

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

LİKOFELONUN GLİA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ OLASI
ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

GÖKHAN KUŞ

DANIŞMAN

Prof. Dr. RUHİ UYAR

2. DANIŞMAN

Doç. Dr. Selda KABADERE

AĞUSTOS, 2011

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

**LİKOFELONUN GLİA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ OLASI
ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

GÖKHAN KUŞ

DANIŞMAN

Prof. Dr. RUHİ UYAR

2. DANIŞMAN

Doç. Dr. SELDA KABADERE

KABUL VE ONAY SAYFASI

Gökhan KUŞ'un Doktora Tezi olarak hazırladığı "Likofelonun glia hücreleri üzerindeki olası etkileri" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

25/08/2011

Üye : Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK

Üye : Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

Üye : Prof. Dr. Ziya KAYGISIZ

Üye : Prof. Dr. Ruhi UYAR

Üye : Doç. Dr. Selda KABADERE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25.10.8/2011 tarih ve 885..14/02... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Merkezi sinir sistemi tümörleri içerisinde gliomalar en büyük grubu oluştururlar ve tüm tedavi seçeneklerine rağmen ölüm oranı çok yüksektir. Araşidonik asit metabolizmasında görev alan siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LOX) yollarının her ikisinin birden baskılanması kanser gelişimini önlemekte ve kanserli hücrelerde apoptozu uyarmaktadır. Bu her iki yolağı birlikte baskılayan en önemli bileşiklerden birisi likofelondur. Çalışmamızda, likofelonun sıçan glioma hücre dizisi (C6) ve Ras geni uyarılmış fibroblast hücre (5RP7) dizilerinde hücre çoğalmasına ve apoptoza olası etkileri *in vitro* ortamda araştırıldı. Ayrıca kolçisin ve 5-florourasil, likofelonun etkilerini karşılaştırmak amacıyla pozitif kontrol olarak seçildi. Hücreler 24 ve 48 saat boyunca 10 ile 250 μ M arasındaki ilaç dozları ile muamele edildi. C6 hücrelerinin yaşam oranları üzerine 10, 50 ve 100 μ M dozlarındaki likofelonun herhangi bir etkisi saptanmadı, fakat 150, 200 ve 250 μ M dozları C6 ve 5RP7 hücre yaşamını doza ve zamana bağılı olarak %90'ları aşan oranlarda azalttı. 5-FU ve kolçisinin bütün dozları sitotoksikti ve yaşayan hücre oranlarını en fazla %78 dolayında azaltabildi. Likofelonun 150, 200 ve 250 μ M dozları C6 ve 5RP7 hücrelerinde apoptozu zaman ve doza bağılı olarak uyardığı bulundu. Likofelon diğer ilaçlarla karşılaştırıldığında C6 hücrelerinin apoptozunu uyarmada en etkili olduğu tespit edildi. 5RP7 hücrelerinin erken apoptozunu uyarmada ise kolçisin kadar olmasa da 5-FU kadar etkiliydi. Bu çalışma likofelonun zaman ve doz bağımlı olarak güçlü bir anti-kanser ve apoptotik etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Anti-kanser, apoptotik, glioma, likofelon.

SUMMARY

Gliomas are the largest group of central nervous system tumours and despite of clinical treatments death rate is very high. Inhibition of both cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) pathways that takes role in arachidonic acid metabolism prevents cancer development and induces apoptosis. One of the most promising compounds that blocks both of these pathways is licofelone. We questioned whether licofelone affects the survival of C6 cells and Ras transformed cells (5RP7), and induces apoptosis of these cells in vitro. We also used colchicine and 5-fluorouracil as positive controls to compare the effects of licofelone. The cells were treated with 10 to 250 μM doses of these drugs for 24 or 48 hours. The treatment of both cell types with 10, 50 and 100 μM licofelone for 24 or 48 hr did not show any action on cell viability however, 150, 200 and 250 μM licofelone reduced the number of living cells more than 90 % as compared to the control. All doses of colchicine and 5-FU were cytotoxic and reduced the number of cells by 78 %. We found that 150, 200 and 250 μM licofelone induces of apoptosis of C6 and 5RP7 cells in a dose and time dependent manner. Compared with 5-FU and colchicine licofelone is the most effective apoptosis inducing drug in C6 cell. Licofelone is also as effective as 5-FU for inducing apoptosis of 5RP7 cells, but not as colchicine. The present study reveals the possibility that licofelone possesses a strong dose and time dependent anticancer and apoptotic properties.

Key words : Anti-cancer, apoptotic, glioma, licofelone.

İÇİNDEKİLER	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Araşidonik asit metabolizması	3
2.1.1. Siklooksijenaz yolağı	4
2.1.2. Lipoksijenaz yolağı	8
2.1.3. COX ve LOX baskılanması	9
2.2. Likofelon	11
2.3. Hücre ölümü: Nekroz ve apoptoz	12
2.3.1. Apoptozun uyarılması	14
2.3.1.1. Apoptozu düzenleyen proteinler	15
2.3.1.2. Apoptozda p53'ün katkısı	17
2.3.1.3. Ölüm reseptörleri ve adaptör proteinler	17
2.3.1.4. Kaspazlar	18
2.3.2. Apoptozun mekanizması	19
2.3.2.1. Hücre dışı uyarımlarla apoptoz	19
2.3.2.2. Hücre içi uyarımlarla apoptoz	19
2.3.2.3. AIF uyarımlı apoptoz	20
2.3.2.4. Apoptozun sitotoksik düzenlenmesi	20
2.4. Glia ve glioma	21
2.5. H-Ras transforme fibroblast hücre hattı (5RP7)	23
2.6. 5-Florourasil (5-FU) ve kolçisin	24

3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Hücre kültürünün yapılması	25
3.2. Hücre sayısını belirleme yöntemleri	26
3.3. Apoptoz ölçümü (Flow Sitometrik Yöntem)	28
3.4. Deney grupları I	28
3.5. Deney grupları II	30
3.6. Deney grupları III	31
3.7. İstatistiksel analiz	32
4. BULGULAR	33
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ	65
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	66
8. ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Başlık	Sayfa
Şekil 2.1.	Araşidonik asit metabolizması	3
Şekil 2.2	Endoplazmik retikulumda bulunan siklooksijenaz enzim yapısı	4
Şekil 2.3.	Likofelonun kimyasal yapısı	12
Şekil 2.4	Kaspaz aktivasyonu	18
Şekil 2.5.	Apoptoz uyarımı sonrası sitoplazmaya AIF ve sitokrom c salınması	20
Şekil 4.1.	Likofelonun 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 µM dozlarının 24 ve 48 saat uygulamasının C6 hücre canlılığı üzerindeki etkisi	33
Şekil 4.2.	Fibroblast kökenli 5RP7 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 µM likofelon uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi	34
Şekil 4.3.	Farklı dozlardaki 5-FU'nun C6 hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda yaşayabilen hücrelerin oranları	35
Şekil 4.4.	Transforme 5RP7 hücrelerine 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 µM 5-FU uygulamasının 24 ve 48 saat sonraki etkileri.	36
Şekil 4.5.	Kültür ortamında çoğaltılmış glioma hücreleri üzerine 24 ve 48 saat süreyle 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 µM kolçisin uygulamasının etkileri.	37
Şekil 4.6.	Kolçisin dozlarının (10, 50, 100, 150, 200 ve 250 µM) 24 ve 48 saat süreyle 5RP7 hücrelerine uygulamasının ardından yaşayabilen hücre oranları	38
Şekil 4.7.	Etkin likofelon dozlarının 24 ve 48 saat süreyle uygulamasının C6 hücre canlılığı üzerindeki etkisinin tripan mavisine göre sonuçları	39
Şekil 4.8.	Ras onkogeni uyarılmış 5RP7 hücrelerinin canlılığı üzerine 150, 200 ve 250 µM likofelonun 24 ve 48 saat uygulaması sonucunun tripan mavisine göre belirlenmesi	40
Şekil 4.9.	Tripan mavisine göre C6 hücre canlılığı üzerine 5-FU'nun doz ve zamana bağlı olarak etkisi	41
Şekil 4.10.	5RP7 hücre canlılığı üzerine 24 ve 48 saat süreyle 150, 200 ve 250 µM 5-FU uygulamasının tripan mavisine göre belirlenmiş sonuçları.	42
Şekil 4.11.	Tripan mavisine göre glioma hücrelerinin canlılık oranına doz ve zamana bağlı olarak kolçisinin etkisinin belirlenmesi	43
Şekil 4.12	Kolçisin dozlarının (150, 200 ve 250 µM) 24 ve 48 saat süreyle 5RP7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi	44
Şekil 4.13.	Likofelon dozlarının uygulanmasının ardından C6 hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri	45

Şekil 4.14.	5RP7 hücrelerine likofelon dozlarının uygulanmasının ardından hücrelerinin mikroskopik görüntüleri	46
Şekil 4.15.	Likofelon dozlarının 24 saat uygulanmasının ardından C6 hücrelerinin erken apoptotik hücre yüzdelerinin flow sitometrik yöntemle belirlenmesi	55
Şekil 4.16.	Kanserli glioma C6 hücrelerine 48 saat likofelon uygulanması sonrası ortaya çıkan erken apoptotik hücre yüzdeleri.	56
Şekil 4.17.	Transforme fibroblast hücrelerinde 24 saat likofelon dozlarının uygulanmasının ardından erken apoptotik hücre yüzdelerinin flow sitometrik yöntemle belirlenmesi	57
Şekil 4.18.	Likofelon dozlarının 48 saat uygulanması sonrası 5RP7 hücrelerinde erken apoptotik hücre yüzdelerinin belirlenmesi	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge no	Başlık	Sayfa
Çizelge 2.1.	Siklooksijenaz yolu ile oluşan prostanooidlerin biyolojik etkileri	7
Çizelge 4.1.	Likofelon ile 24 saat muamele edilen C6 hücrelerinde belirlenen apoptoz sonuçlarının pozitif kontrollerle karşılaştırılması	49
Çizelge 4.2.	Kanserli glia hücrelerinde 48 saat 150 µM likofelon uygulaması sonucu elde edilen apoptoz verilerinin kolçisin ve 5 florourasille karşılaştırılması	49
Çizelge 4.3.	Likofelon ile 24 saat muamele edilen C6 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdelerinin kolçisin ve 5-FU ile karşılaştırılması	50
Çizelge 4.4.	Kanserli glioma hücrelerinde apoptotik hücre oranlarının 48 saat ilaç uygulanmasından sonra karşılaştırılması	50
Çizelge 4.5.	Aynı dozlardaki ilaçlarla 24 saat muamele edilen C6 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdelerinin karşılaştırılması	51
Çizelge 4.6.	Likofelon ile 48 saat muamele edilen C6 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdelerinin kolçisin ve 5-FU ile karşılaştırılması	51
Çizelge 4.7.	Fibroblast kökenli 5RP7 hücrelerine 24 saat süreyle 150 µM likofelon uygulaması sonucunda elde edilen apoptotik hücre yüzdelerinin karşılaştırılması	52
Çizelge 4.8.	Transforme 5RP7 hücrelerinde 48 saat ilaç uygulaması sonrası apoptotik hücre yüzdelerinin karşılaştırılması	52
Çizelge 4.9.	5RP7 hücrelerinde 24 saat 200 µM likofelon uygulaması sonucu elde edilen apoptotik verilerin pozitif kontrollerle karşılaştırılması	53
Çizelge 4.10.	5RP7 hücrelerinin apoptotik hücre yüzdelerinin 48 saat ilaç uygulaması sonrası flow sitometrik olarak belirlenmesi	53
Çizelge 4.11.	Likofelon ile 24 saat muamele edilen fibroblastik 5RP7 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdelerinin kolçisin ve 5-FU ile karşılaştırılması.	54
Çizelge 4.12.	5RP7 hücrelerinde 48 saat 250 µM ilaç uygulaması sonrası flow sitometrik yöntemle belirlenen apoptotik hücre yüzdelerinin karşılaştırılması	54

SİMGE ve KISALTMALAR

- 5-FU 5-florourasil
- 5RP7 Ras transforme hücre hattı
- AIF Apoptoz uyarıcı faktör
- Apaf-1 Apoptoz aktive edici protein-1
- ATP Adenozin trifosfat
- bax bcl ilişkili x proteini
- BH bcl homoloğu
- BAD bcl ilişkili ölüm uyarıcısı protein
- cAMP Döngüsel adenozin monofosfat
- C6 Kanserli sıçan glioma hücre dizisi
- CLT Sitotoksik lenfosit
- COX Siklooksijenaz
- Cx Oksijenaz katalitik bölgesi,
- DFF-45 DNA fregmantasyon faktör- 45
- DHDMBF30 Dihidrofuran-30
- DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium
- DMSO Dimetil sülfoksit
- EP Prostaglandin E reseptörü
- FADD Fas ilişkili protein
- FasL Fas ligandı
- FCS Fetal dana serumu
- FITC Floresan izotiyosiyanat
- FLAP Lipoksijenaz aktive edici protein
- GDP Guanin difosfat
- GTP Guanin trifosfat
- HBSS Hank's balanced salt solution
- HCA-7 Kanserli kolon hücreleri
- HETE Hidroksieikosatrenoik asit

- HPETE Hidroperoksiieikosatetraenoik asit
- HT-29 İnsan kanserli kolon hücre dizisi
- IP3 İnositol trifosfat
- LOX Lipoksijenaz
- LT Lökotrien
- Mcl Miyeloid lösemi hücresi
- MSS Merkezi sinir sistemi
- MTT 3-(4,5-D-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue
- NK Doğal katil
- P21 Protein 21
- P53 Tümör protein 53
- PC Fosfatidilkolin
- PCR Polimeraz zincir reaksiyonu
- PE Fosfatidiletanolamin
- PG Prostaglandin
- PGG2 Döngüsel hidroperoksit
- PGHS Prostaglandin H sentaz
- PGI₂ Prostasiklin
- PLA2 Fosfolipaz A2
- Px Peroksidaz katalitik bölgesi
- PS Fosfatidilserin
- RIP Reseptör aracılı protein
- SODD Ölüm bölgesi susturucusu
- TGF Transforme edicici büyüme faktör
- TNF Tümör nekroz faktör
- TNFR1 TNF reseptörü-1
- TRAIL TNF- ilişkili apoptoz uyarıcı ligand
- Tx Tromboksan
- VEGF Damar endotel büyüme faktörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Merkezi sinir sisteminde (MSS) nöronların etrafını saran ve onları destekleyen hücre grubuna glia denmektedir. Glia hücreleri şekil olarak nöronlardan küçüktür ama sayı olarak nöronların 5-10 katıdır. Tüm beyin hacminin yaklaşık yarısını oluşturan glia hücreleri nöron gruplarını birbirinden ayırarak onları destekler ve korurlar. Beyindeki tümör oluşumundan birinci dereceden sorumlu olan glia hücreleridir (38,68).

Araşidonik asit zar fosfolipidlerine bağlı olarak zarda bulunan doymamış bir yağ asitidir. Özellikle beyin, kas ve karaciğerde bol miktarda bulunur. Hücre zarında bulunan araşidonik asit, çeşitli uyarıcılar sonucu aktif hale geçen sitoplazmik fosfolipaz A₂ enzimi ile hücre içine salınır. Siklooksijenazlar (COX) araşidonik asitten prostaglandinleri, tromboksanları ve prostasiklini oluştururken; lipoksijenazlar (LOX) araşidonik asitten lökotrienleri, hidroksieikozatetraenoik asiti ve lipoksinleri oluşturur (17,34). Araşidonik asitten oluşan ürünler fizyolojik olarak, beden ısısının düzenlenmesi, pıhtılaşma, doğum kontrolü, kan basıncının düzenlenmesi ve bağışıklık sistemi gibi birçok normal işlevde görev alırlar (23,26). Patolojik olarak ise bu lipid mediatörler astım, sedef, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve kanser gibi çeşitli hastalıklara neden olurlar (26,36,75,80). Klinik çalışmalarda COX ve LOX baskılayıcılarının potansiyel antikanser ilaçlar oldukları belirtilmiştir (11). Antiinflamator olarak kullanılan ilaçların bir grubu araşidonik asitin lipoksijenaz yolağını baskılamakta iken diğer bir grubu siklooksijenaz yolağını baskılamaktadır (36,80).

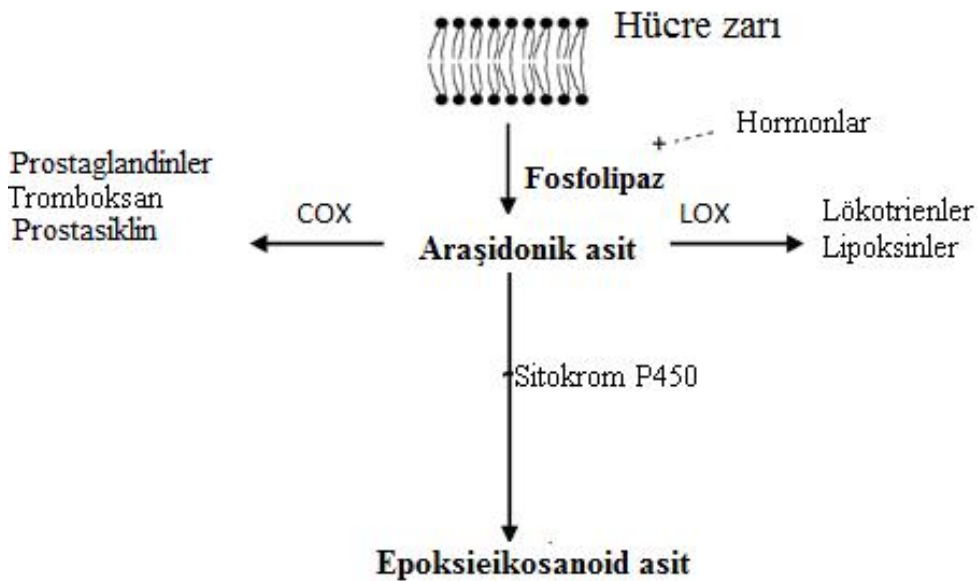
Likofelon hem LOX hem de COX yolağını baskılayan bir maddedir. Likofelonun metastatik kanserli prostat hücrelerinde lipoksijenazları baskılayarak kanserli hücre çoğalmasını engellediği; kolon kanseri (HCA-7) hücrelerinde ise mitokondrial yolak üzerinden hücrelerde apoptozu uyardığı gösterilmiştir (16,45).

Sıçan glioma hücrelerinde (C6) ve Ras onkogeni uyarılmış kanserli fibroblast hücrelerinde (5RP7) likofelonun çoğalmayı arttırıcı/baskılayıcı ve apoptozu uyarıcı/baskılayıcı etkileri olup olmadığına yönelik bilimsel bir veriye şu ana kadar rastlanılmadığından likofelonun bu hücrelerin çoğalmasını ve apoptozunu baskılayıcı ya da uyarıcı etkileri araştırılmıştır. Hücre canlılığına etkisi 3-(4,5-D-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide thyazolyl blue (MTT) ve tripan mavisi boyama yöntemiyle; apoptoz etkisi floresan izotiyociyanat (FITC) annexin V apoptoz belirleme kiti ile ölçülmüştür. Ayrıca çalışmamızda hücre çoğalmasını baskılayan ve antikanser etkinliği ispatlanmış olan kolçisin ile 5-florourasil pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Araşidonik asit metabolizması

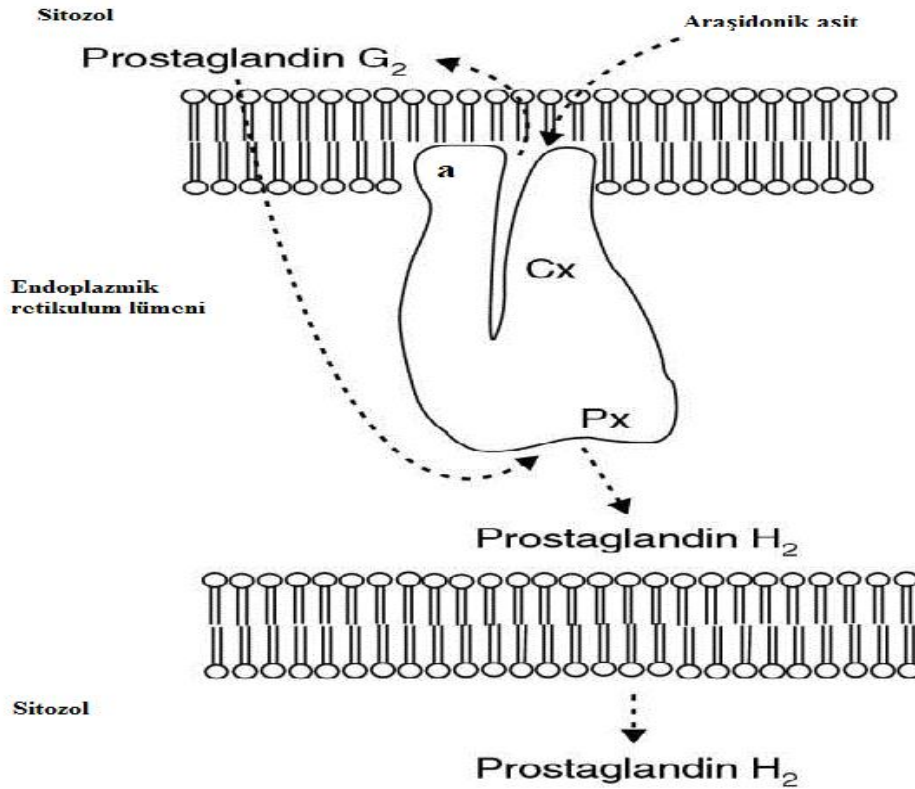
Besin yoluyla alınan linoleik asitten türeyen 20 karbonlu doymamış bir yağ asidi olan araşidonik asit hücre zarında fosfolipidlere ester şeklinde bağlı olarak bulunur (83). Hücrenin uyarılması sonucu (inflamatör uyarılar, sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar) aktif hale geçen sitoplazmik fosfolipaz A₂ enzimi ile fosfolipidler parçalanınca araşidonik asit açığa çıkar (34). Araşidonik asit parçalanması için bugün bilinen 3 temel yol vardır (şekil 2.1). Birincisi siklooksijenaz yoludur; prostaglandinler ve tromboksanları oluşturur. İkincisi lipoksijenaz yoludur; lökotrienler, hidroksieikozatetraenoik asitler ve lipoksinleri oluşturur. Üçüncü yol ise sitokrom P450 epoksijenaz yolu olup epoksitleri ve diolleri oluşturur (78,80). Topluca eikosanoid adı verilen araşidonik asit türevi bu maddeler otokrin ve parakrin etkilerle hücre fonksiyonunun düzenlenmesine katkıda bulunurlar (34,83). Ayrıca bu maddeler tümör hücrelerinin çoğalması ve yayılmasının uyarılması gibi bir çok fizyolojik ve patolojik olaylarda da etki gösterebilmektedir (17,23,67).



Şekil 2.1. : Araşidonik asit metabolizması (83)

2.1.1. Siklooksijenaz yolağı

Siklooksijenaz enzimleri endoplazmik retikulumun lümenine bakan kısmında ve çekirdek zarının iç yüzeyine yerleşmiş zar proteinleridir (61,80). Çekirdek zarında bulunan COX'ların rolü kesin olarak bilinmemektedir. Endoplazmik retikuluma bağlı COX enzim ailesi üyelerinin yapıları zara bağlanma bölgeleri ve katalitik bölgeleri olmak üzere iki ana kısımdan oluşurlar (şekil 2.2.). Katalitik bölgeleri siklooksijenaz ve peroksidaz katalitik bölgeleri olarak iki parçadan ibarettir. Siklooksijenaz bölgesi hücre zarından kopan araşidonik asitin bağlandığı ve araşidonik asitin oksitlendiği bölgedir. Bu bölgenin amino asit dizilimi hidrofobiktir. COX baskılayıcı ilaçların ana hedefi bu bölgeyi etkisiz hale getirmektir (84).



Şekil 2.2. Endoplazmik retikulumda bulunan siklooksijenaz enziminin yapısı (84)
a) Zara bağlanma bölgesi, Cx: Oksijenaz katalitik bölgesi, Px: Peroksidaz katalitik bölgesi

COX enzimin 1990 yılına kadar tek bir tipi olduğu düşünölmüşse de günümüzde bilinen üç izoformu bulunmaktadır; COX-1, COX-2 ve COX-3. Pek çok türde COX-1 ve COX-2'nin primer yapıları bilinmektedir. Glikoprotein yapısında olan COX-1 ve COX-2 sırasıyla 576 ve 587 amino asitten oluşur (12). Bu iki

izoform birbirine benzemesine rağmen, COX-1 endoplazmik retikulumun lümene bakan yüzeyinde, COX-2 ise çoğunlukla çekirdek zarında yerleşmiştir (1,80). Bu iki enzimin üç boyutlu yapıları X-ışınlarıyla belirlenmiştir. Benzer enzimler olmalarına rağmen COX-2 enziminin aktif bölgesi COX-1'den %20 daha büyüktür ve biraz daha farklıdır. Bu farklılık çoğunlukla amino asit dizilimindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır (36,80).

COX-1 ürünleri daha çok dokularda koruyucu etki gösterirken, COX-2 enziminin ürünleri genelde COX-1'e zıt etki göstermektedir. Bir anlamda COX-1'in fizyolojik, COX-2'nin ise patolojik bir enzim olduğu söylenebilir (17). Sağlıklı bireylerde COX-2 enzimi yapımı yok denecek kadar azken sitokinler, büyüme faktörleri, tümör yapıcı ajanlar, bakteriyel endotoksinler, inflamasyon sırasında salınan interlökin-1, tümör nekrosis faktör (TNF) ve lipopolisakkarit gibi uyarılarla hızla yapımı ve salınımı artar (1,17,36). COX-2 ürünü olan prostaglandinler inflammatör tepkimelerde ana rolü oynarlar. Kolorektal ve meme kanseri gibi bazı kanser türlerinde de COX-2'nin uyardığı ve oluşturduğu prostaglandinlerle hücrenin apoptozunu engellediği ve hatta kanserli hücrelerin çoğalmasını teşvik ettikleri görülmüştür. COX-2 enzim sentezinin kanserli bağırsak, pankreas, akciğer ve bazı hematolojik kanser (lenfoma ve akut promonotik lösemi) hücrelerinde arttığı belirtilmektedir. Ayrıca Alzheimer ve Parkinson hastalarının beyinlerindeki plaklarda da COX-2 nin uyarıldığı saptanmıştır (12,24,69).

COX-1 enzimi bedende bir çok dokuda bulunmaktadır. Özellikle endotel hücrelerinde, monositlerde, kan pulcuklarında, böbrek toplayıcı kanallarında ve seminal veziküllerde yüksek düzeyde bulunmaktadır (17,63). Hücre dizilerinde COX-1 enzim sentezinin hücre farklılaşması sırasında arttığı gösterilmiştir. COX-1 doku homeostasisinde hücre çoğalmasından yeni damar oluşumuna kadar bir çok fizyolojik olayda görev almaktadır (63,69). COX-3 enzimi yeni keşfedildiği için hücre çoğalması etkisi üzerine yeterli bilgi yoktur (16). Ancak beyinde ve kalpte yüksek düzeylerde bulunduğu gösterilmiştir (61,69).

COX baskılayıcıları, COX enziminin aktif bölgesiyle etkileşmek için araşidonik asit ile yarışır. Bir çok anti-inflamatör ilacın hedefi COX-1 ve COX-2 enzimlerinin etkilerini baskılamaktır. COX enzimlerinin baskılanması inflamasyonu ve araşidonik asit metabolizmasını azaltır (26,80).

Siklooksijenaz enzimi ya da diğer adıyla prostaglandin endoperoksit H sentaz zar bağımlı bir enzimdir (80). Siklooksijenasyon ve peroksidasyon olarak bilinen ve prostaglandinlerle tromboksanların (Tx) oluşumuyla sonuçlanan prostaglandin sentez yolağındaki ilk iki basamağı katalizler (26,36). Fosfolipaz A₂ enzimi ile açığa çıkan araşidonik asite, COX iki molekül oksijen katarak döngüsel hidroperoksiti (PGG₂) oluşturmaktadır. Ardından COX, PGG₂'yi PGH₂'ye indirgemektedir. Biyosentezde yer alan PGH₂ dayanıksız bir endoperoksit olduğu için dokularda bazı sentaz ve izomerazlar tarafından genel adı prostanoid olan PGE₂, PGF₂, PGD₂, PGI₂ (prostasiklin) ve tromboksan A₂ (TxA₂) 'ye dönüştürülmektedir (34). Prostanoidler, otokrin ve parakrin fonksiyonlara sahip olmalarından dolayı yerel hormonlar olarak değerlendirilmektedir. Hücrede sentezlenen prostanoid hücreden çıktıktan sonra hedef hücrede G protein ilişkili reseptörüne bağlanarak ikinci haberciler üzerinden ya da doğrudan çekirdekteki reseptörler üzerinden etki gösterirler. Bugün bilinen en azından dokuz adet G protein ilişkili prostanoid reseptörü vardır (63,69). Prostanoidlerin bilinen en temel fonksiyonları doku hasarında ve inflamasyonda bedenin yanıt vermesine aracılık etmektedir. Ayrıca, hücre çoğalmasını uyararak kansere yol açtıkları da bilinmektedir (84). PGE₂ ve PGI₂ histamin ve bradikinin gibi otokoidler ile sinerji oluşturarak güçlü damar genişletici etki gösterirler. Hasar gören bölgede kılcal damarlarda kan akımını ve damar geçirgenliğini arttırarak inflamasyona katkıda bulunurlar (36,80). Aynı zamanda duyuşal liflerdeki periferik uçları duyarlaştırarak hiperaljezi oluştururlar. Prostanoidlerin belli başlı diğer işlevleri Çizelge 1'de özetlenmiştir (22,30,36,63,69,84).

COX-2'nin aşırı yapım ya da uyarımı özellikle PGE₂'nin aşırı yapım ve salınımı ile ilişkilidir. PGE₂, COX metabolizmasının ana ürünüdür. PGE₂'nin hücre çoğalmasını, tümör büyümesinde yeni damar oluşumunu ve anti-apoptotik Bcl-2 ve

Bcl-xL proteinlerinin yapımını arttırdığı ve bunun sonucunda hücre ölümünü azaltarak tümör büyümesine yol açtığı gösterilmiştir (69). PGE₂, nöronları da etkileyerek ateş, yorgunluk ve ağrıda aşırı duyarlılığa neden olur (65). PGE₂ hücre zarında bulunan prostaglandin E (EP) reseptörlerine bağlanır. Bugün bilinen en az 4 tip G protein ilişkili EP reseptörü vardır. EP1, fosfolipaz C-inositoltrifosfat (IP3) yolağını ve EP2 ve EP4 adenilsiklaz-cAMP yolağını uyarırken; EP3, cAMP yolağını baskılayarak etki gösterir. Bu farklı yollar, reseptör türüne bağlı olarak hücrelerde neden farklı etkilerin ortaya çıktığını açıklamaktadır (69).

Çizelge 2.1: Siklooksijenaz yolu ile oluşan prostanoidlerin biyolojik etkileri

Prostanoid	Bulunduğu Yer	Görevi
TXA ₂	Kan pulcukları ve monositler	Kan pulcukları kümelenmesi, bronş daralması, hücre çoğalması ve damar daralması.
PGI ₂	Endotel	Kan pulcukları yapışmasının baskılanması, arteryal hücrelerden kolesterol sızması, damar genişlemesi ve bronş genişlemesi.
PGD ₂	Mast hücreleri, beyin	Bronkospazm, alerjik astım, uyku, kan pulcukları kümelenmesinin baskılanması.
PGE ₂	Böbrek medullası, mide mukozası, kan pulcukları, endotel, beyin	Sodyum geri emiliminin azalması, uterus kasılması, lenfosit fonksiyonu, bronş genişlemesi, ateş düzenlenmesi, beyin fonksiyonu.
PGF ₂	Beyin, uterus	Bronş ve uterus kasılması, doğum

2.1.2. Lipoksijenaz yolağı

Lipoksijenaz (LOX), bitki ve hayvanlarda bulunan bir lipit peroksidaz enzimdir. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu katalizler. Bugüne kadar insanda 3 ana izoenzimi bulunmuştur. Bunlar 5-LOX, 12-LOX ve 15-LOX'dur. Bunlar araşidonik asitin sırasıyla 5, 12 ve 15'inci karbonlarına oksijen bağlayarak sırasıyla 5-hidroperoksieikosatetraenoik asiti (5-HPETE), 12-HPETE ve 15-HPETE'yi oluştururlar. Glutasyon peroksidaz enzimi ile de sırasıyla 5-hidroksieikosatrenoik asit (5-HETE), 12-HETE ve 15 HETE oluşur. 12-LOX ve 15-LOX enzimlerinin fonksiyonları hakkında günümüzde yeteri kadar bilgi yoktur. Ancak 5-LOX enzimi üzerinde ciddi çalışmalar yapıldığından en önemli LOX enzimi olarak kabul edilir. 5-LOX enzimi özellikle lökotrienlerin üretilmesinde görev alır (11,24,44). 5-LOX enzimi stoplazmada ve çekirdekte bulunur. Hücreye uyarı geldiğinde stoplazmada ve çekirdekte bulunan 5-LOX enzimi çekirdek zarına yerleşir ve enzimatik etkisini burada fosfolipaz A₂ enzimin etkisiyle hücre zarından açığa çıkan araşidonik asit üzerinden gösterir. 5-LOX enziminin aktivasyonunda beş lipoksijenaz aktive edici proteinin (5-FLAP) de katkısı büyüktür. Endoplazmik retikulumla ilişkili olarak çekirdek zarında bulunan 5-FLAP, 5-LOX enziminin çekirdek zarına ve araşidonik asite bağlanmasına aracılık eder. Lökotrienlerin yapımı sırasında Ca⁺⁺ ve ATP bağımlı süreç doğrultusunda 5-LOX enzimi aktive olur. (63,79)

Aktive olan 5-LOX iki ayrı etki ile araşidonik asitten önce çok kısa bir yarılanma süresine sahip 5-HPETE'yi oluşturur. 5-HPETE'den de 5-HETE oluşur. 5-HETE, LOX enzimi ile epoksi lökotrien A₄'e (LTA₄) dönüşür (34). Lökotrien A₄ bütün lökotrienlerin sentezinde ortak ara basamaktır (17,60). LTA₄ ya hidrolaz enzimi ile dihidroksil asit LTB₄'e dönüşür ya da sentaz enzimi ile LTC₄'e dönüşür. LTC₄ de glutamil transferaz enzimi ile LTD₄'e dönüşür. LTD₄ de dipeptidaz enzimi ile LTE₄'e dönüşür (24).

Prostanoidlerin aksine lökotrienler çoğunlukla inflamasyona uğramış hücreler tarafından sentezlenir. Lökotrienler parakrin hormonlardır ve G protein aracılı

haberleşme sistemi ile etkilerini gösterirler. LTB₄, nötrofil, makrofaj ve eozonofil gibi inflamatörü yok edici hücreler için kuvvetli bir kemotaktik araçtır. İnflamasyonlu bölgeye doğru lökosit göçüne aracılık eder. Diğer lökotrienler (LTC₄, LTD₄ ve LTE₄) hızla gelişen aşırı duyarlılık reaksiyonları, solunum yolları düz kaslarının kasılması, eozonofiller için kemotaktik etki sağlaması gibi bir çok biyolojik olayda görev almaktadır (50). Kuvvetli proinflamatuvar özellikteki LTB₄ ve diğer LT'ler astım, alerjik ve inflamatuvar rahatsızlıklar gibi çeşitli hastalıklara neden olurlar. Bu nedenle LOX baskılayıcıları ile bu etkilerin baskılanması klinik olarak hedeflenmektedir (54).

2.1.3. COX ve LOX baskılanması

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize edilen sonucu bazı kanser tipleri için ölüme kadar giden ve bu nedenle tedavisi en çok araştırılan ve çok çeşitli yöntemler denenilen bir hastalıktır (39,59). Kanser önlenmesine ve tedavisine yönelik çalışmaların ortak hedefleri kanserli hücrelerin çoğalmasını durdurmak, yaşamlarını sona erdirmek ve yeni damar oluşumunu engellemektir (34). Kanser tedavisinde kullanılan yöntemleri 3 ana başlık altında toplamak mümkündür: Cerrahi girişim, ilaçla ve ışınla tedavi. Kanser kemoterapisinde kullanılacak ilaçlarla tümörün büyümesini ve yayılmasını engellemek ve daha sonraki aşamalarda tümörün ortadan tamamen kaldırılması hedeflenmektedir (37). Genel olarak bu ilaçların sadece kanser hücrelerine etki etmesi istenir ancak bu tip ilaçlar kanser hücrelerine seçici özellik gösterememekte ve sağlıklı normal hücreler üzerinde de etki göstermektedir. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılan ilaçların önemli yan etkileri olduğundan ilaçlar üzerinde yapılan çalışmalar hızla artmaktadır (38,39,59).

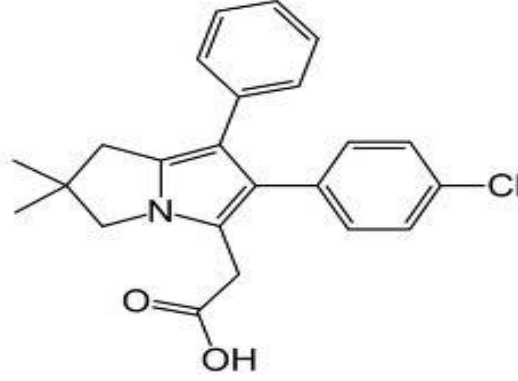
Kronik inflamasyonda etkin hale geçen moleküler yolakların kanser oluşumuna katkıda bulunduğuna yönelik kanıtlar giderek artmaktadır (34). COX ve LOX enzimlerinin aşırı sentez ve salınımı kanserle eşleştirilmektedir. Kanserli akciğer hücreleri ile yapılan bir çalışmada COX-2'nin aşırı şekilde sentez ve salınımı

bir yandan hücrelerin büyümesini ve yeni damar oluşumunu uyarırken bir yandan da hücrelerin apoptoza uğramasını engellemektedir. Benzer şekilde seçici COX-2 enzim baskılayıcıları akciğer kanser hücre dizisinde hücrelerin büyümesini azaltırken hücrelerin apoptozunu da uyardığı gösterilmiştir (72). Yine COX baskılayıcılar ile bağırsak kanserinin engellendiği de gösterilmiştir (80). COX ve LOX enzim yolları hücre çoğalması ve yeni damar oluşumunda anahtar düzenleyicilerdir. Kanserli bağırsak, akciğer, meme, pankreas, prostat, glia hücrelerinde COX ve LOX enzim yapımının arttığı ve bu artışa bağlı olarak yapımları artan eikosanoidlerin hücrelerde çoğalmayı uyardığı ve apoptosizi engellediği gösterilmiştir (17,34,63,72,75,80). Bu nedenle, COX ve LOX baskılayıcı ilaçlar potansiyel anti-kanser ilaçlar olarak kanser tedavisinde kullanılmaktadır (63). Antiinflamator ilaçlarda hedef COX ve LOX enzimlerinin baskılanmasıdır. Bu ilaçlardan bir tanesi olan aspirin ilk olarak 1899 yılında kullanılmaya başlanmış ve zamanla ibuprofen, diklofenak ve naproksen gibi çeşitli antiinflamator ilaçlar piyasaya sürülmüştür. Bu ilaçların tedavi etkilerinin yanı sıra sindirim sistemi ve boşaltım sistemi üzerine olumsuz etkileri vardır (24,72.). Klasik COX-1 baskılayıcı ilaçlar mide ve böbreklerdeki fizyolojik prostaglandinlerin sentezini baskılayarak mide ve böbrekte hasara yol açarken, COX-2 baskılanması ile de hasarlı dokuda proinflamator prostaglandinlerin üretimini düşürerek antiinflamator etki gösterirler. Bu nedenle seçici COX-2 baskılayıcı ilaçların kullanımı yan etkilerinin daha az olmasından dolayı günümüzde hızla artmaktadır. Bu ilaçlar özellikle COX-2'nin karışmış olduğu bazı kanser tiplerinde ve Alzheimer hastalığında kullanılmaktadır (24,80). Ancak, seçici COX-2 baskılayıcı ilaçlar, özellikle mide ülserlerinin iyileşmesinde, inflamator bağırsak hastalıklarında ve böbreğin hemodinamik fonksiyonlarında rol alan COX-1 uyarımı ile oluşan yararlı prostaglandinlerini de baskılamasından dolayı diğer COX baskılayıcı ilaçlar gibi olumsuz etki yapabilmektedir. Bu nedenle son yıllarda COX-2 enziminin mide mukozasının korunması, böbrek fonksiyonunun düzenlenmesi ve endotel prostaglandin oluşumu gibi fizyolojik rollerine ilişkin bilgilerin giderek artmasından dolayı COX-2 seçici baskılayıcıların yararlarının sorgulanmasına neden olmuştur. Benzer şekilde COX baskılanması sonucu damar genişletici ve mide koruyucu prostaglandinlerin sentezi azalırken, lipoksijenaz yolağı ile lökotrienlerin

arttığı bildirilmiştir. Bunun temel nedeni COX baskılanması sonucu 5-LOX enziminin sentez ve salınımının artışıdır. Bu nedenle prostaglandin ve lökotrienlerin birlikte baskılanmasının daha güçlü bir antiinflamator etki yaratacağı ve iki yönlü baskılamanın sindirim sistemi üzerindeki olumsuz etkileri ortadan kaldıracağı düşünüldüğünden iki yönlü baskılayıcılar geliştirilmiştir. Bu iki yönlü baskılayıcıların çeşitli kanser tiplerinin ve sinir sistemi hastalarının tedavisinde umut olacağı düşünülmektedir. Bu bileşiklerden en ileri aşamadaki iki yönlü baskılayıcılardan birisi olan likofelon osteoartrit tedavisinde etkinliği ve sindirim sistemi üzerindeki güvenilirliği kanıtlanmış bir ilaçtır (19,20,24).

2.2. Likofelon

Sadece COX enzim yolağını baskılayan ilaçlara göre hem COX hem de LOX yolağını birlikte baskılayan ilaçların klinik yararları olduğu düşünülmektedir. İnflamasyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen molekül ağırlığı 379.879 g/mol ve formülü $C_{23}H_{22}ClNO_2$ olan likofelon 2,2-dimetil-6-(4-clorofenil)-7-fenil-2,3-dihidro-1H-prazolin-5-asetik asit siklooksijenaz ve 5-lipoksijenaz yolaklarının her ikisini de baskılayan en önemli ilaçlardan birisidir (şekil 2.3). Likofelon sindirim sistemi üzerine yan etkisi olmaksızın ağrı kesici, anti-inflamatör ve anti-astımatik etkiler göstermektedir (16,47). Likofelonun hücre çoğalması etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, likofelon doza ve zamana bağlı olarak kanserli kolon hücrelerinde apoptozu uyarıcı ve kanser baskılayıcı etki göstermiştir. Likofelonun bu apoptoz etkisinin araşidonik asitten bağımsız olarak mitokondriden salınan sitokrom c aracılı kaspaz 3 ve 9 uyarımı ile olduğu belirtilmiştir. Ayrıca likofelon apoptoz uyarıcı etkisi düşük olan proteinlerin apoptoz uyarıcı etkisi daha yüksek olan proteinlere dönüşümünü de uyarmaktadır (73). Benzer şekilde başka bir çalışmada likofelonun kanserli prostat hücrelerinde COX and LOX yolaklarını baskılayarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (57).



Şekil 2.3. Likofelonun kimyasal yapısı

2.3. Hücre ölümü: Nekroz ve apoptoz

Çok hücreli canlıların ömürleri boyunca döllenmeden başlayarak mitoz, farklılaşma ve ölüm olayları büyük önem taşır. Bir hücrenin yaşaması, bölünmesi, farklılaşması ya da ölmesi konusundaki kararı hücre içi ve dışından gelen uyarılar belirler. Hücre ölümü genellikle apoptoz veya nekroz şeklinde olmaktadır (35,40).

Nekroz mekanik bir hasardan ya da toksik kimyasal ajanlara maruz kalmaktan ileri gelir. Nekrozda, akut hücre hasarını takiben hücre ve organellerinin şişip parçalandığı pasif ve patolojik bir hücre ölümü söz konusudur. Nekroz, dış güçlerin etkisi ile koruyucu mekanizmaların devreye girmesine fırsat vermeyecek şekilde gelişir. Nekrozda zarar gören esas hedef organel, hücrenin enerji kaynağı olan mitokondridir. Nekrozda hasarlanan hücre zarının geçirgenliği değişir ve iyon-madde-sıvı alışveriş dengesi bozulur. Hücre başta mitokondri gibi organeller olmak üzere şişer ve parçalanır. Nekroz sırasında hücrenin su ile şişerek patlaması sonucu parçalanan hücrelerin parçaları ve salgı ürünleri (prostaglandinler, serotonin, histamin gibi) kemotaktik etki yaparak inflamasyona yol açan süreci başlatır (46,62,78).

Apoptoz ise fizyolojik ya da patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş veya potansiyel olarak neoplastik hücrelerin uzaklaştırılması için başvurulan bir hücre intihar mekanizmasıdır. Bu içsel intihar formunun temelinde genetik mekanizma vardır (35,40). Apoptozis ilk kez 1885’de Flemming tarafından gözlenmiş ve bu durum kromatolizis olarak isimlendirilmiştir. Flemming memelilerin yumurta hücreleri üzerinde çalışmış ve foliküllerin epitelyum hattındaki hücrelerde çekirdeğin yıkıma uğradığını ve sonunda ortadan kaybolduğunu gözlemiştir. O yıllarda kromatolizis kavramı farklı araştırmacılar tarafından farklı şekillerde kullanılmıştır (21). Bir çok araştırmacı embriyodaki fizyolojik hücre ölümünü kromatolizise dayandırmıştır. Hücre çekirdeğinin ve sitoplazmanın sıvı kaybıyla küçüldüğünü, nükleer boyalar için çekiciliğin yitirildiğini, çekirdeğin indirgenip ortadan kaybolduğunu ve daha sonra hasar gören hücrenin komşusu tarafından fagosite edildiğini belirtmiştir. 1950’lerin sonlarına doğru lizozomlardan kaynaklanan hücre intiharı fikri ortaya atılmıştır. Hücrelerin kendi içlerinde intihar çantaları gibi rol oynayan lizozomların patlamasıyla öldükleri belirtilmiştir. 1960’larda serbest radikal patolojisi terimi ortaya çıkmış ve hücrel organellere zarar verebilen serbest radikallerin intrasellüler salınımının hücre intiharının belirmesinde rol oynadığını belirtmiştir (15,21). İlk kez Kerr ve arkadaşları tarafından 1972’de tanımlanan programlı hücre ölümünün ya da apoptozun, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir görevi olduğu ortaya konmuştur (47). Kerr ve arkadaşları hücre ölümlerini incelerken bazı hücrelerin daha küçük parçalara dönüştüğünü ve bunların da makrofajlar tarafından fagosite edildiğini göstermişler ve Yunanca yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz demişlerdir. Başka bir deyişle apoptoz hücrelerin kendilerinde varolan intihar programını devreye sokarak programlı bir şekilde, çevreye hiç zarar vermeden yaşamlarını bitirmelerine denir (21, 43,53).

Apoptoz nekrozdan farklı olarak aktif işlev gerektiren genetik kontrollü bir süreçtir. Apoptoz sırasında hücre büzülür ve 1 saatten kısa bir sürede hacminin %30’nu kaybeder. Apoptoz, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan ilişkinin kaybolması ile karakterizedir. Hücrel büzüşmenin nedeni, Na, K, Cl

taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarım alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovilusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle hücre zarının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur; bu yapı "**zeiozis**" olarak tanımlanır. Mitokondri morfolojik olarak sağlamdır ve burada esas hasarlanan hedef organel, çekirdektir. Plazma ve çekirdek yoğunlaşmasını takiben kromatinin kümelenmesi şekillenir. Kromatindeki değişikliklerin başlamasının hemen öncesinde sitozolik Ca^{++} düzeyinde önemli bir artış olmaktadır. DNA parçalanmasının kalsiyum artışına duyarlı endonükleazlar ile olduğu ileri sürülmektedir. Çekirdekte kromatin yoğunlaşır ve DNA parçalanır. Hücrenin parçalanmasıyla çekirdek içeriğini içeren zarla çevrili "apoptotik cisimcikler" oluşur ve bunlar çevredeki hücreler tarafından fagositozla ortamdaki uzaklaştırılırlar (47,62).

İki katlı lipit tabakada fosfolipit asimetrisi, hücre zarının bir özelliğidir. Hücre zarı iç tabakasında bulunan fosfatidilserin (PS) ile fosfatidiletanolamin (PE) ve dış tabakada bulunan fosfatidilkolin (PC) asimetrik olarak dağılmışlardır (9,35). Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz enzimiyle aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu PS'nin iç sıra lipit tabakadan dış sıra tabakaya yerleşmesi ile sonuçlanır. Bu durum, apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyardırmaz, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler (47,78).

2.3.1. Apoptozun uyarılması

Programlı hücre ölümünün moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli patofizyolojik ve oksidatif stres gibi olaylarla başlatılmasıdır. Apoptozu etkileyen uyarıların bazıları şu şekilde sıralanabilir: Büyüme faktörlerinin azalması, hücre içi kalsiyum düzeyindeki artış, tümör nekroz faktör (TNF), transforme edici büyüme faktörü (TGF-B), Fas/FasL sisteminin uyarılmaları, DNA hasarı nedeniyle bir tümör

baskılayıcı gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyal enfeksiyonlar ve glukokortikoidler. Ayrıca yüksek ateş, radyasyon, hücrel toksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de hafif dozlarda apoptoz oluştururlar (62,78)

Apoptotik hücre ölüm programı, 4 ana çerçeveye dayanır; Bcl-2 ailesi proteinleri, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1, p53 geni ve kaspazlar (35). Bu anahtar bileşenlerin biyokimyasal olarak uyarılması, apoptozda gözlenen morfolojik değişikliklerden, mitokondriyal hasardan, çekirdek zarı kırılmalarından, DNA parçalanmasından, kromatin yoğunlaşmasından ve apoptotik cisimciklerin şekillenmesinden sorumludur. Ayrıca sinir hücre hasarı, otoimmünite, kalp hastalıkları, kanser ve diğer bozukluklar gibi geniş bir alana yayılan hastalıkların patogenezi apoptozun kötü düzenlenmesi ile ilişkilidir (9,47). Değişik hücre tiplerinde farklı çevresel uyarılar apoptozisi başlatabilir. Hemen hemen tüm hücrelerde radyasyon, inflamatuvar sitokinler, oksidatif stres, redoks potansiyelinde değişiklikler, büyüme faktörleri veya trofik faktörlerin ortamdaki kaybolması, mekanik stres, enerji dengesinin bozulması ve yaşlanma apoptozu başlatabilmektedir. Apoptoz reaktif oksijen radikalleri ile de uyarılabilir. Apoptozis sırasında çeşitli genlerin kodladığı bazı proteinler hücre içinde aktif veya inaktif hale gelirler (47).

2.3.1.1. Apoptozu düzenleyen proteinler

Apoptozun düzenlenmesi Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1 gibi apoptoz baskılayıcısıdır (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır. Proapoptotik genler: Bax (Bax, Bak ve Bok) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bad, Bid gibi) olmak üzere iki alt aileye sahiptir. Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışırlar. Örneğin; Bcl-2 nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2 oranının

daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir. Bu yüzden Bcl2/Bax" oranı "death switch" (ölüm anahtarı) olarak değerlendirilmektedir. Hücrenin yaşamı ya da ölümü konusundaki son yıllardaki araştırmalar dikkatleri mitokondri üzerinde toplamıştır (28,62). Mitokondriler çift zarlı organellerdir. Bcl-2, 24-26 kDa'luk protein kodlayan bir proto-onkogendir ve ürettiği protein, mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek zarında yerleşmiştir. Bu proteinler iyon alışverişini düzenler ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu etki yaparlar. Özellikle anti-apoptotik genler içinde yer alan Bcl-xL'in mitokondriyal hasarı engelleyerek mitokondriyi koruduğu ileri sürülmektedir. Bu sayede apoptoz baskılanması gerçekleşmektedir. Bax proteinleri sitoplazmada da bulunur. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarına doğru yönelirler ve buraya bağlanırlar (78). Bu bağlanma, seçici iyon geçirgenliğini azaltabilir ya da bozar. Bazı araştırmacılar da zarda delik açtığını düşünmektedirler. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve apoptoz uyarıcı faktör (apoptosis inducing factor, AIF) gibi mitokondri zarları arasında yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF, doğrudan kromatin yoğunlaşması ve parçalanmaya başlamış olan çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplazmadaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır (4, 25). Sitokrom c, elektron taşıma sisteminin önemli bir üyesidir. Normalde mitokondri iç ve dış zarı arasında bulunur. Salınımı Bcl2 tarafından engellenir. Sitokrom c'nin apoptotik süreçteki görevi kaspaz aktivasyonunda ko-faktör olarak görev yapmasıdır. Sitokrom c, bir sitoplazma proteini olan apoptoz aktive edici protein-1'in (Apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) aktivatörüdür. Sitokrom c'nin Apaf-1 'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks "apoptosom" olarak isimlendirilir (25). Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu (özellikle kaspaz 3, 6, 7) başlatır . Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu olay apoptozun neden enerjiye gereksinim duyduğunu açıklamaktadır (6, 81).

2.3.1.2. Apoptozda p53'ün katkısı

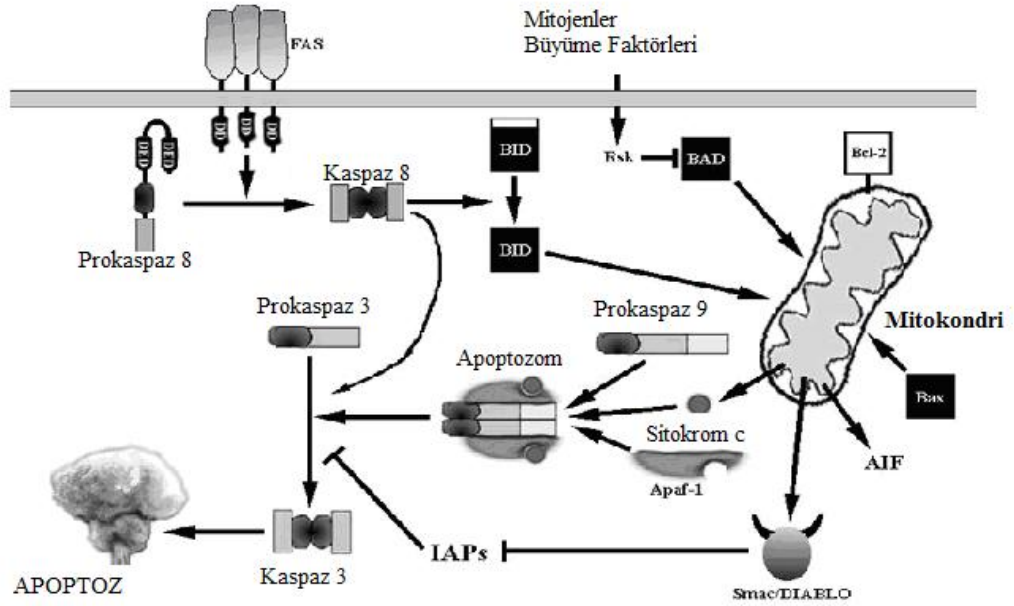
İnsanda apoptozun düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir (81). Bir tümör baskılayıcı gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre ömrü uzar (62). Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon düzenleyici geni olan p53'ü aktive eder. p53 geninin hücre büyümesini ve hücre bölünmesini azaltıcı önemli görevleri vardır. Hücre hasarında bu gen ürünü fosfoprotein, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G1'de hücre döngüsünü durudurur, tamir için gerekli zamanı kazandırır ya da hasar fazlaysa hücreyi apoptoza yönlendirir (55, 66). Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği de düşünülmektedir (28,52).

2.3.1.3. Ölüm reseptörleri ve adaptör proteinler

Ölüm reseptörleri TNF reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptörler ölüm bölgesi adı verilen bir amino asit dizisi içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar (62). Hücreye uyarı gelmediği sürece bu bölge ölüm bölgesi susturucusu (SODD) proteini ile kapalı tutulur, fakat apoptotik uyarı olursa SODD buradan ayrılır. CD95 (APO-1/Fas), TNF- ilişkili apoptoz uyarıcı ligand-R1 (TRAIL-R1), TRAIL-R2, TNF-R1, DR3 ve DR6 diye bilinen altı tane ölüm reseptörü vardır. Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) karaciğerde bol miktarda bulunur. Fas ligandı (FasL), TNF ailesinin bir üyesidir. Özellikle sitotoksik T hücreleri ve doğal katil hücreleri üzerinde bulunur. FasL'nin, Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik işlem başlar. Fas'ın sitoplazmik bölümü ölüm bölgesi Fas ilişkili protein (FADD) ve reseptör aracılı protein (RIP) ile etkileşimdedir. FADD ve RIP'in aktivasyonu ile başlatıcı kaspazlar 8 ve 10 aktive olur. Bu başlatıcı kaspazlar cellat kaspazlar diye bilinen 3, 6 ve 7'yi aktive eder. Ayrıca kaspazlar ve aktive olan DNazlar aracılığı ile de DNA yıkımına neden olur (62,78).

2.3.1.4. Kaspazlar

Apoptotik programın merkez bileşeni olan kaspazlar hücre parçalanmasını sağlayan proteolitik enzimlerdir. Kaspaz aktivasyonu her hücreye özgüdür. Tüm hücrelerde inaktif pro-enzim halinde bulunurlar. Sitokrom c'nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar şekil 2.4'de gösterildiği gibi aktive olur (55). Uyarılmış kaspaz, bir proteaz aktivasyon dizisi başlatarak bir yandan sitoplazmik proteinlerin yıkımında rol alırken bir yandan da nukleazları aktive ederek DNA ve RNA yıkımını gerçekleştirmektedir. Kaspaz baskılayıcılarının kaspazları baskılayarak apoptozu engellediği gösterilmiştir (33,52).



Şekil 2.4.: Kaspaz aktivasyonu (78)

Kaspazların etki ettiği bazı yapılar aşağıda kısaca belirtilmiştir. Poliadenin difosfat riboz polimeraz: DNA hasarı, replikasyon ve transkripsiyonda görev alan bu molekül kaspazlarla yıkılınca DNA hasarı giderilemez ve replikasyon gerçekleşmez (31). Laminler: Çekirdek zarının bütünlüğünü sağlayan proteinlerdir. Kaspazlarla lamin yıkılınca zar yapısı bozulur (7). DNA fragmentasyon faktör- 45 (DFF-45): DNA'nın parçalanmasına neden olan nükleazları baskılar. Kaspazlar DFF-45'i

yıkınca nüklezlar DNA'yı parçalar (51). DNA protein kinaz (DNA-PK): DNA iplikçiklerinde oluşan kırıkları gideren bu enzimi de kaspazlar parçalar (49). Fodrin: Hücre iskelet proteinidir. Aktin ve ankriinle bağlantısı vardır. Kaspaz bu proteini parçalayınca hücrenin küçük veziküllere ayrılma işlemleri başlamış olur (71).

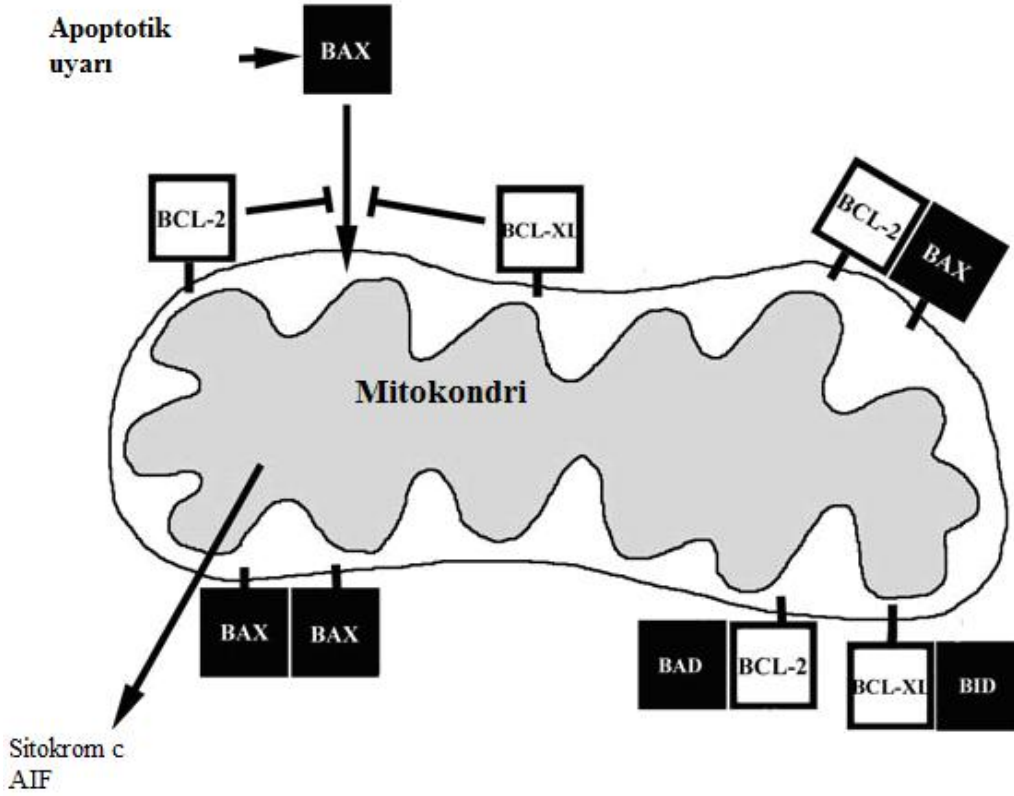
2.3.2. Apoptozun mekanizması: Bu süreç kısaca dört ana başlık altında toplanabilir: Hücre dışı uyaranlarla apoptoz, hücre içi uyaranlarla apoptoz, AIF uyarımlı apoptoz ve sitotoksik düzenleme.

2.3.2.1. Hücre dışı uyaranlarla apoptoz

Fas ve TNF reseptörleri hücre zarında bulunan reseptörlerdir ve bunlara bağlanan Fas ve TNF'nin hücreyi apoptoza sürüklemesinden dolayı bunlara ölüm reseptörleri de denir. Bağlanma kaspaz 8'i ve kaspaz 10'u aktive eder. Kaspaz 8 de diğer kaspazları aktive ettiği gibi kendisi de proteinleri yıkıcı görev alır (41).

2.3.2.2. Hücre içi uyaranlarla apoptoz

Apoptoz sinyali hücre içinden kaynaklanabilir. Sağlıklı hücrelerin mitokondri dışı zarında Bcl-2 ailesi proteinleri yer alır. Hücreye içeriden bir stres söz konusu olursa örneğin reaktif oksijen türevleriyle Bax proteini uyarılır. Uyarılmış olan Bax da mitokondri zarını delerek sitokrom c'nin dışarı çıkmasına neden olur (Şekil 2.5). Sitokrom c ATP aracılığıyla Apaf-1'e bağlanır, oluşan apoptosom kaspaz 9'u aktive eder. Kaspaz 9 da kendisi hücresel proteinleri parçaladığı gibi diğer kaspazlardan 3, 6 ve 7'yi de aktive eder. Kaspazlar yapısal proteinleri ve DNA'yı parçalar (14).



Şekil 2.5.: Apoptoz uyarımı sonrası stoplazmaya AIF ve sitokrom c salınımı (78)

2.3.2.3. AIF uyarımlı apoptoz

Bazı hücrelerde ve nöronlarda farklı bir apoptotik mekanizma vardır. Kaspazları kullanmazlar. AIF mitokondrinin iç ile dış zarı arasındaki boşlukta bulunur. Hücreye ölüm uyarısı geldiğinde AIF mitokondriden salınır ve çekirdeğe giderek DNA'ya bağlanır ve onu parçalar. Ayrıca bazı hücreler de kaspazları kullanmadan çeşitli proteazları, endonükleaz G, kalpain ve katepsinleri kullanarak apoptosize uğrarlar (14,41).

2.3.2.4. Apoptozun sitotoksik düzenlenmesi (Granzim veya Perforin Sistemi)

Bu salgısal apoptotik yol, patojenle enfekte olmuş hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkilidir. Perforinler ve granzimler, sitotoksik T lenfositlerinin (CTL) ve doğal katil (NK) hücrelerinin sitoplazmik salgı granülleri içinde bulunan proteinlerdir. Bir CTL hedef hücreye bağlandığında, CTL perforinler

salgılar ve salgılanan perforinler hedef hücre üzerinde dairesel bir delik oluştururlar. Bu perforin poru, hücre içi kalsiyumda hızlı bir artışa neden olur. Granzim B, açılan bu delikten bir vezikül içinde hedef hücreye reseptör aracılığı ile girer. Hücre içine girmiş perforin proteini, vezikülden granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Bu andan itibaren granzim B hızlı bir şekilde DNA parçalanmasını ve apoptoz ile birlikte prokaspaz aktivasyonunu başlatır (13, 41).

2.4. Glia ve glioma

Merkezi sinir sisteminde nöronların etrafını saran ve onları destekleyen hücre grubuna glia denmektedir. Tüm beyin hacminin yaklaşık yarısını glia oluşturmaktadır. Glia hücrelerinin 3 türü bulunmaktadır; astrositler, oligodendrositler ve mikroglia (42, 82). Astrositler glia hücre grubunun sayıca en çok ve fonksiyonca en fazla olan hücre grubudur. Genel olarak yuvarlak çekirdekleri ve geniş, düzensiz sitoplazmaları olan, parlak görüntülü hücreler olarak tanımlanmışlardır. Astrositlerin hücre gövdeleri çeşitli şekillerde bulunabilmektedir. Astrositlerin çoğunlukla uzun uzantıları vardır. Nöronlar üzerinde uçayaklar oluştururlar. Kan beyin engeliyle bu uçayaklar aracılığı ile temasta bulunarak nöronların beslenmesini sağlarlar. Hasarlı dokuda oluşan atıkları mikroglia hücreleri ile birlikte uzaklaştırarak doku iyileşmesine yardımcı olurlar (68,82).

Oligodendrositler astrositlere göre daha az sayıda ve daha küçük uzantıları olan hücrelerdir. Bu hücreler elektriksel uyarıların iletimini arttıran miyelin kılıfı oluşturarak aksonu çevresinden izole ederler. Oligodendrositler merkezi sinir sisteminde, Schwann hücreleri ise periferik sinir sisteminde bulunan aksonların çevresinde miyelin kılıf oluştururlar. Oligodendrositlerin sitoplazmaları astrositlere göre daha yoğundur, çekirdekleri daha koyudur ve uzantıları astrositler gibi parlaktır (29,46).

Mikroglia, glia hücreleri içinde boyut olarak en küçük olan ve makrofajlardan köken alan fagositik hücrelerdir. Fizyolojik ve embriyolojik olarak sinir sisteminin

diğer hücreleri ile ilişkili değildir. Mikroglialara inaktif hücreler de denmektedir. Merkezi sinir sisteminin inflamasyonu ya da hasarı durumunda hasarlı bölgeye giderek aktif duruma geçerler. Genel olarak glia hücrelerinin işlevleri kısaca aşağıdaki gibi özetlenebilir (29,42,82).

- a) Beyin dokusunu oluşturacak şekilde destek elemanı olarak görev yaparlar
- b) Nöron gruplarını birbirinden ayırırlar.
- c) Miyelin kılıf oluşturarak aksonları izole ederler ve elektriksel uyarıların daha hızlı iletilmesini sağlarlar.
- d) Doku hasarı ve nöron ölümü sonrasında doku artıklarını uzaklaştırırlar.
- e) Hücre dışı alanda K^+ iyon fazlalığını tamponlarlar.
- f) Sinaptik ileti sırasında nöronlar tarafından salınan kimyasal transmitterleri ortamdaki uzaklaştırırlar.
- g) Gelişim evresinde nöron göçüne öncülük ederler.
- h) Gelişim evresinde akson büyümesine öncülük ederler.
- i) Beyin kılcal damar ve endotel hücreleriyle yakın bağlantılar kurarak kan beyin engeli oluşumuna katkıda bulunurlar.
- j) Nöronların beslenmesine yardımcı olurlar.

MSS tümörlerinin en büyük grubunu glial hücrelerden gelişen ve genel olarak glioma olarak adlandırılan tümörler oluşturur. Glioma ölümcül hastalıklar sıralamasında yetişkinlerde üçüncü, çocuklarda lösemiden sonra ikinci sırayı almaktadır. Glial tümörlerinin görülme sıklığındaki çokluk ve maligniteleri araştırmacıları bu tümörleri daha iyi kavrama ve tedavi edebilme yolunda yoğun çaba harcamaya yöneltmiştir. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi tüm tedavi seçeneklerine rağmen malign gliomalarda ölüm oranı çok yüksektir. İleri cerrahi ve radyoterapi tekniklerine rağmen 5 yıllık yaşam oranı %5'ten azdır. Glioma etiopatogenezinde genetik faktörlerin önemli bir yer tuttuğu artık bilinmektedir. Genetik yapıya ait değişikliklerden iki tanesi ön plandadır. Bunlar hücre bölünmesini

ortaya çıkaran onkogenlerin varlığı ve tümör baskılayıcı genlerini kaybetmiş hücrelerin ortaya çıkmasıdır (39,64). Hayvan beyin tümörlerinin insan beyin tümör modelleri ile olan benzerlikleri, klinikte parametrelerin tanımlanması ve doğru tedavinin uygulanması açısından oldukça yol göstericidir. C6 sıçan glial tümör modeli insan glioblastomasına benzerliğinden dolayı bu araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (27,38).

2.5. H-Ras transforme fibroblast hücre hattı (5RP7)

Onkogenler hücre çoğalmasını düzenleyen normal genlerin mutasyona uğramış Őekilleridir. Genler mutasyona uğradıktan sonra buldukları hücreyi kanser olma yolunda değişikliklere srklerleler. Bu genler arasında en çok tanınanı ve üzerinde en çok çalışma yapılanı Ras protoonkogenidir. Ras geni mutasyona uğradıktan sonra oluşumuna yol açtığı Ras proteini ile hücrede bölünmeye ve kanser oluşumuna neden olmaktadır. Tüm insan tümörlerinin %20–30 kadarında Ras geninin anormal olduğu gösterilmiştir. 189 amino asitlik ve 21-kDa'luk bir protein kodlayan Ras gen ailesi, hücre zarından sinyal iletiminin düzenlenmesinde görev alır. Ras proteinlerinin aktif hale geçebilmesi için hücre zarına yerleşmesi gerekir. Dinlenim halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif Ras-GDP bileşiminde bulunur. Hücrenin uyarılması ile fosforilasyon sonucu aktif Ras-GTP Őekline dönüşür. GDP yerine GTP bağlanarak aktif Ras-GTP konumuna dönüşür. Aktif Ras-GTP hücre bölünmesi için sürekli sinyal üreterek kontrolsüz hücre bölünmesine neden olur (2,77). Fibroblastların kanserli hücrelerin çoğalmasına ve yayılmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (32).

2.6. 5-Florourasil (5-FU) ve kolçisin

Yaklaşık 50 yıldır kanser tedavilerinde kullanılan 5-FU, DNA yapımı için gerekli olan timidinin yapımını baskılayarak hücrelerin çoğalmasını engellerken, hücrede apoptozu uyarmaktadır (3). Mide tümörlerinde (70), kanserli ağız hücrelerinde (74), kanserli insan kolon hücreleri (58) gibi bir çok hücre çeşidinde 5-FU uygulamasının apoptosizi uyardığı gösterilmiştir.

Sonbahar çiçeğinden (*Colchicum Autumnale*) elde edilen kolçisin hücrelerde mitotik ipliklerin oluşumunu engelleyerek mitozu metafaz evresinde baskılar. Bu etki kolçisinin tubuline bağlanması ile ilişkilidir. Böylece mikrotubul oluşumunu ve lökosit fonksiyonunu baskılar. Ayrıca LTB4 oluşumunu da önleyerek antiinflamator etki gösterir (5,18). Glioma hücrelerinde kolçisin uygulamasının hücrelerin çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (48).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre kültürünün yapılması

Hücre kültürü fizyolojik ve patolojik olayların araştırılması, sinyal mekanizmalarının açıklanması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre çoğalması ve hücre ölüm olaylarının aydınlatılabilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Çoğu hücre kültürleri %95 O₂ ve %5 CO₂ ile temel olarak hiperoksit nemli bir ortamdır. Hücreler bu in vitro ortama uyum sağladığı sürece gelişir ve çoğalırlar. Çalışmamızda sıçan glioma hücre dizisi (C6, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embryoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayhan BİLİR'in armağanıdır) ve Ras onkogeni uyarılmış fibroblast hücre dizisi (5RP7, Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Prof. Dr. H.Mehtap KUTLU'nun armağanıdır) kullanılmıştır.

3.1.1. Kültür için yapılan hazırlıklar

Toz halinde steril şişelerde bulunan Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) bir litrelik steril ve deiyonize su içine eklenerek çözüldü. Bu besi ortamı, önceden steril edilmiş şişelere 0,22 mikrolitrelik filtrelerden enjektör yardımı ile geçirilerek sterilize edildi ve buzdolabında 4 °C' de saklandı. Fetal dana serumu (Fetal calf serum = FCS, Sigma) ve penisilin + streptomisin (Sigma) küçük hacimlere bölünerek buzdolabında eksi 20 °C saklandı. Toz halindeki likofelon (Cayman) dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma) içerisinde çözülerek, elde edilen çözeltiden her deneyden önce istenen dozlar taze olarak hazırlandı. Toz halindeki 5 florourasil (Sigma) DMSO içerisinde çözülerek elde edilen çözeltiden belirlenen dozları hazırlandı. Toz halindeki kolçisin (Serva) DMEM içerisinde çözülerek istenen dozları ayarlandı.

3.1.2. Hücrelerin ekimi ve yaşatılması

Önceden eksi 80 °C sıvı nitrojen içerisinde konularak saklanmış olan C6 ve 5RP7 hücreleri nitrojen tankından çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında çözündü. Hücreler çözündükten sonra DMEM, %10 FCS ve %1 penisilin + streptomisin karışımını içeren santrifüj tüpü içinde 1000 devir /dakika ve 4 °C'de 5 dakika döndürüldü. Üstteki sıvı atılarak dondurma işleminde kullanılan DMSO uzaklaştırılmış oldu. Dipteki hücreler, içerisinde besiyeri bulunan flasklara (75 cm²) ekilerek 37 °C, %5 CO₂ ve %100 nem içeren inkübatöre kondu. İnkübatörde bulunan flasklar, ilk iki gün yerinden oynatılmamak koşuluyla, kuluçka süresince inverted mikroskop (Olympus) ile kontrol edilerek hücrelerin çoğalmaları gözlemlendi. Eskiyen besiyerleri pipet yardımıyla boşaltılarak, içerisinde 0.1mL penisilin + streptomisin, 1mL FCS ve 8.9 mL DMEM bulunan besiyeriyle 2-3 günde bir yenilendi. Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra deneye alındı.

3.2. Hücre sayısını belirleme yöntemleri

3.2.1. Tripan mavisiyle boyama

Tripan mavisiyle boyama yönteminde ölü hücreler tripan mavisi ile boyanırken, canlı hücreler hücre zarları sağlam olduğu için boya ile boyanmamaktadır. Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra hücrelerin besiyeri pipet yardımıyla çekildi ve atıldı. Daha sonra flasklar Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma) ile yıkanarak flaskta kalan proteinler uzaklaştırıldı. Flasklarda kalan hücreler 5 dakika %0,25 tripsin (Sigma) ile yıkanarak tabandan uzaklaştırıldı ve 4 C⁰ de 1200 devir/dk da 5 dakika döndürüldü. İşlem sonrasında üstte alan sıvı kısım atıldı ve sayım kabı içerisine 0,2 mL altta kalan iyice karıştırılan hücre çözeltisinden, 0,3 mL HBSS ve en son 0,5 mL

tripan mavisi (Sigma) koyarak 1 mL'ye tamamlandı. Beş dakika beklendikten sonra sayım kabı içinden alınan 10 µL örnek CEDEX marka hücre sayım aletinde sayılarak 1 mL'de bulunan canlı hücre sayısı belirlendi. Hücre sayısı belirlendikten sonra her biri 25 cm²'lik flaska 1x10⁶ hücre gelecek şekilde flasklara ekim yapıldı. 24 saat kuluçka süresinin ardından hücreler grupları belirtilen ilaçlar ile 24 ve 48 saat muamele edildi. Flaskların mikroskop altındaki görüntüleri Olympus marka fotoğraf makinesiyle çekildi (X200).

3.2.2. MTT

Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra flask tabanında kalan hücreler tripan mavisıyla boyama yöntemi ile sayılarak 1 mL'de bulunan canlı hücre sayısı belirlendi ve her bir kuyucuğa 1x10⁴ hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu kaplara ekim yapıldı. C6 ve 5RP7 hücreleri 24 ve 48 saat ayrı ayrı 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 µM likofelon, kolçisin ve 5-FU dozları ile muamele edildikten sonra MTT yöntemi uygulandı.

İlaçların hücreler üzerindeki sitotoksitesisi Mossmann tarafından tanımlanan MTT (Sigma) spektrofotometrik yöntemi ile belirlendi (56). MTT, PBS içinde çözünerek hazırlandı ve filtre edildi. Her 250 µl besiyeri için 25 µl MTT çözeltisi eklenerek 37 °C'de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuktaki besiyeri çekilerek 100 µl DMSO eklendi. Kaplar 5–8 dakika çalkalanarak beklendi. 550 nm'de oluşan formazan boya absorbansı spektrofotometrede (Bio Tek) okundu. Canlı hücrelerin mitokondrisinde oluşan ve MTT ürünü olan formazan yaşayan hücre sayısı ile korelasyon gösterdiğinden, ilaç verilen kuyucuklarda okunan optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Bu işlem için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\frac{\text{Her bir kuyucuktaki ilaç verilen hücre absorbansı} \times 100}{\text{Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı}}$$

3.3. Apoptoz ölçümü (Flow Sitometrik Yöntem)

Hücre apoptoz uyarısı alırsa hücre zarının sitoplazmik yüzeyindeki lipid sırasında bulunan fosfatidilserin hücre zarının sırasındaki dış lipid tabakasına sıçrar. Bu yer değiştirme apoptozun erken döneminde gerçekleşir. Anneksin V fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, bu protein floresan bir madde ile (FITC) işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilir. Bu bağlanma oranı da flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerde de anneksin bağlanması görülebileceği için ayrıca vital bir boya olan propidium iyodür (PI) boyaması da yapılır. Canlı hücreler zarları sağlam olduğu için PI boyası ile boyanmazlar. Canlı hücreler FITC (-) / PI (-), erken apoptotik hücreler FITC (+) / PI (-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler FITC (+) / PI (+) olarak ayırt edilir (86).

Tripan mavisi boyama yöntemi için sayım tamamlandıktan sonra kalan C6 ve 5RP7 hücreleri üzerinde likofelon, 5-FU ve kolçisinin apoptoz etkisini araştırmak için Anneksin apoptoz ölçüm kit (Invitrogen) yöntemi doğrultusunda belirtilen deney gruplarına uygulandı. İlaç uygulamalarından sonra flasklardaki supernatanlar tüplere aktarıldı. Flask tabanında kalan hücreler %0,25 tripsin ile 5 dakika yıkanarak tabandan uzaklaştırıldı. Daha sonra tabandan kopan hücreler supernanantı konan tüplerin içerisine ilave edildi. Tüpler 4 C⁰ de 1200 devir/dk da 5 dakika döndürüldü. İşlem sonrasında üstte kalan sıvı kısım tüp içinde 2 mL kalacak şekilde atıldı. Tripan mavisile boyama yöntemi ile 1 mL'de bulunan hücre sayıları belirlendikten sonra tüpler 2 kez soğuk fosfat tamponu (Phosphate buffered saline, PBS, Sigma) ile 4 C⁰ de 1200 devir/dk da 5 dakika döndürüldü. Supernatanlar atıldıktan sonra dipte kalan hücrelerin sayıları binding buffer ile kit prosedürüne uygun olarak 1x10⁶ hücre olacak şekilde ayarlandı. Falcon tüp içerisine 5 µL Anneksin-5, FITC ve 10 µL prodium iyodür (PI) kondu. Bu tüp üzerine 100 µL hücre süspansiyonu eklendikten sonra karıştırıcı ile karıştırılıp 15 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra üzerine 400 µL binding buffer konarak hücreler resüspanse edildi. Facsclibur akım sitometri cihazında (Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarında) cellquest programında acquisition yapıldı.

3.4. Deney grupları I

Likofelonun ve pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU ile kolşisinin hücre çoğalması üzerindeki etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi için belirtilen gruplar oluşturuldu.

3.4.1. Likofelon grupları

Aşağıda belirtilen likofelon dozları C6 ve 5RP7 hücrelerine 24 ve 48 saat ayrı ayrı uygulandı.

1. grup : Kontrol, aşağıdaki 14 grup için ayrı ayrı kontrol grubu oluşturuldu ve bunlara sadece besiyeri uygulandı.
2. ve 3. gruplar : 250 μ M DMSO, 24 ve 48 saat (n=24)
4. ve 5. gruplar : 10 μ M likofelon, 24 ve 48 saat (n=24)
6. ve 7. gruplar : 50 μ M likofelon, 24 ve 48 saat (n=24)
8. ve 9. gruplar : 100 μ M likofelon, 24 ve 48 saat (n=24)
10. ve 11. gruplar: 150 μ M likofelon, 24 ve 48 saat (n=24)
12. ve 13. gruplar: 200 μ M likofelon, 24 ve 48 saat (n=24)
14. ve 15. gruplar: 250 μ M likofelon, 24 ve 48 saat (n=24)

3.4.2. 5-FU grupları

Yine C6 ve 5RP7 hücrelerine farklı 5-FU dozları 24 ve 48 saat olmak üzere uygulandı.

1. grup : Kontrol, 14 grup için de ayrı ayrı kontrol oluşturuldu ve bunlara sadece besiyeri uygulandı.
2. ve 3. gruplar : 250 μ M DMSO, 24 ve 48 saat (n=24)
4. ve 5. gruplar : 10 μ M 5-FU, 24 ve 48 saat (n=24)
6. ve 7. gruplar : 50 μ M 5-FU, 24 ve 48 saat (n=24)
8. ve 9. gruplar : 100 μ M 5-FU, 24 ve 48 saat (n=24)
10. ve 11. gruplar: 150 μ M 5-FU, 24 ve 48 saat (n=24)
12. ve 13. gruplar: 200 μ M 5-FU, 24 ve 48 (n=24)
14. ve 15. gruplar: 250 μ M 5-FU, 24 ve 48 saat (n=24)

3.4.3. Kolçisin grupları

Kolçisin dozları da C6 ve 5RP7 hücrelerine ayrı ayrı olarak 24 ve 48 saat süreyle uygulandı.

1. grup : Kontrol, 12 grup için ayrı ayrı kontrol grubu oluşturuldu ve bunlara sadece besiyeri uygulandı.
2. ve 3. gruplar : 10 μ M kolçisin, 24 ve 48 saat (n=24)
4. ve 5. gruplar : 50 μ M kolçisin, 24 ve 48 saat (n=24)
6. ve 7. gruplar : 100 μ M kolçisin, 24 ve 48 saat (n=24)
8. ve 9. gruplar : 150 μ M kolçisin, 24 ve 48 saat (n=24)
10. ve 11. gruplar: 200 μ M kolçisin, 24 ve 48 saat (n=24)
12. ve 13. gruplar: 250 μ M kolçisin, 24 ve 48 saat (n=24)

3.5. Deney grupları II

MTT yöntemi uygulaması sonucunda likofelon, kolçisin ve 5-florourasilin 150, 200 ve 250 μ M dozları her iki hücre dizisi üzerinde de anlamlı çoğalma etkisi gösterdiği için, ikinci bir hücre canlılığı belirleme yöntemi olan tripan mavisiyle boyama yöntemi de kullanılarak iki yöntem karşılaştırıldı.

3.5.1. Likofelon grupları

1. grup : Kontrol, 6 grup için ayrı ayrı kontrol grubu oluşturuldu ve bunlara sadece besiyeri uygulandı.
2. ve 3. gruplar: 150 μ M likofelon, 24 ve 48 saat (n=3)
4. ve 5. gruplar: 200 μ M likofelon, 24 ve 48 saat (n=3)
6. ve 7. gruplar: 250 μ M likofelon, 24 ve 48 saat (n=3)

3.5.2. 5-FU grupları

1. grup : Kontrol, 6 grup için ayrı ayrı kontrol grubu oluşturuldu ve bunlara sadece besiyeri uygulandı.
2. ve 3. gruplar: 150 μ M 5-FU, 24 ve 48 saat (n=3)
4. ve 5. gruplar: 200 μ M 5-FU, 24 ve 48 saat. (n=3)
6. ve 7. gruplar: 250 μ M 5-FU, 24 ve 48 saat (n=3)

3.5.3. Kolçisin grupları

1. grup : Kontrol, 6 grup için ayrı ayrı kontrol grubu oluşturuldu ve sadece besiyeri uygulandı.
2. ve 3. gruplar: 150 μ M kolçisin 24 ve 48 saat (n=3)
- 4 ve 5. gruplar : 200 μ M kolçisin 24 ve 48 saat (n=3)
- 6 ve 7. gruplar : 250 μ M kolçisin 24 ve 48 saat (n=3)

3.6. Deney grupları III

Anneksin apoptoz ölçüm kiti ile belirtilen deney grupları üzerinde ilaçların hücrelerde apoptoz uyarımına neden olup olmadığı araştırıldı.

3.6.1. Likofelon grupları

1. grup : Kontrol, aşağıdaki her 6 grup için ayrı ayrı kontrol grubu oluşturuldu ve bunlara sadece besiyeri uygulandı.
2. ve 3. gruplar: 150 μ M likofelon, 24 ve 48 saat. (n=3)
4. ve 5. gruplar: 200 μ M likofelon, 24 ve 48 saat. (n=3)
6. ve 7. gruplar: 250 μ M likofelon, 24 ve 48 saat. (n=3)

3.6.2. 5-FU grupları

1. grup : Kontrol, 6 grup için ayrı ayrı kontrol grubu oluşturuldu ve bunlara sadece besiyeri uygulandı.
2. ve 3. gruplar: 150 μ M 5-FU, 24 ve 48 saat (n=3)
4. ve 5. gruplar: 200 μ M 5-FU, 24 ve 48 saat. (n=3)
6. ve 7. gruplar: 250 μ M 5-FU, 24 ve 48 saat (n=3)

3.6.3. Kolçisin grupları

1. grup : Kontrol, 6 grup için ayrı ayrı kontrol grubu oluşturuldu ve sadece besiyeri uygulandı.
- 2 ve 3. gruplar: 150 μ M kolçisin 24 ve 48 saat (n=3)
- 4 ve 5. gruplar: 200 μ M kolçisin 24 ve 48 saat (n=3)
- 6 ve 7. gruplar: 250 μ M kolçisin 24 ve 48 saat (n=3)

3.7. İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler kontrolün ortalama %fraksiyonu \pm standart hata şeklinde ifade edildi. İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (Statistics Program for Social and Science) tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma testi ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

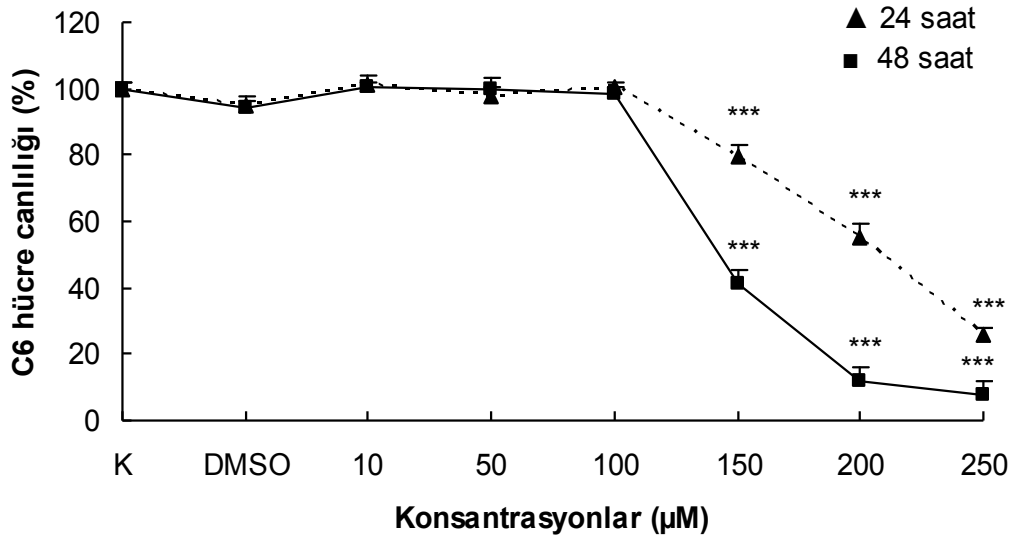
4.1. İlaçların hücre canlılığına etkileri

İlaçların hücre canlılığı üzerine olan etkisi 2 farklı yöntemle (MTT ve tripan mavisiyle boyama) belirlendi ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

4.1.1. MTT yöntemi bulguları

4.1.1.1. Likofelonun C6 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanması

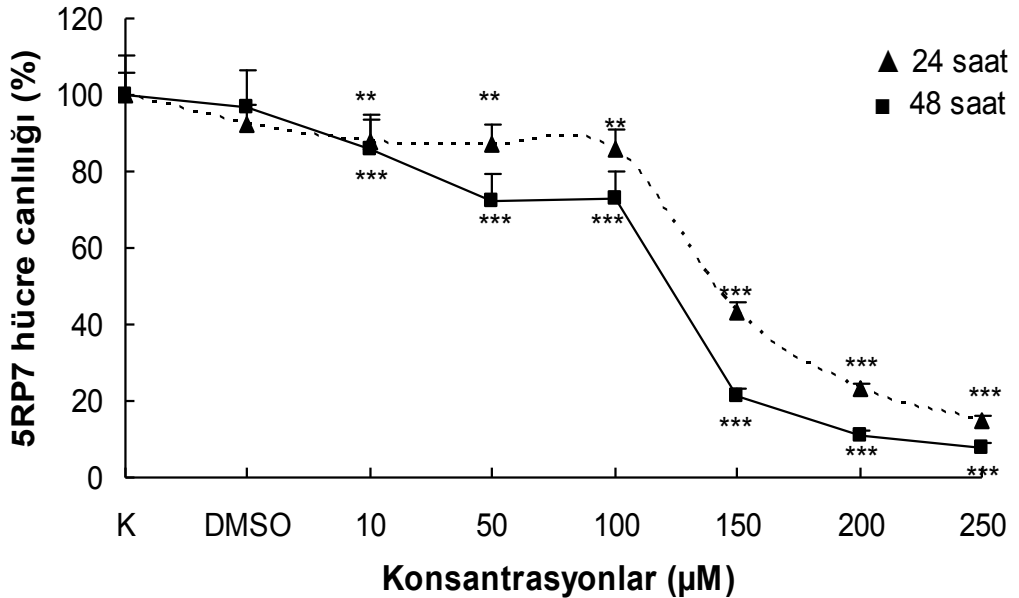
Çözücü olarak kullanılan en yüksek dozdaki 250 μ M DMSO hücre yaşam oranında herhangi bir değişime neden olmadı. C6 hücrelerine 24 saat süreyle 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 μ M likofelon uygulaması sonucunda elde edilen yaşayan hücre oranları sırasıyla %100, %97, %100, %80, %55 ve %26 olarak hesaplandı. 48 saatte ise 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 μ M likofelon dozlarında elde edilen yaşam oranları sırasıyla %100, %100, %99, %42, %12 ve %7 oldu (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. : Likofelonun 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 μ M dozlarının 24 ve 48 saat uygulamasının C6 hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Kontrol grubuna göre * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$;

4.1.1.2. Likofelonun 5RP7 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanması

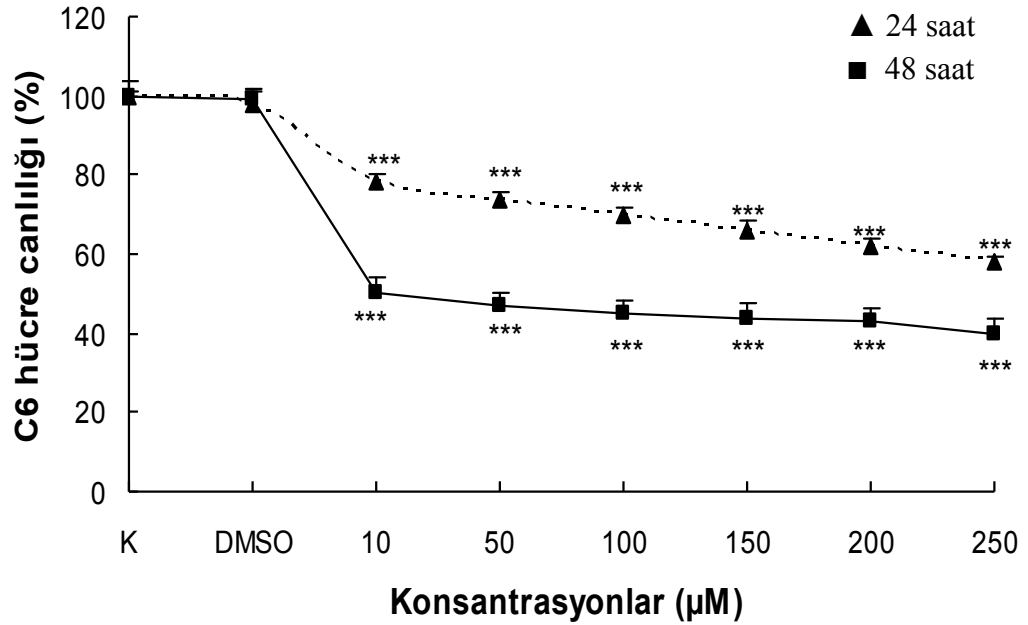
Transforme olmuş 5RP7 fibroblast hücrelerine 24 saat süreyle 10, 50,100, 150, 200 ve 250 μ M likofelon uygulaması sonucunda elde edilen hücre yaşam oranları sırasıyla %88, %87, %86, %43, %23 ve %15 olarak hesaplandı. Uygulama süresi 48 saate çıkarıldığında 10, 50,100, 150, 200 ve 250 μ M likofelon dozlarında elde edilen hücre canlılığı sırasıyla %86, %72, %73, %21, %11 ve %8 olarak hesaplandı. İlacı çözdüğümüz en yüksek dozdaki 250 μ M DMSO 5RP7 hücre yaşam oranında da herhangi bir değişime neden olmadı (Şekil 4.2). Likofelon en düşük doz olan 10 μ M'da bile yaşayan kanserli fibroblast hücre sayısını azalttı. Kullandığımız en yüksek doz olan 250 μ M likofelon 48 saat sonra her iki hücre (C6 ve 5RP7) türünde de %90'ın üstünde hücre ölümüne neden oldu. Bulgulara göre fibroblast kökenli 5RP7 hücrelerinin C6 hücrelerine göre daha az dayanıklı olduğu tespit edildi. Çünkü, en düşük doz olan 10 μ M likofelon bile 5RP7 hücrelerinde yaklaşık %15'lik hücre ölümüne neden oldu.



Şekil 4.2.: Fibroblast kökenli 5RP7 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 μ M likofelon uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Konrol grubuna göre * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4.1.1.3. 5-FU'in C6 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanması

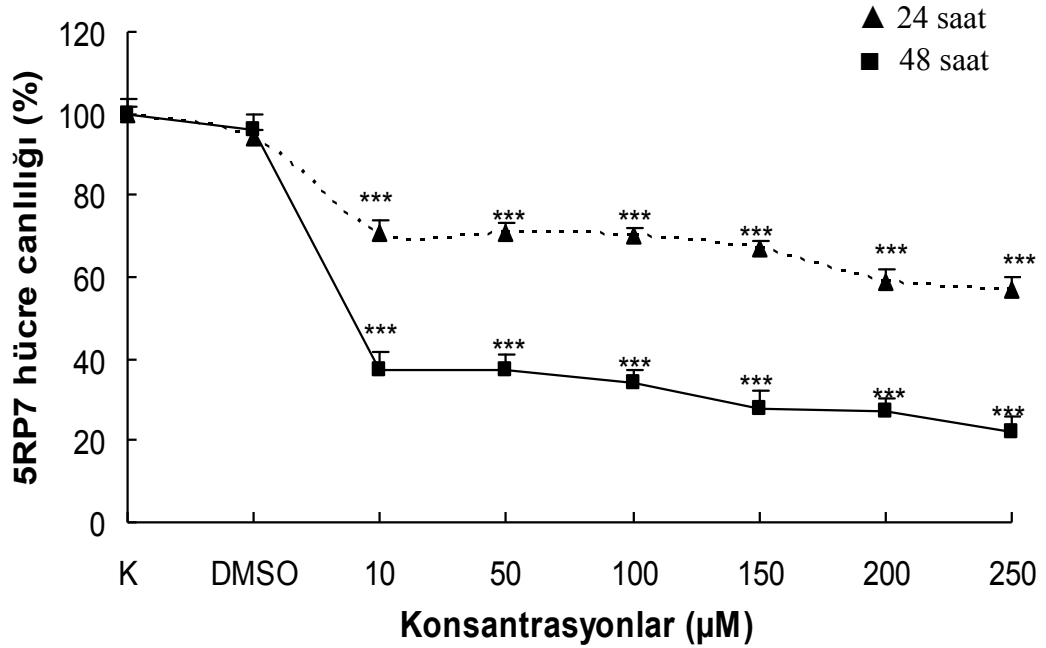
Sıçandan elde edilmiş kanserli glioma C6 hücrelerine 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 μM 5-florourasilin 24 saat süreyle benzer şekilde uygulamasında sonra yaşar kalabilen hücrelerin yüzde oranları sırasıyla %78, %74, %70, %66, %62 ve %58 olarak hesaplandı. Aynı 5-FU dozlarının C6 hücrelerine 48 saat uygulaması sonucunda ise elde edilen hücre yaşam oranları sırasıyla %50, %47, %45, %44, %43 ve %40 dolayındaydı (Şekil 4.3). Kullanılan dozlara ve zamana bağlı olarak 150, 200 ve 250 μM dozlarda, 5-FU etkisinin likofelona göre daha az olduğu belirlendi. Uzun süre olan 48 saat sonra azalan glioma hücre oranı ancak %60 kadardı; oysa likofelon %93 oranında hücre ölümüne neden oldu.



Şekil 4.3.: Farklı dozlardaki 5-FU'nun C6 hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda yaşayabilen hücre oranları. Kontrol grubuna göre * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$.

4.1.1.4. 5-FU'in 5RP7 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanması

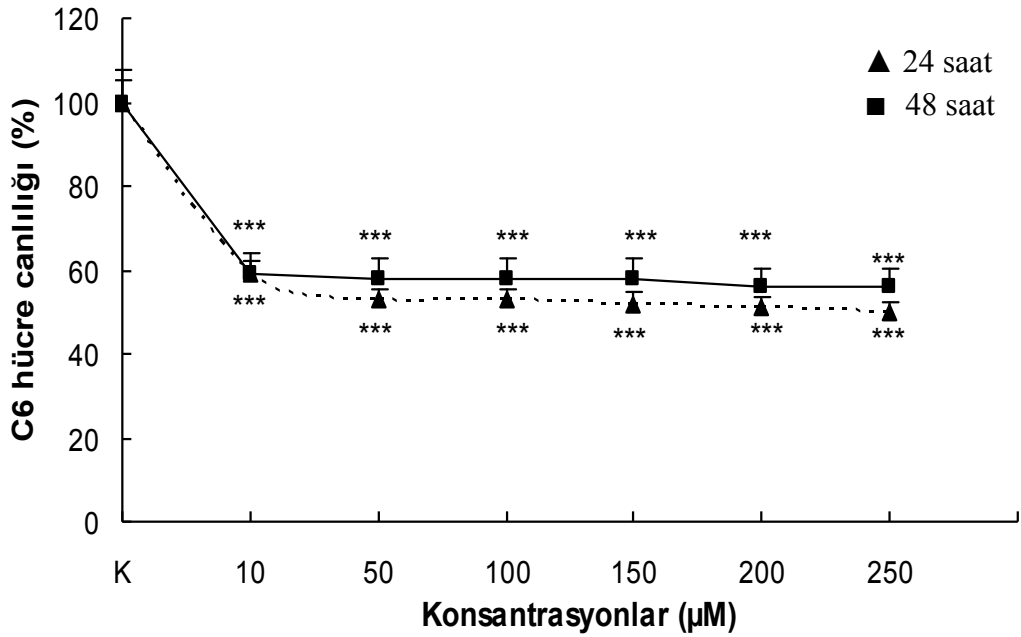
Fibroblast kökenli 5RP7 hücrelerine 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 μM dozlarındaki 5-florourasil uygulamasından 24 saat sonra hücre yaşam oranları sırasıyla %71, %71, %70, %67, %59 ve %57 olarak belirlendi. Aynı hücrelerin 48 saat sonra hücre yaşam oranları ise sırasıyla %37, %37, %34, %28, %27 ve %22 olarak hesaplandı (Şekil 4.4). Fibroblastik hücrelerin 5-florourasile daha dayanıklı olduğu bulundu. Çünkü, likofelon 48 saatte en yüksek dozda 5RP7 hücrelerinde %90'ın üzerinde ölüm oluşturduğu, 5-florourasilin aynı doz ve sürede öldürme oranının %78'lerde kaldığı tespit edildi.



Şekil 4.4.: Transforme 5RP7 hücrelerine 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 μM 5-FU uygulamasının 24 ve 48 saat sonraki etkileri. Kontrol grubuna göre * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$.

4.1.1.5. Kolçisinin C6 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanması

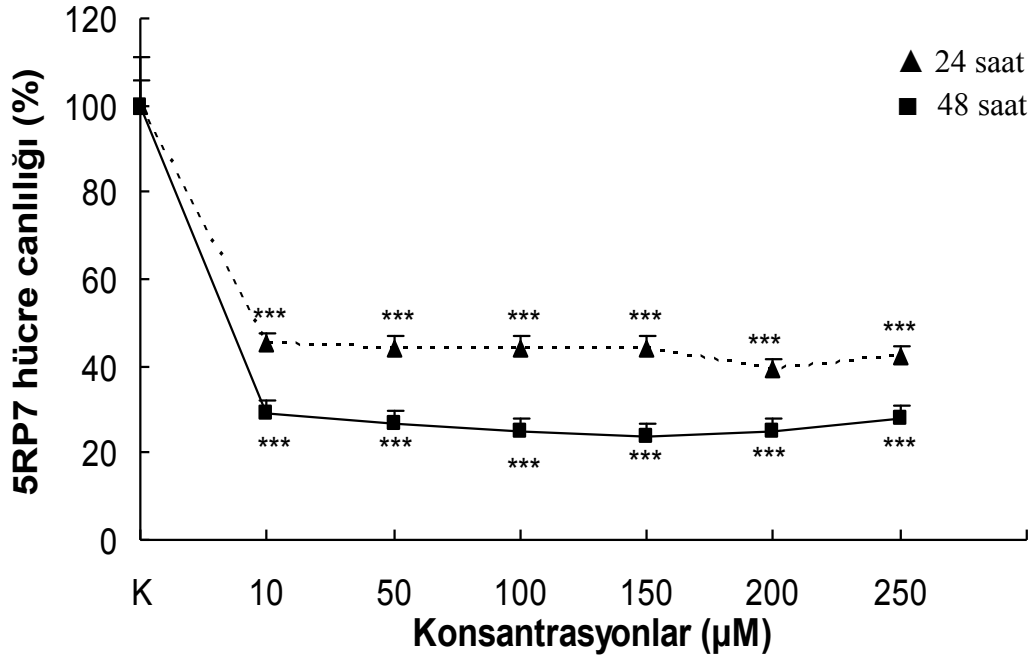
Belirlenen kolçisin dozlarının (10, 50, 100, 150, 200 ve 250 μM) C6 glioma hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulamasının ardından MTT yöntemi ile hücre canlılığı tespit edildi. Tespit edilen yaşayabilen hücrelerin oranları 24 saat sonrasında sırasıyla %59, %53, %53, %52, %51 ve %50; 48 saat sonrasında ise sırasıyla %59, %58, %58, %58, %56 ve %56 olarak belirlendi (Şekil 4.5). Kolçisin en düşük dozda bile glioma hücrelerin yaklaşık %40'ını öldürdü ve bu etki doza ve zamana bağlı değildi. Kolçisinin neden olduğu hücre ölümü 48 saatte en fazla %44 dolayındaydı. Oysa, 5-FU'nun %60 ve likofelonun %93'e varan oranda glioma hücrelerini öldürdüğü bulundu.



Şekil 4.5.: Kültür ortamında çoğaltılmış glioma hücreleri üzerine 24 ve 48 saat süreyle 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 μM kolçisin uygulamasının sonuçları. Kontrol grubuna göre * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4.1.1.6. Kolçisinin 5 RP7 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanması

Kanserli 5RP7 fibroblast hücrelerine 24 saat boyunca 10, 50,100, 150, 200 ve 250 μ M kolçisin verilmesi sonucunda elde edilen hücre yaşam oranları sırasıyla %45, %44, %44, %44, %39 ve %42 olarak tespit edildi. Aynı hücrelere 48 saat 10, 50, 100, 150, 200 ve 250 μ M kolçisin verilmesi sonrasında elde edilen hücre yaşam oranları sırasıyla %29, %27, %25, %24, %25 ve %28 olarak belirlendi (Şekil 4.6). En yüksek dozda ve sürede likofelon 5RP7 hücrelerinde %92, 5-FU %78 ve kolçisin %72 oranında ölüme neden oldu. Kolçisinin ise öldürme yüzdesi 24 saatte tüm dozlarda yaklaşık %55; 48 saatte ise bu oran yaklaşık %75 idi.



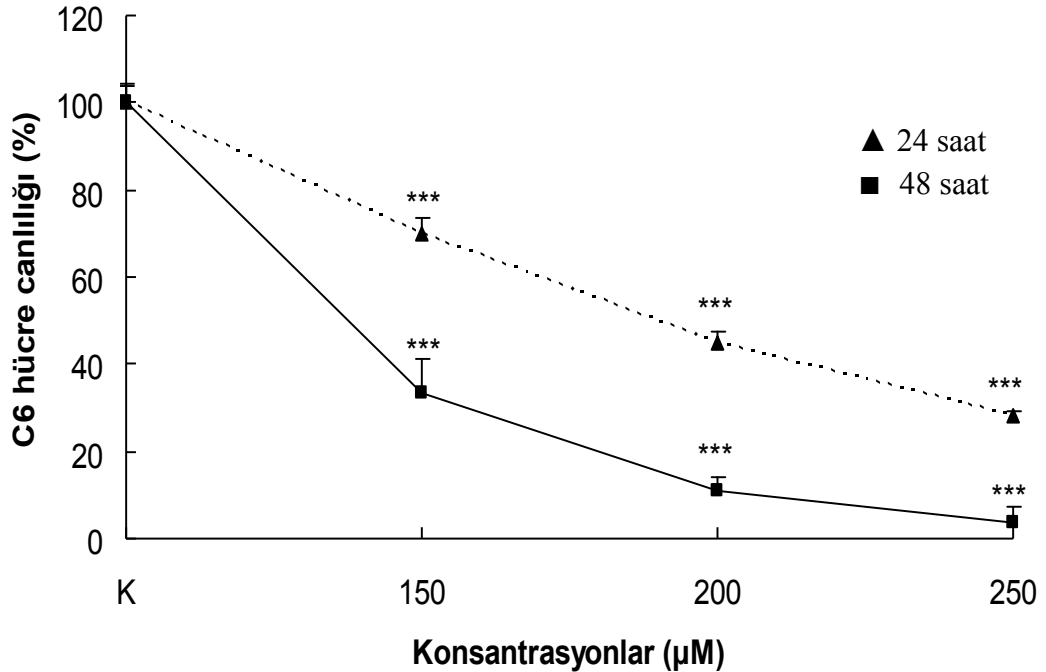
Şekil 4.6.: Kolçisin dozlarının (10, 50, 100, 150, 200 ve 250 μ M) 24 ve 48 saat süreyle 5RP7 hücrelerine uygulamasının ardından yaşayabilen hücre oranları. Kontrol grubuna göre * : p < 0.05, ** : p < 0.01, ***: p < 0.001.

4.1.2. Tripan mavisi boyama yöntemi bulguları

MTT uygulaması sonucunda kullandığımız kimyasal maddelerin 150, 200 ve 250 μM dozları düşük dozlara göre daha etkili olduklarından tripan mavisi yöntemi sadece bu üç doza uygulanarak iki yöntemin sonuçları karşılaştırıldı.

4.1.2.1. Likofelonun C6 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması

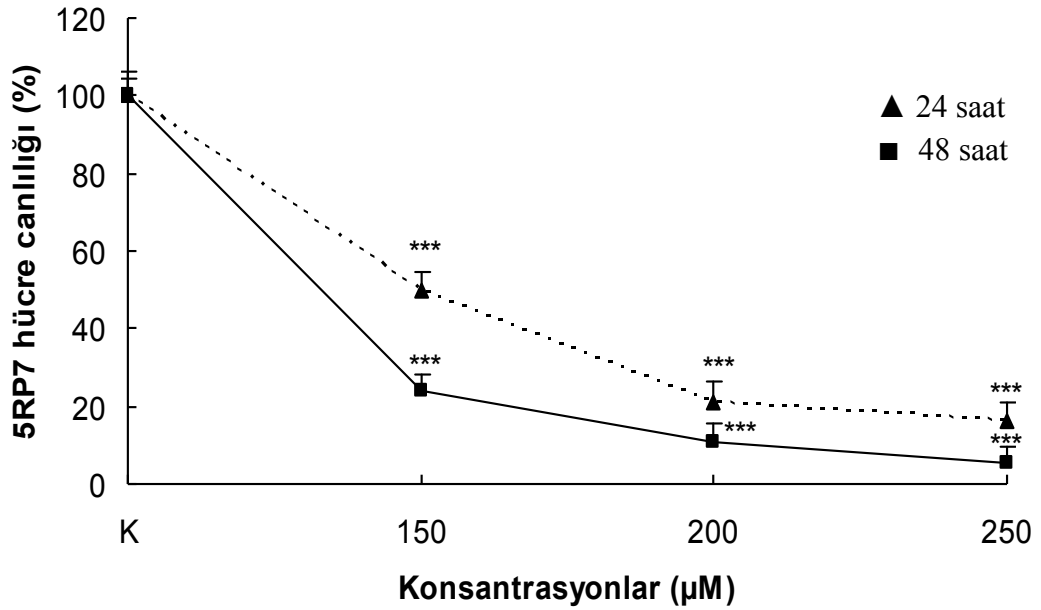
Kültür ortamında çoğaltılmış C6 hücrelerine 24 saat süresince 150, 200 ve 250 μM likofelon uygulamasının ardından elde edilen hücre yaşam oranları sırasıyla %70, %45 ve %28 dolayında olmuştur. 48 saat etki sonrasında elde edilen hücre yaşam oranları sırasıyla %33, %11 ve %4 olarak hesap edildi. (Şekil 4.7). MTT ve tripan mavisi yöntemleri karşılaştırılarak likofelonun C6 hücrelerine etkisinin araştırılması sonucunda birbirine benzer sonuçlar elde edildi.



Şekil 4.7.: Etkin likofelon dozlarının 24 ve 48 saat süreyle uygulamasının C6 hücre canlılığı üzerindeki etkisinin tripan mavisi yöntemine göre sonuçları.
Konrol grubuna göre * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$.

4.1.2.2. Likofelonun 5RP7 hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca uygulanması

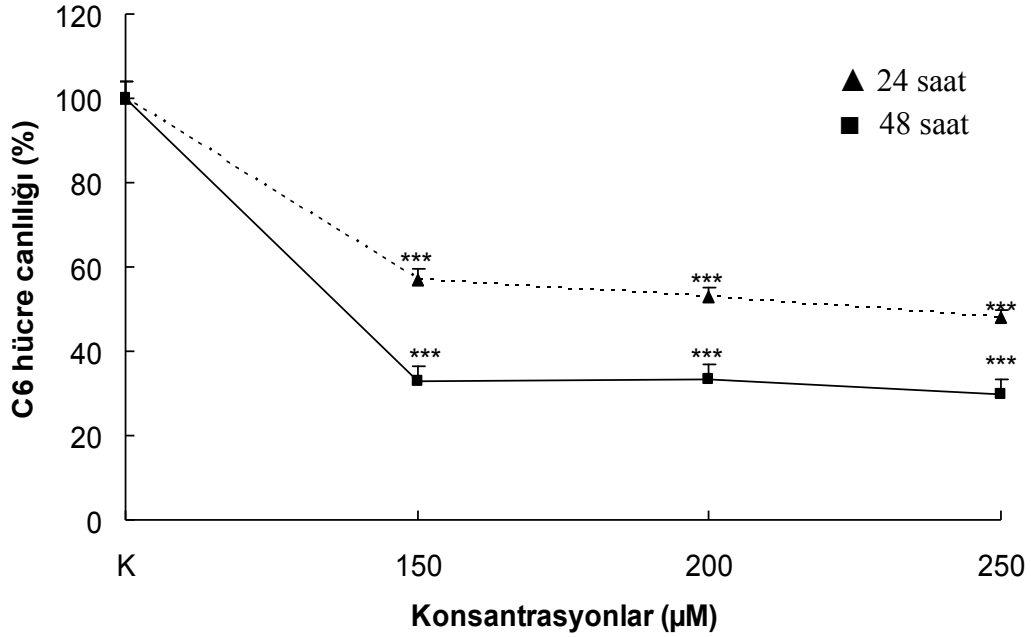
Ras onkogeni uyarılmış 5RP7 hücrelerine 24 saat boyunca 150, 200 ve 250 μM likofelon uygulaması sonucunda elde edilen hücre yaşam oranları sırasıyla %50, %21 ve %16 olarak hesaplandı. Aynı dozlardaki etkin likofelon dozlarının 48 saat uygulaması sonucunda elde edilen hücre yaşam oranları ise sırasıyla %24, %11 ve %6 olarak hesaplandı (Şekil 4.8). İki ayrı yöntem kullanılarak likofelonun 5RP7 hücrelerine olan etkileri karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar farklılık göstermedi. Likofelonun 5RP7 hücrelerinde öldürme oranı en yüksek dozda ve 48 saatlik sürede MTT yöntemi ile yaklaşık %92 iken bu oran tripan mavisiyle boyama yöntemi ile %94 olarak hesaplandı.



Şekil 4.8.: Ras onkogeni uyarılmış 5RP7 hücrelerinin canlılığı üzerine 150, 200 ve 250 μM likofelonun 24 ve 48 saat uygulaması sonucunun tripan mavisi ile belirlenmesi. Kontrol grubuna göre * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$.

4.1.2.3. 5-FU'in C6 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması

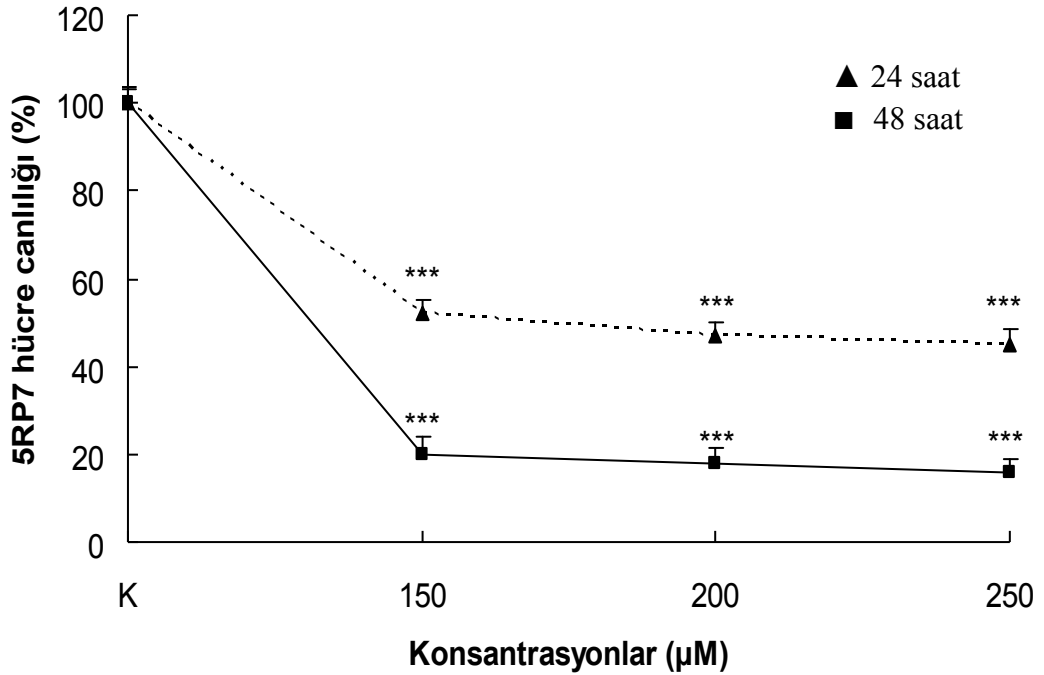
C6 hücre canlılığı üzerine 150, 200 ve 250 μM 5 florourasilin 24 ve 48 saat süreyle uygulaması sonucunda elde edilen hücre yaşam oranları 24 saatlik uygulama sonunda etki için sırasıyla %57, %53 ve %48 ve 48 saatlik uygulama sonunda sırasıyla %33, %33 ve %30 olarak hesaplandı (Şekil 4.9). 5-FU uygulaması sonrasında aynı etki süresince hücrelerde MTT yönteminde olduğu gibi doza bağlı olmaksızın öldürme oranları birbirine yakındı. İki yöntem karşılaştırıldığında 5-FU uygulamasından etkilenen glioma ve fibroblast hücre oranları birbirine benzerlik gösterdi.



Şekil 4.9.: Tripan mavisi yöntemine göre C6 hücre canlılığı üzerine 5-FU'nun doz ve zamana bağlı olarak etkisi. Kontrol grubuna göre * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4.1.2.4. 5-FU'in 5RP7 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması

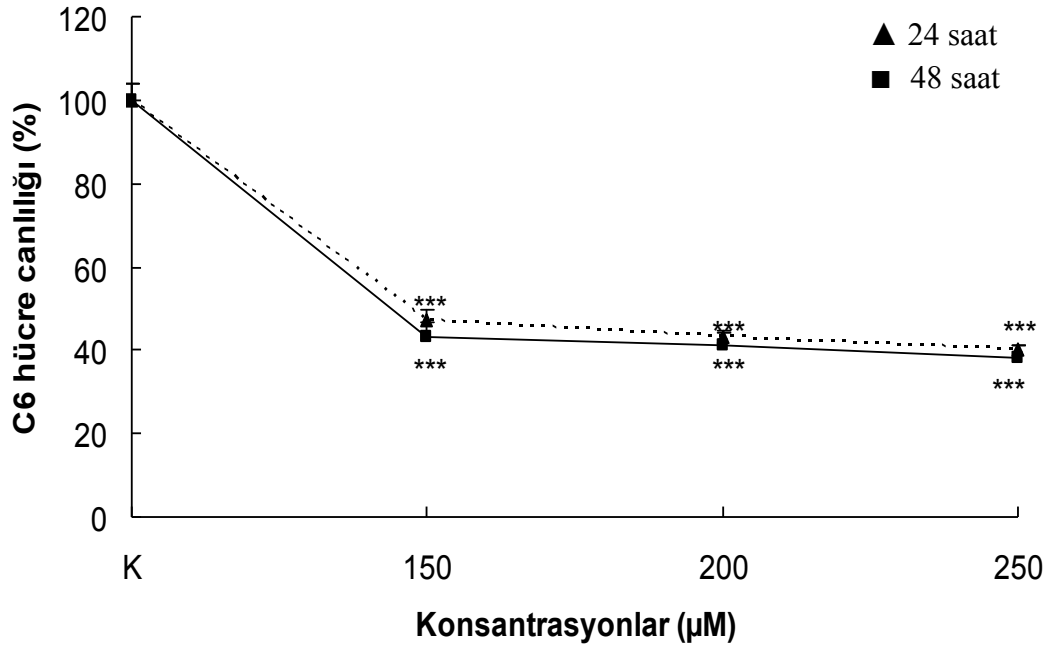
Kanserli fibroblast hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle 150, 200 ve 250 μM 5-FU uygulaması sonucunda elde edilen hücre yaşam oranları 24 saat sonrası etki sırasıyla %52, %47 ve %45 olarak hesaplanırken 48 saat sonrası için sırasıyla %20, %18 ve %16 olarak hesap edildi. (Şekil 4.10). MTT yönteminde olduğu gibi bu yöntem sonucu da 5-FU'nun etkisinin doza bağlı olmadığını gösterdi. İki yöntem arasındaki hücre öldürme oranları karşılaştırıldığında ise birbirine benzer öldürme oranları olduğu belirlendi.



Şekil 4.10.: 5RP7 hücre canlılığı üzerine 24 ve 48 saat süreyle 150, 200 ve 250 μM 5-FU uygulamasının tripan mavisi yöntemiyle belirlenmiş sonuçları. Kontrol grubuna göre * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4.1.2.5. Kolçisinin C6 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması

Glioma hücrelerine 24 saat süreyle 150, 200 ve 250 μM kolçisinin verilmesinin ardından tripan mavisi yöntemiyle belirlenmiş hücre yaşam oranları sırasıyla %47, %43 ve %40 olarak hesaplandı. Aynı kolçisinin dozlarında tespit edilen 48 saat sonrasındaki hücre yaşam oranları ise sırasıyla %43, %41 ve %38 olarak hesap edildi (Şekil 4.11). Kolçisinin iki yöntemle de doza bağlı olarak aynı sürelerde hücrelerin çoğalmasında bir farklılık göstermediği belirlendi.

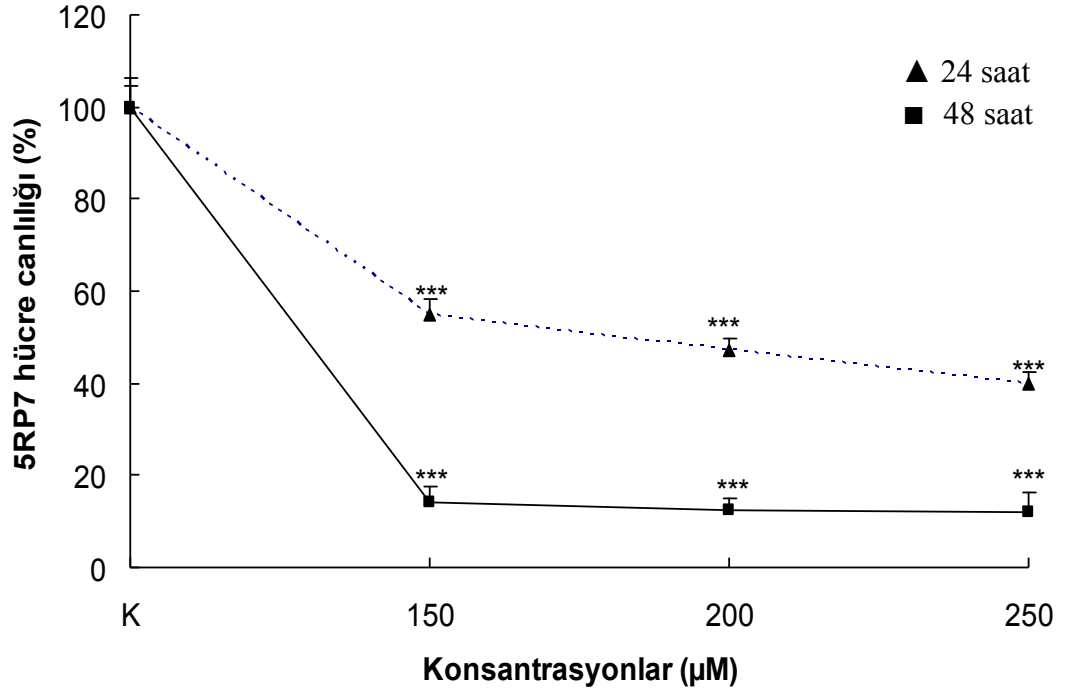


Şekil 4.11.: Tripan mavisi yöntemi uygulamasına göre, glioma hücrelerinin canlılık oranına doz ve zamana bağlı olarak kolçisinin etkisinin belirlenmesi.

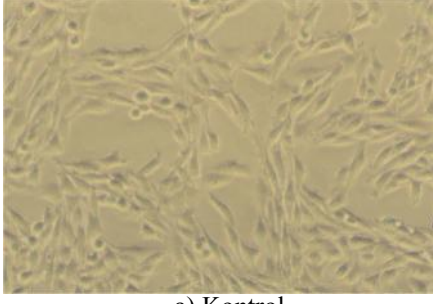
4.1.2.6. Kolçisinin 5RP7 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması

Fibroblastik 5RP7 hücrelerine 24 saat boyunca 150, 200 ve 250 μM kolçisinin uygulaması sonucunda tripan mavisiyle elde edilen hücre canlılığı oranları sırasıyla %55, %47 ve %40 olarak hesaplandı. Aynı hücrelere 48 saat 150, 200 ve 250 μM kolçisinin verilmesinden elde edilen hücre yaşam oranları sırasıyla %14, %13 ve %12 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12). Kolçisinin C6 ve 5RP7 hücrelerine olan etkisini

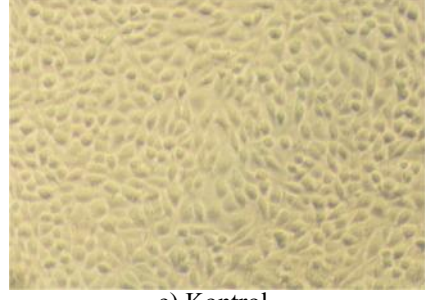
belirlemek için kullanılan iki farklı yöntemden tripan mavisi 5RP7 hücre ölümünün MTT yöntemine göre biraz fazla olduğunu gösterdi.



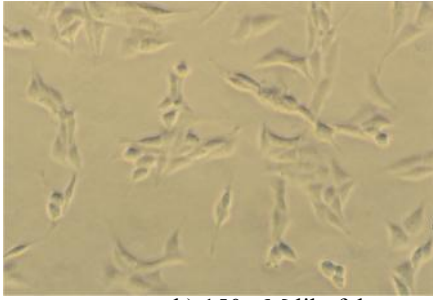
Şekil 4.12.: Kolçisin dozlarının (150, 200 ve 250 μM) 24 ve 48 saat süreyle 5RP7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.



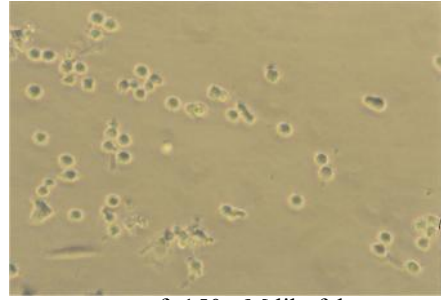
a) Kontrol



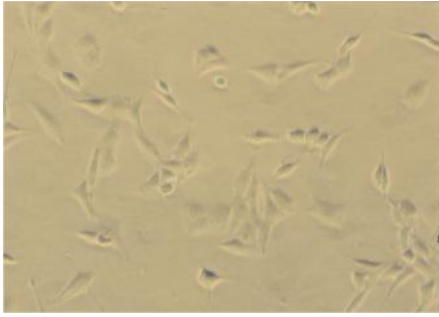
e) Kontrol



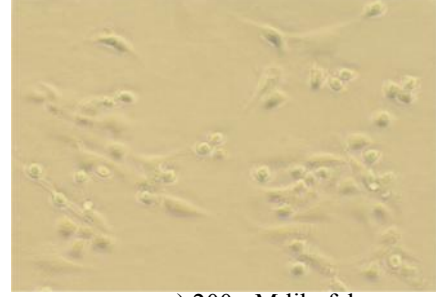
b) 150 µM likofelon



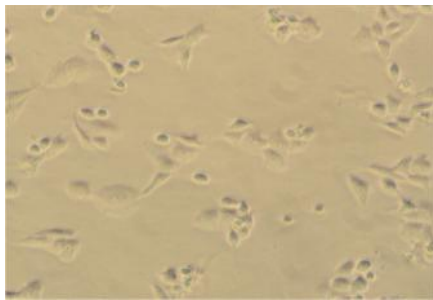
f) 150 µM likofelon



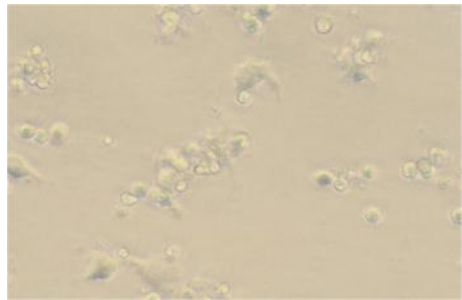
c) 200 µM likofelon



g) 200 µM likofelon

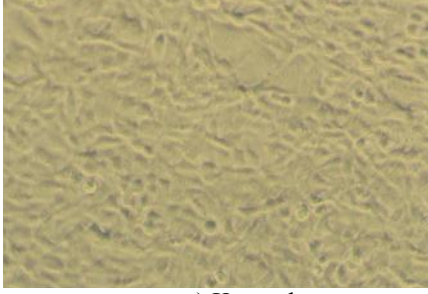


d) 250 µM likofelon

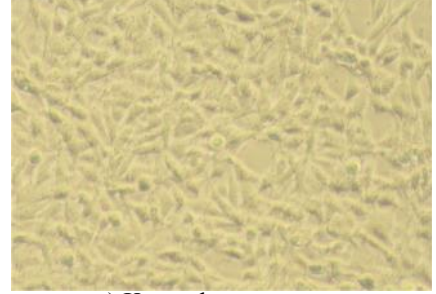


h) 250 µM likofelon

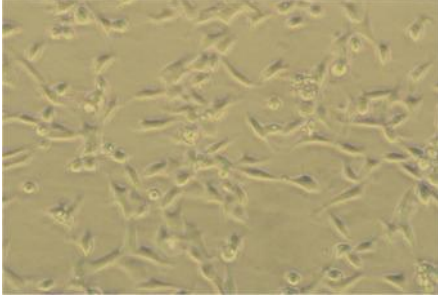
Şekil 4.13. Likofelon dozlarının (150, 200 ve 250 µM) 24 ve 48 saat uygulanmasının ardından C6 hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri. a-d: 24 saat, e-h: 48 saat. X 200



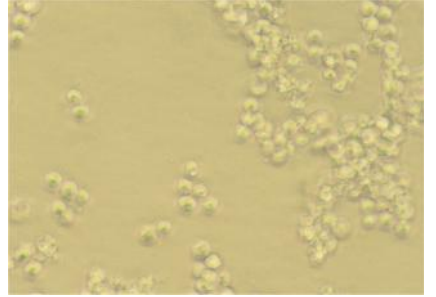
a) Kontrol



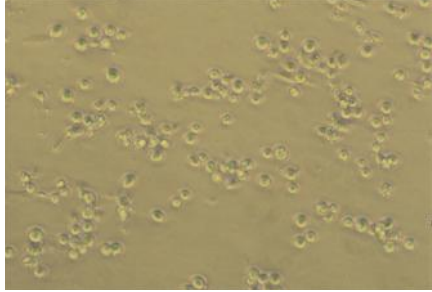
e) Kontrol



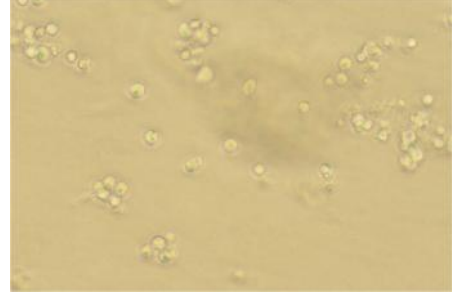
b) 150 µM likofelon



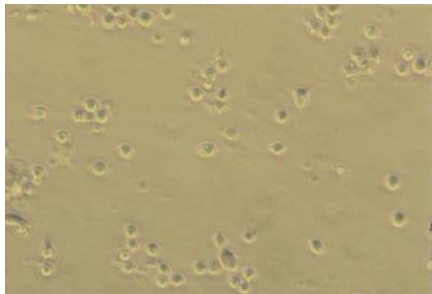
f) 150 µM likofelon



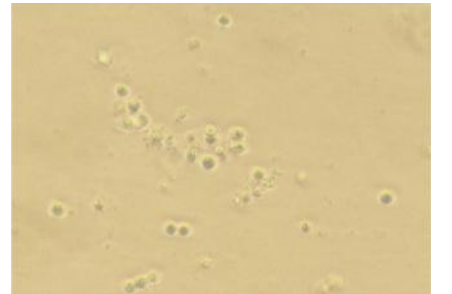
c) 200 µM likofelon



g) 200 µM likofelon



d) 250 µM likofelon



h) 250 µM likofelon

Şekil 4.14. SRP7 hücrelerine 150, 200 ve 250 µM likofelon dozlarının 24 ve 48 saat uygulanmasının ardından hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri. a-d: 24 saat, e-h: 48 saat. X 200

Kanserli glioma C6 hücre canlılığı üzerine 10, 50 ve 100 μ M likofelonun etkisi görülmezken, 150, 200 ve 250 μ M likofelon hücre canlılığını anlamlı ölçüde doz ve zamana bağlı olarak azalttı. Likofelon uygulamasında 24 ve 48 saatte en yüksek dozda ölüm oranı sırasıyla %74 ve %93 olarak hesaplandı. Elde edilen bu veriler tripan mavisi boyaması ile elde edilen sonuçlara benzerlik gösterdi. Tripan mavisi boyamasıyla en yüksek dozda bu etkiler sırasıyla %72 ve %96 idi. C6 hücrelerine uygulanan kolçisin ve 5-florourasil, likofelonun aksine tüm dozlarda hücre sayısını anlamlı ölçüde azalttı. 5-FU uygulanması sonrasında hesaplanan en yüksek doz ölüm değerleri 24 ve 48 saatte %42 ve %60'dı. Bu ölüm oranları tripan mavisi boyama yöntemiyle elde edilen sonuçlara yakındı. Kolçisin de ölçülen ölüm oranları aynı dozda 24 ve 48 saatte sırasıyla %50 ve %44 olarak hesaplandı. Ancak bu etki zamana ve doza bağlı değildi. Çünkü, 24 ve 48 saatte tüm dozlarda elde edilen ölüm oranı yaklaşık %50-60 civarındaydı. Benzer sonuçlar tripan mavisiyle boyama yöntemi ile de elde edildi. Sonuçta 3 farklı ilacın C6 hücrelerinin yaşam oranları üzerine olan etkisine bakıldığında; 10, 50 ve 100 μ M likofelonun hücre yaşam oranına etki etmediği ancak kolçisin ve 5-FU'in anlamlı azaltma etkisi gösterdiği belirlendi. Ayrıca, kolçisin ile 5-FU etkisinin bu dozlarda karşılaştırılmasında kolçisinin daha öldürücü etki gösterdiği belirlendi. Yüksek dozlarda (150, 200 ve 250 μ M) ise likofelonun özellikle 200 ve 250 μ M dozlarında 24 saatte sırasıyla %45 ve %74; 48 saatte ise %88 ve %93 oranında etki gösterdiği belirlendi. Diğer ilaçlara göre 200 ve 250 μ M dozlarında likofelon hücrelerin yaşam oranlarını azaltmada daha etkilidir. Yüksek dozlarda da 24 saatte kolçisin 5-FU'a göre daha etkili iken 48 saatte ise 5-FU daha etkilidir.

C6 hücrelerindeki sonuçların aksine kanserli fibroblastik hücrelerinde likofen tüm dozlarda anlamlı öldürücü etki gösterdi. Benzer şekilde etkin dozlarda (150, 200 ve 250 μ M) da öldürme oranının daha yüksek olduğu görüldü. Likofelonun bu dozlarda öldürme etki oranları sırasıyla 24 saatte %57, %77 ve %85; 48 saatte %79, %89 ve 92; 5-FU 24 saatte %33, %41 ve %43 ve 48 saatte %72, 73 ve %78, kolçisin 24 saatte %56, %61 ve %58, 48 saatte %76, 75 ve %72 olarak hesaplandı. Elde edilen bu veriler tripan mavisiyle boyama yöntemi sonucu ile de uyum

göstermektedir. Bu dozlarda likofelon, 5RP7 hücrelerinde kolçisin ve 5-FU'e göre daha öldürücü etki göstermektedir. Düşük dozlardaki (10, 50 ve 100 µM) ölüm oranları ise likofelon için 24 saatte %12, %13 ve %14, 48 saatte %14, 28, 27; 5 FU için 24 saatte %29, %29 ve %30, 48 saatte %63, %63 ve %66; kolçisin için 24 saatte %55, %56 ve %56, 48 saatte %71, %73 ve %75 olarak hesaplandı. Verilere göre bu dozlarda 5-FU ve kolçisin, likofelona göre daha öldürücü etki göstermektedir. Kolçisinin süreye bağlı kalmaksızın tüm dozlarda 5-FU'e göre öldürme oranı daha yüksek bulundu.

Elde edilen verilerden, likofelonun C6 hücrelerine göre 5RP7 hücreleri üzerinde daha fazla öldürücü etki gösterdiği anlaşılmaktadır. 5-FU ise 5RP7 hücrelerinde 48 saatte C6 hücrelerine göre daha etkilidir. Kolçisinin ise C6 hücrelerinde 24 ve 48 saatteki etkisinin doz ve zamana bağlı olmadığı ve bu etkinin %40-%50 arasında olduğu görüldü. 5RP7 hücrelerinde de bu etki 24 saat için doza bağlı olmaksızın %50-%60 arasında; 48 saatte ise %70-%80 arasındaydı. MTT ve tripan mavisiyle boyama yöntemleri karşılaştırıldığında genel olarak elde edilen veriler birbirine paralellik göstermektedir. Ancak yine de tripan mavisiyle boyama yönteminin hücre canlılık oranlarının belirlenmesinde daha hassas olduğu söylenebilir. Hücrelerin mikroskopik görüntüleri de ilaçların hücre çoğalması üzerindeki etkileri hakkında fikir vermektedir (şekil 4.13 ve 4.14).

4.2. Likofelonun, 5-FU'in ve kolçisinin apoptoz üzerine etkileri

Kanserli glia hücrelerinde ilaçların 24 saat ve 150 µM uygulanmasından sonra kontrole göre erken apoptoz oranının çizelge 4.1'de gösterildiği gibi en fazla kolçisin dozunda %3,3 değerine ulaştığı diğer ilaçların etki etmediği görüldü. Süre 48 saate çıkarıldığında ise bu oran kontrol değerine (%1,4) göre likofelon'da 1,4'e, 5-FU' de 4,4' e ve kolçisinde %8,8'e çıktı (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Likofelon ile 24 saat muamele edilen C6 hücrelerinde belirlenen apoptoz sonuçlarının pozitif kontrollerle karşılaştırılması.

C6 Hücre yüzdesi	Kontrol	150 µM Likofelon	150 µM 5-FU	150 µM Kolçisin
Canlı	79,4 ± 4,9	78,9 ± 1,3	71,5 ± 7,3	70,2 ± 7,5
Erken apoptotik	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,4	1,6 ± 0,3	3,3 ± 0,8
Geç apoptotik ya da nekrotik	15,1 ± 4,6	18,9 ± 2,2	25,5 ± 7,8	20,4 ± 5,9

Çizelge 4.2. Kanserli glia hücrelerinde 48 saat 150 µM likofelon uygulaması sonucu elde edilen apoptoz verilerinin kolçisin ve 5 florourasille karşılaştırılması.

C6 Hücre yüzdesi	Kontrol	150 µM Likofelon	150 µM 5-FU	150 µM Kolçisin
Canlı	81,4 ± 7,1	77, 1 ± 4,3	75,2 ± 7,9	74,3 ± 11,1
Erken apoptotik	1,4 ± 0,1	1,8 ± 1,4	4,4 ± 1,4	8,8 ± 3,4
Geç apoptotik ya da nekrotik	15,64 ± 6,3	18,9 ± 4,1	18,9 ± 8,6	15,1 ± 7,2

Glioma hücrelerinde ilaç dozları 200 µM'a çıkartıldığında kolçisinin 24 saatte diğer ilaçlara göre erken apoptotik hücre oranını az da olsa arttığı (çizelge 4.3.), 48 saatte ise likofelon kontrole göre (%1,4) erken apoptotik hücre oranını %21,4'lere kadar çıkardığı görüldü. Bu oran 5-FU için 4,1 ve kolçisin için 7,6 idi (çizelge 4.4).

Çizelge 4.3. Likofelon ile 24 saat muamele edilen C6 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdelерinin kolçisin ve 5-FU ile karşılaştırılması.

C6 Hücre yüzdesi	Kontrol	200 µM Likofelon	200 µM 5-FU	200 µM Kolçisin
Canlı	79,4 ± 4,9	80,3 ± 3,1	69,1 ± 7,3	66,6 ± 3,3
Erken apoptotik	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,4	1,8 ± 0,3	3,5 ± 1,6
Geç apoptotik ya da nekrotik	15,1 ± 4,6	17,6 ± 4,1	27,5 ± 11,9	20,1 ± 5,4

Çizelge 4.4. Kanseri glioma hücrelerinde apoptotik hücre oranlarının 48 saat ilaç uygulanmasından sonra karşılaştırılması.

C6 Hücre yüzdesi	Kontrol	200 µM Likofelon	200 µM 5-FU	200 µM Kolçisin
Canlı	81,4 ± 7,1	43,9 ± 28,6	72,2 ± 1,8	74,3 ± 10,1
Erken apoptotik	1,4 ± 0,1	21,4 ± 14,5	4,1 ± 1,4	7,6 ± 3,5
Geç apoptotik ya da nekrotik	15,6 ± 6,3	33,6 ± 13,3	21,1 ± 4,3	16,3 ± 6,5

En yüksek dozdaki likofelonun 24 saatteki C6 hücrelerinin erken apoptotik hücre oranı değeri %6,8 dir ve diğer ilaçlara göre daha etkilidir (çizelge 4.5). Likofelon 48 saatte ise erken apoptoz oranını %28,2' ye kadar çıkarmıştır (çizelge 4.6).

Çizelge 4.5. Aynı dozlardaki ilaçlarla 24 saat muamele edilen C6 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdelерinin karşılaştırılması.

C6 Hücre yüzdesi	Kontrol	250 µM Likofelon	250 µM 5-FU	250 µM Kolçisin
Canlı	79,4 ± 4,9	66,4 ± 13,7	68,0 ± 11,9	67,6 ± 2,5
Erken apoptotik	0,9 ± 0,2	6,8 ± 4,2	1,67 ± 0,7	3,5 ± 1,4
Geç apoptotik ya da nekrotik	15,1 ± 4,6	26,5 ± 8,7	24,2 ± 12,3	19,1 ± 2,2

Çizelge 4.6. Likofelon ile 48 saat muamele edilen C6 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdelерinin kolçisin ve 5-FU ile karşılaştırılması.

C6 Hücre yüzdesi	Kontrol	250 µM Likofelon	250 µM 5-FU	250 µM Kolçisin
Canlı	81,4 ± 7,1	3,2 ± 0,9	70,2 ± 8,4	66,7 ± 14,9
Erken apoptotik	1,4 ± 0,1	28,2 ± 11,2	4,9 ± 3,5	8,5 ± 3,4
Geç apoptotik ya da nekrotik	15,6 ± 6,3	67,8 ± 17,9	23,4 ± 9,6	22,6 ± 10,1

Trasforme fibroblastik hücrelerde 24 ve 48 saatte 150 μ M ilaç uygulaması sonucunda kolçisin ve 5-FU likofelona göre doz ve zamana bağlı olarak erken apoptozu uyarmaktadır (çizelge 4,7). Kolçisin 48 saatte erken apoptoz değerini kontrol değerine (%2) göre %45,6'ya çıkardı. Bu etki 5-FU için %19,1 ve likofelon için %3,7 idi (çizelge 4.8).

Çizelge 4.7. Fibroblast kökenli 5RP7 hücrelerine 24 saat süreyle 150 μ M likofelon uygulaması sonucunda elde edilen apoptotik hücre yüzdelerinin karşılaştırılması.

5RP7 hücre yüzdesi	Kontrol	150 μM Likofelon	150 μM 5-FU	150 μM Kolçisin
Canlı	90,4 \pm 2,1	86,3 \pm 0,9	73,4 \pm 4,9	47,2 \pm 2,4
Erken apoptotik	1,4 \pm 0,2	1,3 \pm 0,1	9,0 \pm 1,1	31,4 \pm 4,2
Geç apoptotik ya da nekrotik	5,7 \pm 3,7	11,4 \pm 1,5	19,0 \pm 1,8	20,0 \pm 1,5

Çizelge 4.8. Transforme 5RP7 hücrelerinde 48 saat ilaç uygulaması sonrası apoptotik hücre yüzdelerinin karşılaştırılması.

5RP7 hücre yüzdesi	Kontrol	150 μM Likofelon	150 μM 5-FU	150 μM Kolçisin
Canlı	87,4 \pm 1,3	71,2 \pm 6,3	35,9 \pm 4,4	34,3 \pm 13,4
Erken apoptotik	2,0 \pm 0,5	3,7 \pm 1,3	19,1 \pm 4,9	45,6 \pm 16,2
Geç apoptotik ya da nekrotik	10,8 \pm 2,4	21,0 \pm 4,1	41,8 \pm 9,2	19,1 \pm 2,5

5RP7 hücrelerinde 200 µM likofelon zamana bağlı olarak erken apoptotik hücre oranını arttırdı (çizelge 4.9. ve 4.10). Yine en büyük artış oranı kolçisin de gözlemlendi.

Çizelge 4.9. 5RP7 hücrelerinde 24 saat 200 µM likofelon uygulaması sonucu elde edilen apoptotik verilerin pozitif kontrollerle karşılaştırılması.

5RP7 hücre yüzdesi	Kontrol	200 µM Likofelon	200 µM 5-FU	200 µM Kolçisin
Canlı	90,4 ± 2,1	68,5 ± 13,3	73,89 ± 1,5	43,4 ± 3,4
Erken apoptotik	1,4 ± 0,2	3,86 ± 1,1	8,6 ± 0,6	36,7 ± 0,9
Geç apoptotik ya da nekrotik	5,7 ± 3,7	23,9 ± 10,5	13,9 ± 0,9	18,2 ± 3,4

Çizelge 4.10. 5RP7 hücrelerinin apoptotik hücre yüzdelерinin 48 saat ilaç uygulaması sonrası flow sitometrik olarak belirlenmesi.

5RP7 hücre yüzdesi	Kontrol	200 µM Likofelon	200 µM 5-FU	200 µM Kolçisin
Canlı	87,4 ± 1,3	9,4 ± 7,7	33,3 ± 5,0	30,9 ± 1,6
Erken apoptotik	2,0 ± 0,5	20,4 ± 8,2	21,6 ± 4,1	50,1 ± 1,5
Geç apoptotik ya da nekrotik	10,8 ± 2,4	66,9 ± 1,3	51,2 ± 3,3	16,9 ± 0,6

En yüksek dozda uygulanan ilaçların erken apoptoza olan etkileri ise diğer dozlara göre daha belirgindi. Ras onkogeni uyarılmış 5RP7 hücrelerinde 24 saatteki likofelon, kolçisin ve 5-FU'in erken apoptotik uyarım oranları sırasıyla %7,2 - %44,4 ve %9,6 (çizelge 4.11), 48 saatte ise %27,1 – 59,6 ve 24,2 idi (çizelge 4.12). Bu veriler en yüksek dozdaki etkinin zamana bağlı olarak arttığını gösterdi.

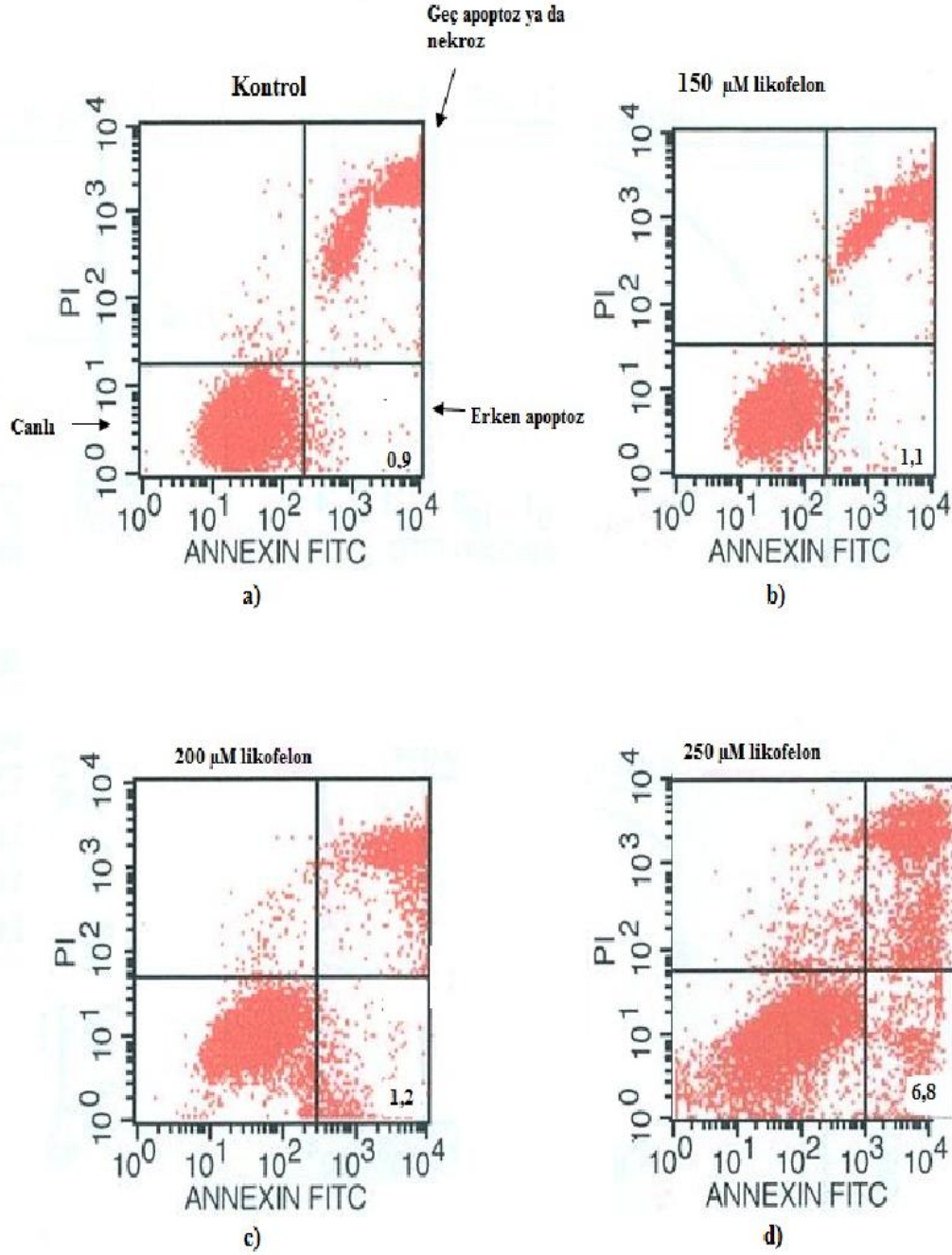
Çizelge 4.11. Likofelon ile 24 saat muamele edilen fibroblastik 5RP7 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdelerinin kolçisin ve 5-FU ile karşılaştırılması.

5RP7 hücre yüzdesi	Kontrol	250 µM Likofelon	250 µM 5-FU	250 µM Kolçisin
Canlı	90,4 ± 2,1	51,1 ± 21,8	70,3 ± 2,5	34,1 ± 13,1
Erken apoptotik	1,4 ± 0,2	7,2 ± 4,4	9,6 ± 0,5	44,4 ± 17,1
Geç apoptotik ya da nekrotik	5,7 ± 3,7	39,9 ± 19,5	19,4 ± 2,3	16,3 ± 3,8

Çizelge 4.12. 5RP7 hücrelerinde 48 saat 250 µM ilaç doz uygulaması sonrası flow sitometrik yöntemle belirlenen apoptotik hücre yüzdelerinin karşılaştırılması

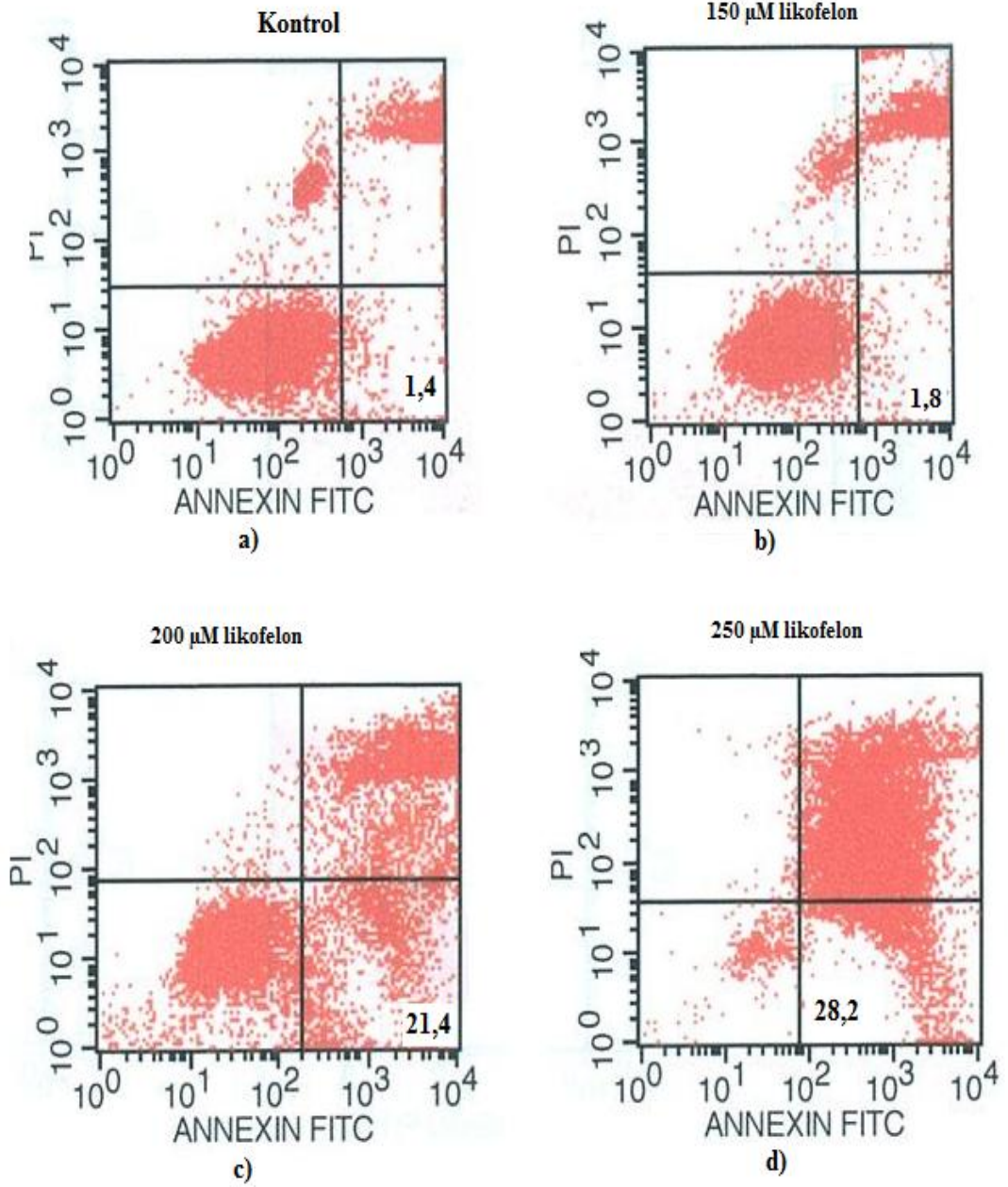
5RP7 hücre yüzdesi	Kontrol	250 µM Likofelon	250 µM 5-FU	250 µM Kolçisin
Canlı	87,4 ± 1,3	2,3 ± 0,5	27,6 ± 2,7	21,9 ± 1,3
Erken apoptotik	2,0 ± 0,5	27,1 ± 8,9	24,2 ± 6,4	59,6 ± 3,1
Geç apoptotik ya da nekrotik	10,8 ± 2,4	69,3 ± 18,4	44,4 ± 8,8	17,3 ± 3,4

Likofelon en yüksek dozda kanserli glioma hücrelerinde erken apoptozu uyarmaktadır. Erken apoptoz kontrol (%0,9) değeri 24 saatlik likofelon uygulaması sonucunda %6,8 değerine çıktı (şekil 4.15).



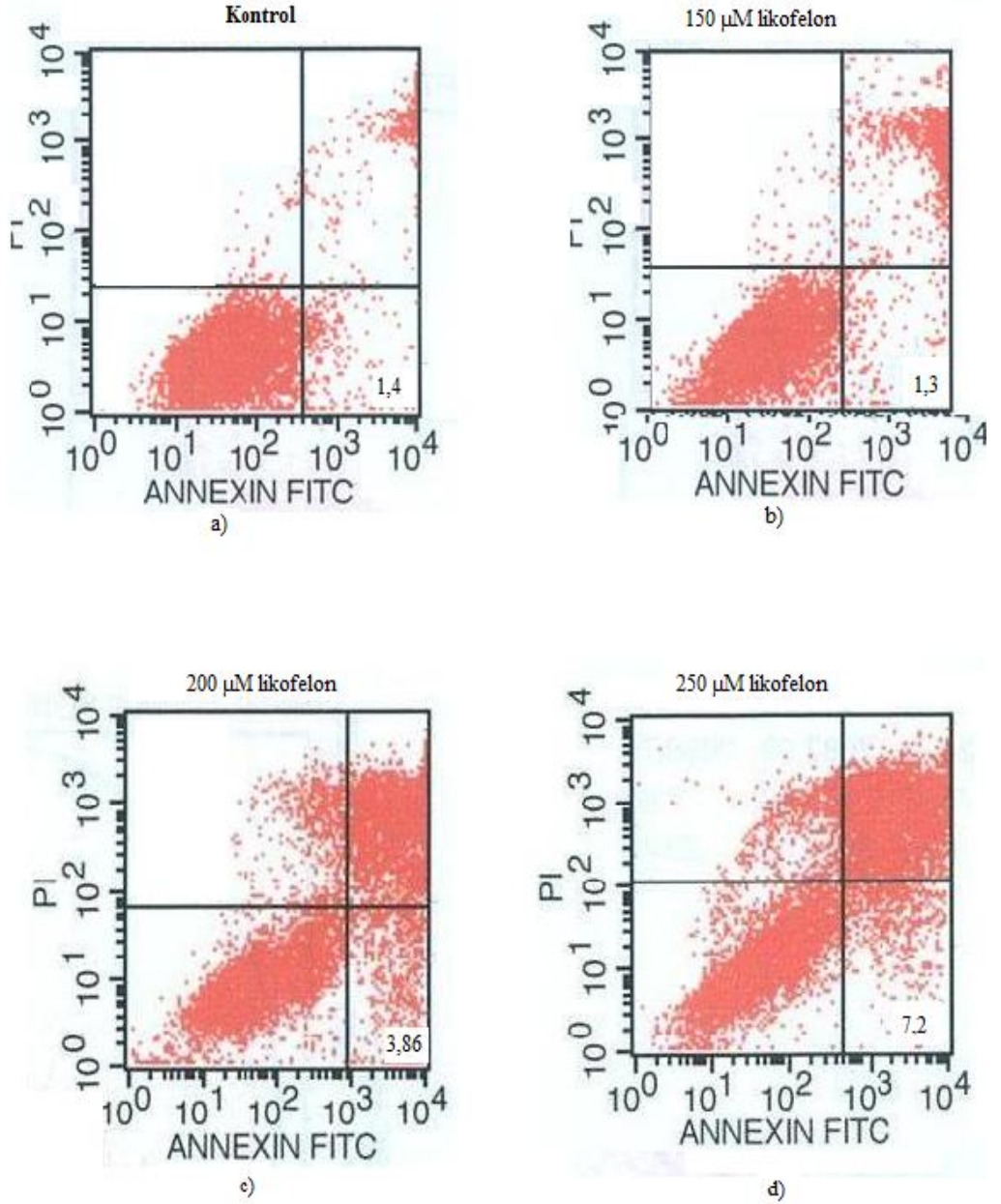
Şekil 4.15 (a- d). Likofelon dozlarının (150, 200 ve 250 µM) 24 saat uygulanmasının ardından C6 hücrelerinin erken apoptotik hücre yüzdelerinin flow sitometrik yöntemle belirlenmesi

Kanserli C6 hücrelerinde 48 saat likofelon uygulaması sonucu elde edilen erken apoptotik değerleri özellikle 200 ve 250 μM dozlarında 24 saate göre daha yüksektir (şekil 4.16). Likofelon doz ve zamana bağlı olarak C6 hücrelerinde apoptozu uyarmaktadır.



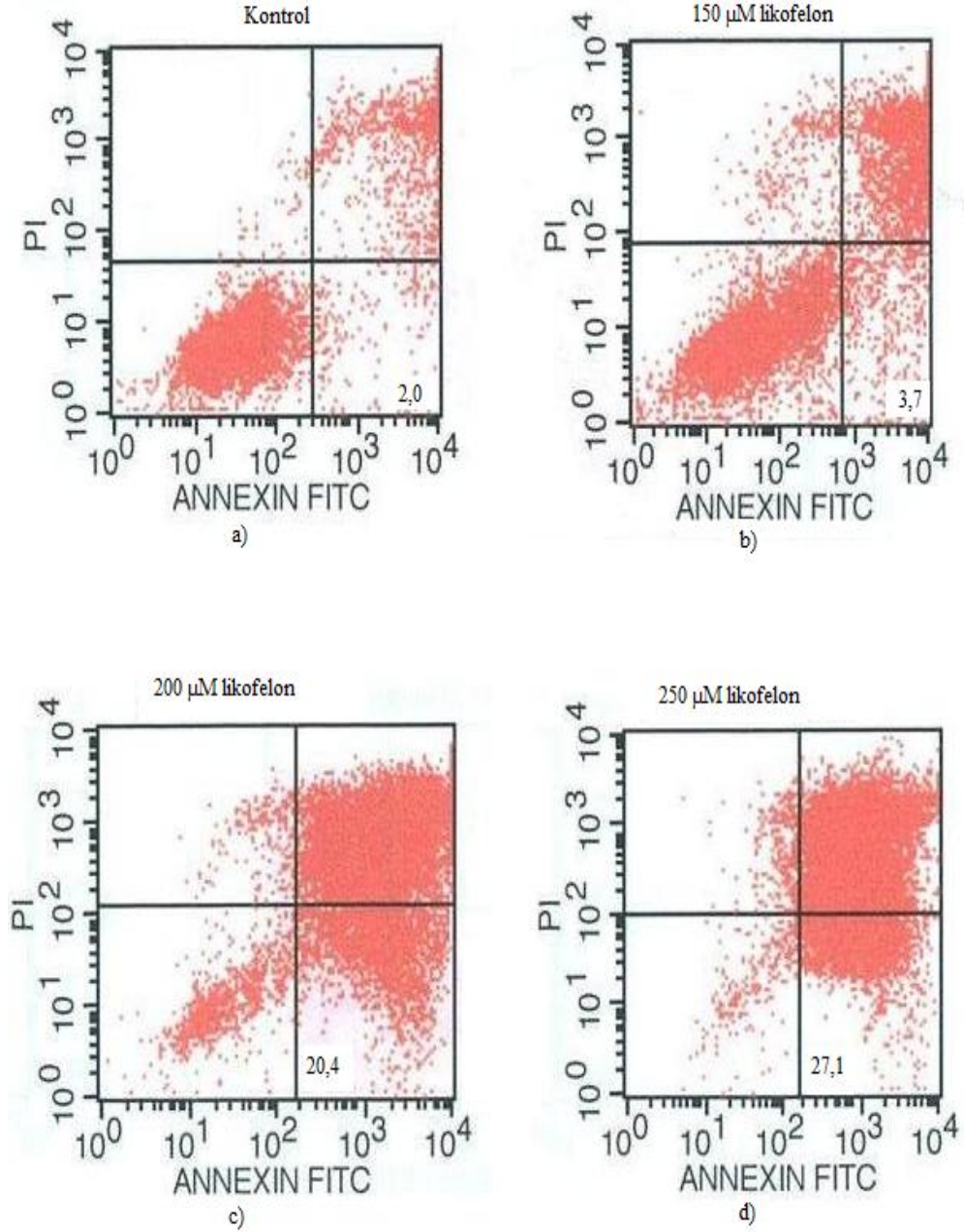
Şekil 4.16 (a- d). Kanserli glioma C6 hücrelerine 48 saat likofelon uygulanması sonrası ortaya çıkan erken apoptotik hücre yüzdeleri.

5RP7 hücrelerinde 24 saat likofelon uygulaması sonucunda elde edilen en yüksek erken apoptotik oran %7,2 dir. Bu değer C6 hücrelerindeki değer ile paralellik göstermektedir (şekil 4.17).



Şekil 4.17 (a- d). Transforme fibroblast hücrelerinde 24 saat likofelon dozlarının (150, 200 ve 250 μ M) uygulanmasının ardından 5RP7 hücrelerinde erken apoptotik hücre yüzdelerinin flow sitometrik yöntemle belirlenmesi

Ras onkogeni uyarılmış 5RP7 hücrelerinde doza bağlı olarak 48 saatte likofelon erken apoptozu uyarmaktadır. Elde edilen verilerin 24 saatlik verilere göre %olarak daha yüksektir. (şekil 4.18).



Şekil 4.18 (a- d). Likofelon dozlarının 48 saat uygulanması sonrası 5RP7 hücrelerinde erken apoptotik hücre yüzdelерinin belirlenmesi

Flow sitometrik olarak elde edilen veriler değerlendirildiğinde, likofelon C6 hücrelerinin erken apoptotik hücre oranlarını doz ve zamana bağlı olarak arttırdı. Kolçisin ise tüm dozlarda erken apoptozu 24 saatte kontrole göre (%0,9) yaklaşık %3,5 değerine, 48 saatte ise yine tüm dozlarda %7,5 değerine yükseltti. 5-FU de benzer şekilde 24 saatte tüm dozlarda yaklaşık %1,7; 48 saatte ise %4,5 değerine yükseltti. Sonuçta C6 hücrelerinin erken apoptotik hücre oranını en fazla likofelon arttırdı. En yüksek dozdaki erken apoptotik hücre oranı 48 saatte %28,2 dir.

Trasforme olmuş 5RP7 hücrelerinde ise tüm ilaçlarda doz ve zamana bağlı olarak erken apoptotik hücre oranları artmaktadır. Bu değerler içinde en yüksek dozda ve sürede likofelon için %27,1, kolçisin için %59,6 ve 5-FU için %24,2 dir. Sonuçta 5RP7 hücrelerinde, doz ve zamana bağlı olarak en çok kolçisin erken apoptotik hücre oranını arttırdı.

Likofelonun her iki hücre dizisindeki erken apoptoz uyarımına etkisi birbirine paralellik göstermektedir. Likofelon doz ve zamana bağlı olarak C6 ve 5RP7 hücrelerinin erken apoptozu gitmelerini uyarmaktadır. En yüksek doz ve sürede bu oranlar C6 hücreleri için 48 saatte %28,2 iken 5RP7 hücreleri için %27,1 dir.

Kolçisin 5RP7 hücrelerinde, C6 hücrelerine göre erken apoptoz uyarımını tüm dozlarda süreye bağlı olarak daha çok etkiledi. En uzun süre ve dozda C6 hücrelerinin erken apoptotik hücre oranı %8,5 larda kalırken, 5RP7’de bu oran %59,6’lara çıktı.

5-florourasilin 24 saatte C6 hücrelerinin erken apoptoz uyarımına etkisi çok düşükken, 48 saatte ise kontrole (%1,4) göre bu oran %4 civarındadır. Kanserli fibroblast hücrelerinde ise 5-FU erken apoptozu daha çok uyarmaktadır. Bu oran en uzun süre ve yüksek dozda %24,2 dir.

5. TARTIŞMA

MTT yöntemi ile yapılan denemelerde, C6 hücrelerinin yaşam oranları üzerine 10, 50, 100 μM dozlarındaki likofelonun 24 ve 48 saatte herhangi bir etkisi saptanmadı, fakat 150, 200 ve 250 μM likofelon dozları hücre yaşam oranları %90'lara varan oranlarda azalttı. 5RP7 hücrelerinde ise kullandığımız tüm likofelon dozları hücre yaşam oranlarını %12 ile %92 arasında azalttı. Pozitif kontrol olarak kullandığımız ilaçlardan 5-FU, C6 hücrelerini %22 ile %60 arasında; 5RP7 hücrelerini ise %29 ile %78 arasında öldürdü. Kolçisinin öldürme oranları ise C6 hücreleri için %41 ile %44, 5RP7 hücreleri için %55 ile %72 idi. Tripan mavisi boyama yöntemi ile yapılan ölçümlerde benzer şekilde 150, 200 ve 250 μM dozlarında likofelon hücrelerin yaşam oranları anlamlı ölçüde azalttı. MTT ve tripan mavisi boyama yöntemi karşılaştırıldığında ise (150, 200 ve 250 μM dozlarında) MTT yöntemine göre biraz daha hassas olduğu belirlendi. Bu hassalığın tripan mavisi boyama yönteminin boya yoğunluğundaki kontrast ve piksel farkını tespit ederek hem canlılık oranını ve hem de ölüm oranını daha hassas ölçmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Likofelonun kanserli prostat hücrelerinde COX and LOX yolaklarını baskılayarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (57).

Doymamış yağ asit metabolizması ve kanser oluşumu arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılan moleküler düzeydeki çalışmalar kanserden korunma ve kanser tedavisinde yeni molekülleri ortaya koymaktadır (16). Araşidonik asitin kanser oluşumuna katkısı yolundaki bilgilerin artmasından sonra dikkatler araşidonik asit ve metabolizmasına çevrilmiştir (34). COX ve LOX enzimlerinin düzeyi bağırsak, meme akciğer, pankreas ve yemek borusu kanserlerinde yüksek bulunmuştur (10,11,17,34,74). COX ve LOX yolakları hücre çoğalmasında ve yeni damar oluşumunda anahtar düzenleyicilerdir. Bu nedenle klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, COX ve LOX baskılayıcı ilaçların potansiyel antikanser ilaçlar olarak kullanılması yönünde çalışmalar devam etmektedir (34,59). İnsan kanserli kolon hücrelerinde normal kolon mukozasına göre COX-2 sentezinin,

prostaglandinlerin ve özellikle PGE₂'nin arttığı gösterilmiştir (19,36). Kültür ortamında da insan kanserli kolon hücre dizisinde (HT-29) prostaglandinlerin arttığı gösterilmiştir. Hatta normal farelerde PGE₂ enjeksiyonun kolon hücrelerinde çoğalmaya yol açtığı da gösterilmiştir (63). Son yıllarda yapılan çalışmalarda da tümör gelişiminde büyük görevi olan yeni damar oluşumu için de COX-2 enziminin gerekliliği ortaya konmuştur (34,59). COX-2'nin hücreleri çoğaltıcı etkisinin prostaglandinlerin aktivitesinden olduğuna inanılmaktadır. Ayrıca COX-2 (-/-) farelerde damar yoğunluğunun ve büyüklüğünün azaldığı da gösterilmiştir (59,63).

Bir çok çalışmada özellikle yağ asitlerince zengin yağlı beslenmenin pankreas ve prostat kanser gelişimine ve büyümesine eşlik ettiği bildirilmektedir (23,75). Hatta LOX yolağı metabolitleri kanserli pankreas hücrelerinde mitojen aktive edici protein kinazları aktive ederek kanser büyümesini uyarmaktadır (17). Benzer şekilde 5-HETE'nin insan prostat kanserlerinin çoğalması için de gerekli olduğu gösterilmiştir (11,76). Kanserli glia hücrelerinde de COX-2 sentezinin arttığı ve bu artışın VEGF haberleşmesini ve yeni damar oluşumunu uyardığı gösterilmiştir (34). Sonuçta COX baskılanmasının kanser oluşumunu azalttığına ve hücrelerin çoğalmasını engellediğine yönelik çalışmalar oldukça artmıştır (17).

Kanserli kolon, akciğer, göğüs, prostat, kemik ve beyin hücrelerinde de normal hücrelere göre 5-LOX sentezinin arttığı gösterilmiştir. Kanserli hücrelerde 5-LOX enziminin biyolojik fonksiyonları 5-LOX enzim baskılayıcılarıyla araştırılmıştır. 1980 yılından itibaren kanserli hücre dizilerinde 5-LOX baskılayıcılarının hücre çoğalmasını azaltıcı etkisi bildirilmektedir. Bu da 5-LOX enziminin kanserli hücre çoğalmasını ve hücrelerin yaşayabilirliğini arttırdığını göstermektedir. Bu etkinin tam olarak nasıl olduğu ortaya konulamamıştır. Ancak bu etkilere büyüme faktörlerinin de aracılık ettiği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda 5-LOX ürünlerinden olan 5-HETE ve LTA₄'ün kanserli hücrelerde damar endotel büyüme faktörünün (VEGF) yapımını arttırdığı da gösterilmiştir (34,63). Bu nedenle 5-LOX enziminin kanser oluşumu ve gelişimine etkisi çift

yönlüdür. Bir yandan hücrelerin çoğalmasını uyarırken diğer yandan da yeni damar oluşumuna katılarak tümörün büyümesine yol açmaktadır.

COX-2 ve 5-LOX enzimlerinin kanser üzerindeki etkileri birbirine benzerlik göstermektedir. Öncelikle her ikisinin de sentezi ve salınımı insan kanserli akciğer, bağırsak, prostat ve meme hücrelerinde artmaktadır (17,34,63). Yine ikisinin ortak özelliği VEGF sentezini ve salınımını uyarmasıdır. COX ve LOX baskılayıcıları bir çok kanser tipinde hücre döngüsünü durdururlar ve apoptozu uyarırlar. Genotoksik stresle sentezi artan 5-LOX ve COX enzimleri p53 uyarımlı hücre ölümünü de baskılamaktadır. Bu nedenle bir çok kanser türünde COX ve LOX enzimlerini baskılayıcı ilaçlar klinik olarak kullanılmaktadır (59,63). Kanserli bağırsak, akciğer, meme, pankreas, prostat, glia hücrelerinde COX ve LOX enzim yapımının arttığı ve bu artışa bağlı olarak yapımları artan eikosanoidlerin hücrelerde çoğalmayı uyardığı ve apoptosizi engellediği gösterilmiştir (34,63,72,75,80). Kanserli bağırsak ve pankreas hücrelerinde LOX ve COX baskılayıcılarının kullanılmasının hücre çoğalmasını azalttığı ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (72).

Kullandığımız ilaçların hücreleri öldürme mekanizmasını belirleyebilmek için yapılan erken apoptoz ölçümlerinde ilaçların zamana ve doza bağlı olarak apoptozu uyarmalarında ya da hücreyi nekroza götürmelerinde farklılıklar olduğu belirlendi. C6 hücrelerinde 250 µM likofelonun 24 saatte erken apoptozu kontrole göre %0,9 değerinden %6,8 değerine çıkardığı tespit edildi. Diğer dozlarda erken apoptoz değerinde belirgin bir değişiklik olmadı. Likofelonun 48 saat uygulaması sonrasında ise 200 ve 250 µM dozlarında erken apoptotik hücre oranını sırasıyla kontrole (%1,4) göre %21,4 ve %28,2' ye çıkardığı ve erken apoptozu uyardığı belirlendi. Pozitif kontrol ilaçlarla bu uyarım oranları karşılaştırıldığında, 24 saatte kolçisin en yüksek dozda kontrole göre apoptotik hücre oranını %3,5'e; 48 saatte kontrole göre %8,5 değerine çıkardı. 5-florourasil ise 24 saatte kontrole göre %1,67; 48 saatte ise %4,9 değerine çıkardı. Elde edilen verilere göre likofelon doza ve zamana bağlı olarak C6 hücrelerinin apoptozunu uyarmaktadır. Likofelonun anti-kanser özelliği

kanıtlanmış pozitif kontrollere göre C6 hücre apoptozunu uyarmada da daha etkili olduğu tespit edildi.

5RP7 hücrelerinde likofelon erken apoptotik hücre yüzdesini kontrole (%1,4) göre 24 saatte en yüksek dozda %7,2 değerine çıkartırken; 48 saatte ise kontrole (%2,0) göre %27,1 değerine kadar çıkardı. Kolçisin 24 saatte en yüksek dozda apoptoz oranını kontrole göre %44,4'e; 48 saatte ise %59,6'ya yükseltti. 5 fluorourasil ise 24 saatte erken apoptoz oranını kontrole göre %9,6; 48 saatte ise %24,2 değerlerine çıkardı. Bu sonuçlara göre likofelon, 5-FU ve kolçisin 5RP7 hücrelerinde erken apoptozu doza ve zamana bağlı olarak uyarmaktadır. Likofelon, 5RP7 hücrelerinin erken apoptozunu uyarmada 48 saatte kolçisin kadar olmasa da 5-FU kadar etkilidir.

Likofelon kanserli kolon hücrelerinde araşidonik asitten bağımsız bir yolak üzerinden mitokondriden salınan sitokrom c aracılı kaspaz 3 ve 9 uyarımı ile doza ve zamana bağlı olarak apoptozu uyarıcı ve kanser baskılayıcı etki göstermiştir. Benzer şekilde likofelon apoptoz uyarıcı etkisi düşük olan proteinlerin apoptoz uyarıcı etkisi daha yüksek olan proteinlere dönüşümünü de uyarmaktadır (73). Hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda, araşidonik asitin 5-LOX yolağının baskılanmasının mitokondriden sitozole sitokrom c salınımını uyarak pankreatik hücrelerin apoptozunu uyardığı ve kanser hücre çoğalmasını baskıladığı da gösterilmiştir (75). Mekanizması tam olarak açıklanamasa da COX enzim aktivitesinin baskılanmasının bağırsak, deri, pankreas ve yemek borusu kanserini de engellediği ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (17,63,72). Araşidonik asit ürünü maddelerin ikinci haberciler gibi davranarak apoptozu düzenlediği bilinmektedir (10). Benzer şekilde kanserli pankreatik hücre dizisinde 5-LOX/COX-2 iki yönlü baskılayıcı ilaçlardan dihidrofuran-30 (DHDMBF30)'un hücrelerin çoğalmasını baskılarken hücrelerin apoptozunu uyardığı gösterilmiştir (85). Kanserli akciğer hücrelerinde de COX-2'nin aşırı yapımı ve salınımı hücre çoğalmasını uyarmasına, apoptoza karşı direnç oluşturmasına ve yeni damar oluşumuna katkısı bilinmektedir (72).

Likofelon araşidonik asit metabolizmasının COX ve LOX yolaklarının her ikisini de baskıladığından inflamasyon hastalıkların tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Bir çok çalışmada likofelonun hücrelerde eikosanoid oluşumunu engellediği gösterilmiştir (8). Kanseri oluşumunda ya da kanserin büyümesi veya yayılmasında COX ve LOX yolaklarının aşırı uyarılması göz önüne alındığında, likofelonun çalışmamızda ilk kez kanserli C6 ve ras onkogeni uyarılmış 5RP7 hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak hücre çoğalmasını baskılayıcı ve apoptozu uyarıcı etkilerinin tespit edilmesi önemlidir.

6. SONUÇ

Doz ve zamana bağlı olarak likofelonun kanserli glia (C6) ve ras onkogeni uyarılmış fibroblast (5RP7) hücre dizilerinde hücre çoğalmasını baskıladığı ve erken apoptozu uyardığı ilk kez bu çalışmada belirlendi. MTT ve tripan mavisi boyaması yöntemleri karşılaştırıldığında elde edilen verilerin çok farklı olmadığı ancak tripan mavisile boyama yönteminin biraz daha duyarlı olduğu tespit edildi. Likofelonun apoptozun hangi mekanizmasını uyardığına yönelik daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Adak, S., 2007, Bazı 5-kloro-6-(tiyazol-4-İL)-2-okso-3H-benzotiyazol türevlerinin sentezi ve COX inhibitör etkileri üzerinde çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 149 s.
2. Akalın, G., ve İncesu, Z., 2005, H-Ras aktif fibroblast hücre apoptozunun bazı 1,3-bis (heteroaril süstitüe) benzen türevleri ile uyarılması, Türk Biyokimya Dergisi, 31, 1, 27–35.
3. Albayrak, S., 2007, Proliferatif vitreoretinopati nedeni ile nüks retina dekolmanı gelişen hastalarda 5-fluorourasil ve düşük molekül ağırlıklı heparin kullanımının retina dekolman rekürensine etkisi, Uzmanlık Tezi, Beyoğlu Göz Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 94 s.
4. Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J.C., Cecceni, F., and Youle, Y.J., 2003, Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization, EMBO J., 1, 22, 4385–4399.
5. Babincová M., Kaljarová, D., Bautista, M.C., And Babinec P., 2009, Contactlens radio-control of colchicine and cisplatin release from magnetoliposomes: New technologies can improve performance of old drugs, Digest Journal Of Nanomaterials And Biostructures, 4, 3, 395-401.
6. Boatright, K.M., Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation, 2003, Curr Opin Cell Biol 15, 725-731.
7. Burke, B., 2001, Lamins and apoptosis, J Cell Biol. 30, 153, 3, 5–7.
8. Burmester, G.R., 2004, Introduction, Rheumatology, 43, suppl 1, 1-3.
9. Cakarto, M., 2008, Preklampsi patogenezinde plasental apoptosizin yeri, Uzmanlık Tezi, 9 Eylül Üniversitesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, 68 s.
10. Cao, Y., Pearman, A.T., Zimmerman G.A., McIntyre T.M. and Prescott, S.M., 2000, Intracellular unstrerified arachidonic acid signals apoptosis, PNAS, 97, 21, 11280-11285.
11. Cenna, M., Oliveri , F., Catalona, A. and Procopio A., 2010, Lipoxigenase inhibitors for cancer prevention: Promises and risks, Curr Pharm Des., 16, 6, 725-733.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

12. Charlier, C. and Michaux, C., 2003, Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Eur J Med Chem.* 2003 Jul-Aug;38(7-8):645-59.
13. Choy, J.C., Cruz, R.P., Kerjner, A., Geisbrecht, J., Sawchuk, T., Fraser, S.A., Hudig, D., Bleackley, R.C., Jirik, F.R., McManus, B.M. and Granville, D.J., 2005, Granzyme B induces endothelial cell apoptosis and contributes to the development of transplant vascular disease, *Am J Transplant*, 5, 3, 494-499.
14. Daugas, E., Susin S.A., Zamzami, N., Ferri, K., Irinopoulou T., Arochette, N., Prévost M.C., Leber, B., Andrews D., Penninger, J., Kroemer, G., 2000, Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis, *The Faseb Journal.*, 14, 729-739.
15. Diamantis, A., Magiorkinis, E., Sakorafas, G.H. and Androutsos, G., 2008, A Brief History of Apoptosis: From ancient to modern times, *Onkologie*, 31, 12, 702-706.
16. Ding, M.C. and Cicuttini F., 2003, Licofelone, *Current I. Drugs*, 6, 802-808.
17. Ding, X.Z., Hennig, R. and Adrian, T.E., 2003, Lipoxgenase and cyclooxygenase metabolism: New insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer, *Molecular Cancer*, 2, 10, 1-12.
18. Dönmez, M., 2008, Kolçisinin ratlarda deneysel olarak oluşturulan intraabdominal adhezyonların gelişimi üzerine etkisi, *Uzmanlık Tezi, Taksim eğitim ve Araştırma Hastanesi*, 45 s.
19. Ergün, B.Ç., 2008, 1,5 diarilpirazol-3-propanoik asit taşıyan COX/5-LOX dual inhibitörü bileşiklerin sentezi ve in vitro inhibitör etki tayinleri üzerinde çalışmalar, *Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 137 S.
20. Fischer, L., Hornig, M., Pergola, C., Franke L., Dodt, G. and Werz O., 2007, The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products, *British Journal of Pharmacology*, 152, 4, 471-480.
21. Formigli, L., Conti, A. and Lippi, D., 2004, Falling leaves: a survey of the history of apoptosis, *Minerva Med.* 95, 2, 159-164.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

22. Fu, J.Y., Masferrer, J.L., Seibert, K., Raz, A. and Needleman, P., 1990, The induction and suppression of prostaglandin H-2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes, *Journal of Biological Chemistry*, 265, 28, 16737-16740.
23. Ghosh, J. and Myers, C.E., 1998, Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *PNAS*, 95,22, 13182-13187.
24. Gökşen, U.S. and Kelekçi, N.G., 2010, Antiinflatuvar tedavide yeni bir yaklaşım: siklooksijenaz ve 5-lipooksijenazın dual inhibitörleri, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 30, 1, 81-118.
25. Granville, D.J. and Gottlieb, R.A., 2002, Mitochondria: regulators of cell death and survival, *The Scientific World Journal*, 11, 2, 1569-1578.
26. Griswold, D.E. and Adams, J.L., 1996, Constitutive Cyclooxygenase (COX-1) and Inducible Cyclooxygenase (COX-2), Rationale for Selective Inhibition and Progress to Date, *Medicinal Research Reviews*, 16, 181-206
27. Grobden, B. DeDeyn, PP. and Slegers, H., 2002, Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion, *Cell Tissue Res.*, 310, 257-270.
28. Gross, A., McDonnel, J.M., and Korsmeyer S.J., 1999, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes & Development*, 13, 1899–1911.
29. He, Fei. And Sun, Y.E., 2007, Glial cells more than support cells?, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 661-665.
30. Hecker, M., Foegh, M.L. and Ramwell, P.W., 1995, The eicosanoids:Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes and related compounds, *Basic and Clinical Pharmacology*, 11, 290-304.
31. Herceg, Z. and Wang, Z.Q., 1999, Failure of poly(ADP-Ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis, *Molecular and Cellular Biology*, 19, 07, 5124–5133.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

32. Heiko, V.K., Haubesis, S., Mürtdler, T., Sonnerberg, M. and Friedel, G., 2010, Dasatinib reverses cancer-associated fibroblasts (cafs) from primary lung carcinomas to a phenotype comparable to that of normal fibroblasts, *Molecular Cancer*, 9,168.
33. Huerta, S., Goulet, E.J., Yopez, S.H. and Livingston, E.H., 2006, Screening and detection of apoptosis, *Journal of Surgical Research*, 139, 1, 143-156.
34. Hyde, C.A.C. and Missailidis, S, 2009, Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis, *International Immunopharmacology*, 9, 701-715.
35. Jin, Z. and El-Deiry, W.S., 2005, Overview of cell death signalling pathways, *Cancer Biol Ther*, 4, 2, 139-163.
36. Joan, C., 2003, Cyclooxygenase-2 biology, *Current Pharmaceutical Design*, 9, 2177-2190.
37. Kayaalp, S.O., 1998, Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar, *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 1, 1007- 1072.
38. Kemerli, Ç., Taşkın, M.M., Güzelhan, Y. ve Kaplan, N., 2003, Deneysel C6 glioma modelinde teknik ve migrasyon yönünden bir inceleme, *Psikiyatri ve Nörolojik Bilimler Dergisi*, 16, 1, 57-64.
39. Kemerli, Ç., Taşkın, M.M., Sütpideler, N., Kaplan, N. ve Ethemoglu, B., 2005, Histopathology, invasion, migration and tumorigenicity in the C6 rat glioma model, *Turkish Neurosurgery*, 15, 3, 109-115.
40. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, 1980, Cell death: the significance of apoptosis, *Int Rev Cytol.*, 68, 251-306.
41. Kızıлтаş, A., 2008, Çocukluk çağı akut lösemilerde serum fas ve fas ligand düzeyleri, *Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları*, 87 s.
42. Kiernan, J.A., 1998, Barr's, the human nervous system. Seventh edition, Lippincott-Raven, U.S.A. 17-41.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

43. Krammer, P.H., Kamiński, M., Kiessling, M., and Gulow, K., 2007, No life without death, *Adv Cancer Res.*, 97, 111-38.
44. Kuhn, H., 2000, Structural basis for the positional specificity of lipoxygenase, prostaglandins and other lipid mediators, 62, 3, 255.
45. Kulkarni, S.K. and Singh, V.P., 2007, Licofelone-a novel analgesic and anti-inflammatory agent, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7, 3, 251-263.
46. Kuş, G., 2004, Leptin hormonunun glia hücreleri üzerindeki olası etkileri, Yüksek Lisans Tezi, ESOGÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 53 s.
47. Kültürsay H. ve Kayıkçıoğlu, M., 2002, Apoptosis ve kardiyovasküler hastalıklar-derleme, *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 2, 4, 323-329.
48. Lei, S., Zhou, H., Xiao, Z., Wung, Z., Yu, H. and Liu, M.A., 2008, Effects of colchicine on proliferation and apoptosis of rat glioma G422 cells in vitro, *Journal of Kunming Medical University*, 5, 24, 17-25.
49. Le-Romancer, M., Cosulich, S.C., Jackson, S.P. and Clarke, P.R., 1996, Cleavage and inactivation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit during apoptosis in *Xenopus* egg extracts, *J Cell Sci*, 109, 13, 3121-3127.
50. Lewis, R.A., Austen, K.F. and Soberman, R.J., 1990, Leukotrienes and other Products of the 5-Lipoxygenase Pathway, *Biochemistry and Relation to Pathobiology in Human Diseases*, *New England Journal Medicinal*, 323, 10, 645-655.
51. Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W., and Wang, X., 1999, Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1, *J Biol Chem*, 274, 20, 13836-13840.
52. MacFarlane, M., and Williams, A.C., Apoptosis and disease: a life or death decision, 2004, *EMBO Rep*, 5,7, 674-678.
53. McCarthy, J.V., 2003, Apoptosis and development, *Essays Biochem.*, 39, 11-24.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

54. McMillan, R.M. and Walker, E.R., 1992, Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors, *Trends in Pharmacological Sciences*, 13, 323-330.
55. Mishra, N.C. and Kumar, S., 2005, Apoptosis: a mitochondrial perspective on cell death, *Indian J Exp Biol.*, 43, 1, 25-34.
56. Mossmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, *J Immun Method* 65, 55-63.
57. Narayanan, K., Nargi, D. and Attur, M., 2007, Anticancer effects of licofelone in prostate cancer cells, *Anticancer Research*, 27, 2393-2402.
58. Oka, Y., Naomato, Y., Yasuoka, Y., Hotano, H., Haisa, M. and Tanaka, N., 1997, apoptosis in cultured human colon cancer cells induced by combined treatments with 5-Fluorouracil, tumor necrosis factor and interferon-a, *Japanese J. Clin*, 27, 4, 231-235.
59. Ölgen, S., Bıçak, I. ve Nebioğlu, D. 2002, Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31, 193-214.
60. Özer, F. ve Yosunkaya, Ş., 2005, Astım ve lökötrienler, *Genel Tıp Dergisi*, 25, 2, 91-99.
61. Picot, D., Loll P.J. and Garavito, R.M., 1994, The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1, *Nature*, 367, 243-249.
62. Rajesh, P., Richa, R., and Sinha R.P., 2009, Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity, *Excli. Journal*, 29, 155-181.
63. Romano, M. and Claria J., 1992, Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase converging fonctions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy, *The FASEB Journal*, 17, 11, 1986-1995.
64. Rostomily, R.C., Berger, M.C. and Keles, E.G., 1996, Radical surgery in the low grade and high grade gliomas, *Clinical Neurology*, 5, 2, 345-369.
65. Samad, T.A., Sapirstein, A., Woolf, C.J., 2002, Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets, *Trends in Molecular Medicine*, 8 (8), 390.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

66. Shen, Y. and White, E., 2001, p53-dependent apoptosis pathways, *Adv Cancer Res.*, 82, 55-84.
67. Sigal, E., 1991, The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism, *Lung Phsiol*, 260, 2, 13 – 28.
68. Snell, RS., 1997, *Clinical neuroanatomy for medical students*. 4th ed, Lippincott-Raven, U.S.A, 76-90.
69. Sobolewski, C., Cerala, C., Dicato, M., Ghibelli, L. and Diederich, M., 2010, The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies, *International Journal of Cell Biology*, 21, 51, 1-21.
70. Sugamura, K., Makino, M., Hiroyoki, S., Kimura, O., Maeta, M., Itoh, H. and Kaibara, N., 1997, Enhanced induction of apoptosis of human gastric carcinoma cells after preoperative treatment with 5-fluorouracil, *Cancer*, 1, 79, 1.
71. Tahzib, N., Ransom N.L., Reitsamer H. A., KcKinnon, S.J., 2004, Alpha-fodrin is cleaved by caspase-3 in a chronic ocular hypertensive (COH) rat model of glaucoma, *Brain Research Bulletin*, 62, 6, 491-495.
72. Tauler, J. and Mulshine, J.L., 2008, Combination therapy of PPAR ligands and inhibitors of arachidonic acid in lung cancer, *PPAR Research*, 10, 1155-1162.
73. Tavolari, S., Bonafè, M., Marini, M., Ferreri, C., Bartolini, G., Brighenti, E., Manara, S., Tomasi, V., Laufer, S., Guarnieri, T., 2008, Licofelone, a dual COX/5-LOX inhibitor, induces apoptosis in HCA-7 colon cancer cells through the mitochondrial pathway independently from its ability to affect the arachidonic acid cascade, *Carcinogenesis*, 29, 2, 371-380.
74. Tong, D., Poot, M., Hu, D. and Oda, D., 2000, 5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells, *Oral Oncology*, 36, 2, 236-241.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

75. Tong, W.G., Ding, X.Z., Witt R.C. and Adrian, T.E., 2002, Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway, *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, 929-935.
76. Tsukada, T., Nakashima, K. and Shirakawa S., 1986, Arachidonate 5-lipoxygenase inhibitors show potent antiproliferative effects on humal leukemia cell lines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14, 140, 832-836.
77. Tural, Ş., Güneş, S., Büyükalpelli, R. ve Bağcı, H., 2006, Mesane Kanseri Olgularında H-Ras Proto-Onkogen Polimorfizmi, *Türk Üroloji Dergisi*, 32, 1, 14-18.
78. Vaskivuo, T., 2002, Regulation of apoptosis in the female reproductive system, University of Oulu, Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynaecology, ISBN 951, 42, 6667, 6. (<http://herkules oulu.fi/isbn9514266676/html/index.html>).
79. Werze, O., 2002, 5-Lipoxygenases: Cellular biology and molecular pharmacology, *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, 1, 1, 23-44.
80. William, L.S., David, D. and Michael, G. R., 2000, Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and molecular biology, *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145–182.
81. Wilson, MR., 1998, Apoptotic signal transduction: emerging pathways, *Biochem Cell Biol*, 76,4, 573-582.
82. Yılmaz, Ö., 1997, Primer mikst glia hücre kültüründe asit ortamının yarattığı toksisite, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 62 s.
83. Zeldin, D.C., 2001, Epoxigenase of arachidonic acid metabolism, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 36059–36062.
84. Zhandrasekharan, N.V. and Simmons D.L., 2004, The cyclooxygenases, *Genome Biology*, 5, 9, 241-248.
85. Zhang, B., Wang, C.L., Zhao, W.H., Wang, C.Y., Zhong, W.X., Zhou. W.Y. and Zhang, Y., 2008, Effect of 5-LOX/COX-2 common inhibitor DHDMBF30 on pancreatic cancer cell Capan2, *World J Gastroenterol.*, 28, 14, 2494-2500.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

86. Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S.R. and Yan, G. 1997, Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V, *Biotechniques*, 23, 525-531.

3. ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Gökhan KUŞ

Doğum tarihi ve yeri: 14/01/1980 Mersin

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Evli

İletişim Adresleri: Ömerağa Mah. Adsız Sok. 2/13 ESKİŞEHİR

Eğitim Durumu

İlkokul: Anamur Temel Eğitim İlköğretim Okulu

Ortaokul: Anamur Anadolu Lisesi

Lise: Anamur Anadolu Lisesi

Üniversite: Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD

Tezsiz Yüksek Lisans: Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği

Mesleki Deneyim

Hücre Kültürü alanında yeterli bilgi ve deneyime sahip

Emniyet Genel Müdürlüğüne bağlı olarak Eskişehir Polis Meslek Eğitim Mekezinde Polis Memuru ve İkyardım Eğitmeni olarak görev yapmaktadır.

Yayımlar

1. Selda Kabadere, **Gokhan Kus**, Ruhi Uyar, Pinar Oztopcu-Vatan, Nilufer Erkasap, Hulyam Kurt and Hasan Veysi Gunes. The actions of leptin on survival and hydrogen peroxide toxicity in primary mixed glial cells of rat. *Biologia Bratislava;section cellular and molecular biology*, 62/6: 793—797, 2007 DOI: 10.2478/s11756-007-0148-7
2. N. Yazihan, Y. Aydın, K. Uzuner, G O. Kavas, **G. Kus**. Effect of erythropoietin incubation on vascular reactivity of aorta in streptozotocin induced-diabetic rats. 4th Congress of the Federation of the European Pharmacological Societies (EPHAR). 14-17 July 2004 Porto,Portekiz.
3. Uyar R, **Kus G**, Kabadere S, Erkasap N, Kaygısız Z: Oxidative and proliferative actions of leptin on rat glial cells in vitro. International Society of Neuroscience-European Society of Neuroscience 20th Biennial Meeting, Innsburg, Austria, 21-26 August, 2005, abstract in *Journal of Neurochemistry* 94 (supl 2): 101, 2005.
4. **Kuş G.**, Kabadere S., Erkasap N., Kaygısız Z., Uyar R. Glia hücrelerinde glutasyon ile leptinin karşılaştırılması ve leptinin mitotik etkisi. *Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 30. Ulusal Fizyoloji Kongresi poster sunumu*, 31 Ağustos-3 Eylül 2004 Konya.

