olanak sağlayan mikroskop çeşididir. Çok ince kesitler halinde, içinden yüksek enerjili elektron geçirilerek görüntü sağlama prensibine dayanmaktadır. Çeşitli aşamalardan geçirilen örnekler floresan ekranda incelenerek fotoğrafları çekilmektedir.

Çalışmamızda R-547 ilacının H-4-IIE hücrelerine uygulanması sonucu hücrelerde meydana gelen morfolojik değişikliklerin yüksek ayırım gücü ile TEM'de görüntülenmesi sağlandı. Bu amaçla ilk olarak 25 cm²'lik flasklara 1x10⁶ sayıda hücre ekimi yapıldı. H-4-IIE hücreleri %90 civarında flask tabanını kaplaması için inkübatöre kaldırılarak takibe alındı. İnkübasyon sonrası flaskta hücreler tarafından kullanılmış olan besiyeri pipet yardımı ile çekilerek atıldı. Kontrol grubu yalnızca 5 ml besiyeri ile, 10 ve 50 µM R-547 grupları ise hesaplanan dozda ilaç içeren 5 ml besiyeri ile beslendi ve 24 saatlik inkübasyon için flasklar inkübatöre kaldırıldı.

İnkübasyon süresi dolduktan sonra fosfat tamponu ve komşu proteinleri birbirine kovalent bağlayan gluteraldehid karıştırılarak elde edilen sıvıda hücreler 4-24 saat arasında +4°C'de fikse edildi. Fikse olmuş hücrelerden fiksatif uzaklaştırmak için 3x15 dakika boyunca tampon çözeltisi ile yıkandı. Birim zar lipid tabakaları ve proteinlerini birbirine bağlamak için osmium tetraoksit içerisinde ikinci tespit işlemi yapıldı. Hücreler tekrar tamponla yıkanmadan önce %50, %70, %90, %96 absöü etil alkolden oluşan alkol serisinden geçirilerek dehidratasyon sağlandı. Ardından hücreler propilen oksitte saflaştırıldı. Son aşama olarak, taze hazırlanmış ve gömme ortamı oluşturan resin ile hücreler bloklanarak polimerizasyon için 48 saat beklendi. Bloklar hazır hale geldiğinde kesitler alınarak kontrastlama ve boyama işlemleri için uranil asetat ve kurşun asetat gibi ağır metal tuzları içeren çözeltiyle boyandı. Boyamanın ardından kesitler grid adı verilen gözenekli ya da film kaplı iletken bakır levhaların üzerine alındı. En son aşama olarak da Eskişehir Anadolu Üniversitesi bünyesindeki Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM)'da bulunan FEI Bio Tween markalı geçirimli elektron mikroskobu ile hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.7 İstatistiksel Değerlendirme

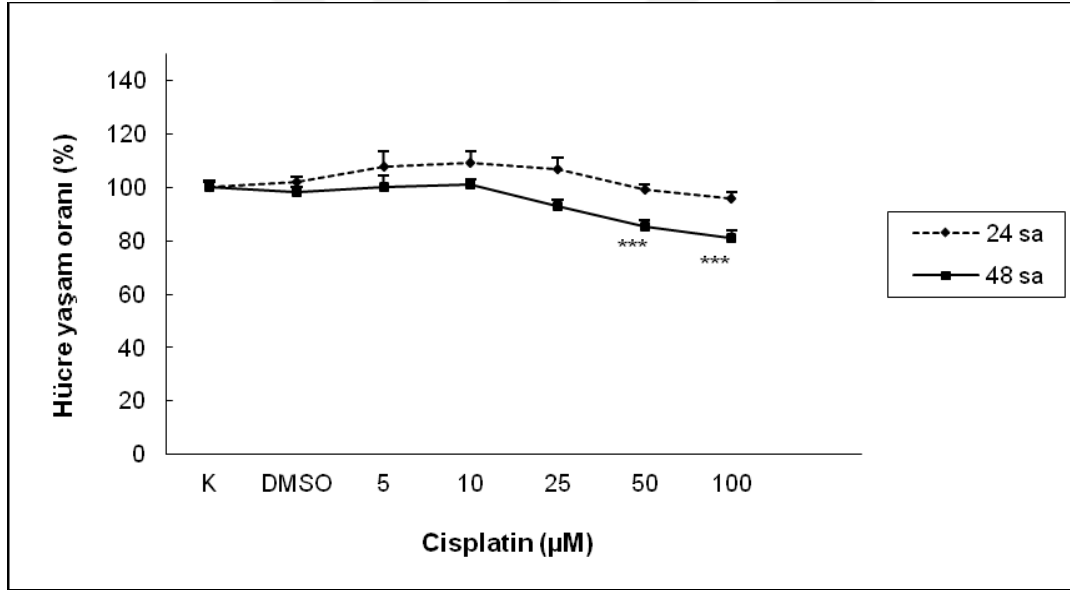
Deneyler sonucunda MTT testi sonuçları SPSS (Statistical Package for the Social Sciences 15.0 version) paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey'in çoklu karşılaştırması ile incelenerek grafikleri çizildi. p değeri 0,05'ten küçük olan veriler anlamlı olarak kabul edildi. Elde edilen tüm sonuçlar bağımsız üç ayrı deneyin ortalamasıdır.

4. BULGULAR

4.1 MTT Yöntemi Bulguları

4.1.1 Cisplatin'in Hep G2 hücrelerine 24 saat ve 48 saat süre ile uygulanması

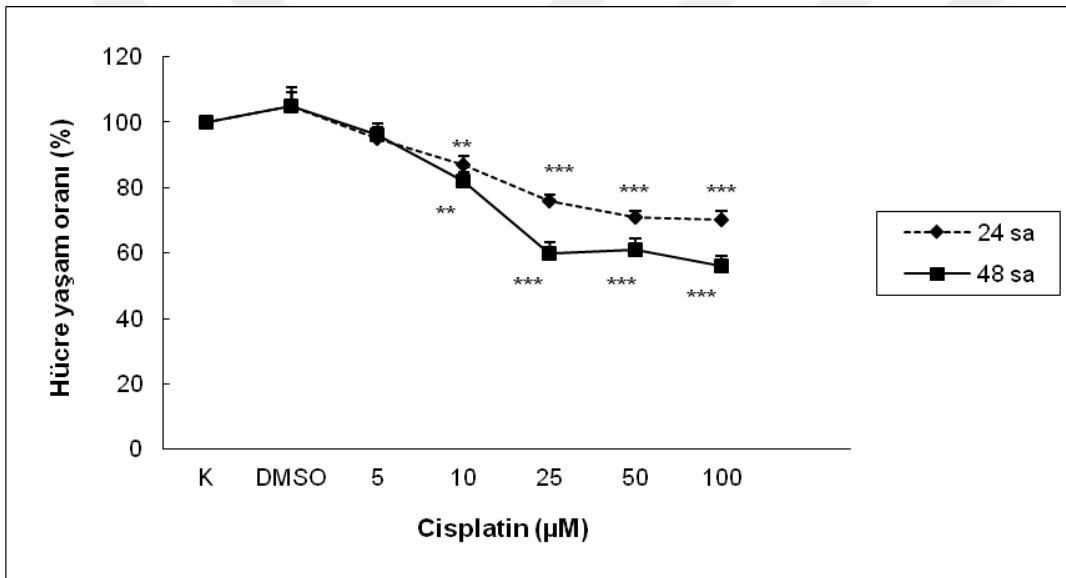
Cisplatinin 100 μM 'lık en yüksek dozunda çözücü olarak kullanılan DMSO, hücre yaşam oranını herhangi bir değişime uğratmadı. Hep G2 hücrelerine 24 saat boyunca 5, 10, 25, 50, 100 μM 'lık dozlarda cisplatin muamelesi sonucunda elde edilen yaşayan hücre oranları sırasıyla %108, %109, %107, %99, %96 olarak hesaplandı. 48 saat boyunca aynı dozlarla muamele edilen Hep G2 hücrelerinin yaşam oranları ise %100, %101, %93, %85,5, %81 olarak hesaplandı (Şekil 4.1.1.1). Elde edilen veriler ışığında, kullanılan Cisplatin'in Hep G2 hücrelerinin yaşam oranlarında gözle görülür bir değişime neden olmadığı gözlemlendi. Bu nedenle çalışmanın bir sonraki aşaması olan apoptoz analizi araştırmasında kullanılmamasına karar verildi.



Şekil 4.1.1.1. Cisplatin ilacının 5, 10, 25, 50, 100 μM 'lık dozlarının 24 saat ve 48 saat boyunca muamele edilmesinin Hep G2 hücre canlılığına olan etkisi. Kontrole göre sonuçlar anlamlıdır (***) : $p < 0,001$).

4.1.2 Cisplatin' in H-4-IIE hücrelerine 24 saat ve 48 saat süre ile uygulanması

Cisplatin'in 100 µM'lık en yüksek dozunda çözücü olarak kullanılan DMSO, hücre yaşam oranını herhangi bir değişime uğratmadı. H-4-IIE hücrelerine 24 saat boyunca 5, 10, 25, 50, 100 µM'lık dozlarda cisplatin muamelesi sonucunda elde edilen yaşayan hücre oranları sırasıyla %95, %87, %76, %71, %70 olarak hesaplandı. Aynı dozlarda 48 saat boyunca Cisplatin muamelesi sonucunda ise H-4-IIE hücrelerinin yaşam oranları sırası ile %96, %82, %60, %61, %56 olarak hesaplandı, ancak bu hücre soyunun da çalışmamızın bir sonraki aşaması olan apoptoz analizi araştırmaları için kullanılmamasına karar verildi (Şekil 4.1.2.1).

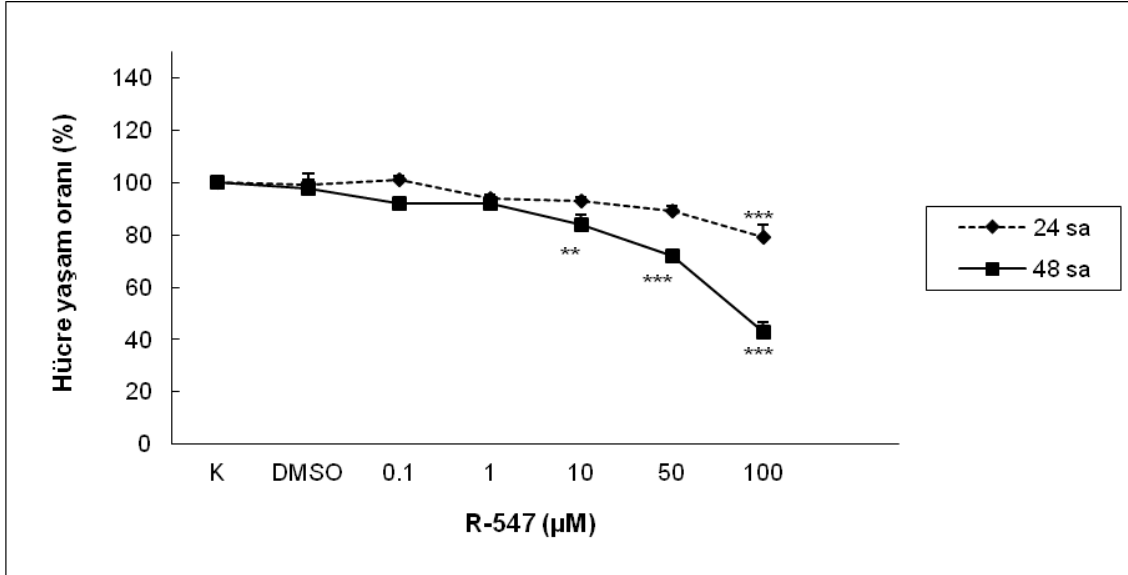


Şekil 4.1.2.1 Cisplatin ilacının 5, 10, 25, 50, 100 µM'lık dozlarının 24 saat ve 48 saat boyunca muamele edilmesinin H-4-IIE hücre canlılığı üzerine etkisi. Sonuçlar kontrole göre anlamlıdır (**: p < 0,01 ve *** : p < 0,001).

4.1.3 R-547 ilacının Hep G2 hücrelerine 24 saat ve 48 saat süre ile uygulanması

R-547 ilacının 100 µM'lık en yüksek dozunda çözücü olarak kullanılan DMSO, hücre yaşam oranında herhangi bir değişime neden olmadı. R-547 ilacı Hep G2 hücrelerine 24 saat süreyle 0,1, 1, 10, 50, 100 µM dozlarında uygulandığında, yaşayan hücre oranlarının sırası ile %101, %94, %93, %89, %79 olduğu sonucu ortaya çıktı. Aynı dozlar ile 48 saat boyunca muamele

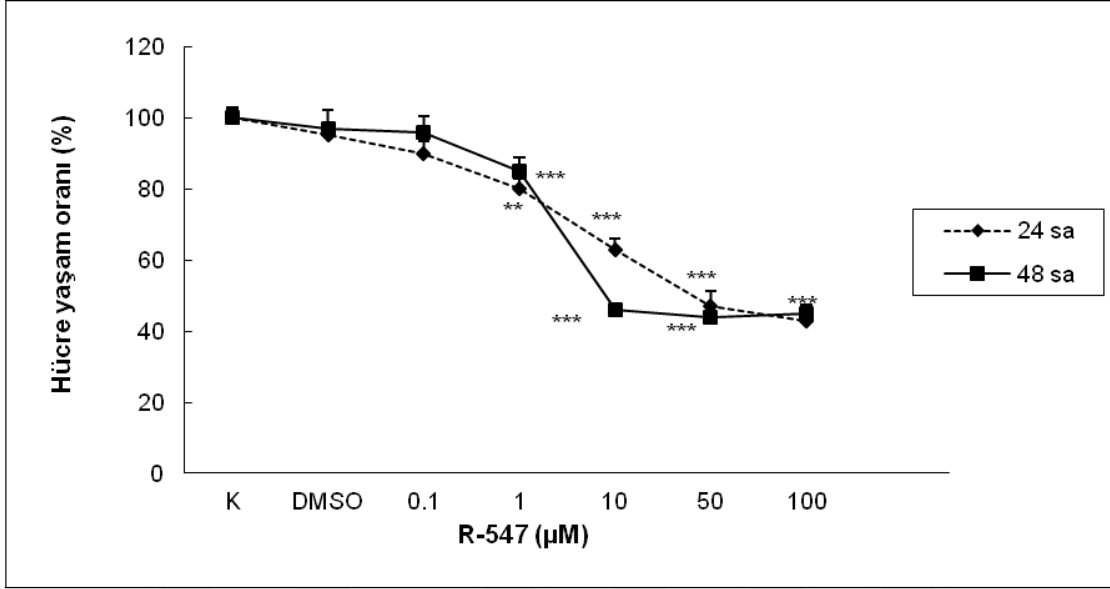
edilen Hep G2 hücrelerinin yaşam oranları sonucu ise sırası ile %92, %101, %53,6, %47,4 , %41 olarak bulundu (Şekil 4.1.3.1). Elde edilen sonuçlar açısından çalışmanın bir sonraki aşaması olan apoptoz analizi araştırmalarında kullanılmamasına karar verildi.



Şekil 4.1.3.1 R-547 ilacının 0,1, 1, 10, 50, 100 µM'lık dozlarının 24 saat ve 48 saat boyunca muamelesinin Hep G2 hücre canlılığı üzerine etkisi. Sonuçlar kontrole göre anlamlıdır (**: p < 0,01 ve *** : p < 0,001).

4.1.4 R-547 ilacının H-4-IIE hücrelerine 24 saat ve 48 saat süre ile uygulanması

R-547 ilacının 100 µM'lık en yüksek dozunda çözücü olarak kullanılan DMSO, hücrelerin yaşam oranını herhangi bir değişime uğratmadı. H-4-IIE hücreleri R-547 ilacı ile 24 saat boyunca 0,1, 1, 10, 50, 100 µM'lık dozlar ile muamele edilmesinin sonucunda hücrelerin yaşam oranı yüzdeleri sırası ile %90, %80, %63, %47, %43 oldu. Aynı dozlarla 48 saat boyunca R-547 ilacı ile muamele edilen H-4-IIE hücrelerinin yaşam oranları ise sırasıyla %96, %85, %46, %44, %45 oldu (Şekil 4.1.4.1). Elde edilen sonuçlara göre 24 saat ve 48 saatlik çalışmalarda gözlemlenen hücre canlılık oranları apoptoz araştırmaları için yol gösterici oldu. Deneylerimizin bundan sonraki aşamalarında R-547 ilacı ile muamele edilmiş H-4-IIE hücrelerinde hücre yaşam oranını %50 civarına ulaştırmış olan 10 ve 50 µM dozları ile 24 saatlik çalışmalar üzerinden devam edilmesine karar verildi.



Şekil 4.1.4.1 R-547 ilacının 0,1, 1, 10, 50, 100 µM'lık dozlarının 24 saat ve 48 saat muamelesinin H-4-IIE hücre canlılığı üzerine etkisi. Sonuçlar kontrole göre anlamlıdır (**: $p < 0,01$ ve ***: $p < 0,001$).

MTT analizleri sonucu elde edilen hücre canlılık yüzdeleri genel bir gözlem yapabilmek amacı ile tablo şeklinde verildi (Tablo 4.1.1 ve Tablo 4.1.2).

Tablo 4.1.1 Cisplatin ile muamele edilmiş H-4-IIE ve Hep G2 hücre soylarında canlılık yüzdeleri.* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001'e göre anlamlı olan konsantrasyonlar, SS: Standart Sapma

	Hep G2 Hücre Canlılık		H-4-IIE Hücre Canlılık	
	24 Saat	48 Saat	24 Saat	48 Saat
Kons. (µM)	Ortalama (%)±S.S	Ortalama (%)±S.S	Ortalama (%)±S.S	Ortalama (%)±S.S
Kontrol	100 ± 2,4	100 ± 2,22	100 ± 9,62	100 ± 14,84
DMSO	102 ± 2,04	98,3 ± 2	105 ± 16,35	105 ± 23,43
5	108 ± 5,6	100 ± 4,3	95 ± 31,19	96 ± 20,22
10	109 ± 4,36	101 ± 2,18	87 ± 5,95 ***	82 ± 5,85**
25	107 ± 4,07	93 ± 2,38	76 ± 19,13 ***	60 ± 6,29 ***
50	99 ± 2,16	85,5 ± 2,47 ***	71 ± 12,08**	61 ± 6,54***
100	96 ± 2,25	81 ± 2,97 ***	70 ± 8,47 ***	56 ± 5,86 ***

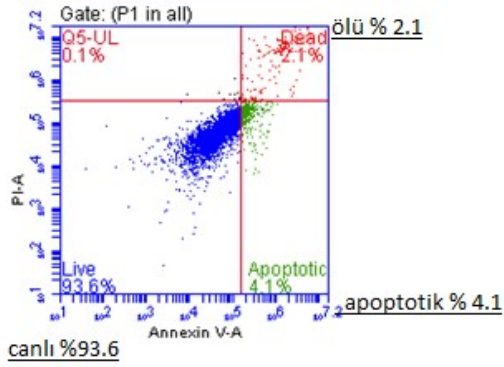
Tablo 4.1.2 R-547 ile muamele edilmiş H-4-IIE ve Hep G2 hücre soylarında canlılık yüzdeleri. ** p<0,01, *** p<0,001'e göre anlamlı olan konsantrasyonlar, SS: Standart Sapma.

	H-4-IIE Hücre Canlılık		Hep G2 Hücre Canlılık	
	24 Saat	48 Saat	24 Saat	48 Saat
Kons. (µM)	Ortalama (%)±SS	Ortalama (%)±SS	Ortalama (%)±SS	Ortalama (%)±SS
Kontrol	100 ± 2,37	100 ± 2,8	100 ± 0,9	100 ± 4,6
DMSO	95 ± 1,1	97 ± 5	99 ± 4,3	88,9 ± 3,2
0,1	90 ± 3,41	96 ± 4,28	101 ± 1,5	92 ± 4,3
1	80 ± 2,7 **	85 ± 4 **	94 ± 1,3	101 ± 1,5
10	63 ± 2,9 ***	46 ± 1,9 ***	93 ± 1,4	53,6 ± 2,4 **
50	47 ± 4,1 ***	44 ± 2,8 ***	89 ± 2,3	47,4 ± 3 ***
100	43 ± 4,4 ***	45 ± 1**	79 ± 5 ***	41 ± 1,3 ***

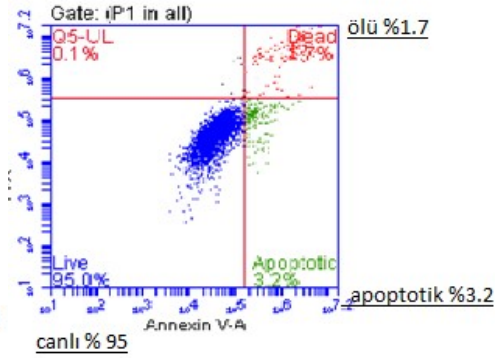
4.2 R-547 İlacının H-4-IIE Hücrelerinde Apoptotik Etkisi Ve Akım Sitometrik Değerlendirilmesi

H-4-IIE hücre soyu 24 saat boyunca R-547 ile muamele için kontrol, çözücü olarak kullanılan DMSO, 10 µM, 50 µM olarak gruplara ayrılarak uygulandı. R-547 ilacı ile 24 saat boyunca muamele edilen H-4-IIE rat hepatosellüler karsinomalı hücre soyunda, ilacın akım sitometri analizleri ile apoptotik etkileri gözlemlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmelerin ardından akım sitometri analizleri ile R-547 ilacının H-4-IIE hücreleri ile 24 saat boyunca muamelesi sonucu elde edilen hücre yüzdeleri Şekil 4.2.1.(a-d)'de verilmektedir:

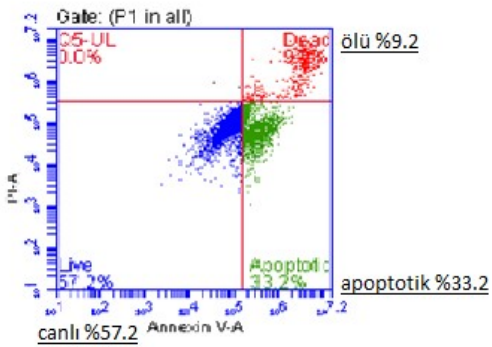
a) Kontrol



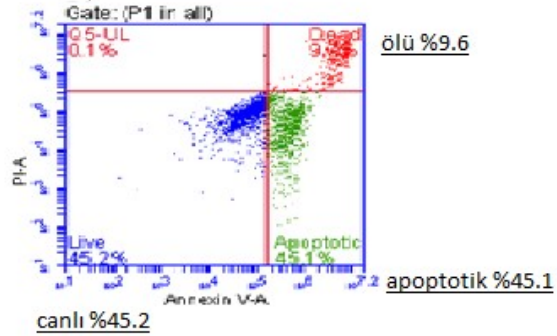
b) DMSO



c) 10 μ M



d) 50 μ M



Şekil 4.2.1.(a-d). H-4-IIE hücre soyunda kontrol, DMSO, 10 μ M, 50 μ M R-547 muamelesi sonucunda 24 saatte oluşan hücre yüzdeleri.

Akım sitometri analizlerinin sonuçları ışığında R-547 ilacının H-4-IIE hücre soyu üzerindeki canlılık, apoptotik ve ölüm değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için SPSS 16.0 paket programı kullanılarak Normalite Testi ve Non parametrik Kruskal Wallis testi yapıldı.

Tablo 4.2.1 Normalite testi sonuçları

GRUP		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CANLI	1	,253	3	.	,964	3	,637
	2	,253	3	.	,964	3	,637
	3	,365	3	.	,797	3	,107
	4	,175	3	.	1,000	3	1,000
APOP.	2	,385	3	.	,750	3	,000
	3	,292	3	.	,923	3	,463
	4	,175	3	.	1,000	3	1,000
OLU	1	,175	3	.	1,000	3	1,000
	2	,385	3	.	,750	3	,000
	3	,385	3	.	,750	3	,000
	4	,253	3	.	,964	3	,637

a. Lilliefors Significance Correction

b. APOP. is constant when GRUP = 1. It has been omitted.

R-547 maddesinin akım sitometri sonuçları incelendiğinde canlılık değerleri açısından normal dağıldığı ancak apoptotik ve ölüm değerlerinin normal dağılmadığı belirlendi. Bu amaçla Shapiro Wilk testi sonucunda gruplar normal dağılım sağlamadıkları için ve grup sayısı 3'ten fazla olduğu (kontrol, DMSO, 10 μ M ve 50 μ M) için parametrik olmayan Kruskal Wallis testi yapılmasına karar verildi.

Tablo 4.2.2 Parametrik olmayan Kruskal Wallis Test Sonuçları.

Test İstatistikleri ^{a,b}			
	CANLI	APOPTOTİK	ÖLÜ
Chi-Square	8,831	10,018	9,599
df	3	3	3
Asymp. Sig.	,032	,018	,022
a. Kruskal Wallis Test			

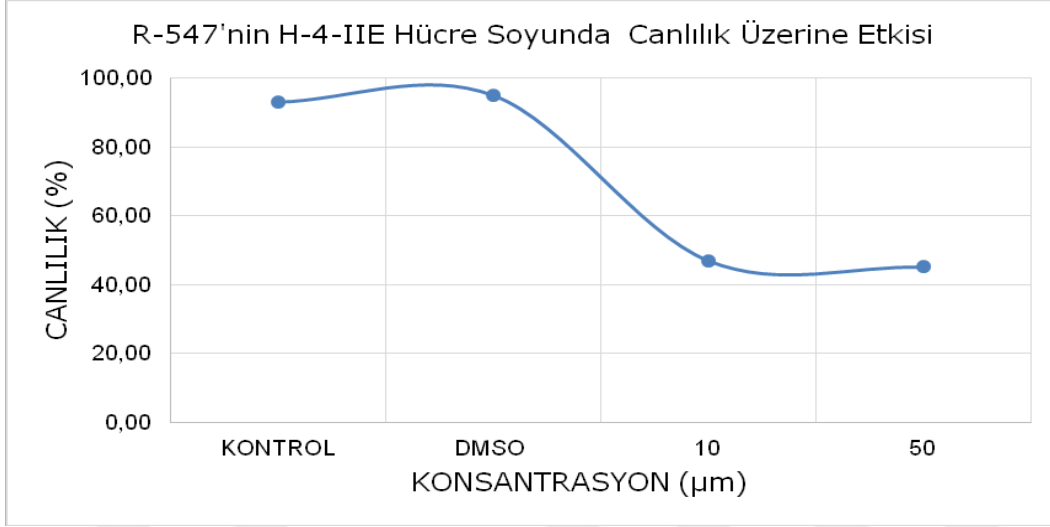
R-547 ilacının akım sitometri verilerimizin Kruskal Wallis istatistik analizi sonuçları tablo 4.2.1 ve 4.2.2' de verilmektedir. Buna göre, R-547 ilacı H4IIE hücre soyu üzerinde, test edilen gruplar arasında, canlılık değerleri açısından anlamlı farklılık meydana getirmiştir (Ki-kare: 8,831, P=0,032). Benzer şekilde, R-547 ilacı H4IIE hücrelerinde apoptotik değerleri açısından analiz edildiğinde test edilen gruplar arasında anlamlı farklılığa neden olmuştur (Ki-kare: 10,018, P=0,018). R-547 ilacı H4IIE hücre hattında ölüm değerleri açısından analiz edildiğinde test edilen gruplar arasında anlamlı farklılık oluşturmuştur (Ki-kare: 9,599, P=0,022).

Tablo 4.2.3 R-547 ilacının H-4-IIE hücre soyunda canlılık, apoptoz ve ölüm üzerine etkisi.

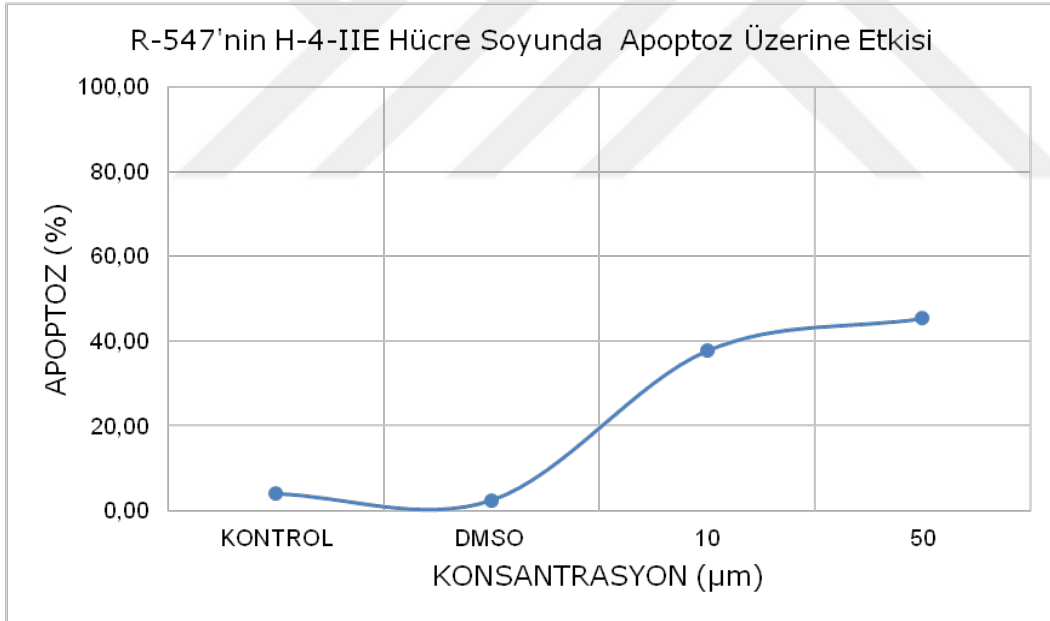
GRUP	CANLILIK (%)	APOPTOTİK (%)	ÖLÜ (%)
	ORTALAMA ± SS	ORTALAMA ± SS	ORTALAMA ± SS
KONTROL	92,93±1,51*	4,07±0,06*	3,20±1,21*
DMSO	94,83±1,46*	2,57±0,93*	2,13±0,51*
10	47,03±8,82*	37,80±4,11*	14,87±4,91*
50	45,20±4,20*	45,40±5,86*	9,27±1,72*

*: İstatistiksel olarak anlamlıdır; SS: Standart sapma

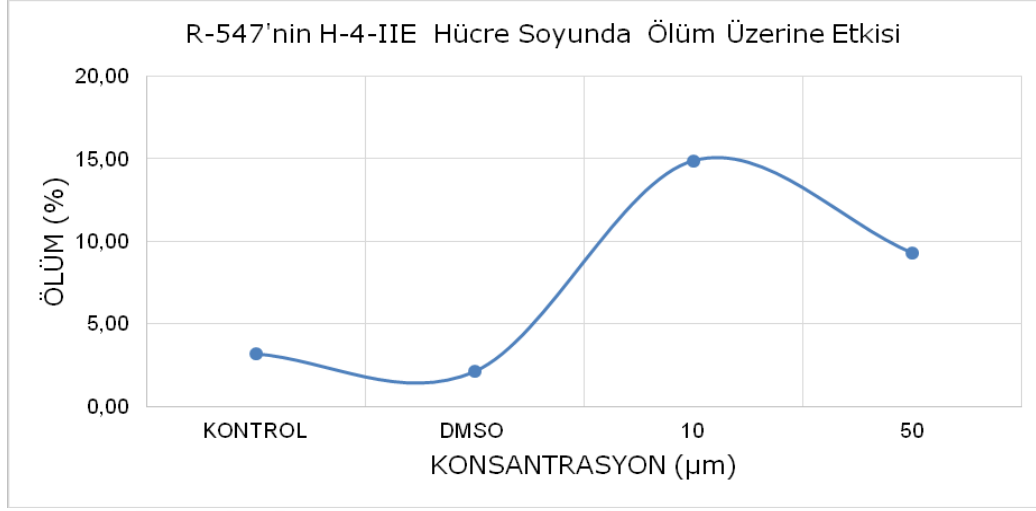
H-4-IIE hücrelerinin 24 saat boyunca R-547 ilacı ile muamelesi sonucunda elde edilen apoptotik hücre yüzdeleri her bir grup için ele alınarak kontrole göre değerlendirilirken bu yüzdeler sırasıyla kontrol grubu için %4,07, DMSO grubu için %2,57, 10 µM'lık ilaç dozu grubu için %37,8, 50 µM'lık ilaç dozu grubu için %45,40 oldu (Tablo 4.2.3). Elde edilen veriler ışığında ilgili grafiklerle sonuçlar ortaya konuldu (Şekil 4.2.5, Şekil 4.2.6, Şekil 4.2.7) .



Şekil 4.2.2 R-547 ilacının H-4-IIE hücrelerinde canlılık üzerine etkisi.



Şekil 4.2.3 R-547 ilacının H-4-IIE hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi.



Şekil 4.2.4 R-547 ilacının H-4-IIE hücrelerinde ölüm üzerine etkisi.

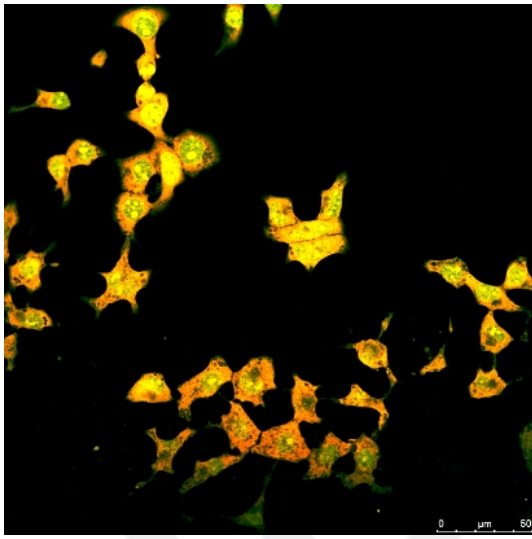
4.3 R-547 İlacı Uygulanan H-4-IIE Hücrelerinde Meydana Gelen Morfolojik Değişimlerin İncelenmesi

4.3.1 konfokal mikroskopi ile R-547 ilacının H-4-IIE hücrelerinde meydana getirdiği morfolojik değişikliklerin incelenmesi

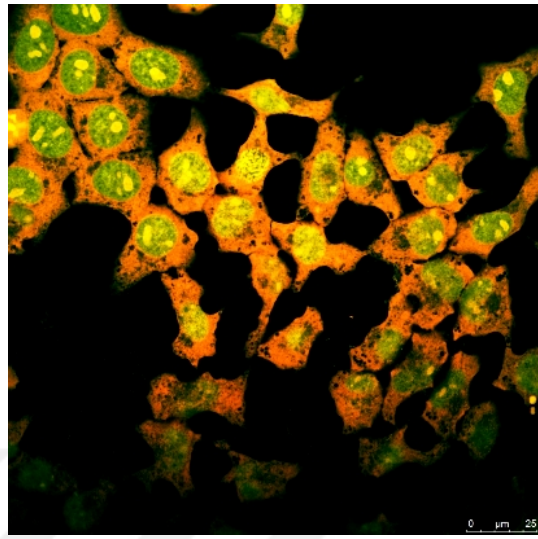
Çalışmamızda, R-547 isimli siklin bağımlı kinaz inhibitörünün H-4-IIE hücrelerinde meydana getirebileceği morfolojik değişiklikleri incelemek amacı ile yüksek ışık çözünürlüğüne sahip olan konfokal mikroskop kullanıldı. R-547 ilacı ile muamele edilen H-4-IIE hücreleri 24 saatlik inkübasyon sonrası kontrol, 10 µM, 50 µM ilaç dozları olmak üzere 3 gruba ayrılarak mikroskopta incelendi, fotoğrafları çekildi ve yorumları yapıldı.

4.3.1.1 kontrol grubu fotoğrafları ve sonuçların yorumlanması

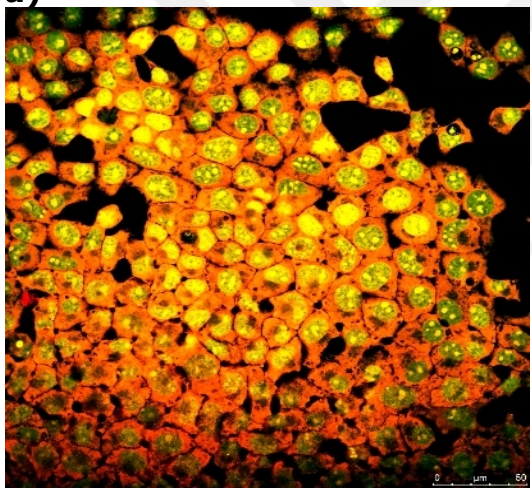
Kontrol grubu kuyucuklarına 24 saat inkübasyona bırakılmak üzere H-4-IIE hücreleri ve besiyeri konuldu. İnkübasyonun ardından fotoğrafları alınarak yorumları yapıldı. Sonuçlara göre yalnızca besiyeri uygulanan kontrol grubu hücrelerinde yapılan konfokal mikroskopi analizleri sonucunda genel bir ifade ile anlatılacak olursak, normal hücre membranı, normal hücre çekirdeği yapısı, normal hücre iskeleti yapısı gözlemlendi. Hücrelerin normal durumlarındaki poligonal yapılarını koruduğu görüldü. Şekil 4.3.1.1. a, b, c, d, e, f, g, h şeklinde verildi ve oklar ile gösterildi.



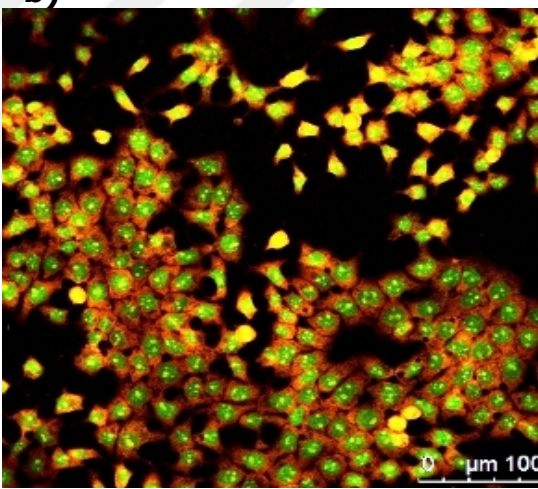
a)



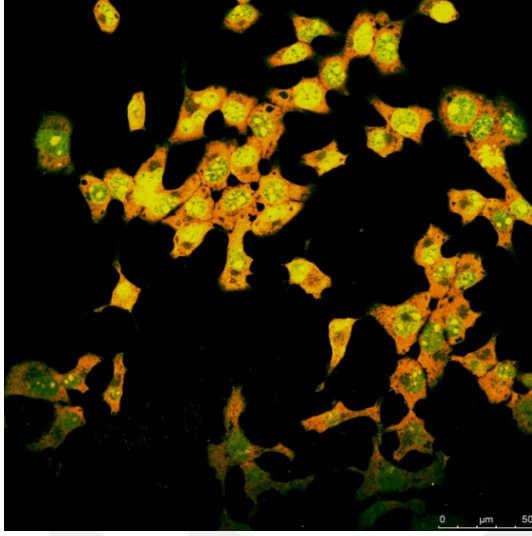
b)



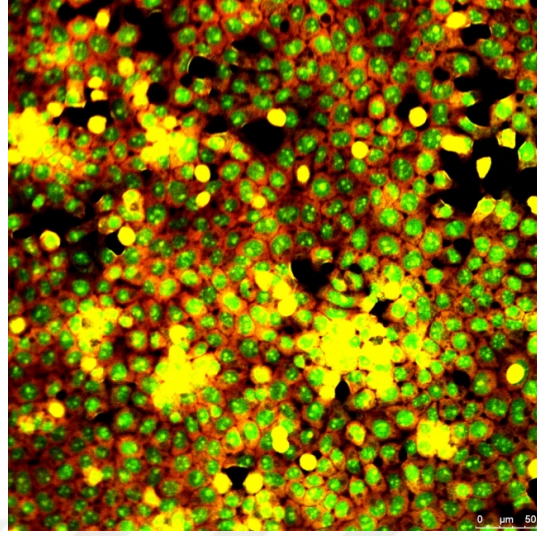
c)



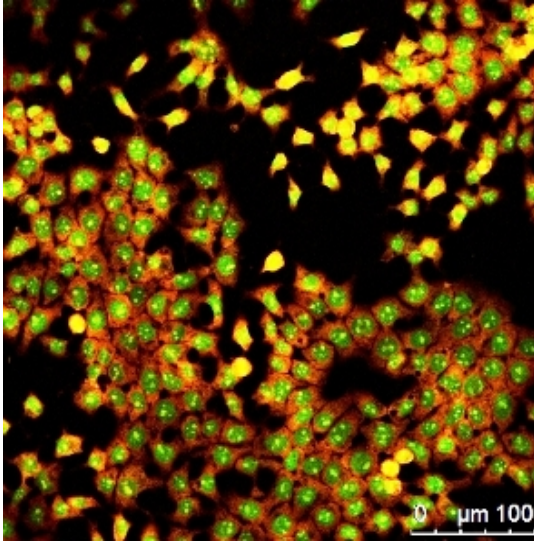
d)



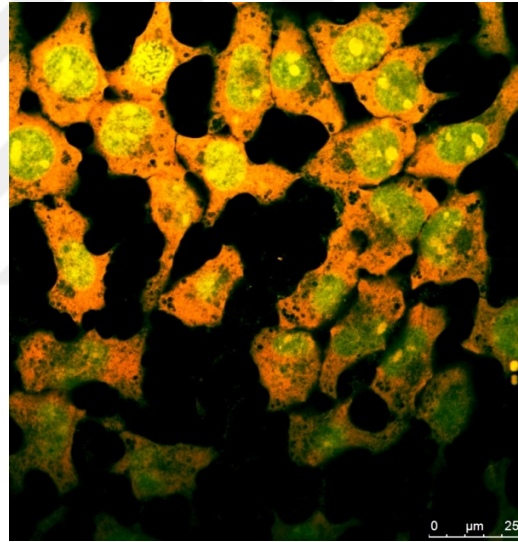
e)



f)



g)

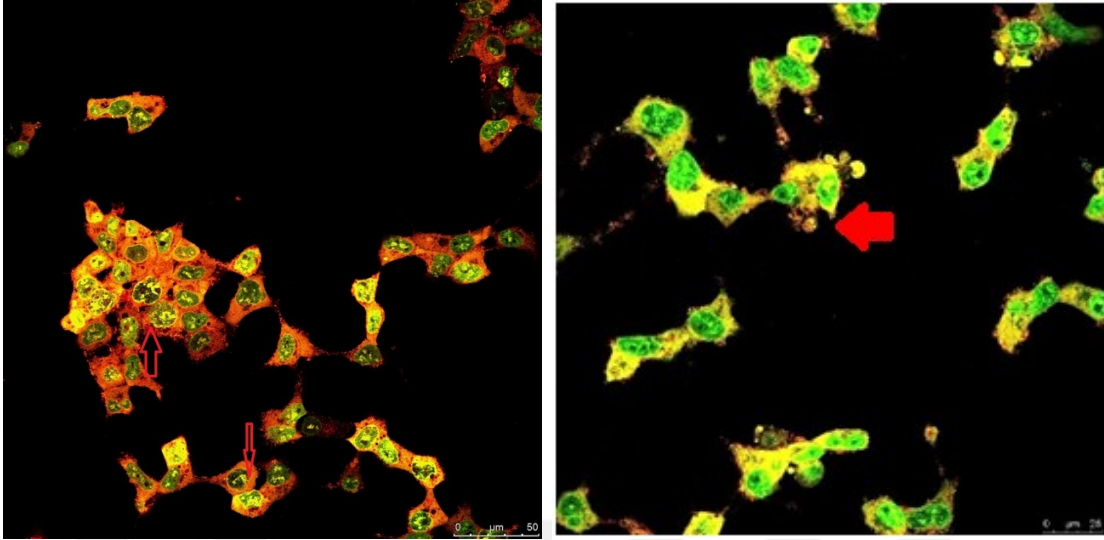


h)

Şekil 4.3.1.1 a, b, c, d, e, f, g, h: 24 saat inkübasyonun ardından kontrol grubu hücrelerinin konfokal mikroskopi görüntüleri.

4.3.1.2 10 µM ilaç dozu grubu fotoğrafları ve sonuçların yorumlanması

10 µM R-547 ilaç grubunda 24 saatlik inkübasyonun ardından ilacın hücrelere verebileceği olası morfolojik etkileri değerlendirmek amacı ile hücreler konfokal mikroskop ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

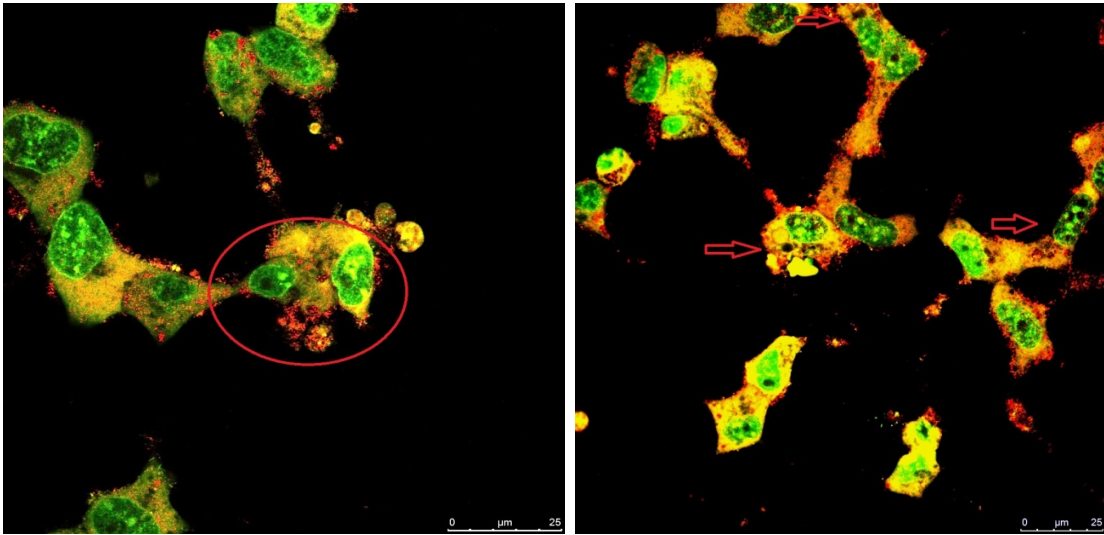


a)

b)

Şekil 4.3.1.2 a ve b: 10 μ M R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.1.2 a'da hücre çekirdeğinin deformasyona uğrayarak parçalandığı, kromozomların yapısının bozularak merdiven şeklini aldığı gözlemlendi. Şekil b'de ise hücre membranında deformasyon sonucu apoptoza gittiğinin göstergesi oldu, membranda blebbing ve dışa doğru tomurcuklanma gözlemlendi ve oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.

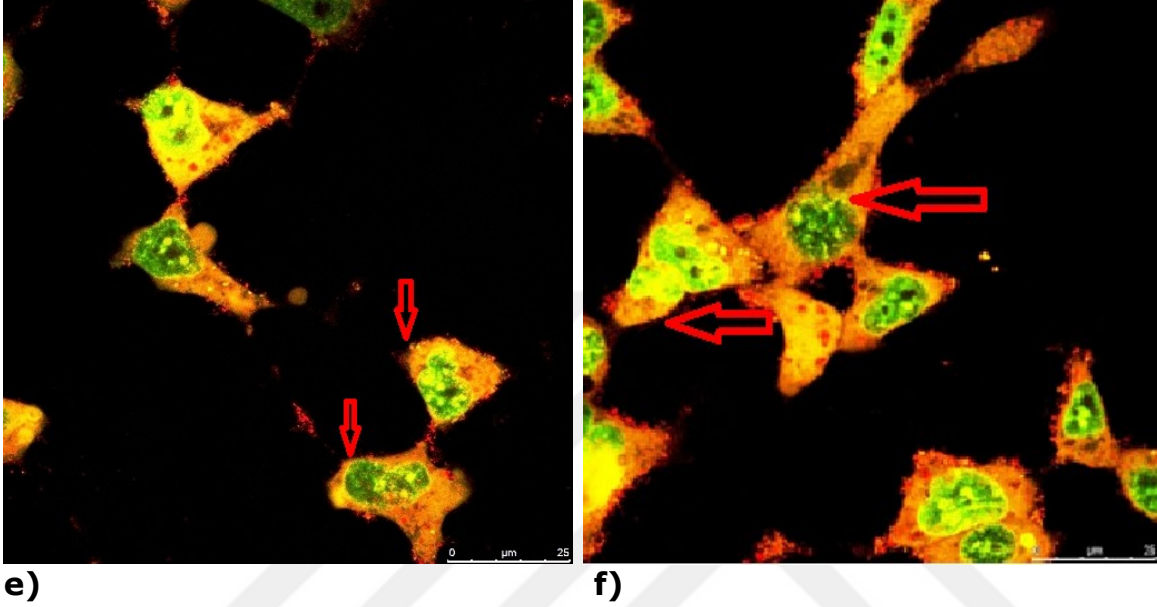


c)

d)

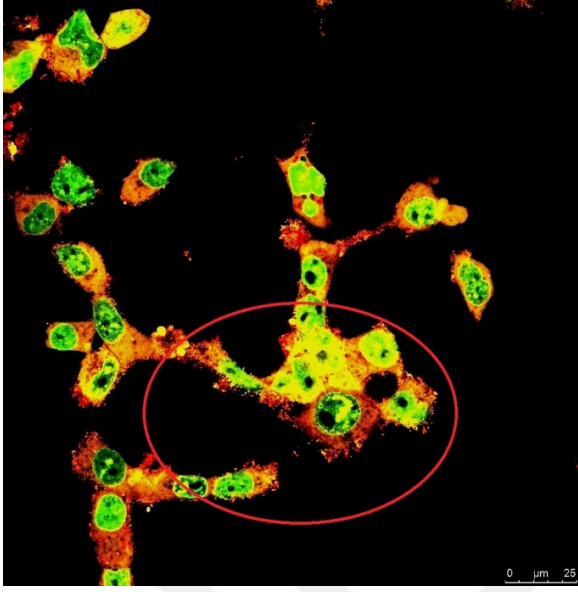
Şekil 4.3.1.2 c ve d: 10 μ M R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.1.2 c ve d fotoğraflarında ise hücre membranında deformasyon oluşarak dışa doğru tomurcuklanma yapısı ve hücre iskeletinde oluşan boşluklar hücrenin apoptoza gittiğini gösterdi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.

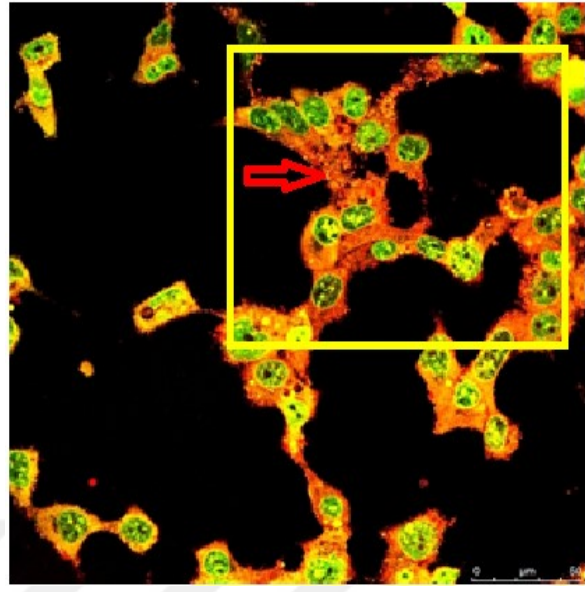


Şekil 4.3.1.2 e ve f: 10 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.1.2 e ve f fotoğraflarında ise hücre membranında oluşan deformasyon sebebi ile blebbing oluşumu ve hücre çekirdeğinde kromozom parçalanması gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.



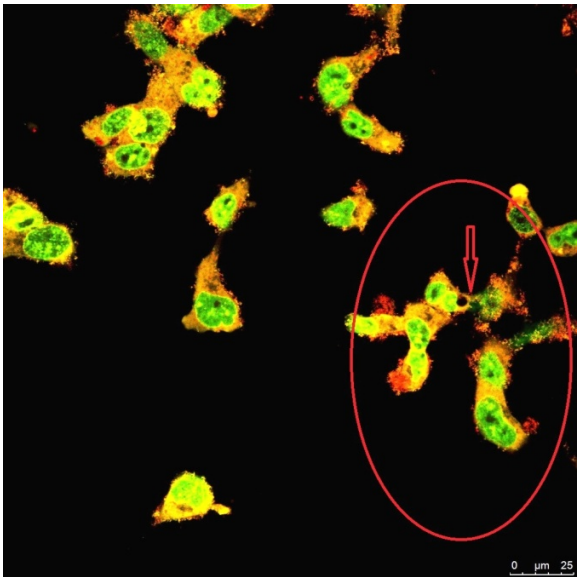
g)



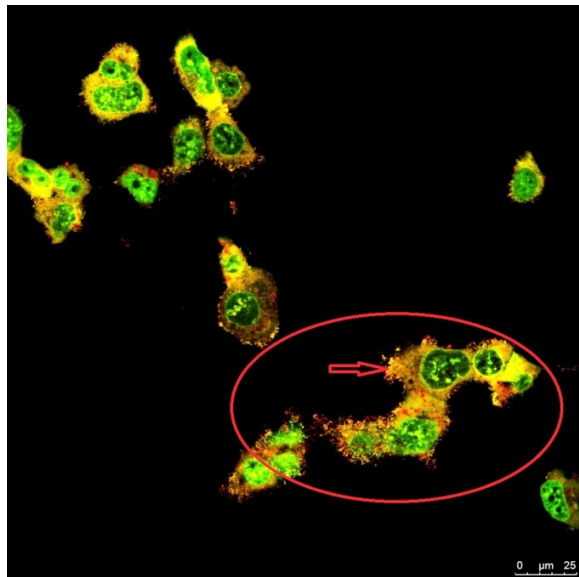
h)

Şekil 4.3.1.2 g ve h: 10 μ M R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.1.2 g ve h resimlerinde membran ve hücre iskeletinde oluşan deformasyon sebebi ile membranda tomurcuklanma ile birlikte hücre iskeletinde oluşan delikler gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.



i)



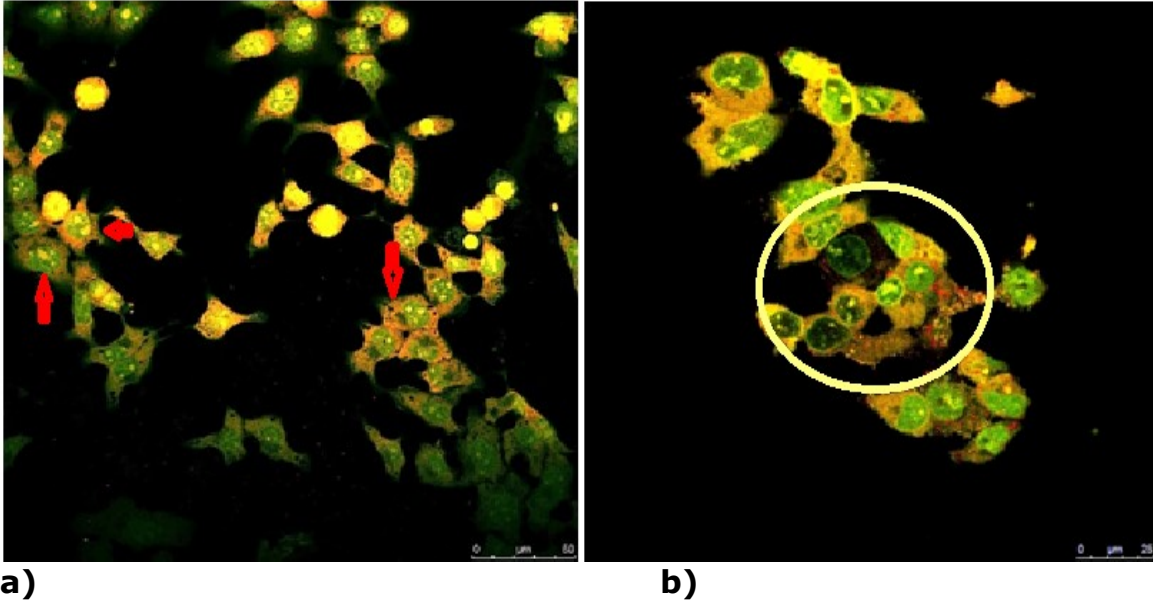
j)

Şekil 4.3.1.2 ı ve j: 10 μ M R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.1.2 ı ve j fotoğraflarında deformasyon sonucunda membranda oluşan tomurcuklanma ile birlikte kromozomların parçalandığı gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.

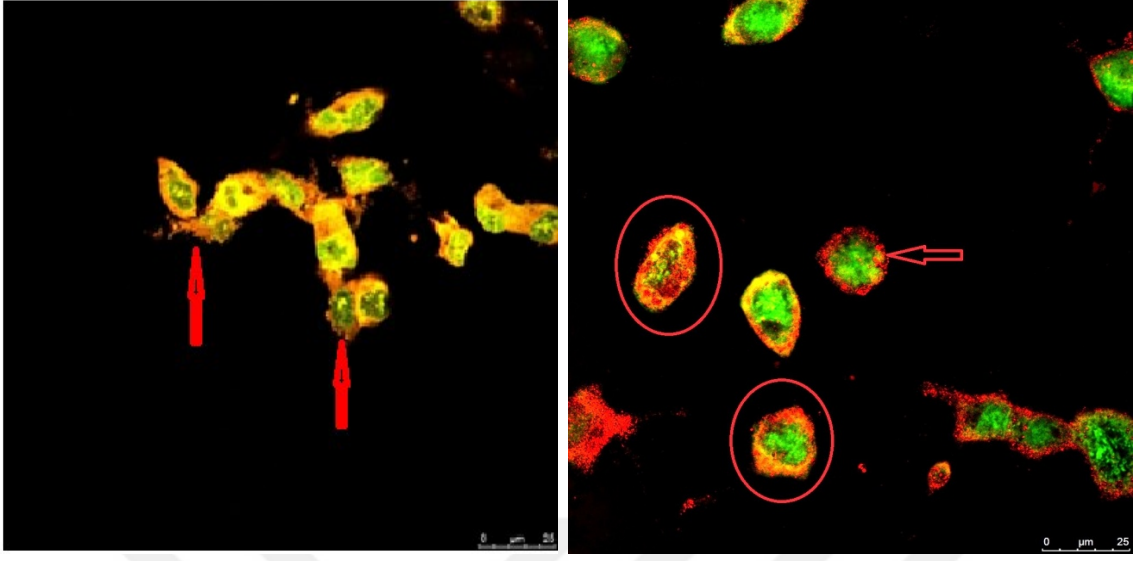
4.3.1.3 50 μ M İlaç dozu grubu fotoğrafları ve yorumlanması

50 μ M R-547 ilaç grubunda 24 saatte ilacın hücrelere verebileceği olası morfolojik etkileri değerlendirmek amacı ile konfokal mikroskop ile incelenerek fotoğrafları çekildi.



Şekil 4.3.1.3 a ve b: 50 μ M R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.

Normal şartlarda poligonal şekle sahip hücrelerin şekil 4.3.1.3 a ve b fotoğraflarında şekil değişikliğine uğradığı ve yuvarlaklaştığı gözlemlendi. Ek olarak hücre iskeletinde deformasyona bağlı olarak delikler oluştuğu ve b fotoğrafında hücrenin kromozomlarında parçalanma ve DNA kırıkları oluşturduğu gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.

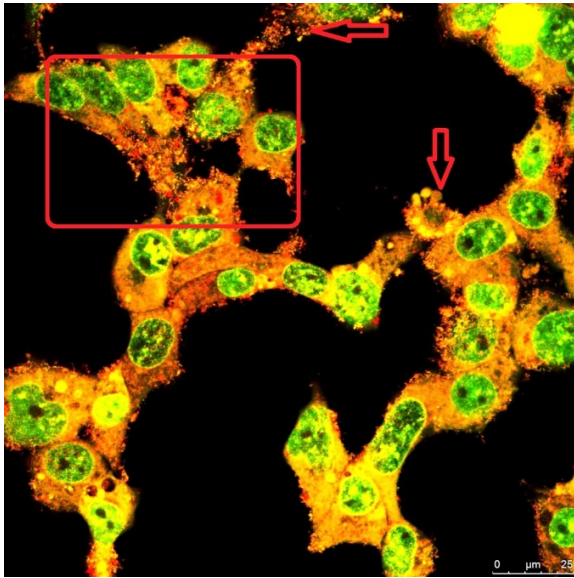


c)

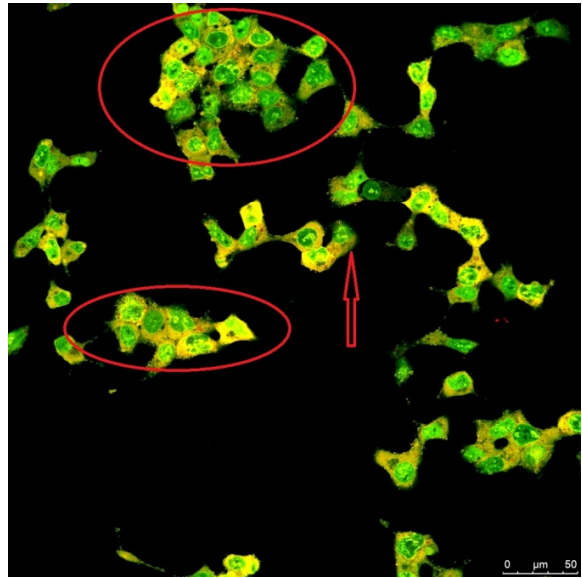
d)

Şekil 4.3.1.3 c ve d: 50 μ M R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.1.3 c ve d fotoğraflarında hücrede meydana gelen deformasyonlar sonucu şekil değişikliğine uğrayarak yuvarlaklaşma görüldü. Diğer yandan membran deformasyonu ile birlikte hücre membranının tomurcuklandığı ve blebbing oluşturduğu gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.



e)



f)

Şekil 4.3.1.3 e ve f:50 µM R-547 uygulanan H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.1.3 e ve f'de deformasyona bağlı olarak hücre membranında oluşan tomurcuklanma ve apoptotik cisimlerin yoğunluğu gözlemlendi. Ayrıca hücre iskeletinde delik oluşumu ve çekirdekte kromozomal deformasyonlar gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.

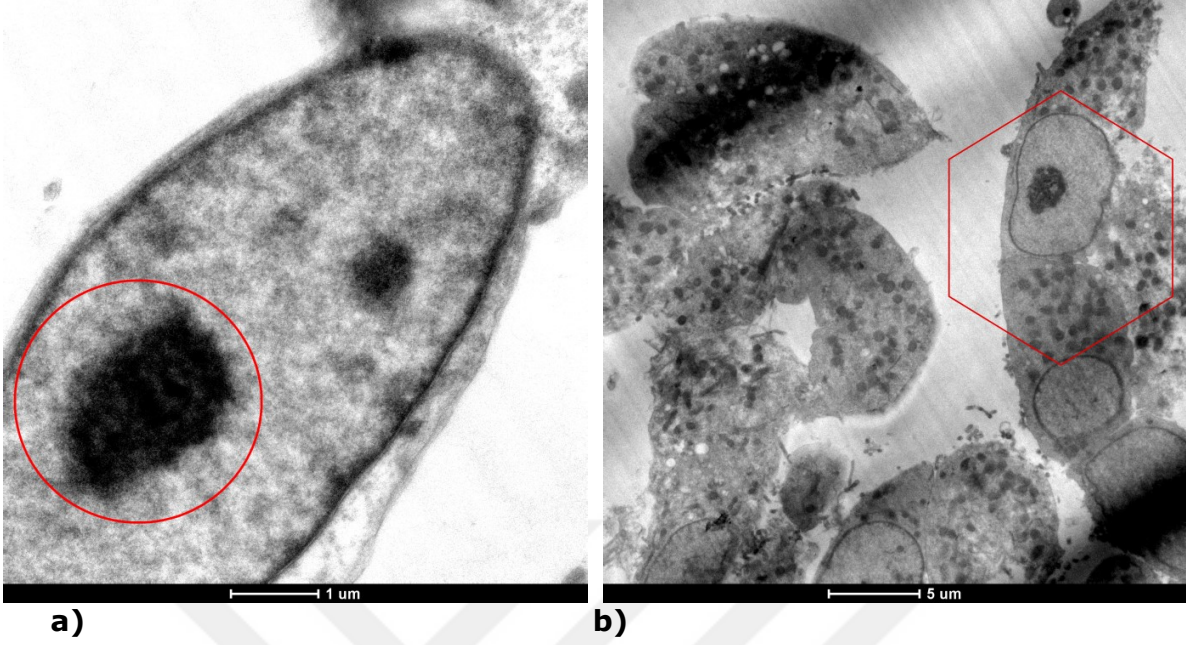
Genel bir ifade ile anlatılacak olursa, yapılan konfokal mikroskopi analizlerine göre R-547 ilacının 10 ve 50 µM dozlarında, 24 saatte çeşitli yapısal ve kromozomal deformasyonlara sebep olduğu ve hücreyi apoptoza götürmeye çalıştığı görüldü.

4.3.2 Transmission electron microscopy (TEM) ile R-547 ilacının H-4-IIE hücrelerinde meydana getirdiği morfolojik değişikliklerin incelenmesi

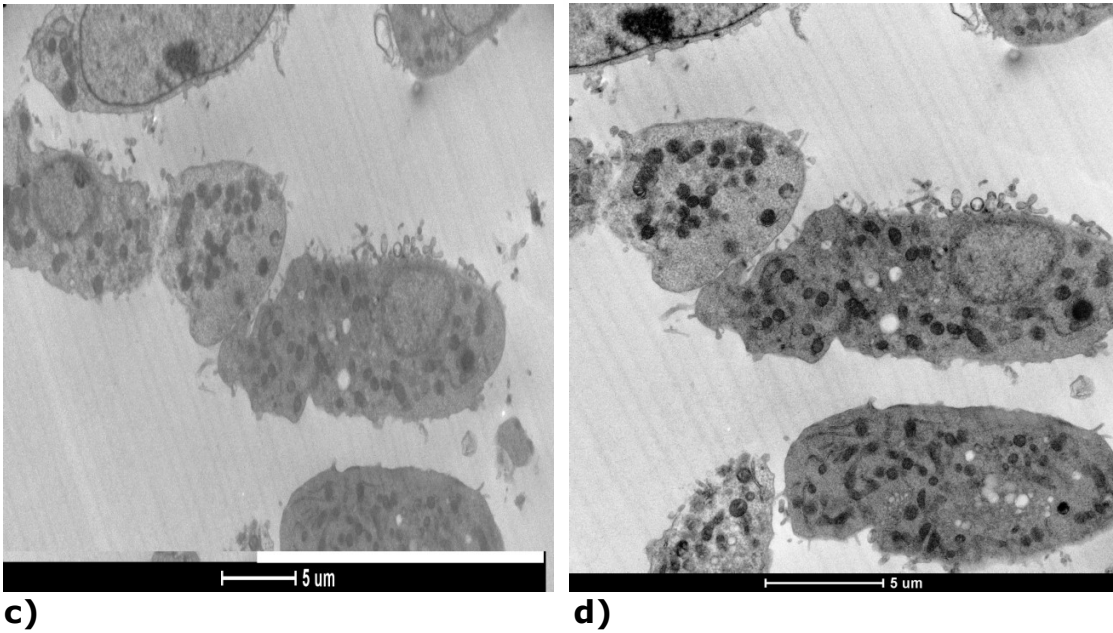
Yapmış olduğumuz çalışmada, H-4-IIE hücrelerinin R-547 ilacı ile 24 saat boyunca inkübasyonu sonucu meydana gelebilecek değişimlerin gözlenmesi amacı ile hücrelerin ince yapılarını ayrıntılı olarak görmemize olanak tanıyan, yüksek ayırma gücü olan geçirimli elektron mikroskobu kullanıldı. Bu amaçla kontrol, 10 ve 50 µM gruplarında oluşan görüntüler mikroskopta incelenerek fotoğrafları çekildi ve yorumlandı.

4.3.2.1 Kontrol grubu fotoğrafları ve sonuçların yorumlanması

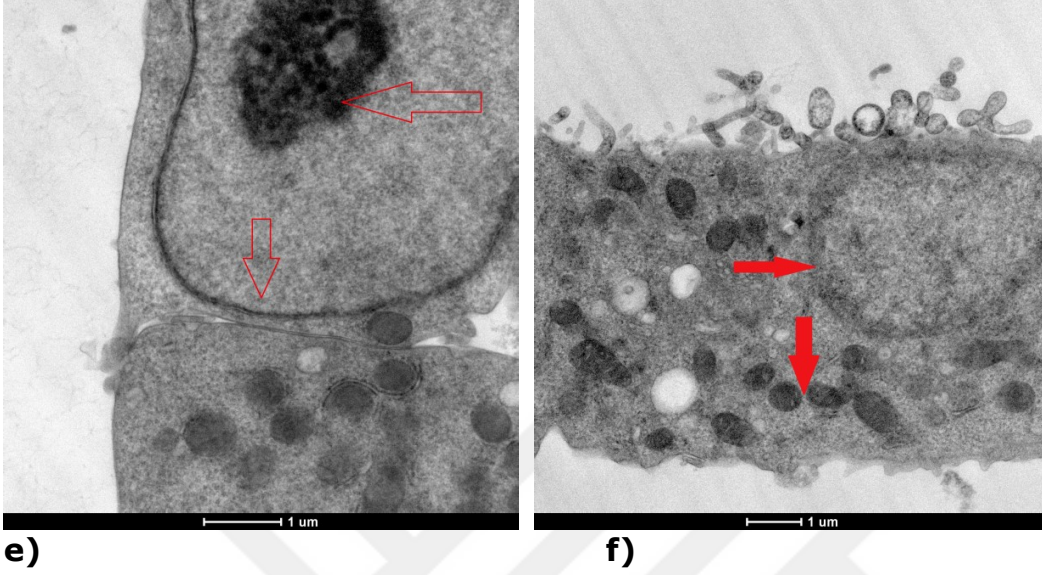
Kontrol grubu flasklarının TEM mikroskop ile incelenmesi sonucunda yorum yapıldı. Sonuçlar genel bir ifade ile belirtilirse, Şekil 4.3.2.1 a ve b'de normal hücre membranı, şekli ve çekirdeği gözlemlendi. Kromozomların çekirdekte toplanmış durumda olduğu görüldü. Şekil 4.3.2.1 c, d, e, f'de yine hücreler şekil, membran ve çekirdek açısından normal olarak belirlendi.



Şekil 4.3.2.1 a ve b: Kontrol grubu H-4-IIE hücreleri.



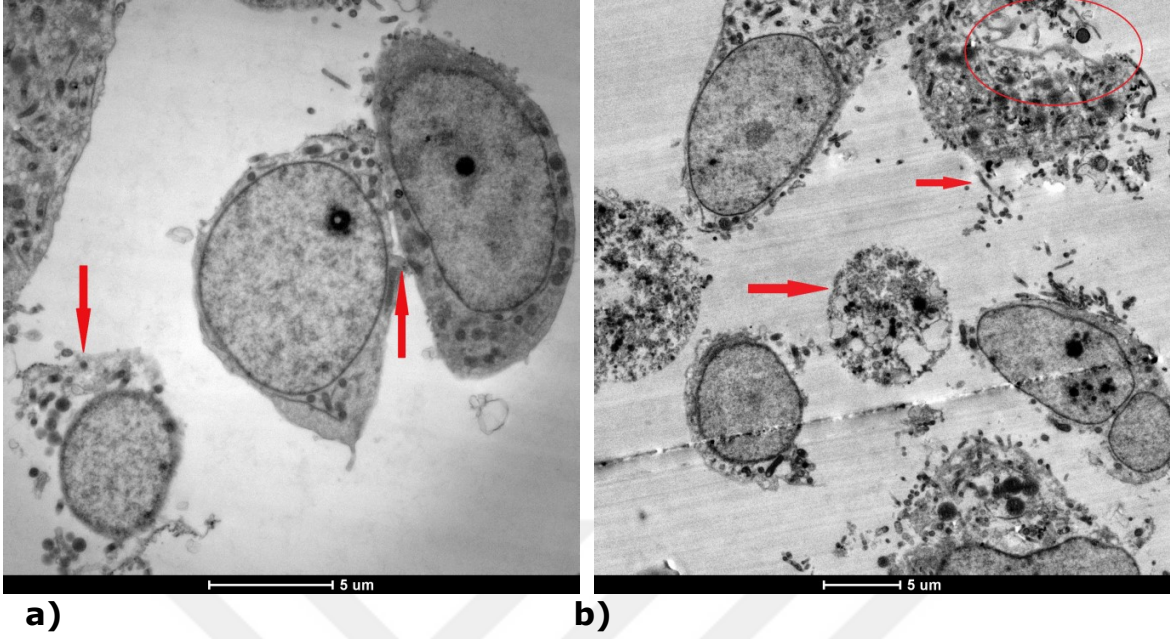
Şekil 4.3.2.1 c ve d: Kontrol grubu H-4-IIE hücreleri.



Şekil 4.3.2.1 e ve f:Kontrol grubu H-4-IIE hücreleri.

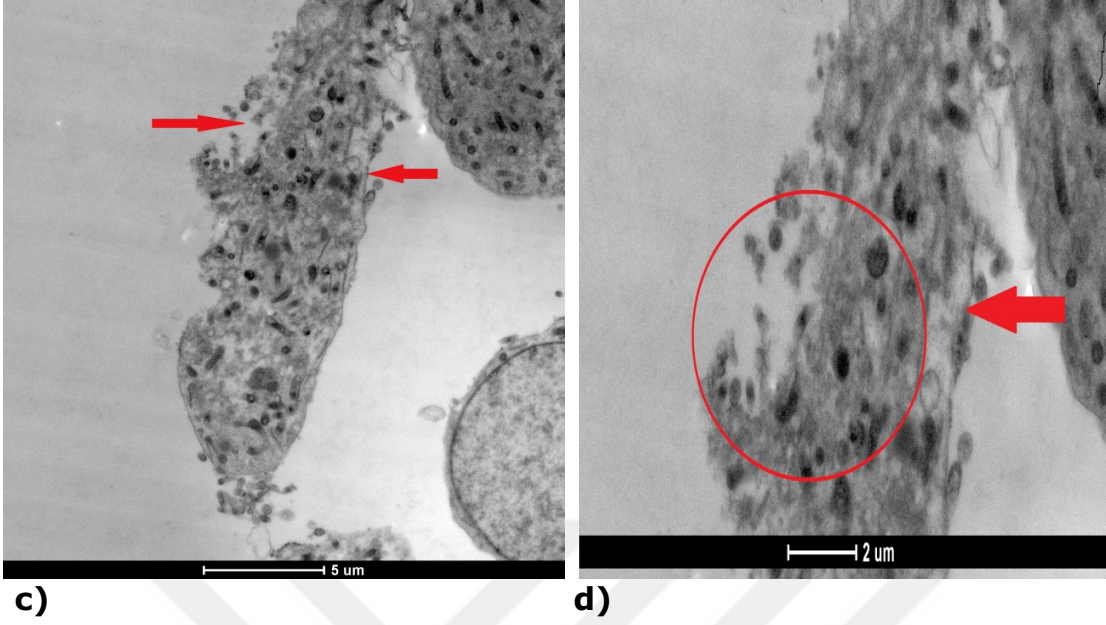
4.3.2.2 10 µM R-547 grubu fotoğrafları ve sonuçların yorumlanması

10 µM R-547 grubu flasklarında, ilacın 24 saatte hücrelere verebileceği olası morfolojik etkileri değerlendirmek amacıyla TEM ile incelenerek fotoğrafları çekildi.



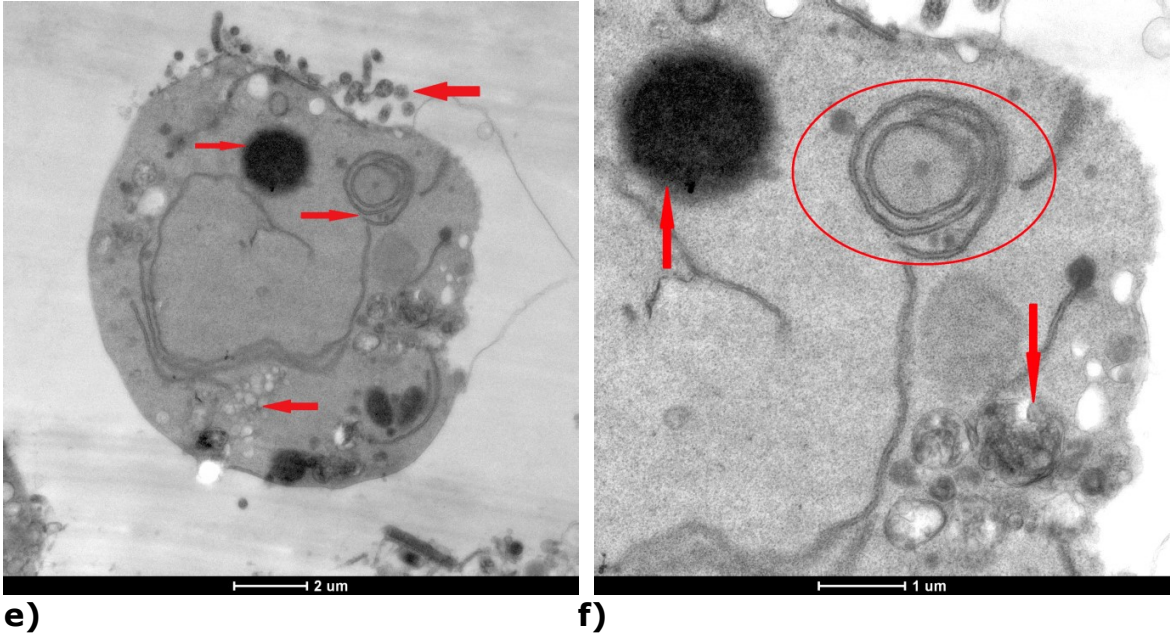
Şekil 4.3.2.2 a ve b: 10 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.2.2 a ve b fotoğraflarında hücrelerin normal şartlarda poligonal olan şeklinin yavaş yavaş bozulduğu, yuvarlaklaşıp, hücre membranının kaybolduğu ve hücre içeriğinin dağılmak suretiyle bozulduğu gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.



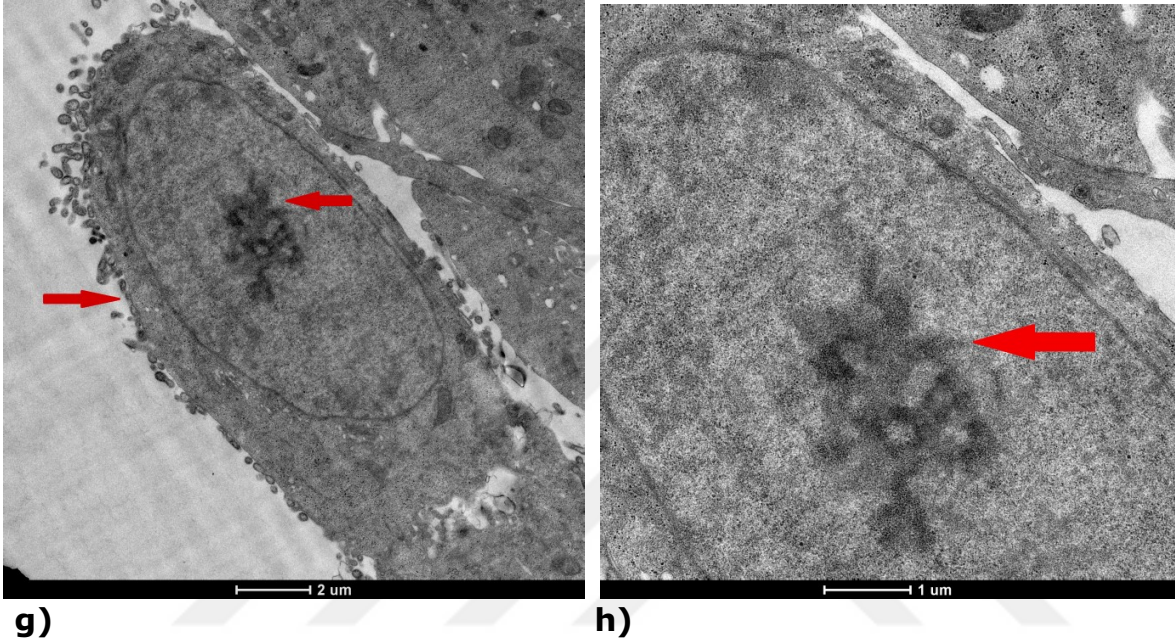
Şekil 4.3.2.2 c ve d: 10 μ M R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.2.2 c ve d fotoğraflarında hücre membranının kaybolduğu ve hücrenin şeklinin bozulduğu, ayrıca hücre içeriğinin de bozulup dağıldığı gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.



Şekil 4.3.2.2 e ve f: 10 μ M R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.2.2 e ve f fotoğraflarında hücre içeriğinin dağıldığı, şekilsel olarak deformasyona uğradığı gözlemlendi. Hücre çekirdeğinin yok olmuş durumda olduğu görüldü. Bunlara ek olarak miyelinli kılıf oluşumu ve otofajik vakuol oluşumu gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.

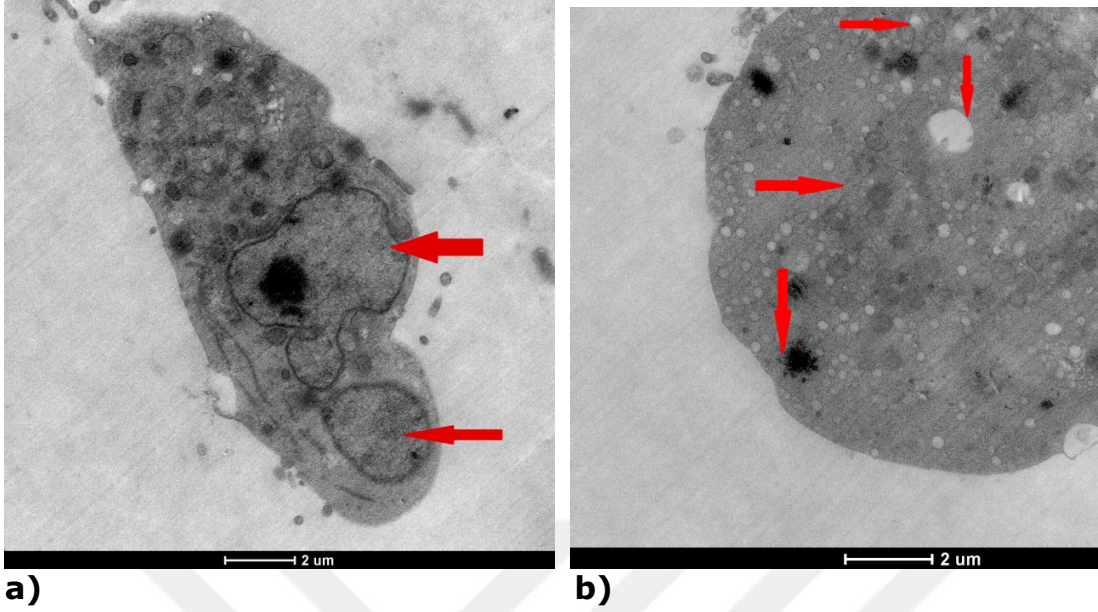


Şekil 4.3.2.2 g ve h: 10 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.2.2 g ve h fotoğraflarında hücrenin şeklinin bozulduğu, hücre içeriğinin dağıldığı gözlemlendi. Bunun yanı sıra hücre çekirdeğinin deformasyona uğraması ile birlikte kromozomların yoğunlaştığı gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.

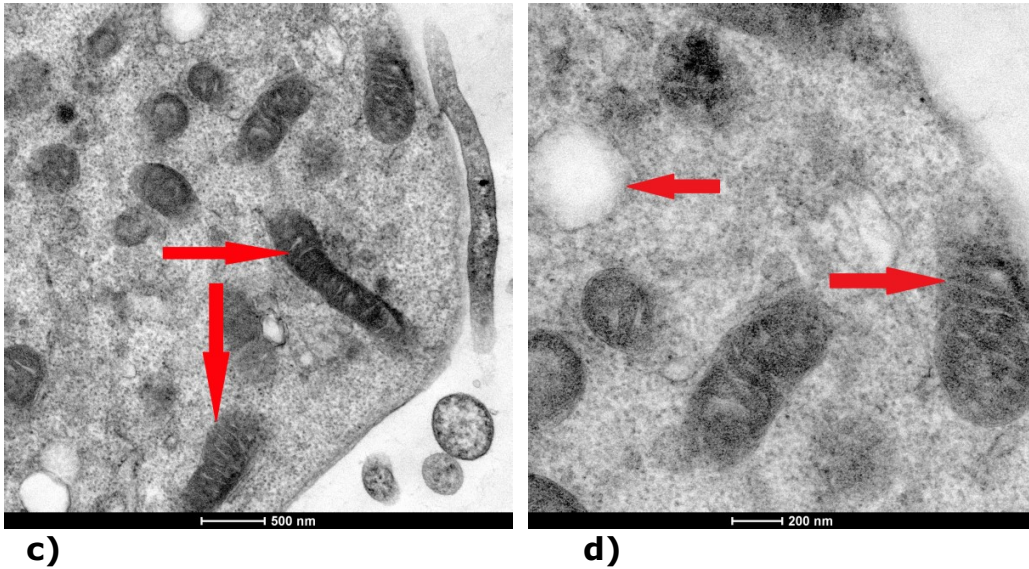
4.3.2.3 50 µM kontrol grubu fotoğrafları ve sonuçların yorumlanması

50 µM R-547 grubu flasklarında, ilacın 24 saatte hücrelere verebileceği olası morfolojik etkileri değerlendirmek amacıyla TEM ile incelenerek fotoğrafları çekildi.



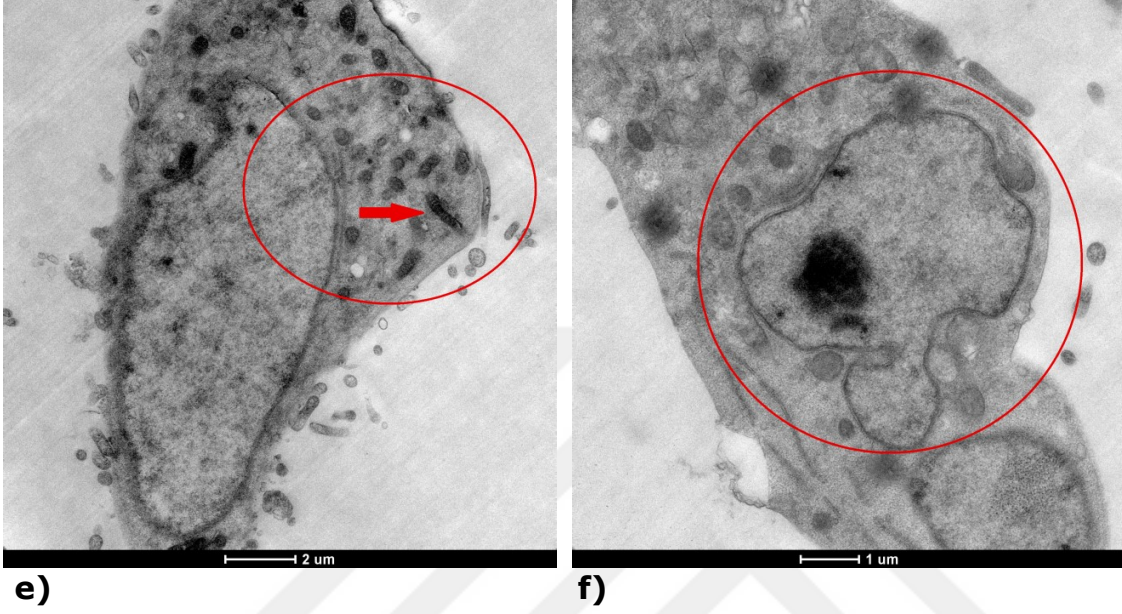
Şekil 4.3.2.3 a ve b: 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.2.3 a'da hücre membranının yapısal ve şekil olarak bozulduğu, hücre çekirdeğinin at nalı şeklini alarak apoptozu düşündürdüğü gözlemlendi. Ayrıca mitokondrilerin şişerek içeriğinin boşaldığı ve kristallarının dağıldığı gözlemlendi. Şekil 4.3.2.3 b fotoğrafında hücre içerisinde oluşan yoğun bir metabolik artışla birlikte vakuolizasyon artışı ve mitokondri deformasyonu ile birlikte mitokondrilerin kristallarını kaybettiği gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.



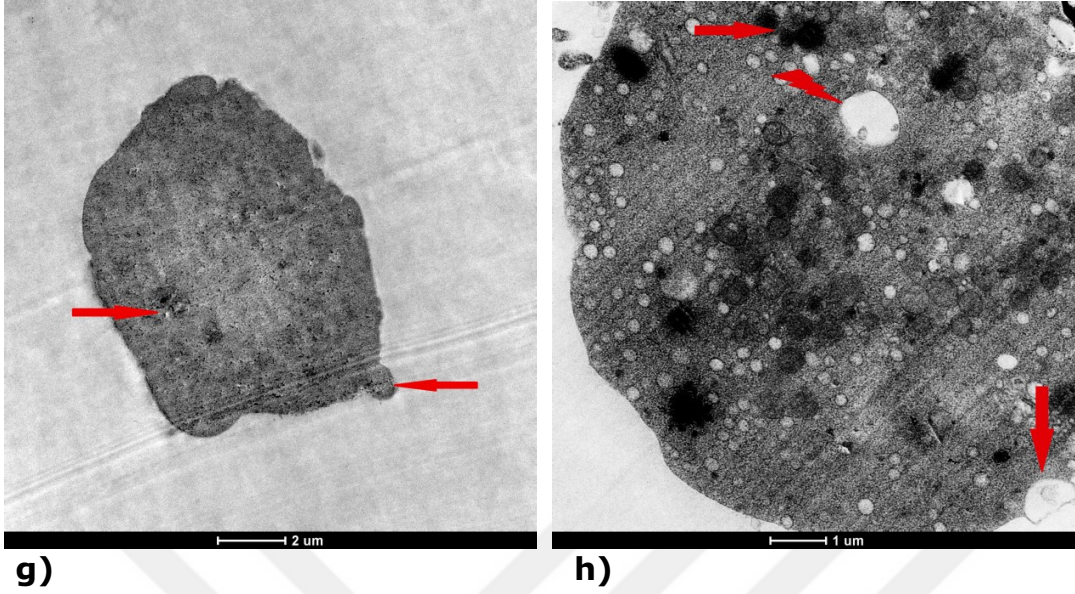
Şekil 4.3.2.3 c ve d: 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.2.3 c ve d'de hücrede oluşan mitokondri deformasyonu ile birlikte c fotoğrafında çomak şekilli mitokondrilerin oluştuğu, d fotoğrafında ise mitokondri deformasyonu sonucunda şişmiş haldeki mitokondriler gözlemlendi. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.



Şekil 4.3.2.3 e ve f: 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.2.3 e ve f fotoğraflarına göre hücre membranının deformasyona uğradığı hücre şeklinin bozulduğu gözlemlendi. E fotoğrafında çomak şekilli mitokondriler görüntülendi, f fotoğrafında ise çekirdek deformasyonu ile birlikte at nalı çekirdek oluşumu vardı. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.



Şekil 4.3.2.3 g ve h: 50 µM R-547 ilaç grubu H-4-IIE hücreleri.

Şekil 4.3.2.3 g ve h fotoğraflarında hücre çekirdeğinin deformasyona uğrayarak dağıldığı gözlemlendi. Şekil 4.3.2.3 h fotoğrafında ise yoğun hücre metabolik artışla birlikte koful oluşumları ve sekonder lizozom oluşumları dikkat çekti. Oluşan yapısal bozukluklar oklarla gösterildi.

Genel bir ifade ile anlatılacak olursak yapılan TEM analizlerine göre R-547 ilacının H-4-IIE hücrelerine 24 saat boyunca inkübasyonu sonucunda 10 ve 50 µM doz gruplarında çeşitli membran, mitokondri, hücre içeriği ve kromozomal deformasyonlara sebep olduğu ve hücreyi apoptoza götürmeye çalıştığı görüldü.

5- TARTIŞMA

CDK 1-2-4 inhibitörü olarak kullanılan R-547, daha önce aydınlatılamamış ve üzerine çok fazla çalışma yapılmamış bir ilaçtır. Daha önce farklı hücre soyları ve hayvan deneyleri ile çalışılan ilaç, HSK'lı hücre soyları üzerinde denenmemiştir. Çalışmamızda, ilk kez insan HSK'lı hücre soyu Hep G2 ve sıçan HSK'lı hücre soyu olan H-4-IIE üzerinde R-547'nin etkilerini araştırmak amaçlanmış ve sitotoksik etkileri spektrofotometrik bir yöntem olan MTT yöntemi ile ortaya konulmuştur. Hep G2 ve H-4-IIE hücre soylarının diğer CDK inhibitörleri ve hücreyi apoptoza götüren ilaçlarla ve benzer yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar incelenmiş ve yapmış olduğumuz çalışmayı desteklemesi açısından karşılaştırılmıştır.

Hep G2 hücrelerinde yapılan MTT yöntemi ile 0,1, 1, 10, 50, 100 µM dozlarında meydana gelen sitotoksik etkiler sonucunda 24 ve 48 saat boyunca R-547 ilacı ile muamele edilen hücrelerin yaşam oranları 24 saat için sırasıyla %101, %94, %93, %89, %79 olurken, aynı dozlarla 48 saat boyunca muamele edilen hücrelerin yaşayan hücre oranları ise %101,8, %101, %53,6, %47,4, %41 olarak bulunmuştur. 24 saatlik sonuçlarda en yüksek doz olan 100 µM'da ölüm oranı %21 olarak tespit edilmiştir. 100 µM R-547, 48 saat süre ile uygulandığında %59'luk bir hücre ölümüne neden olmuştur. R-547, Hep G2 hücrelerinde aynı dozlarda denediğimiz cisplatinden daha etkili bulunmuştur. Ancak 24 saatte görülen etkiler önemli düzeyde olmaması sebebi ile deneylerin bir sonraki aşaması olan apoptoz belirleme yöntemi olan akım sitometri, konfokal mikroskopi ve TEM aşamalarında kullanılmadı.

XJAO ve arkadaşları Hep G2 hücre soyunda, klinikte malign tümör tedavisinde kullanılan paclitaxel ilacını ve bunu takiben CDK-1 inhibitörü olarak kullanılan RO3306 ilacını hem ayrı ayrı hem de kombine olarak kullanmışlardır. 18 saat boyunca 0,2 µM dozunda paclitaxel ve bunu takiben de 6 saat boyunca 2 µM dozunda RO3306 ilacını Hep G2 hücrelerine uygulamışlardır. Yapılan bu çalışmaya göre, kombine olarak kullanılan iki ilacın hücrelerde sinerjik bir şekilde inhibisyon sağladığı, hücre gelişimini bölünmenin M evresinde durdurarak, hücreleri mitozdan kaydırarak apoptozu indüklediğini belirtmişlerdir (XJAO, v.d. , 2014).

Shi ve arkadaşlarının Hep G2 ve diğer bir insan HSK'lı hücre soyunda ve in vivo şartlarda, anti psikotik ilaç olarak kullanılan ve potansiyel CDK2 inhibitörü olan fluspirilene ile yapmış olduğu çalışmaya göre, doz ve zamana

bağlı olarak hücre bölünmesini G1 fazında ve S fazına geçişte durdurduğunu, CDK2, pRB düzeylerinde değişiklik meydana getirerek, apoptozu indüklediğini ortaya koymuşlardır. Yapılan bu çalışmaya göre çeşitli kanser türleri için de fluspirilenenin klinikte kullanılabileceği fikrini ortaya atmışlardır (Shi, v. d. , 2015).

Bir başka in vitro HSK çalışmasında Bollard ve arkadaşları, CDK4 ve CDK6 inhibitörü olarak kullanılan palbociclib ilacını klinik öncesi tümör gelişimini engellemek amacı ile Hep G2 ve diğer insan HSK'lı hücre soylarında denemişlerdir. Çalışmaya göre doz ve zamana bağlı olarak pablociclibin hem tek başına hem de sorafenib ile birlikte hücre proliferasyonunu baskıladığı fikrini ortaya atmışlardır (Bollard, v. d. , 2016).

YC-1 ilacı ile yapılmış olan çalışmada Wang ve arkadaşları, çeşitli insan HSK'lı hücre soylarında, doz ve zamana bağlı olarak, hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, DNA sentezini inhibe ederek hücre bölünmesinin G1-S geçişinde durdurucu etkiye sahip olduğunu ve siklin-CDK kompleksinin p21 ve p27 seviyelerinin değişime uğrayarak inhibisyonunu gerçekleştirdiğini ortaya koymuşlardır (Wang, v. d. , 2004).

Zhang ve arkadaşlarının başka bir CDK inhibitörü çalışmasına göre de dihydroartemisinin (DHA) ile Hep G2 hücrelerini 24 ve 48 saat boyunca 0 ve 80 μM arasındaki dozlarla muamele ederek hücre canlılığına olan etkilerini MTT yöntemiyle belirlemişlerdir. Doz ve zamana bağlı olarak 24 saatte DHA'nın hücre canlılığını 20 μM dozunda %50 oranına düşürdüğü gözlemlenmiştir (Zhang, v.d. , 2012).

Jin ve arkadaşlarının yapmış olduğu kombine ilaç denemelerinde, CDK inhibitörlerinden olan doxorubicin ve paclitaxel'i kombine olarak 24 saat boyunca Hep G2 hücreleri ile muamele etmişler ve hücre canlılığına sitotoksik etki gösterdiğini belirlemişlerdir (Jin, v.d. , 2009).

Xyclocydine, spesifik bir CDK inhibitörü olup HSK tedavisi için iyi bir antikanser ilaçtır. Cho ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada CDK inhibitörü olan xylocydine ile Hep G2 hücrelerini 24 saat boyunca muamele ederek, hücre canlılığını MTT sitotoksikite analizi ile belirlemişlerdir. Güçlü bir şekilde hücre canlılığını inhibe eden ve apoptozu uyaran ilacın IC_{50} değeri 50 μM altında bulunmuştur (Cho, v.d. , 2010).

Lu ve arkadaşlarının Hep G2 ve diğer insan HSK'lı hücre soyları ile yapmış olduğu çalışmada, sinomenine hydrochloride (SH) ilacının çeşitli zaman ve dozlara bağlı olarak, hücre proliferasyonunda sitotoksik etkilerini ortaya koymuşlardır. Hücre döngüsü düzenleyicileri olarak görev yapan Siklin/CDK komplekslerini inhibe eden p21/WAF1/Cip1'nin ekspresyon düzeylerinde değişiklikler meydana getirdiğini belirtmişlerdir. Çalışmaya göre, SH'nin hücre döngüsü esnasında G1 fazı ve diğer fazlara geçişlerinde hücre döngüsünü durdurucu etkilerinin olduğunu ve apoptozu uyardığını belirtmişlerdir (Lu, v. d. , 2012).

CDK inhibitörleri ile yapılan başka bir çalışmaya göre de, Han ve arkadaşları Hep G2 hücre soyunda küçük inhibitör molekül ve antikanser ajan olan SKLB70326'yi çeşitli doz ve zaman aralığında denemişlerdir. Bu molekülün, p53-p21 gibi CDK inhibitörleri aracılığıyla hücre döngüsünün G0-G1 geçişinde durdurucu etki göstererek apoptozu uyardığını ortaya koymuşlardır (Han, v. d. , 2012).

Relja ve arkadaşlarının yapmış olduğu CDK çalışmasında Hep G2 ve diğer bir HSK'lı hücre soyu simvastatin ile 32 ve 64 μ M dozlarda farklı zaman aralıklarında muamele edilmiştir. Çalışmaya göre hücre döngüsü düzenleyici proteinler CDK1, CDK2, CDK4 inhibisyonu ile birlikte p19 ve p27 düzeylerinde değişiklikler meydana gelmiştir. Antiproliferatif etki ve CDK-Siklin komplekslerinin inhibisyonu ile apoptozun uyarıldığını ortaya koymuşlardır (Relja, v. d. , 2010).

Cheng ve arkadaşlarının zeytin yaprağından izole ettikleri fenolik bir bileşik olan Oleuropeini belirli doz ve zaman aralıklarında insan HSK'lı hücre soyu üzerinde denemişlerdir. Buna göre oleuropein'in p53, p21, CDK1 ve Siklin B düzeylerinin değişimine bağlı olarak hücre döngüsü geçiş noktalarında durdurucu etkisi olduğunu ve ayrıca Ca^{+2} salınımı ve düzeyleri üzerindeki etkileri ile de sitotoksik etkilerinin olduğunu saptamışlardır (Cheng, v. d. , 2016).

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz diğer bir HSK'lı hücre soyu olan sıçan H-4-IIE' de R-547 ilacının 0,1, 1, 10, 50, 100 μ M'lik dozlarıyla 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmesi ile ortaya çıkan sitotoksik etkileri yine MTT yöntemi ile belirlendi. 24 saat için yaşayan hücre oranları sırasıyla %90, %80, %63, %47, %43 olurken, 48 saat için %96, %85, %46, %44, %45 oldu. R-547 ilacı ile 24 saat boyunca muamele edilen H-4-IIE hücre soyunda

ilacın hücre proliferasyonunu 20,3 μM dozunda %50 civarında inhibe ettiği gözlemlendi. Çalışmanın bir sonraki deney aşamalarında bu değer bir üst dozu olan 50 μM ve bir alt dozu olan 10 μM ile apoptotik etkilerin belirlenmesi için akım sitometri, hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimlerin tespiti için ise konfokal mikroskopi ve TEM yöntemleri kullanılmıştır.

H-4-IIE ve Hep G2 hücreleri ile yapmış olduğumuz çalışmamızda pozitif kontrol amacı ile kullanılan Cisplatin ilacının 24 ve 48 saat boyunca 5, 10, 25, 50, 100 μM dozları ile muamelesinin hücre canlılığına gözle görülür bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Kishimoto ve arkadaşlarının H-4-IIE ve Hep G2 hücre soylarında 72 saat boyunca 0,1, 1, 10 μM Cisplatin dozları ile muamele ettikleri çalışmada hücre canlılığına gözle görülür bir etkisi saptanamamıştır (Kishimoto, v.d., 2016). Bu da bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

R-547 ilacının H-4-IIE hücre soyunda MTT yöntemi ile belirlenen hücre canlılığını zamana ve doza bağlı olarak değiştirdiğini gözlemleyebiliriz. Michels ve arkadaşlarının luteolin ile yapmış olduğu çalışmada 24 saatte ve farklı doz aralıklarında H-4-IIE hücre canlılığını inhibe eden %50'lik dozu 95 μM olarak bulmuşlardır (Michels, v.d., 2005). Vatan ve arkadaşlarının H-4-IIE hücrelerinin 24 saat boyunca menadione ile muamele edilmesiyle hücre canlılığını inhibe eden IC_{50} değerini 25 μM olarak bulmuşlardır (Vatan, v.d. , 2013).

Radyasyonun yanı sıra çoğu hormonal ve sitotoksik tedaviler, tamir edilemeyen hücresel hasarlar sonucunda kanser hücrelerinde apoptozu uyarmaktadır (Sjöström, Johanna, Makela, Tomi, 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalarda apoptozisin kanser, otoimmün bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynadığı gerek deneysel gerekse de klinik çalışmalarla gösterilmiştir (Dinçel ve Kul, 2015).

Gerek R-547'nin diğer kanser hücre soyları ile yapılan çalışmalarında gerekse diğer CDK inhibitörü ya da CDK inhibitör proteinlerinin seviyelerini değiştiren ilaçlar ve maddeler ile yapılan çalışmalarda, sitotoksik etkiler ile apoptozun uyarılması genellikle Annexin V ve FITC ölçümleri ile tespit edilmektedir. Bizim çalışmamızda da sitotoksik etkileri belirlemek amacı ile yapılan MTT yöntemi sonuçlarına istinaden, kullanmış olduğumuz sıçan HSK'lı hücre soyu, H-4-IIE'de apoptozun varlığını tespit etmede Annexin-V ve FITC

ölçümlerinin yapıldığı akım sitometri yöntemi kullanılmıştır. H-4-IIE hücrelerinin 24 saat boyunca R-547 ilacı ile muamelesi sonucunda elde edilen apoptotik hücre yüzdeleri her bir grup için ele alınarak kontrole göre değerlendirilmiştir ve bu yüzdeler sırasıyla kontrol grubu için %4,07, DMSO grubu için 2,57, 10 µM'lık ilaç dozu grubu için %37,8, 50 µM'lık ilaç dozu grubu için %45,40 sonuçları ile apoptozu uyardığı tespit edilmiştir.

De Pinto ve arkadaşlarının, R-547 ilacını 48 saat boyunca kolon kanser hücre soyu ile muamele ederek yaptıkları akım sitometri yöntemine göre daha önceden belirlemiş oldukları IC₅₀ değeri ile (yaklaşık 0,1 µM), apoptotik hücre oranını %69 olarak tespit etmişlerdir. Sonuçlara göre R-547 ilacının DNA fragmantasyonu ile apoptozu uyardığını bulmuşlardır (De Pinto, v.d. , 2006).

Cho ve arkadaşlarının Xylocydine ile yapmış olduğu çalışmada Hep G2 ve farklı HSK hücre soylarını 24 saat boyunca 10 ve 50 µM Xylocydine dozları ile muamele etmelerinin ardından apoptoz varlığını Anneksin V -FITC yöntemini kullanarak belirlemişlerdir, Bax, Bcl proteinlerini ve kaspaz düzeylerini ölçmüşlerdir. Sonuçlara göre kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonundaki artışa bağlı olarak apoptozu uyardığını ortaya koymuşlardır. (Cho, v.d. , 2010).

Çalışmamızın en son aşaması ise, apoptozun meydana getirmiş olduğu morfolojik değişimleri inceleme yöntemi olan mikroskopi aşaması olmuştur. Mikroskopi yöntemleri için ayırım gücü yüksek olan konfokal mikroskopi ve TEM kullanılmıştır. R-547 ilacı ile muamele edilen H-4-IIE hücreleri 24 saatlik inkübasyon sonrası kontrol, 10 µM, 50 µM ilaç dozları olmak üzere 3 gruba ayrılarak konfokal mikroskopta ve TEM'de incelenerek fotoğrafları çekilmiş ve apoptozun meydana getirmiş olduğu morfolojik değişimler tespit edilmiştir. Sonuçlara göre hücre şeklinin ve içeriğinin bozulması, hücrenin büzülmesi, DNA fragmantasyonu, hücre membranı tomurcuklanması, apoptotik cisim oluşumu, çekirdek kondensasyonu, at nalı çekirdek oluşumu ve mitokondri yapısının şekilsel ve içerik olarak bozulması, kristalarda deformasyon oluşumu gibi apoptozu çağrıştıran bilgiler edinilmiştir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde apoptozun meydana getirdiği morfolojik değişimler genellikle floresan mikroskop ile görüntülenmiştir (Vatan, v.d, 2013, Michels, v.d., 2005). TEM yöntemi ile programlanmış hücre ölümü olan apoptozun belirlenmesinde kondanse olmuş kromatinler ve DNA fragmantasyonu bir gösterge olmuştur (Doonan ve Cotter, 2008).

CDK inhibitörleri ile yapılmış olan in vitro ve in vivo koşullardaki farklı kanser tiplerine ait çalışmalara göre, Hayashi ve arkadaşları, CDK 2 inhibitörü olarak görev yapan flavopiridol (FP)'ü, temozolomide ile muamele edilmiş olan çeşitli insan ve hayvan gliomalı hücre soylarına uygulamışlar ve hücre döngüsünün DNA tamir mekanizması için son derece önemli olan G2 kontrol noktasını inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Buna göre hücre döngüsünde G2/M fazları geçişini bloklayarak hasarlı DNA'nın döngüde ilerlemesini durdurduğunu ortaya koymuşlardır (Hayashi, v. d. , 2013).

Heo ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir CDK inhibitör çalışmasına göre, akut myeloid lösemi (AML) hücre soyları ve AML'li hastalardan alınan kemik iliği hücreleri çeşitli doz ve zamanda radotinib ile muamele edilmiştir. Sitotoksik etkiler sonucu doz ve zamana bağlı olarak radotinibin p21, p27, CDK 2, CDK 4 ve CDK 6 inhibisyonunu gerçekleştirerek hücre döngüsünün G0/G1 faz geçişlerinde durdurmuş ve kaspaz bağımlı olarak apoptozu uyardığını ortaya koymuşlardır (Heo, v. d. , 2016)

Martinez – Urbina ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya göre, 6-Substituted 2-(N-trifluoroacetyl amino) imidazopyridines denilen sentez bir madde ile kolon, lösemi, prostat, glioma, meme ve akciğer kanserli hücre soylarının muamelesinin doz ve zamana bağlı olarak CDK1 ve CDK 2 inhibisyonunu gerçekleştirerek hücre döngüsünün G2/M faz geçişini durdurarak apoptozu uyardığını ortaya koymuşlardır (Urbina, v. d. , 2010).

Cicenas ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise birçok kanser türünde roscovitine'nin güçlü olarak CDK1, CDK5, CDK7, daha zayıf olarak ise CDK 4 ve CDK6 inhibitörü olarak işlevinden söz etmişlerdir. Buna göre hücre döngüsünün çeşitli fazlarında ve geçiş fazlarında inhibisyon gerçekleştirerek antikanser ajan olarak kullanıldığını belirtmişlerdir. Antikanser işlevinin yanı sıra nörodejeneratif hastalık tedavisi, enflamasyon, viral enfeksiyonlar ve polikistik böbrek rahatsızlıklarında da kullanılabileceğini sunmuşlardır. Roscovitine derivasyonları şeklinde üretilen maddelerin de çeşitli kanserlerde antikanser ilaç olarak kullanılabileceği, işlevsel ve metabolik fonksiyonları belirtilmiştir. Buna göre roscovitine derivasyonlarından biri olan ve CDK 1, CDK2, CDK 4 inhibitör görevi gören N-&N1 in karaciğer kanserinde kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır (Cicenas, v. d. , 2015).

Çeşitli yöntemler ile in vitro koşullarda HSK'lı hücre soyları ile yapmış olduğumuz çalışmamız ile, R-547 isimli CDK inhibitörünün sitotoksik etkileri sonucu hücre proliferasyonunu ve hücre döngüsünü G1-S fazlarında baskılamak suretiyle apoptozu uyararak çeşitli morfolojik değişimlere sebep olduğunu söyleyebiliriz. Bu da, R-547 ilacının HSK tedavisinde umut vaat edici aday bir CDK inhibitör ilaç olduğunu göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda geliştirilen CDK inhibitörü olan R-547, hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan CDK 1/siklin B, CDK 2/siklin E ve CDK 4/siklin D1 komplekslerini baskılamaktadır. Çalışmamızda, R-547, Hep G2 (insan) ve H-4-IIE (sıçan) HSK'lı hücre soylarında belirli doz ve zaman aralıklarında uygulandı. Hep G2 hücrelerinde 24 saatte kullandığımız en yüksek dozda % 21 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. H-4-IIE hücrelerinde ise etki daha belirgindir. R-547, H-4-IIE hücrelerinde 24 saatte, en yüksek dozda % 57'lik, 48 saatte ölüm oranı %55'lik ölüme sebep olmuştur. Etkinin daha fazla olması nedeniyle apoptoz ve mikroskopi deneyleri için H-4-IIE hücreleri kullanılmıştır. R-547'nin, doz bağımlı olarak apoptozu uyardığı akım sitometri yöntemi ile ortaya kondu. Bulgularımız konfokal mikroskopi ve TEM teknikleri ile görüntülenerek desteklendi.

Sonuçta bulgularımız, R-547 isimli CDK inhibitörünün hücre bölünmesini durdurucu ve apoptozu uyarıcı etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bulgularımızın sağlıklı ve çeşitli kanserli hücre soyları ve hayvan deneyleri ile daha ileri araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz. R-547 ilacının kanser tedavisinde kanserli hücre bölünmesini durdurucu ve apoptoz uyarıcı aday CDK inhibitörü olarak bilime ışık tutacağı inancındayız.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akdeniz, D., Tuncer, Ş. B., & Yazıcı, H. (2015). Retinoblastoma Gene Pathway and Cancer. *Turkish Journal Of Oncology*, 30(3):158-165. (doi: 10.5505/tjoncol.2015.1067).
- Akşit, H., Bildik, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1):55-63.
- Ankit, Sharma, R., Singh, S., Khinchi, M. P. (2017). A brief review on apoptosis. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development* 5(3), 1-10.
- Bollard J, Miguela V, Ruiz de Galarreta M, et al. , (2016). Palbociclib (PD-0332991), a selective CDK4/6 inhibitor, restricts tumour growth in preclinical models of hepatocellular carcinoma .Doi:10.1136/gutjnl-2016-312268
- Cabadak, H. (2008). Hücre Siklusu ve Kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3):51 – 61.
- Chang, A. Y., & Wang, M. (2013). In-vitro growth inhibition of chemotherapy and molecular targeted agents in hepatocellular carcinoma. *Anti-cancer drugs*, 24(3), 251-259.
- Cheng, Jin-Shiung, Ting-Chou, Chiang, Yuarn-Liu, Yuan, v. d. , (2015). The effect of oleuropein from olive leaf (*Olea europaea*) extract on Ca²⁺ homeostasis, cytotoxicity, cell cycle distribution and ROS signaling in HepG2 human hepatoma cells. *Food and Chemical Toxicology Volume 91*, May 2016, Pages 151-166. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.015>
- Cho, S. J., Lee, S. S., Kim, Y. J., Park, B. D., Choi, J. S., Liu, L., & Lee, S. K. (2010). Xylocydine, a novel Cdk inhibitor, is an effective inducer of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *Cancer letters*, 287(2), 196-206.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

- Choi, B. Y., & Lee, C. H. (2010). Cell cycle arrest and cytochrome c-mediated apoptotic induction by MCS-5A is associated with up-regulation of p16 INK4a in HL-60 cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(13), 3880-3884.
- Chu, X. J., DePinto, W., Bartkovitz, D., So, S. S., Vu, B. T., Packman, K., & Goelzer, P. (2006). Discovery of [4-amino-2-(1-methanesulfonylpiperidin-4-ylamino) pyrimidin-5-yl](2, 3-difluoro-6-methoxyphenyl) methanone (R547), a potent and selective cyclin-dependent kinase inhibitor with significant in vivo antitumor activity. *Journal of medicinal chemistry*, 49(22), 6549-6560.
- Cicenas, J. , Kalyan, K. , Sorokinas, A. , Stankunas, E. , Josh Levy, J. (2015). Roscovitine in cancer and other diseases. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.61
- Çapan, Z., Yalçın, Ö., F. (2010). Karaciğer hastalıkları ve anestezi. Teltik Başar, Baltacı, H., Kaymak, B., Ç(ed). Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 125-142.
- De Pinto, W., Chu, Xin-Jie, Yin, Xuefeng. (2006). In vitro and in vivo activity of R-547: A potent and selective cyclin-dependent kinase inhibitor currently in phase I clinical trials.
- Deshpande, A., Sicinski, P., & Hinds, P. W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, 24(17), 2909.
- Dinçel, G. Ç., Oguz, K. U. L.(2016). Patolojik Apoptozis Ve Tanı Yöntemleri. *Gümüşhane University Journal of Health Sciences*, 5(1).
- Doonan, Francesca, Cotter, T., G. (2008). Morphological assessment of apoptosis. DOI:10. 1016/j.ymeth.2007.11.006.
- Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O. A., Baltacı, D., Oktay, M., & Çolakoğlu, S. (2012). Apoptozis hakkında bilinenler (literatür taraması). *Duzce Medical Journal*, 14(2).

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

- Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*, 23(12), 620-633.
- Freshney, R.I. (2000). Culture of animal cells: A manual of basic technique, 3rd edition; Wiley-Liss, New York.
- Funk, Oliver, Jens, 2005. Cell cycle checkpoint genes and cancer. *Encyclopedia of Life Sciences*. DOI: 10.1038/npg.els.0006046.
- Granit, D. (2015). Karaciğer fizyolojisi ve anatomisi, *Türkiye Klinikleri Journal Medical Onkology-special topics* 8(1), 1-6.
- Güneş, H. (2003). Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri. *Tr. J. of Biology*, 23: 283-292.
- Güneş, H. Veysi. (2003).*Moleküler Hücre Biyolojisi*, 1.Baskı, Kaan Kitabevi,2003.
- Hayashi, T., Adachi, K. Shigeo Ohba , Yuichi Hirose (2013).The Cdk inhibitor flavopiridol enhances temozolomide-induced cytotoxicity in human glioma cells. *J. Neurooncology*, (2013) 115:169–178 DOI 10.1007/s11060-013-1220-5
- Jin, C., Li, H., He, Y., He, M., Bai, L., Cao, Y., & Dou, K. (2010). Combination chemotherapy of doxorubicin and paclitaxel for hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 136(2), 267-274. (doi:10.1007/s00432-009-0658-5)
- Kang, H. W., Muramatsu, H., Lee, B. J., & Kwon, Y. S. (2010). Monitoring of anticancer effect of cisplatin and 5-fluorouracil on HepG2 cells by quartz crystal microbalance and micro CCD camera. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4), 1576-1581.
- Kishimoto, S., Yasuda, M., Suzuki, R., & Fukushima, S. (2016). Intracellular uptake of an antitumor-active azole-bridged dinuclear platinum (II) complex in cisplatin-resistant tumor cells. *Biometals*, 29(6), 1075-1083. (doi:10.1007/s10534-016-9978-5)

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

Klatt, E. C. (2009). Atlas of Pathology. Eğılmez,R. Ç (ed), Ankara, Güneş Tıp Kütabevleri Ltd. Şti., 215.

Kuş, Gökhan (2017). Hepatosellüler Karsinom Hücrelerinde Karmofurun Sitotoksik Ve Apoptotik Etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 18(2):55-60.

Latif, N. A. A., Batran, Rasha, Khedr, M., Abdalla, M. (2016). 3- Substituted-4-hydroxycoumarin as a new scaffold with patient CDK inhibition and promising anticancer effect: Synthesis, molecular modeling and QSAR studies. <http://dx.doi.org/10.1016./j.bioorg.2016.06.005>

LU, X. , JIN ZENG , YU-LE CHEN, PENG-MEI HE, MAI-XIA WEN, MU-DAN REN, YA-NAN HU, GUI-FANG LU, SHUI-XIANG HE (2012). Sinomenine hydrochloride inhibits human hepatocellular carcinoma cell growth *in vitro* and *in vivo*: Involvement of cell cycle arrest and apoptosis induction. DOI: 10.3892/ijo.2012.1704

Marie, Annick, B. (2000). Genetics of hepatocellular carcinoma, *seminars in cancer biology*, 10, 185-200.

Mariaule, G., & Belmont, P. (2014). Cyclin-dependent kinase inhibitors as marketed anticancer drugs: where are we now? A short survey. *Molecules*, 19(9), 14366-14382.

Michels, G., Wätjen, W., Niering, P., Steffan, B., Thi, Q. H. T., Chovolou, Y., & Kahl, R. (2005). Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology*, 206(3), 337-348.

Miguel Angel Marti´nez-Urbina, Alejandro Zentella , Miguel Angel Vilchis-Reyes , Angel Guzma´n, Omar Vargas , Mari´a Teresa Ramı´rez Apana, Jose´ Luis Ventura Gallegos , Eduardo Dı´az (2010). 6-Substituted 2-(N-trifluoroacetylamino)imidazopyridines induce cell cycle arrest and apoptosis in SK-LU-1 human cancer cell line. *European Journal of*

Medicinal Chemistry 45 (2010) 1211–1219. journal homepage:<http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

- Miguel Angel Martı´nez-Urbina, Alejandro Zentella , Miguel Angel Vilchis-Reyes , Angel Guzma´n, Omar Vargas , Mari´a Teresa Ramı´rez Apana, Jose´ Luis Ventura Gallegos , Eduardo Di´az (2010). 6-Substituted 2-(N-trifluoroacetyl-amino)imidazopyridines induce cell cycle arrest and apoptosis in SK-LU-1 human cancer cell line. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2010) 1211-1219. journal homepage:<http://www.elsevier.com/locate/ejmech>
- Mossman T, (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Öztopcu-Vatan, P., Sayitoglu, M., Gunindi, M., & Inan, E. (2015). Cytotoxic and apoptotic effects of menadione on rat hepatocellular carcinoma cells. *Cytotechnology*, 67(6), 1003-1009.
- Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., & Morris, M. C. (2015). Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to peptide inhibitors. *Cancers*, 7(1), 179-237.
- Reed, J.C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *American Journal of Pathology*, 157, 1415-1430.
- RELJA, B. , MEDER, F. , WILHELM, K. , HENRICH, D. , MARZI, I. , LEHNERT, M. , (2010). Simvastatin inhibits cell growth and induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest in hepatic cancer cells. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* 26: 735-741, 2010. DOI: 10.3892/ijmm_00000520
- Sánchez-Martínez, C., Gelbert, L. M., Lallena, M. J., & de Dios, A. (2015). Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25(17), 3420-3435.
- Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K., & Paules, R. S. (1999). Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environmental health perspectives*, 107(1), 5.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

- Shi X-N, Li H, Yao H, Liu X, Li L, Leung KS, et al. (2015) In Silico Identification and In Vitro and In Vivo Validation of Anti-Psychotic Drug Fluspirilene as a Potential CDK2 Inhibitor and a Candidate AntiCancer Drug. *PLoS ONE* 10(7): e0132072. doi: 10. 1371/journal. pone. 0132072
- Shih-Wei Wang, Shioh-Lin Pan, Jih-Hwa Guh, Hui-Ling Chen, Dong-Ming Huang, Ya-Ling Chang, Sheng-Chu Kuo, Fang-Yu Lee, and Che-Ming Teng, (2004). YC-1 [3-(5-Hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl Indazole] Exhibits a Novel Antiproliferative Effect and Arrests the Cell Cycle in G0-G1 in Human Hepatocellular Carcinoma Cells, *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS* Vol. 312, No. 3 doi:10.1124/jpet.104.077230.
- Shu-Lan, Yuan, Wei, Yu-Quan, Wang, X., Xiao, F. (2004). Growth inhibition and apoptosis induction of tanshinone II-A on human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterology*, 10 (14). <http://www.wjgnet.com/1007-9327/10/2024asp>.
- Sjöström, J., & Mäkelä, T. (2006). Apoptosis and the cell cycle in human disease. *eLS*. (doi:10.1002/9780470015902.a0006043)
- Solakoğlu, Z. (2009). Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni. *Klinik Gelişim*, 22(3):20-25.
- Taş, A., (2010). Hepatoselüler Karsinom Tanı ve Tedavisi. *Güncel Gastroenteroloji*, 14(3).
- Tomatır, A. G. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 23(6):499-508.
- Tortora, G., Derrickson, J., (2008). Principles of anatomy and physiology, 12th edition, 24/946.
- Tunçel, N., Aydın, S., Zeytinoğlu, M., (2000). İnsan anatomisi ve fizyolojisi, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Yayınları, Eskişehir, 1246/702, 218-223.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

- Ustaoglu, M., A. (2009). Temel kanser fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim Dergisi*, 22 (3), 46-49.
- Vedantham, K., Swet, J. H., McKillop, I. H., & El-Ghannam, A. (2012). Evaluation of a bioresorbable drug delivery system for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(2), 432-440. (doi: 10.1002/jbm.a.33228)
- Wang, F., He, L., Dai, W. Q., Xu, Y. P., Wu, D., Lin, C. L., & Wang, C. F. (2012). Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *PloS one*, 7(12), e50638. (doi:10.1371/journal.pone.0050638)
- Williams, G. H., & Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *The Journal of pathology*, 226(2), 352-364. (doi: 10.1002/path.3022)
- XIAO1, J, QIU1, P, LAI1, X, HE1,P, Y. WU1, B. DU2, Y. TAN1, (2014). Cyclin-dependent kinase 1 inhibitor RO3306 promotes mitotic slippage in paclitaxel-treated HepG2 cells. doi:10. 4149/neo_2014_007
- Xu, M. Y., & Kim, Y. S. (2014). Antitumor activity of glycyrol via induction of cell cycle arrest, apoptosis and defective autophagy. *Food and chemical toxicology*, 74, 311-319.
- Zhang, C. Z., Zhang, H., Yun, J., Chen, G. G., & San Lai, P. B. (2012). Dihydroartemisinin exhibits antitumor activity toward hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Biochemical pharmacology*, 83(9), 1278-1289.
- Zhang, J. F., Liu, J. J., Lu, M. Q., Cai, C. J., Yang, Y., Li, H., & Chen, G. H. (2007). Rapamycin inhibits cell growth by induction of apoptosis on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Transplant immunology*, 17(3), 162-168.
- Zhang, R., Niu, Y., & Zhou, Y. (2010). Increase the cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA damage in HepG2 cells by XRCC1 abrogation related mechanisms. *Toxicology letters*, 192(2), 108-114.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam ediyor)

Zhang, Z., C., Zhang, H., Yun, J. (2012). Dihydroartemisinin exhibits antitumour activity toward hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo Doi:10.1016/j.bcp.2012.02.002

Zhou, Y., Ling, X. L., Li, S. W., Li, X. Q., & Yan, B. (2010). Establishment of a human hepatoma multidrug resistant cell line in vitro. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 16(18), 2291. (doi:10.3748/wjg.v16.i18.2291)

Zhou, Y., Shen, J. K., Hornicek, F. J., Kan, Q., & Duan, Z. (2016). The emerging roles and therapeutic potential of cyclin-dependent kinase 11 (CDK11) in human cancer. *Oncotarget*, 7(26), 40846.



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Betül Hacıoğlu
Dođum tarihi ve yeri : 22.02.1984-BURSA
Uyruđu : T.C.
Medeni durumu : Bekâr
İletişim adresleri : Siteler Mahallesi Ertuđrulgazi Caddesi
Güzelvadi Sitesi C Blok Kat 1 Daire 3
Güzelyalı/ Mudanya/ BURSA
betulhacioglu@gmail.com
0506 584 86 39
(0224) 550 00 30

Eğitim Durumu

İlköğretim : Bursa Sönmez İlköğretim Okulu (Bursa-
Ortaöđretim : Bursa Şehit Dođan Sevinç İlköğretim
Okulu (1995-1998)
Lise : Bursa Atatürk Lisesi (1998-2002)
Üniversite : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen
Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
(2007-2012)
Yabancı dil : İngilizce

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

TÜRK FİZYOLOJİK BİLİMLER DERNEĞİ (Eylül- 2017)

Kurslar ve Eğitim Programları

- TÜRK FİZYOLOJİK BİLİMLER DERNEĞİ, 3. UYGULAMALI MOLEKÜLER YÖNTEMLER KURSU (3-5 Haziran 2017, ESKİŞEHİR)
- KANSERDE VERİ MADENCİLİĞİ (DATA MINING) ÇALIŞTAYI (25-26 Ekim 2016, KONYA)
- COMET ASSAY ÇALIŞTAYI (25-26 Ekim 2016, KONYA)
- WESTERN BLOT ÇALIŞTAYI (25-26 Ekim 2016, KONYA)
- qRT-PCR ÇALIŞTAYI (25-26 Ekim 2016, KONYA)
- HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI (Ağustos 2009, ESKİŞEHİR)

SERTİFİKALAR-KATILIM BELGELERİ

- TÜRK FİZYOLOJİK BİLİMLER DERNEĞİ 43.ULUSAL FİZYOLOJİ KONGRESİ (4-7 Eylül 2017, DENİZLİ)
- MOKAD (MOLEKÜLER KANSER ARAŞTIRMA DERNEĞİ) MOLEKÜLER KANSER ZİRVESİ, İSTİNYE ÜNV. (23-24 Mart 2017, İSTANBUL)
- MOKAD (MOLEKÜLER KANSER ARAŞTIRMA DERNEĞİ) 6. MULTİDİSİPLİNER KANSER ARAŞTIRMA KONGRESİ (27-30 Ekim, KONYA)
- ESOGÜ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI ALZHEIMER HASTALIĞININ MOLEKÜLER TEMELİ VE YENİ TEDAVİ STRATEJİLERİ SEMPOZYUMU (Mayıs 2016, ESKİŞEHİR)



