

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**WARFARİN'İN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
K562 LÖSEMİK HÜCRE SOYUNDA ÇALIŞILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Sevide ŞENCAN**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Temmuz 2006
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**WARFARİN'İN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
K562 LÖSEMİK HÜCRE SOYUNDA ÇALIŞILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Sevide ŞENCAN**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBT-06-01 nolu
proje ile desteklenmiştir**

**Temmuz 2006
KAYSERİ**

Prof.Dr.HALİL DEMİRTAŞ Danışmanlığında Sevide ŞENCAN tarafından hazırlanan:
“Warfarin’in Sitotoksik Etkisinin K562 [Lösemik Hücre Soyunda] Çalışılması”
adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

31/07/2006

JÜRİ

Başkan : Prof. Dr. Halil DEMİRTAŞ
Üye : Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ
Üye : Doç. Dr. İlhan ONARAN

İmza

H. Demirtaş




ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile
onaylanmıştır.

.....

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca beni destekleyen ve her türlü yardımda bulunan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ'a,

Çalışmamın başarıya ulaşması yolunda bilgi ve tecrübelerini paylaşan, her konuda desteğini yanımda hissettiğim danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Halil DEMİRTAŞ'a,

Araştırmamın planlanması ve yürütülmesi sırasında fikirlerini, özverisini ve tecrübesini esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr.İlhan ONARAN'a,

Yüksek lisans eğitimimi tamamlamama fırsat veren değerli hocam İleri Analizler Laboratuvar Müdürü Prof.Dr.Ahmet KAŞGÖZ'e,

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde her türlü olanağı sağlayan Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Turgut ULUTİN'e, Çapa Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ayhan BİLİR'e, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı şefi Prof.Dr.Mustafa GÜLTEKİN'e, Tıbbi Biyolog Zekeriya SOYDAN'a

Çalışmalarımın yürütülmesi sırasında karşılaştığım her türlü sorunda desteğini aldığım sevgili arkadaşım Uzman Dr.Zuhal HASKÖSE HAMURCU'ya ve hayatımın her anında yanımda olan, bugünlere yetiştiren aileme

Teşekkür Ederim

WARFARİN'İN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN K562 LÖSEMİK HÜCRE SOYUNDA ÇALIŞILMASI

ÖZET

Kanser hastalarında trombus oluşumunun fazla olması nedeniyle tedaviyi destekleyici olarak antikoagülanlar kullanılmaktadır. Klinik ve hayvan laboratuvar çalışmaları antikoagülanların dolaylı olarak primer tümörlerin ve metastazın gelişmesini önlediği belirtilmiştir. Vitamin K antagonisti olan warfarinin de böyle bir etkisi olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, ilacın kanser hücrelerinde doğrudan bir sitotoksik etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir. Bu sitotoksik etkinin warfarinin elektron transfer etme özelliğiyle kanser hücrelerinde süperoksid ve hidrojen peroksid gibi reaktif oksijen türlerini artırarak meydana geldiği önerilmektedir. Ancak literatürde bu görüşle ilgili bir çalışma görülmemektedir. Bu çalışmada K562 lösemik hücre soyuna, farmakolojik dozların üstündeki farklı konsantrasyonlarda warfarin uygulanarak, ilacın oksidatif stres oluşturma potansiyeli ve buna bağlı olarak hücre sitotoksitesi oluşturma özelliği araştırıldı. Çalışmamızda eritrolösemik hücre soyu olan K562 hücreleri warfarinin farmakolojik (2-5 μ M) ve üstündeki dozlarda (50-200 μ M) 72 saat kültüre edildi. Hücre canlılığı tripan blue, hücre proliferasyonu MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid] yöntemiyle ve warfarinin K562 hücrelerinde oksidatif stres üzerine etkisi kemilüminesans ve 2',7' DCFH-DA (2', 7'-dichlorohidrofluorescindiasetat) ile değerlendirildi. Çalışmamızda apoptoz göstergesi olarak kabul edilen DNA fragmentasyonu, ELİSA ve elektroforetik yöntemleri ile warfarinin sitotoksik etkilerini göstermek amacıyla kullanıldı. Bulgularımız, farmakolojik konsantrasyonun üzerindeki dozlarda warfarinin K562 hücrelerinde hücre içi oksidatif stresi artırdığı ve hücre çoğalmasımı azalttığını göstermektedir. DNA fragmentasyonu üzerindeki çalışmalarda da yüksek konsantrasyonlarda ilacın sitotoksik bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Warfarin, K562, Kanser, Sitotoksite, Serbest Radikaller

EVALUATION OF EFFECT ON THE CELL CYTOTOXICITY OF WARFARIN IN LEUKEMIA CELL LINE

ABSTRACT

It is used anticoagulants as support treatment, because of being excessive of thrombus formation at cancer patients. At the studies of clinical and animal models laboratory, it was reported that anticoagulants prevented indirectly development of primary tumors and metastasis. It was suggested that warfarin, is being vitamin K antagonist, has also this effect. In addition to this, it has been shown the drug may have a direct cytotoxic effect on malignant cells. It was suggested that this cytotoxic effect may be due to reactive oxygen species as superoxide and hydrogen peroxide produced in the malignant cells by warfarin, which is a potent electron transferring substance. However, it is not encountered any literature about this view. In this study, it was examined the potential of forming oxidative stress of drug and depending on this feature of forming the cell cytotoxicity by treating different concentrations of warfarin over pharmacological doses on K562 leukaemia cell line. We have cultured K562 cells, are erythrolymphocyte cell line, pharmacological (2-5 μ M) and higher doses (50-200 μ M) of warfarin for 72 hours. It was evaluated cell viability by using trypan blue method, cell proliferation by using MTT method and the effect of warfarin on oxidative stress of K562 cells by using Chemiluminescence and 2',7' DCFH-DA method. In our study, DNA fragmentation considered as apoptosis indication, we have used ELISA and electrophoretic methods for demonstrating cytotoxic effects of warfarin. Our findings were shown that warfarin doses over pharmacological concentrations at K562 cells increased intracellular oxidative stress and decreased cell proliferation. On the studies about DNA fragmentation, it was determined higher concentrations of drug have a cytotoxic effect.

Key Words : Warfarin, K562, Cancer, Cytotoxicity, Free Radicals

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR	VIII
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. OKSİDATİF STRES	3
2.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Sınıflandırılması	5
2.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları	6
2.1.3. Antioksidan Savunma	7
2.1.3.1. Antioksidan Enzim Sistemleri	7
2.2. KANSER	8
2.2.1. İnsan Myeloid Lösemi Hücreleri (K562).....	8
2.2.2. Kanser ve Fibrin.....	9
2.3. ANTİKOGÜLAN OLARAK WARFARİN	11
2.3.1. Warfarinin Etki Mekanizması.....	11
2.4. MİTOKONDİRİ, OKSİDATİF FOSFORİLASYON VE KANSER.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. GEREÇLER.....	15
3.2. KİMYASAL MADDELER	16
3.3. KULLANILAN ARAÇLAR	17

3.4. İN VİTRO UYGULANAN YÖNTEMLER.....	18
3.4.1. K562 Hücre Serisinin Uzun Süreli Kültürü	18
3.4.2. Periferik Kandan Lenfosit Eldesi ve Uzun Süreli Kültürü.....	18
3.4.3. Hücre Canlılık Testleri ve Hücre Proliferasyon Oranı.....	19
3.4.3.1. Tripan Mavisi ile Boyama	19
3.4.3.2. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2,5-difenil Tetrazolyum Bromid).....	20
3.4.4. Reaktif Oksijen Türleri (Kemilüminesans Şiddeti) Tespiti	20
3.4.5. Hücre İçi Oksidatif Stresin Spektrofluometrik Analizi.....	21
3.4.6. DNA Fragmentasyon Yöntemi	21
3.4.6.1. ELİSA	21
3.4.6.2. Elektroforetik Olarak DNA Fragmentasyon Yöntemi	22
3.4.6.3. % 0,8'lik Agaroz Jel Elektroforezi	22
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	22
4. BULGULAR.....	23
4.1. WARFARİNİN HÜCRE SİTOTOKSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ.....	23
4.1.1. K562 ve HL-60 Hücre Kültürlerinde Warfarinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	23
4.1.2. K562 ve HL-60 Hücre Kültürlerinde Warfarinin Hücre Çoğalması Üzerine Etkisi..	25
4.2. WARFARİNİN K562 VE HL-60 HÜCRE SOYLARINDA OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ.....	26
4.2.1. K562 ve HL-60 Hücre Kültürlerinde Warfarinin Lüsigenin ve Lüminol Aracılı Kemilüminesans Şiddeti	26
4.2.2. K562 ve HL-60 Hücre Kültürlerinde Warfarinin Hücre İçi Oksidatif Stres Üzerine Etkisi	28
4.3. K562 VE HL-60 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE WARFARİNİN DNA FRAGMENTASYONU ÜZERİNE ETKİSİ.....	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
6. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

ALL	: Akut Lenfositik Lösemi
AML	: Akut Myeloid Lösemi
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
Gla	: γ -Karboksiglutamik Asit
Glu	: Glutamik Asit
GSH Px	: Glutasyon Peroksidaz
HL-60	: Lenfositik Hücre Soyu
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
K562	: Eritrolösemik Hücre Soyu
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KML	: Kronik Myeloid Lösemi
mtDNA	: Mitokondrial DNA
nDNA	: Nükleer DNA
O₂⁻	: Süperoksit Radikali
OH⁻	: Hidroksil Radikali
PKMH	: Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 2.1. Reaktif oksijen türleri	12
Tablo 4.1. K562 ve HL-60 hücrelerinde warfarinin konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonu üzerine etkisi	13
Tablo 4.2. K562, HL-60 ve lenfositlerin 100 µM warfarin ve salisilik asit ile İnkübasyon sonrası hücre içi ROS oluşumu üzerine etkisi	24
Tablo 4.3. Warfarinin K562 ve HL-60 hücrelerinde DNA fragmentasyonu üzerine (ELİSA) etkisi ..	25
Şekil 2.1. Warfarinin K vitamini döngüsüne etkisi	26
Şekil 2.2. Elektron transport zinciri ile oksidatif fosforilasyonun eşlenmesi	2
Şekil 4.1. Warfarinin 72 saatlik inkübasyonu sonucu K562 ve HL-60 hücrelerinde doza bağımlı hücre canlılığı üzerine etkisi	28
Şekil 4.2. K562, HL-60 ve lenfosit hücrelerinin 100 µM warfarin veya asetil salisilik asit ile inkübasyonun hücre canlılığı üzerine etkisi	29
Şekil 4.3. K562, HL-60 ve lenfositlerin 100 µM warfarin ve salisilik asit ile inkübasyon sonrası kemilüminesans oluşumu üzerine etkisi	30
Şekil 4.4. 72 saat warfarinle inkübe edilmiş K562 ve HL-60 hücrelerinde hücre içi ROS oluşumu üzerine warfarinin doza bağımlı etkisi	5
Şekil 4.5. Warfarinin K562 ve HL-60 hücrelerinde DNA fragmentasyonu üzerine (elektroforetik yöntemle) etkisi	31

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir vitamin K antogonisti olan warfarin, tromboembolik bozuklukların önlenmesinde ve korunmasında en sık kullanılan oral antikoagülanlardandır. Vitamin K pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX, X ve antikoagülan protein C ve S'in sentezi için gerekli bir kofaktördür. Warfarin K vitamininin siklik rejenerasyonunu bloke ederek dolaylı yoldan bu faktörlerin sentezinde hız sınırlayıcı olarak rol oynar.

Pıhtılaşma mekanizması elemanlarının, kanser hücrelerini kapiller duvara tutunmasını kolaylaştırmasıyla metastaza katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür. Neoplastik hücrelerin çevresinde fibrin depolanmasının, konak immün sistemi tarafından tümör hücresinin tanınmasını engelleyerek, tümör hücresinin yayılımını kolaylaştıracağı da bildirilmiştir. Birçok araştırmacının sonuçlarına dayanarak, antikoagülanların metastatik tümör oluşumunu dolaylı yoldan inhibe edebilecekleri öne sürülmüştür.

Literatürü incelediğimizde warfarinin de bu şekilde dolaylı yoldan antimetastatik bir etkisi olduğunu ileri süren çalışmalar görülmektedir. Bu etkinin hangi mekanizmayla gerçekleştiğine dair kısıtlı bir bilgiyle karşılaşmaktayız. Ancak Berkarda ve arkadaşları tek dozluk warfarin uygulamasından sonra kronik ve akut lenfositik lösemili hastalardan kontrol olarak da sağlıklı bireylerden elde ettikleri lenfositlerde elektron mikroskopik değerlendirme sonucu ilacın potent bir elektron transfer etme yeteneği ile kanserli hücrelerde mitokondrideki hücresel solunumu uyarmak ve oksijenin kullanımını

artırmak suretiyle, hücre içi oksidatif stres artışı ile doğrudan bir antitümoral etki ortaya çıkarabileceğini öne sürmüşlerdir. Hayvan çalışmaları ve hücre soyları ile warfarinin etkisini araştıran çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte ilacın bu etkisi üzerine bir çalışma göze çarpmamaktadır.

Farklı görüşler olmakla birlikte kanserli hücrelerde antioksidan savunma sisteminde bir yetersizlik söz konusudur. Ancak kanserli hücrelerde elektron transport sisteminde oluşan defektlerin sonucu olarak, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunun azalmış olması nedeniyle bu hücrelerin antioksidan sistemdeki yetersizlikten etkilenmediği öne sürülmüştür. Radyoterapi ve bazı antikanser ilaçlar, kanserli hücrelerde oksidatif stres oluşturmak suretiyle oksidatif hasarla sitotoksik etkilerini ortaya çıkarabilmektedir. Bu görüşün doğrultusunda, eğer warfarinin kanserli hücrelerde süperoksit radikalinin artışıını indükleyebilme özelliği varsa bu hücreler için sitotoksik bir etki ortaya çıkarması beklenebilir.

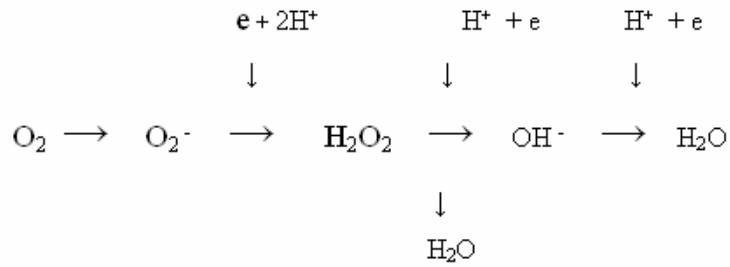
Berkarda ve arkadaşlarının hipotezine bir ışık tutmak amacıyla, çalışmamızda K562 lösemik hücre soyuna ve kontrol hücre olarak insan lenfositlerine, farmakolojik dozlarda ve bu dozların üstündeki farklı konsantrasyonlarda warfarin uygulanarak, ilacın oksidatif stres oluşturma potansiyeli ve buna bağlı olarak hücre sitotoksitesi oluşturma özelliği araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OKSİDATİF STRES

Serbest radikaller dış orbitalinde tek sayıda ortaklanmamış elektron taşıyan, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom ya da moleküllerdir. Bu şekilde radikaller, oldukça kararsız ve reaktiftir. Başka moleküller ile çok kolay elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri (ROS) de denmektedir (1-4).

Bilindiği gibi, oksijen canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için gerekli bir elementtir. Hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüşmektedir. Bu sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3 tam olarak suya dönüşmez, süper oksit anyonu ve hidroksil radikali oluşur (5, 6).



Yaşam süreleri çok kısa olmasına rağmen yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapılı olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir (5, 7, 8). Organik ve inorganik kimyasal maddeler (protein, lipid ve karbonhidrat) ve özellikle de membran ve nükleer asitlerin anahtar molekülleri ile reaksiyona girer. Ayrıca serbest radikaller reaksiyona girdikleri moleküller vasıtası ile oto katalitik reaksiyonları başlatırlar, bunlarda kendi kendilerine serbest radikallere dönüşerek hasar zincirini genişletirler.

Bu reaktif türlerin etkileri oldukça yaygındır ancak 3 reaksiyon özellikle hücre hasarı ile ilişkilidir.

1. Zarların yağ peroksidasyonu : Organizmada pek çok türde ROS oluşabilir (Tablo 1). Ancak en sık olarak lipid yapılarla oluşur (7). Oksijenin varlığında serbest radikaller plazma ve organellerin zarlarında bulunan yağların peroksidasyonuna neden olur (9). Yağ peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır (5, 10).

Doymamış yağ asitlerinin allil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid kökü meydana gelir. Oluşan lipid kökü, oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksi radikalini oluşturur. Lipid peroksi radikali, diğer lipidlerle zincir reaksiyonunu başlatır ve lipid hidroperoksitler oluşur. Lipid hidroperoksitleri diğer yağ asitlerinin redüksiyonunu başlatır. Bir otolitik zincir reaksiyonu meydana gelir ve bu da aşırı derecede membran, organel ve hücrel hasara yol açar (7, 11). Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir. Lipit peroksidasyonu sonucu zarın bütünlüğü bozulur ve geçirgenliği artar (12, 13).

2. Proteinlerin oksidatif değişimi : Enzimler, reseptörler, transport proteinleri oksidatif hasar için önemli hedef moleküllerdir. Serbest radikallerin proteinlerle etkileşimi sonucu özellikle histidin, arginin, lizin ve prolin gibi amino asitlerde karbonil gruplarının oluşumu başta olmak üzere çeşitli amino asit değişiklikleri oluşmaktadır (14, 15). Reaktif türevler ya peptit bağları ile yada yan zincirler ile reaksiyona girer. Oksidatif değişime uğramış proteinler ya düşük molekül ağırlıklı ürünlere ayrılır yada çapraz bağlı yüksek molekül ağırlıklı ürünleri oluşturur (16).

3. DNA üzerine etkileri : DNA hasarı, ROS'un DNA'ya doğrudan etkisi veya DNA'nın lipid peroksitlerinin yıkım ürünleri ile etkileşimleri sonucu ortaya çıkar (15-19). Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlarla, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir (20-22). Normalde bu DNA hasarları DNA'daki mekanizmalar ile onarılmaktadır. Ancak onarım gerçekleşmezse, DNA'daki hasar, replikasyonla bir sonraki kardeş hücrelerde mutasyon veya apoptozis olarak ortaya çıkar (15-19).

2.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Sınıflandırılması

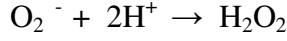
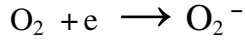
Hidrojen peroksit zarlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle "reaktif oksijen türleri " ifadesi, süperoksit gibi radikaller, ayrıca hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir. Oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır. Diğer ROS grubunda ise normal oksijenden çok daha aktif bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen" bulunmaktadır (7, 23-26).

Tablo 2.1. Reaktif Oksijen Türleri

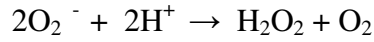
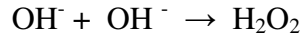
Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit radikal (O_2^-)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikal (OH^\cdot)	Singlet oksijen (O_2^-)
Alkoksil radikal (LO^\cdot)	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)
Peroksil radikal (LOO^\cdot)	Hipoklorik asit ($HOCl$)

Singlet oksijen (O_2^-): Singlet oksijen molekülü yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. Singlet oksijen hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açar.

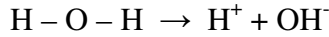
Süperoksit radikal (O_2^-) : Oksijenin bir elektron indirgemesi sonucu süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikalının dismutasyonu ile hidrojen peroksit oluşur.



Hidrojen Peroksit (H_2O_2) : Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektron taşımadığı için radikal olarak kabul edilmez. Aktivitesi düşük olmasına rağmen zarlardan kolayca geçebilmektedir.



Hidroksil Radikalleri (OH^-) : Hidroksil radikalleri en reaktif radikal olarak bilinir ve OH^- her moleküle hücum ederek hasar meydana getirir. Oldukça reaktif OH^- 'nin biyolojik moleküllerle reaksiyonu nonradikal bir tepkimedir. OH^- reaksiyonları DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşir, ayrıca birçok tiol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu çıkarabilir.



2.1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada ROS' lar oluşur. ROS' ların in vivo ortamda kaynakları aşağıda görülmektedir (7).

Reaktif Oksijen Türleri Kaynakları

1. Normal biyolojik işlemler

- a) Oksijenli solunum
- b) Katabolik ve anabolik işlemler

2) Oksidatif stres yapıcı durumlar

- a) İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite intoksikasyon
- b) Ksenobiotik maddelerin etkisi
- c) Oksidan enzimler
- d) Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
- e) Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma
- f) Uzun süreli metabolik hastalıklar
- g) Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

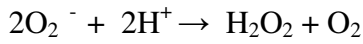
2.1.3. Antioksidan Savunma

Oksijenli yaşamla birlikte aerobik organizmalar oksijen kaynaklı radikalleri oluşturmaya başlamışlardır. Bununla eş zamanlı olarak, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bu sistem; antioksidan enzimler ve düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucuları olmak üzere iki gruba ayrılır (27-31).

Oksidan maddelerin oluşumu ile savunma mekanizmalarının işleyişi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin oksidan baskının artması yönünde bozulması hücrelerin veya organizmanın hasarı ile sonuçlanabilir. Oksidan etki sonucu oluşan hasarın büyüklüğü hasar üretilme hızı ile oksidatif harabiyeti önleyen yada kısmen tamir eden mekanizmalar arasındaki dengeye bağlıdır (1, 2, 23, 29).

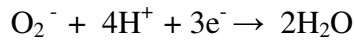
2.1.3.1. Antioksidan Enzim Sistemleri

Süperoksit dismutaz (SOD) : Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar böylece hücre içindeki süperoksit radikali düzeylerini azaltır.

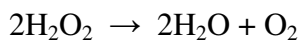


SOD'un insanlarda iki izoenzimi vardır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik yapıdaki bakır ve çinko içeren Cu/Zn-SOD ile mitokondrilerde bulunan tetramerik yapıdaki Mn içeren Mn-SOD'dır. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazladır.

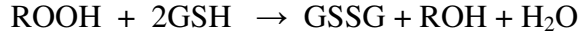
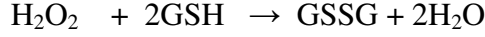
Sitokrom oksidaz: Mitokondrilerde solunum zincirinin en son basamağında yer alan ve bakır içeren bir enzimdir. Solunum zincirindeki görevini sürdürürken süperoksit radikalinin suya dönüşümünü de sağlar.



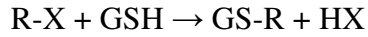
Katalaz: Hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler. Enzim peroksizomlarda yerleşmiştir ve yapısında 4 tane Hem grubu bulunur.



Glutasyon Peroksidaz (GSH Px) : 4 selenyum atomu içeren sitozolde yerleşik bir enzimdir. Hidrojen peroksitin ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini sağlar.



Glutasyon transferaz : Dimerik yapıdadır ve sitozolde bulunur. Çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin glutasyonla konjugasyonunu katalizler.



2.2. KANSER

Çevresel veya genetik faktörlerin etkisiyle normal hücrelerde nükleer yada sitoplazmik onkogenlerin aktifleşmesi, transkripsiyonu düzenleyen sinyal moleküllerin etkilenmesi, tümör supressör genlerinin aktivitesinin baskılanması sonucu hücrelerin kontrol dışı çoğalmasıyla oluşan duruma kanser denir (33).

Kanserler, hematolojik ve solid doku kanserleri olmak üzere iki grup altında incelenirler. Hematolojik kanserlerde kendi içerisinde lösemi ve malign lenfomalar olmak üzere iki gruba ayrılır. Hematopoetik kök hücrelerinin farklılaşma durumuna göre KML (Kronik myeloid lösemi), AML (Akut myeloid lösemi), KLL (Kronik lenfositik lösemi), ALL (Akut lenfositik lösemi) olarak kendi içinde alt gruplara ayrılmaktadır (34).

2.2.1. İnsan Myeloid Lösemi Hücreleri (K562)

KML, diferansiyasyonun her basamağındaki myeloid elemanların proliferasyonu (apoptozun azalması ile birlikte) ve adheziv özelliklerinin kaybı ile karakterize klonal bir hematopoietik kök hücre malignitesidir. İlk olarak 19. yüzyılda tanımlanmış olup, 3 farklı klinik evre ile karakterizedir: İlk faz (kronik) olgunlaşma gösteren miyeloid hücrelerin artışı, zamanla myeloid farklılaşma azalır ve akselere faz ve/veya blastik krize geçiş gözlenir (35).

K562 hücre soyu, ilk kez 1975 yılında Lozzio (37) ve arkadaşları tarafından, KML hastalarının terminal blastik kriz evresinde, plevral sıvılarında izole edilerek hazırlanmış bir lösemik hücre soyudur. Eritroid farklılaşma, oksidatif stres, glutasyon sistemi ve anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir hücre soyudur (36-38).

Morfolojik ve histokimyasal özellikleri; Giemsa ile hazırlanmış preparatlarda K562 hücreleri farklılaşmamış blast hücreleri olarak tanımlanır ve yaklaşık 20 µM çapındadır. Basofilik sitoplazmaları granül içermez ve iki yada daha fazla parçalı nükleusları vardır. K562 hücreleri granülosit ve monositler gibi sitokimyasal maddeler ile pozitif boyanmazlar (39, 40).

Büyüme kinetikleri; Kültür medyumunda süspansiyon olarak büyüyen K562 hücrelerinin iki kat artma süreleri ortalama 12 saattir (39-41).

Karyotipik özellikleri; K562 hücrelerinde, normal kromozom sayısının yaklaşık 1,5 katı kromozom bulunur. KML için spesifik bir belirteç olan Ph kromozomu K562 hücrelerinde pozitifdir. Buna bağlı olarak bu hücre serisinde abl/bcr füzyon geni ekspresyonu nedeniyle apoptosise karşı direnç vardır (42, 43).

Normal hücrelerin uzun süre kültürde tutulması ve senkronize olmuş bir hücre topluluğunun elde edilmesi oldukça zordur. Bu nedenle hücre kültüründe kolayca çoğaltılabilen K562 hücreleri sitotoksosite ve apoptosis çalışmaları için uygun sistemlerdir. K562 hücreleri kültürde spontan olarak apoptosise gitmedikleri için farklı maddelerle apoptozisi indüklemek başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlar.

2.2.2. Kanser ve Fibrin

İlk olarak 1865 yılında Armand Trousseau malign hastalıkların yaygın komplikasyonu olarak venöz tromboembolizm meydana geldiğini rapor etmiştir. Birkaç yıl sonra tromboemboli ile tümör hücrelerinin yayıldığını kanıtlayan ve trombus içinde kanser hücrelerini tanımlayan Billroth tarafından metastazın gelişmesi ve pıhtılaşma mekanizması arasında bir ilişki olabileceği ifade edilmiştir.

Temel çalışmalar şunları göstermiştir:

- Tümör hücreleri çeşitli mekanizmalarla kan koagülasyon mekanizmasını aktive etme yeteneğine sahiptir.
- Bu yetenek tümör hücrelerinin malign transformasyonu ile artar.
- Son ürün olarak pıhtılaşma mekanizmasının aktive olmasıyla tümör dokularında fibrin oluşumu artar.
- Sözü edilen basamakların tümörün büyümesi ve yayılmasını artırdığı bildirilmiştir (44-46).

O'Meara yaptığı çalışmalarda bütün kanser lezyonlarının içinde ve civarında fibrin olduğunu göstermiştir (47). Bu bilgilere dayanarak kanser hücreleri destek olarak fibrin yapıları kullanır ve fibrin tümörde yeni kan damarlarının oluşumunda etkili olduğunu açıklamıştır. Pıhtılaşma mekanizmasının komponentleri; kapiller duvara hücrelerin adhezyonunu kolaylaştırmasıyla ya da kapillerde hücreleri tutmasıyla metastaza katkıda bulunabileceğini öne sürmüştür. Neoplastik hücrelerin çevresinde fibrin depolanmasının, konak immün sistemi tarafından tümör hücresinin tanınmasını engelleyerek, tümör hücresinin yayılımını kolaylaştıracağı da bildirilmiştir (48, 49).

Birçok araştırmacı kan koagülasyon sürecinin inhibisyonun malignansinin ilerlemesini engellediği gözlemlerine dayanarak (45), antikoagülanların metastatik tümör oluşumunu dolaylı yoldan inhibe edebileceklerini öne sürmüşlerdir (50, 51).

Tümör hücresi ile prokoagülan ve fibrinolitik faktörler arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların sonuçları; lokal trombin oluşumunun, fibrin depolanmasının ve erimesinin tümör büyümesinde ve yayılmasında önemli olduğunu göstermiştir (46, 48, 49, 52, 53). Ancak fibrin(ojen)in mi yoksa plasmin(ojen)in mi dolaşan tümör hücrelerinin metastatik potansiyelinden sorumlu olduğu net olarak gösterilememiştir.

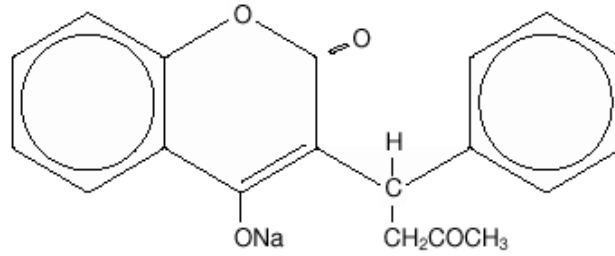
2.3. ANTİKOGÜLAN OLARAK WARFARİN

Warfarin tromboembolik bozuklukları önleme ve korumada en sık kullanılan oral antikoagülandır (54). 3-(asetobenzil)-4-Hidroksikumarin ve R-S enantiyomerlerinin aynı anda bulunduğu bir karışımdır. Kristal warfarin sodyum izopropanol türevi olup molekül ağırlığı 330.3 gr/mol'dür. Deneysel formülü ve yapısal formülü şekilde verilmiştir (55).

Deneysel Formülü : $C_{19}H_{15}NaO_4$

Molekül Ağırlığı : 330,3 gr/mol

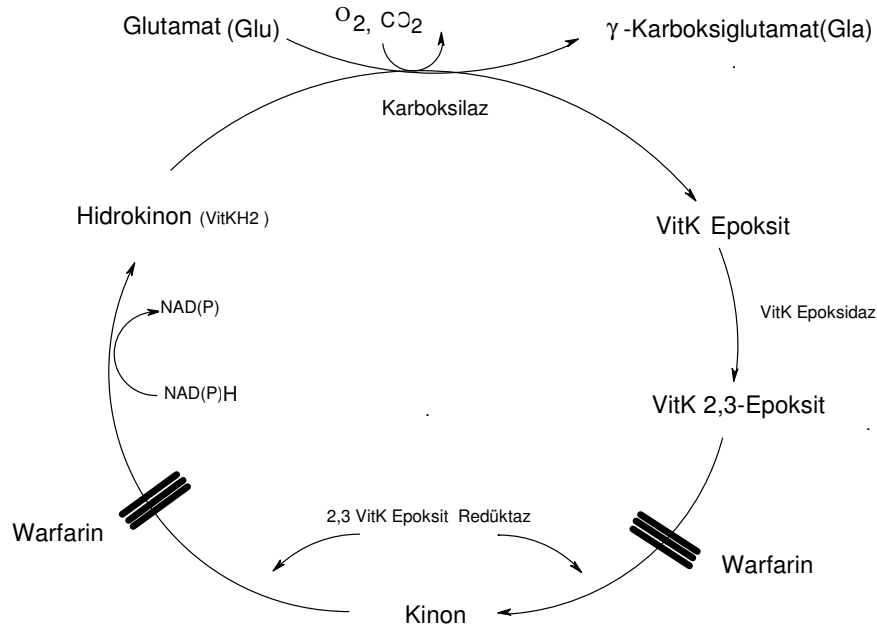
Yapısal Formülü :



Suda çözülebilir bir bileşik olan warfarin sodyum, beyaz ve kokusuz olmakla birlikte ışıkla rengi bozular. Bileşik kloroform ve eterde çok az çözülür.

2.3.1. Warfarinin Etki Mekanizması

Warfarin, vitamin K antagonistidir. Vitamin K pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX, X ve antikoagülan protein C ve S'in sentezi için gerekli bir kofaktördür. K vitaminin biyokimyasal etkisi, prekürsör proteinlerdeki glutamik asitlerin (Glu) olgun proteinlerdeki γ -karboksigliutamik asitlere (Gla) posttranslasyonel dönüşümünde rol oynar. Warfarin K vitaminin siklik rejenerasyonunu bloke eder, böylece gama karboksilasyon reaksiyonlarıyla dolaylı olarak etkileşir ve bu faktörlerin sentezinde hız sınırlayıcı olarak rol oynar (Şekil 2.1) (56-62).



Şekil 2.1. Warfarinin K vitamini döngüsüne etkisi

Warfarinin % 90'nı plazma proteinlerine özellikle albumine bağlı olarak taşınır. İlaç, sitokrom P450 gibi hepatik enzimler vasıtasıyla metabolitlerine parçalanır. İnaktif metabolitler idrar ve dışkıyla atılır (54, 63).

2.4. MİTOKONDİRİ, OKSİDATİF FOSFORİLASYON VE KANSER

Hücrenin bir alt kompartmanı olan mitokondri hücrel enerji metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu organel hücrel homeostazda, intrasellüler sinyalizasyonda, apoptozda önemli bir role sahip olmakla birlikte, amino asitlerin, kolesterolün, steroidlerin ve nükleotidlerin metabolizmasında da etkilidir (64, 65). Mitokondri hem iç hem dış membrana sahiptir ve içinde viskoz, yarı kolloidal bir sıvı vardır. Bu bölgeye matriks denir. Mitokondri kendi genomunu içerir, rRNA, tRNA'yı kodlayabilir ve oksidatif fosforilasyonda yer alan proteinlerin bir kısmını sentezler (57). Mitokondri solunum aktivitesindeki değişikliklere bağlı olarak organizasyon durumu ve hacmi değişikliklere uğrar (66).

Oksidatif fosforilasyon mitokondride meydana gelir ve solunum zincirinde ATP oluşumu sağlanır. Oksidatif fosforilasyonda gerekli olan proteinler mitokondrial iç membranda yerleşir ve elektron transport zinciri (ETS) komponentlerini, ATP sentazı ve adenin nükleotid taşıyıcısını içerir (67-69). Elektronlar ETS olarak bilinen moleküler

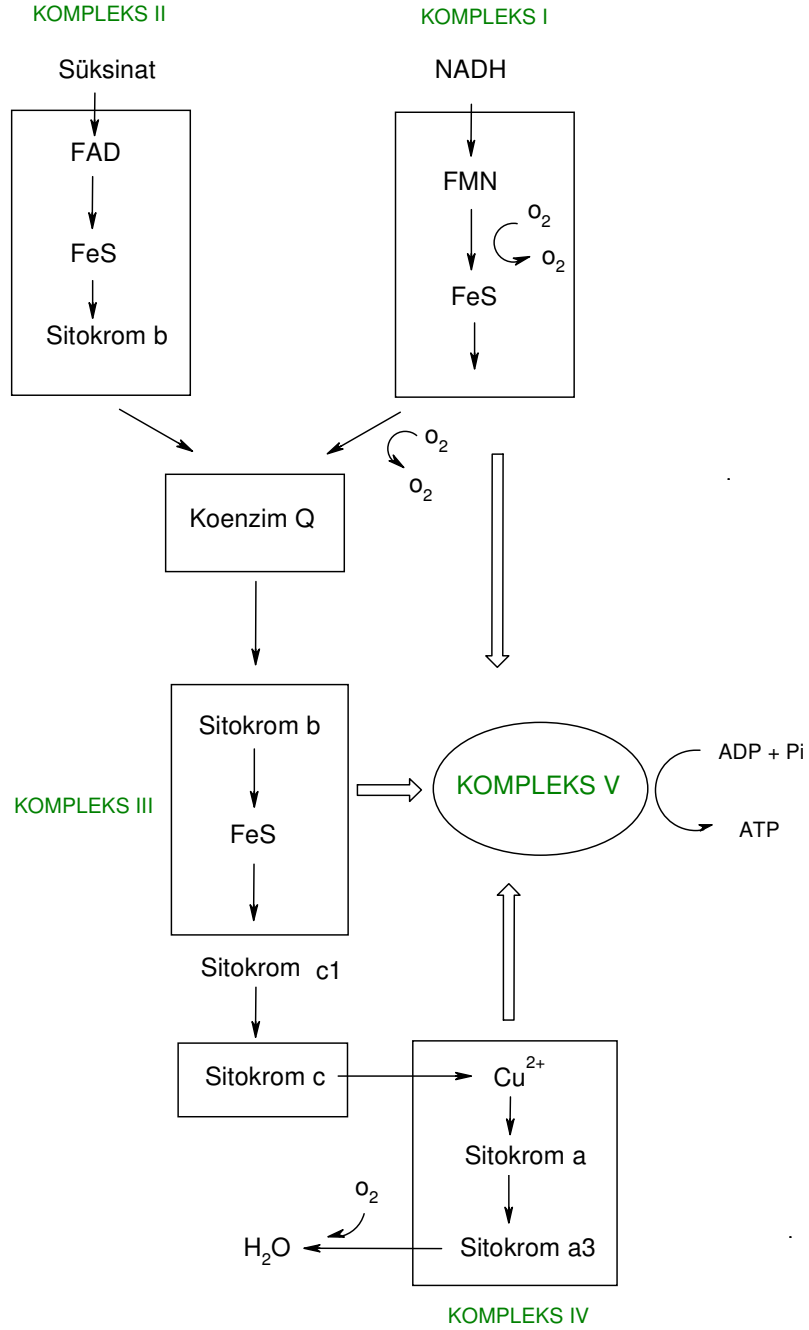
kompleksler boyunca geçer. Elektron transport zinciri 5 komponentten oluşmuştur. Elektronlar I, II, III, IV. komponentler üzerinden suya aktarılır. Komponent V ise ATP formunda kimyasal enerjinin yapıldığı yerdir. Elektronlar suya ilave edilme sürecinin son basamağında moleküller oksijeni indirgerler (Şekil 2.2) (70, 71).

Mitokondrial solunum hücre sel oksijen girişinin yaklaşık %90'ından sorumlu tutulur ve oksijen tüketiminin %1-2'si ROS'a (özellikle O_2^- 'a) dönüşür. İç mitokondrial membranın sitozolik yüzeyinde üretilen O_2^- , sitokrom c ve sitokrom oksidaz tarafından okside edilebilir veya Cu/Zn-SOD tarafından H_2O_2 dönüşebilir. Matriks kısmında üretilen O_2^- , matriksin Mn-SOD tarafından H_2O_2 'e dönüştürülür. H_2O_2 , glutatyon peroksidaz veya intra ve ekstra-mitokondrial katalaz tarafından H_2O 'ya dönüştürülür. Mitokondrial O_2^- oluşumunun arttığı koşullar altında veya antioksidan sistemler yetersiz kaldığında H_2O_2 birikebilir. Bu durumda, H_2O_2 indirgenmiş geçiş metallerinin (Fe^{+2}) varlığında son derecede reaktif hidroksil radikaline (OH^-) de dönüşebilir (69, 71-74).

Kronik olarak ROS'a maruz kalma mitokondrial ve hücre sel proteinlere, lipidlere ve nükleik asidlere karşı oksidatif hasar ile sonuçlanabilir. mtDNA'nın koruyucu histon proteinin olmamasından ve ROS üretiminin fazla ve tamir mekanizmasının da kısıtlı olmasından dolayı mitokondri genomu nükleer DNA ile karşılaştırıldığında DNA hasarına daha çok açık ve sonucunda kazanılan mutasyonların daha fazla olduğu saptanmıştır (75-77). Bu mutasyonların kanserli hücrelerde mitokondrial enerji üretim seviyesinde farklılıklara yol açtığı bildirilmiştir. İnsan karsinom hücrelerinden izole edilen mitokondrilerde ATPaz aktivitesinin normal hücrelere göre oldukça az olduğu, mitokondrial sitokrom c oksidaz aktivitesinin ise kontrol epitel hücre soyundan önemli miktarda düşük olarak ölçüldüğü belirtilmiştir. Fakat mitokondrial membran potansiyeli karsinoma hücrelerinde normal epitel hücrelerinden önemli miktarda yüksek olarak gösterilmiştir (78).

Bazı çalışmalarda elektron transport zincirindeki yetersizliğin (bozukluğun) elektron akışında kaçışlara yol açarak hücre içi ROS üretiminin artmasına neden olacağı bildirilmiştir (79, 80). Bununla birlikte bazı çalışmalarda ise kanser hücrelerindeki mitokondrial defektlerin ETS'de etkili olarak ROS oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (81-83). Bu çalışmalar göz önüne alındığında kanser hücrelerinde ROS oluşumu ve bunun mekanizmasının tam olarak açıklanamadığı görülmektedir.

Antioksidan savunma mekanizması ile kanser arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışmada çelişkili bulguların olduğu görülmektedir. Bazı çalışmalarda antioksidan savunma enzimlerinin düzeylerinin kanserli hücrelerde arttığı gösterilirken, bazı çalışmalarda bu enzim düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (80, 84, 85).



Şekil 2.2. Elektron transport zinciri ile oksidatif fosforilasyonun eşlenmesi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

Çalışmamızda deney sistemlerimizi uygulamak üzere K562, HL-60 hücre serisi ve periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) kullanıldı. K562 ve HL-60 hücreleri İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji A.D'dan temin edildi. Lenfositler yaşları 25-35 olan sağlıklı bireylerden heparinle alınan periferik kandan, Ficoll- Histopaque 1077 ile yoğunluk gradienti uygulanarak izole edildi(86).

K562 hücre serisinin kültürü için RPMI 1640 medyumunu kullanıldı. Hücreler %5'lik CO₂, 37 °C'li inkübatörde kültür edildi. Hücrelerin 72. saat sonunda medyumları değiştirildi. Ekim kabının içindeki hücre yoğunluğu doygunluğa ulaştığında hücrelerden pasaj alındı. Lenfosit kültürü içinde aynı şartlar ve aynı özelliklerdeki besiyeri kullanıldı (87-88).

Çeşitli dozlarda warfarin eklenmiş ve eklenmemiş hücre kültürleri canlılık oranları ölçümleri tripan mavisi ile hücrelerin boyanması ve 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) indirgeme yöntemi ile spektrofotometrik olarak tespit edildi.

Hücre kültüründen sonra hücre süspansiyonunda oluşan reaktif oksijen türleri Lüminol ve Lüsigenin kullanılmak suretiyle lüminesans şiddetlerinin ölçüldüğü kemilünemetric yöntem vasıtasıyla tespit edildi. 2', 7'-dichlorohidrofluorescindiasetat (DCFH-DA) kullanılarak spektrofluometrik olarak hücre içi reaktif oksijen türleri ölçüldü. Hücrelerin warfarin verilmesi sonrasında apopitoz oranları, ticari kit (Roche Diagnostic) kullanılmak suretiyle hücre DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi yapıldı.

3.2. KİMYASAL MADDELER

- Fetal Calf Serum (FCS) (Biological Industries..)
- Fitohemaglutinin (PHA-M) (Sigma)
- Ficoll Histopaque-1077 (Biochrom AG)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) (Sigma)
- Penisilin / Streptomisin (Sigma)
- RPMI 1640 Medyum (L-Glutaminli) (Sigma)
- Tripan Blue (Sigma)
- Warfarin Sodyum (Eczacıbaşı)
- Sodyum Klorür (NaCl) (Carla Erba)
- Sodyumhidrojenfosfat (Na_2HPO_4) (Merck)
- Sodyumdihidrojenfosfat (NaH_2PO_4) (Merck)
- İsoopropanol (Merck)
- Etil Alkol (Merck)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma)
- 2', 7'-dichlorohidrofluorescindiasetat (DCFH-DA) (Sigma)
- Tris (Sigma)
- Etilendinitrotetraasetikasit (EDTA) (Sigma)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma)
- Proteinaz K (Sigma)
- Agaroz (Sigma)
- Hidroklorik Asit (Merck)
- Tween 20 (Sigma)
- Fenol (Sigma)
- Lüminol (Sigma)

- Lüsigenin (Sigma)
- Kloroform (Merck)
- DNA Fragmentasyon Kiti (Roche Diagnostic, Cat.No.11 585 045 001)
- Etidyum Bromür (Applichem)

3.3. KULLANILAN ARAÇLAR

- CO₂'li etüv
- Laminar air flow
- İverted mikroskop
- Işık mikroskobu
- Hassas terazi
- Santrifüj
- Steril cam pipet (pastör pipeti)
- Steril plastik pipet ve pipet aid
- Steril konik kültür tüpleri
- Ekim kapları (Flask)
- Eppendorf
- Lüminometre
- Spektrofotometre
- Spektrofluometre
- Benmari su banyosu
- Vorteks
- Manyetik karıştırıcı
- pH metre
- Mikropipet

3.4. İN VİTRO UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. K562 Hücre Serisinin Uzun Süreli Kültürü

Kültür Ortamı

- 100 ml RPMI 1640 Medyum (L-Glutaminli)
- 10 ml Fetal Calf Serum
- 1 ml Streptomisin / Penisilin

Laboratuvarımıza ağız sıkıca kapalı flasklar içerisinde getirilen K562 hücreleri hemen taze medyuma alınarak nemli ve %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatöre (flaskların ağız hafifçe gevşetilerek) kaldırıldı. 72.saat sonunda invert (ters) mikroskopla incelendi ve hücre yoğunluğu %90 - %95 ulaşırsa hücrelerden pasaj alındı. K562 hücreleri solüsyonda serbest olarak büyüyen hücreler oldukları için tüm hücre süspansiyonunu içeren medyum, 14 ml'lik ucu konik, steril falcon tüplerine alındı. 2000 g'de 5 dakika döndürülerek çökmeleri sağlandı.

Santrifüj sonrası üst fazdaki eski medyum uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine taze hazırlanan medyum eklendi. Hücre sayısına göre her bir yeni pasajda yaklaşık 1-2x10⁵ hücre olacak şekilde hücreler yeni flaska bölündü. 25 cm²'lik flasklara 10 ml taze medyum koyularak hücreler nemli, %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatöre yerleştirildi. Yeni ekimden sonraki her 72. saatte, hücrelerin medyum içindeki durum ve sayıları invert mikroskop ile kontrol edilerek medyumları değiştirildi. 72.saatte yeni pasajlar alınarak hücre koleksiyonu sağlandı (87-88).

72.saat sonunda yeterli hücre yoğunluğuna ulaşmış olan flasklar 14 ml'lik ucu konik, steril falcon tüplerine alındı ve 2000 g'de 5 dakika döndürülerek çökmeleri sağlandı. Santrifüj sonrası üst fazdaki eski medyum atıldı ve 1ml taze medyumla hücreler resüspanse edildi. Tripan mavisi ile boyanarak hücre canlılığı kontrol edildi. 6'lı kuyucuklu flasklara 1 ml'sinde 1x10⁶ hücre olacak şekilde ekimler yapıldı. 2 saat sonra kontrol grubu hariç warfarinin 5-200 µM arasında değişen konsantrasyonları kültüre eklendi.

72. saat sonunda hücre süspansiyonları 1ml'lik eppendorf tüplere alındı; hücre canlılığı ve hücre çoğalma oranı için sayıldıktan sonra bu kültür örnekleri kemilüminesans, MTT, DFCH-DA, DNA fragmentasyonu yöntemleri için kullanıldı.

3.4.2. Periferik Kandan Lenfosit Eldesi ve Uzun Süreli Kültürü

Heparinize tam kandan ficoll- histopage 1077 yöntemi ile lenfositler izole edildi (86).

PBS Solüsyonu

- 8.1 gr NaCl
- 2.302 gr Na₂HPO₄
- 0.194 gr NaH₂PO₄

Lenfosit Kültür Medyumu

- 100 ml RPMI 1640 Medyum (L-Glutaminli)
- 10 ml Fetal Calf Serum
- 1 ml Streptomisin / Penisilin
- 1.5 ml Fitohemaglutinin (PHA-M)

Sağlıklı bireylerden alınan 10 ml heparinize kan eşit hacimde 10 ml'lik falcon tüplerine paylaştırıldı. Sızdırma metodu ile ficol üzerine yayılan periferik kan, 2000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Yoğunluk gradiyentine göre fazlara ayrılan kandan lenfosit tabakası cam pastör pipeti yardımı ile toplandı. 2 defa steril PBS ile 2000 g'de 10 dk yıkandıktan sonra 72 saatlik kültür için medyuma alındı. 6 kuyucuklu flakslara 1 ml'sinde 1×10^6 hücre olacak şekilde ekimler yapıldı. 2 saat sonra warfarinin 5-200 μ M arasında değişen konsantrasyonları kültüre eklendi.

3.4.3.Hücre Canlılık Testleri ve Hücre Proliferasyon Oranı

72 saatlik kültür öncesi ve kültür sonrası hücre canlılığı tespit edildi. Kültür sonrasında warfarinin hücre canlılıkları ve proliferasyon oranları üzerine etkilerine bakıldı (88).

3.4.3.1. Tripan Mavisini ile Boyama

Hem hücre sayısını hem de canlı ve ölü hücre oranını elde ettiğimiz bu yöntemde % 4'lük Tripan mavisinden 50 μ l alınarak içinde 50 μ l hücre süspansiyonu bulunan tüpe eklendi. Hafifçe karıştırılarak boyanın hücre süspansiyonu ile karışması sağlandı. Toma lamında hücreler sayıldı.

Canlılık için boyayı almış ve almamış hücre sayıları karşılaştırıldı. Hücreler canlılıklarını kaybetmemiş iseler membran bütünlükleri ve permeabiliteleri bozulmadığı için boyayı hücre içine almazlar. Bu özelliklerine dayanarak boyanmış ve boyanmamış hücre oranı ile hücre canlılığı % olarak hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Total canlı hücre sayısı} \times 100}{\text{Total hücre sayısı}}$$

3.4.3.2. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2,5-difenil Tetrazolyum Bromid)

Hücre canlılık testlerinden olan MTT yönteminde mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid ile reaksiyona girerek formazan bileşikleri oluşturmaları esasına dayanır. Bu kristallerin 490 nm’de ve 600 nm’de verdikleri absorbanslarının ölçülmesine dayanır. Ölü hücreler formazan bileşikleri oluşturamadıkları için renk reaksiyonu ve buna bağlı olarak absorbans alınamaz (89).

5 mg/ml MTT, RPMI-1640 da çözüldü. 1 ml MTT çözeltisi hücre kültürü örneklerine ilave edilerek 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 1 ml asidik isopropanol alkol çözeltisi (saf isopropanol alkolde 0.04M HCl) ilave edilerek 1.5 ml eppendorf tüplerine alınarak 10000g 2 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıların absorbansları spektrofotometrede 590 nm’de ölçüldü. Kültürde çoğalan hücrelerin çoğalma oranları absorbans değerlerinden aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\text{Hücre proliferasyon (\%)} = \frac{(\text{Warfarinli Hücrelerin Absorbansı}) - (\text{Hücre İçermeyen Örneklerin Absorbansı})}{(\text{Warfarin İçermeyen Hücrelerin Absorbansı}) - (\text{Hücre İçermeyen Örneklerin Absorbansı})}$$

3.4.4. Reaktif Oksijen Türleri (Kemilüminesans Şiddeti) Tespiti

Hücre kültür sonrası örnekler, 1/5 oranında PBS ile seyreltilerek polipropilen tüpler içerisine alındı. Son konsantrasyonu 0.1mM olacak şekilde örnekler DMSO içerisinde çözülmüş lüminol yada 0,25 mM olacak şekilde RPMI içerisinde çözülmüş Lüsigenin eklendi. Lüminometrenin kuyucuklarına konulan örneklerin lüminesans şiddetleri 1 dakika boyunca, çeşitli zaman aralıklarında (0, 15, 30, 60. saniyelerde) kaydedildi. DMSO kullanılarak hazırlanan örnekten elde edilen kemilüminesans değerleri kaydedilip örneklerin değerlerinden çıkartıldı. Sonuçlar 10⁶ hücre başına düşen Relative Light Unite (RLU) cinsinden verildi (90).

3.4.5. Hücre İçi Oksidatif Stresin Spektrofluometrik Analizi

2', 7'-dichlorohidrofluorescindiasetat (DCFH-DA) warfarinle inkübe edilmiş hücrelerde oluşan ROS üretimini ölçmek için kullanıldı. İki kez PBS ile yıkanmış hücreler, son konsantrasyon 20 µM olacak şekilde 37°C'de 30 dk DCFH-DA ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler iki kez PBS ile tekrar yıkandı. % 0,5 Tween 20 içeren 10 mM Tris -HCl 7.4 tamponu ile hücre membranı parçalanan hücreler 10000g'de 10 dk santrifüj edildiler. Floresans bileşik olan ve DCFH-DA okside olmuş şekli dichlorofluorescin floresans şiddeti, süpernatanda 5 bant genişliğinde 480 eksitasyon 500-550 emisyon ile tarama modunda tespit edildi. Veriler warfarinsiz örneklerle karşılaştırılarak normalize edilip, nisbi floresans şiddeti olarak 10^6 hücre başına ifade edildi (91-93).

3.4.6. DNA Fragmentasyon Yöntemi

Oksidan ajanların DNA üzerindeki en önemli etkilerinden birisi de DNA'da fragmentasyona neden olmalarıdır. Apoptozun en karakteristik özelliklerinden biri olan hücresel DNA fragmentasyonu ELİSA ve Elektroforetik olarak iki yöntemle ölçülmüştür.

3.4.6.1. ELİSA

Hücresel DNA fragmentasyonu ölçümü ELİSA yöntemiyle ticari kit kullanılmak suretiyle (Roche Diagnostic) (Cellular DNA Fragmentation ELİSA Cat.No.11 585 045 001) üretici firmanın ön gördüğü tarife göre ölçülmüştür (94-95).

BrdU (5'-Bromo-2-deoxy-Uridine) ile işaretli DNA fragmentleri anti-BrdU antikoru ile işaretlenmiş peroksidaz solusyonu ile görünür hale getirilerek ELİSA okuyucuda örneklerin 450 nm'deki absorbansları okundu ve DNA fragmentasyonu 10^6 hücre başına absorbans değeri olarak hesaplandı.

3.4.6.2. Elektroforetik Olarak DNA Fragmentasyon Yöntemi

Hücre Kültüründen DNA Saflaştırma Yöntemi

TE tamponu

- 10 mM Tris
- 1 mM EDTA

Liziz Tamponu

- 10 mM NaCl 90 µl
- %10 Sodyum dodesil Sülfat 80 µl
- Proteinaz K 5 µl

Hücre kültür solusyonları 1 ml TE tamponu ilave edilerek 1300g 1 dk santrifüj edilerek süpernantant atıldı ve bu işlem iki defa tekrarlandı. Pellet üzerine liziz tamponu eklenir ve TE ile 500 µl'ye tamamlanır; 56 °C de iki saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrası Fenol- kloroform (1-1) oranında 500 µl eklenir. 3000g de 2 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üst berrak kısım temiz eppendorf tüplerine alınır üzerine % 100'lük etil alkol ilave edilip hafifçe çalkalanır. Sonra % 70'lik etil alkol ilave edilip uçana kadar beklenir. Daha sonra % 0,8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek değerlendirildi.

3.4.6.3. % 0,8'lik Agaroz Jel Elektroforezi

0,24 gr agaroz, 30 ml 0,5xTEB içinde kaynatıldı, 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra 0,5 µg/ml etidyum bromür eklendi. Standart jel kalıbına dökülen jelin polimerleşmesi için 15-20 dakika beklendi. Kuyucuklara spektrofluometrik olarak miktar tayini yapılmış olan DNA içeriğinden 10 µg yüklenerek 120 volt ve 0,5xTEB'de 30 dakika süreyle yürütüldü.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler Windows için SPSS 11,5 programı kullanılarak değerlendirildi. Ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü, ANOVA testi ile yapıldı ve p<0,05 istatistiksel anlamlı fark olarak kabul edildi. Tüm veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi.

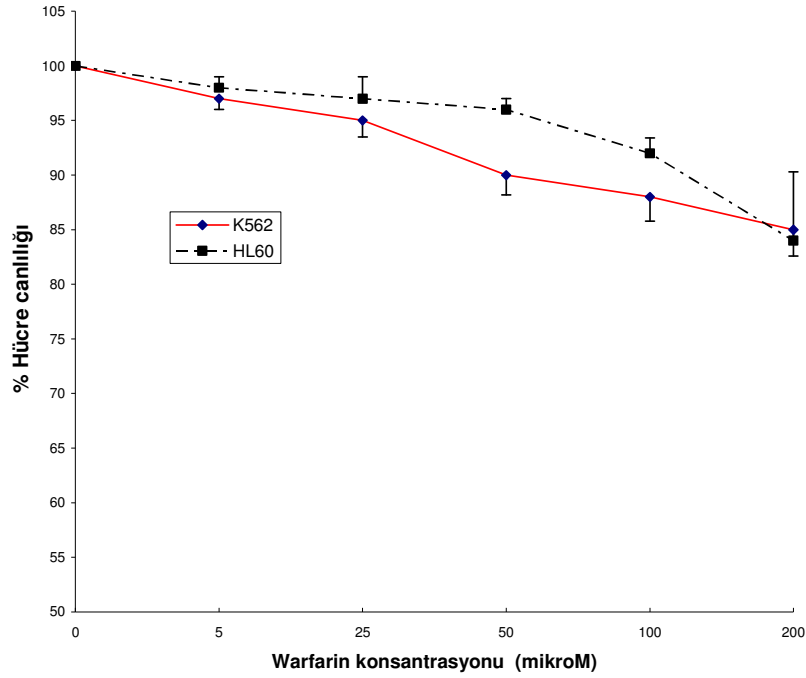
4. BULGULAR

4.1.WARFARİNİN HÜCRE SİTOTOKSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

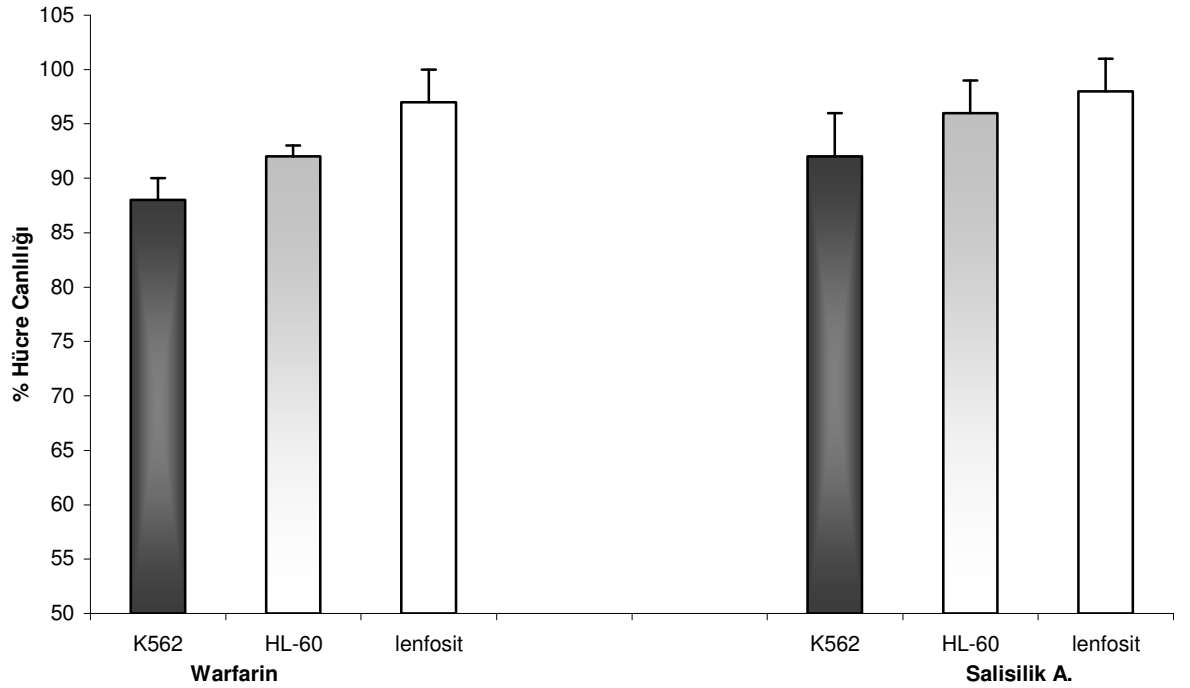
Çalışmamızda K562, HL-60 hücre soyları ile lenfositler kullanıldı. Warfarinin hücre sitotoksitesi üzerine olası etkileri, hücre canlılığı ve hücre çoğalması etkileriyle incelendi. Hücre canlılığı için tripan blue boyama testi, hücre proliferasyonu için MTT yöntemi uygulandı.

4.1.1. K562 ve HL-60 Hücre Kültürlerinde Warfarinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Farmakolojik konsantrasyonlara yakın ve üstündeki çeşitli konsantrasyonlarda (5, 25, 50, 100 ve 200 μ M) warfarin ile kültüre edilen K562 ve HL - 60 hücrelerinde % 3-15 ve % 2-16 arasında hücre ölümünü indüklemiştir. Warfarinle 72 saat inkübe edilen kültürlerin 50 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücre ölümünün %5'in üzerinde olduğu saptandı. 100 μ M konsantrasyonda asetil salisilik asit(aspirin) aynı şartlar altında hücre ölümünü K562, HL-60 ve lenfosit hücrelerinde sırasıyla % 8, % 4 ve % 2 oranlarında indüklemiştir.



Şekil 4.1. Warfarinin 72 saatlik inkübasyonu sonucu K562 ve HL-60 hücrelerinde doza bağımlı hücre canlılığı üzerine etkisi. Sonuçlar birbirinden bağımsız 7 farklı çalışmadan elde edilmiş olup değerler, ortalama \pm SD olarak sunulmuştur.



Şekil 4.2. K562, HL-60 ve lenfosit hücrelerinin 100 μ M warfarin veya asetil salisilik asit (aspirin) ile inkübasyonun hücre canlılığı üzerine etkisi. Sonuçlar birbirinden bağımsız 3 farklı çalışmadan elde edilmiştir. Değerler, ortalama \pm SD olarak sunulmuştur

4.1.2. K562 ve HL-60 Hücre Kültürlerinde Warfarinin Hücre Çoğalması Üzerine Etkisi

Çeşitli konsantrasyonlarda (5, 25, 50, 100 ve 200 μM) warfarin ile inkübe edilen K562 hücrelerinde hücre çoğalması warfarin içermeyen kontrol hücrelerine göre % 10-51, HL-60 hücrelerinde ise % 8-41 arasında azaldığı görülmüştür. 100 μM konsantrasyonda salisilik asit ise hücre çoğalmasını bazal seviyede çoğalan hücrelere göre K562 ve HL-60 hücrelerinde sırasıyla % 26 ve % 20 oranında azalttığı gözlenmiştir. Bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı gözükmemektedir (Tablo 4.1.). (Ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü, ANOVA testi ile yapıldı ve $p < 0,05$ istatistiksel anlamlı fark olarak kabul edildi.)

Tablo 4.1. K562 ve HL-60 hücrelerinde warfarinin konsantrasyona bağlı olarak hücre çoğalması üzerine etkisi

İnkübasyon şartları	Kontrol hücrelere göre nisbi proliferasyon yüzdesi (%)	
	K562	HL-60
• Kontrol (Bazal Şartlar)	100	100
• Warfarin		
• 5 μM	90 \pm 2	92 \pm 2
• 25 μM	89 \pm 3	90 \pm 3
• 50 μM	64 \pm 5	67 \pm 2
• 100 μM	61 \pm 4	62 \pm 2
• 200 μM	49 \pm 6	59 \pm 5
• Salisilik asit		
• 100 μM	74 \pm 3	80 \pm 4

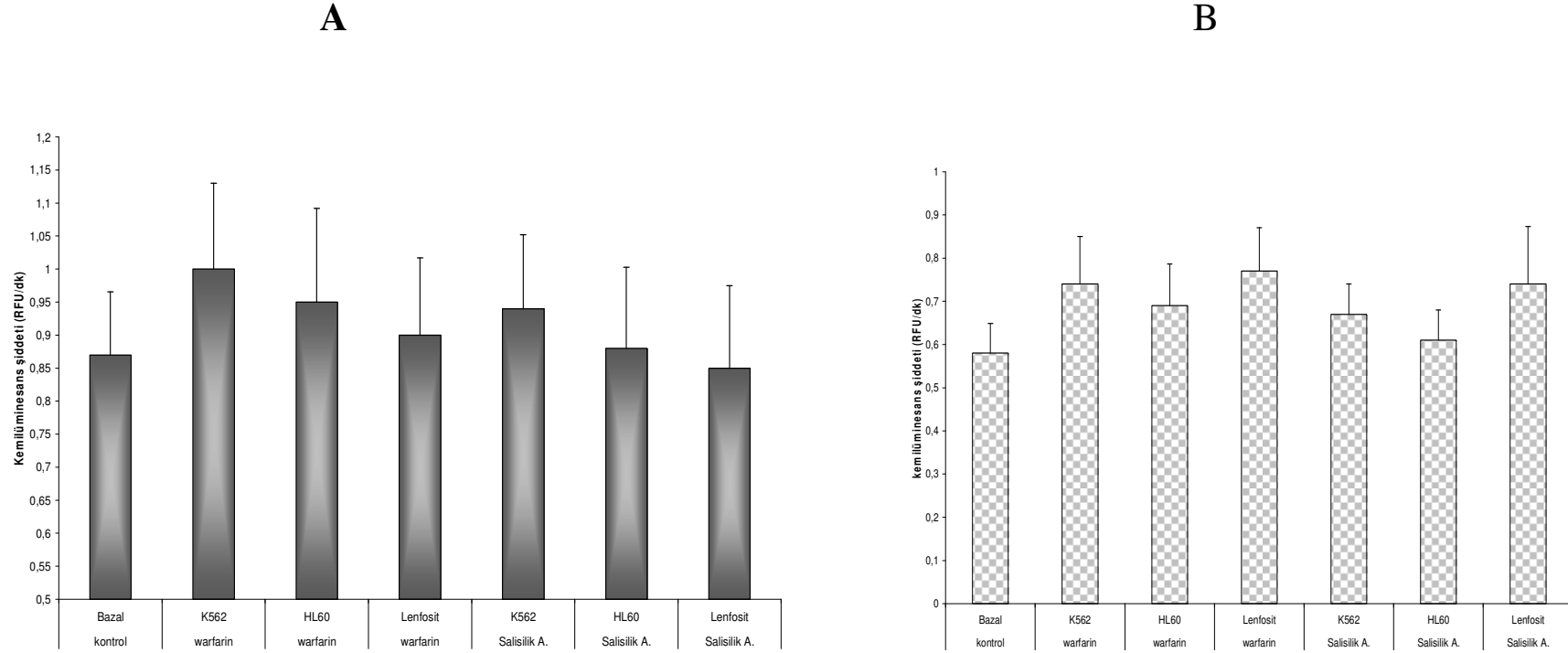
Veriler warfarin içermeyen kontrol hücrelere göre % değişim olarak ifade edilmiş olup, K562 hücrelerinde birbirinden bağımsız 8 ayrı, HL-60 hücrelerinde birbirinden bağımsız 5 ayrı çalışmanın ortalama \pm SD değerleridir.

4.2. WARFARİNİN K562 VE HL-60 HÜCRE SOYLARINDA OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ

Kemilüminesans ölçümleri ve bir spekturofluometrik yöntem olan 2',7' DCFH-DA oksidasyonunun analizi son yıllarda biyolojik sistemlerde oksidan mekanizmaların etkilerini ortaya çıkaran tetkikler olduğundan, çalışmamızda warfarinin K562 ve HL-60 hücrelerinde oksidatif stres üzerine etkisi lüsigenin ve lüminol aracılı kemilüminesans ve 2',7' DCFH-DA oksidasyonu ile değerlendirildi.

4.2.1. K562 ve HL-60 Hücre Kültürlerinde Warfarinin Lüsigenin ve Lüminol Aracılı Kemilüminesans Şiddeti

Warfarinle 72. saat inkübe edilen K562 ve HL-60 hücrelerinde oksidatif stres göstergesi, lüsigenin ve lüminol varlığında oksidan oluşumunu gösteren kemilüminesans şiddetindeki değişikliklerle incelendi. Lüminol ve lüsigenin eklenmiş örneklerin 0, 15, 30, 60. saniyelerde kemilüminesans şiddetleri analiz edildiğinde warfarinin 100 µM konsantrasyonunun bazal şartlardaki hücelere göre kemilüminesans şiddetlerini değiştirmedeği gözlenmektedir. Aynı şartlar altında salisilik asitle inkübasyon sonrası kemilüminesans şiddetinde önemli değişiklikler gözlenmemiştir. Şekil 4.3. A ve B' de 1. dakikada elde edilen kemilüminesans şiddetlerinin ortalamaları gösterilmektedir



Şekil 4.3. K562, HL-60 ve lenfositlerin 100 μ M warfarin ve salisilik asit ile inkübasyon sonrası kemilüminesans oluşumu üzerine etkisi. Sonuçlar birbirinden bağımsız 5 farklı çalışmadan elde edilmiş değerlerin \pm SD ortalaması olup, (A) lüsijenin aracılı ve (B) lüminol aracılı kemilüminesans şiddetlerini göstermektedir.

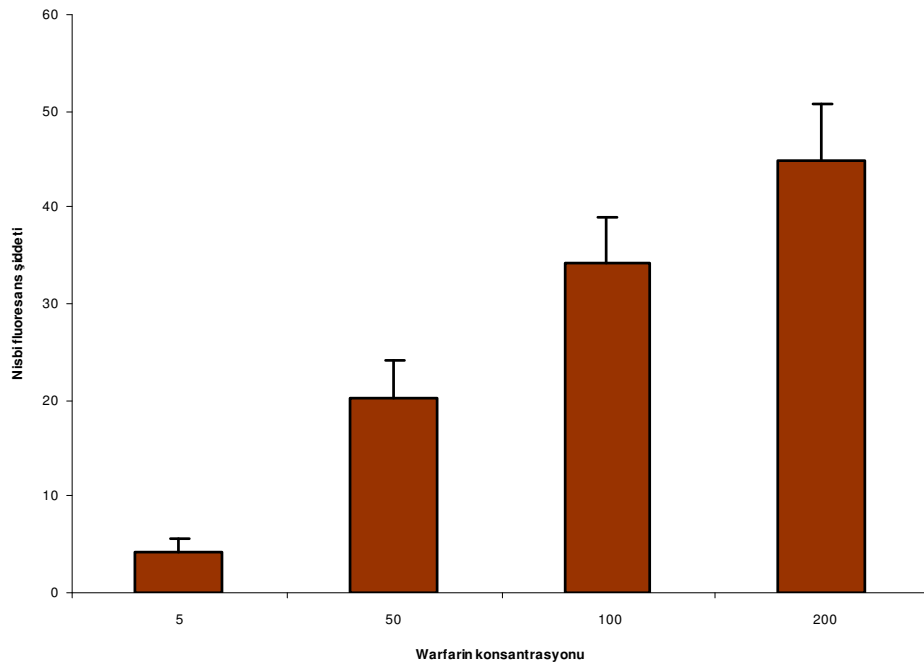
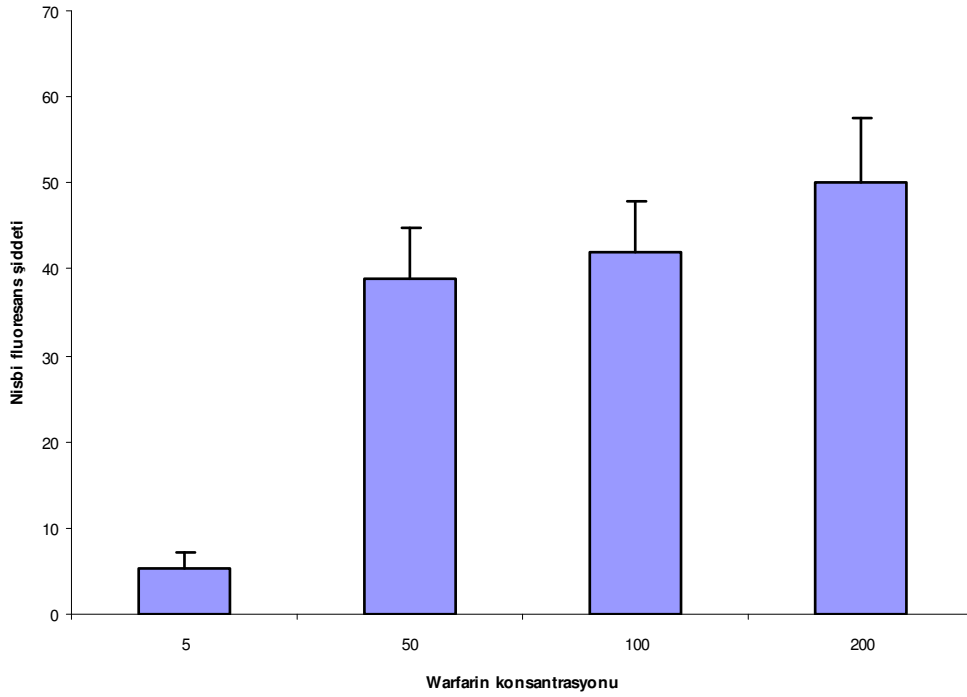
4.2.2. K562 ve HL-60 Hücre Kültürlerinde Warfarinin Hücre İçi Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Warfarinin hücre içi oksidatif stres üzerine etkisini incelemek amacı ile, hücre kültürleri 72 saatlik inkübasyon sonrasında fluoressans vermeyen bir bileşik olan 2',7' DCFH-DA ile inkübe edildiler. Çeşitli oksidanların varlığında, fluoressans veren bir bileşik şekline dönen 2',7' DCFH-DA'nın oksidasyonu spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Sonuçlarımız hücre kültürlerinin warfarinle inkübasyonunun 2',7' DCFH-DA oksidasyonunun warfarin içermeyen kontrol hücrelerine göre, K562 hücrelerinde doza bağımlı olarak % 5-50, HL-60 hücrelerinde ise % 4-45 artırdığı görülmektedir (Şekil 4.4.) Bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı gözükmemektedir. ($p < 0,05$) (Ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü, ANOVA testi ile yapıldı ve istatistiksel anlamlı fark olarak kabul edildi).

Tablo 4.2. K562, HL-60 ve lenfositlerin 100 μ M warfarin ve salisilik asit ile inkübasyon sonrası hücre içi ROS oluşumu üzerine etkisi

	Nisbi Fluoressans şiddeti (10^6 hücre başına)	
	Warfarin (100 μ M)	Salisilik Asid (100 μ M)
K562	42 \pm 5.87	9 \pm 1
HL-60	34.2 \pm 4.91	6 \pm 0.8
Lenfosit	15 \pm 8	7 \pm 4

Sonuçlar warfarin veya salisilik asidin 2',7'DCFH-DA oksidasyonunda bazala göre meydana getirdiği 10^6 hücre başına nisbi fluoressans şiddetinin birbirinden bağımsız 5 farklı çalışmadan elde edilmiş ortalama \pm SD değerleridir.



Şekil 4.4. 72 saat warfarinle inkübe edilmiş K562 ve HL-60 hücrelerinde hücre içi ROS oluşumu üzerine warfarinin doza bağımlı etkisi. Farklı konsantrasyonlarda warfarinle inkübe edilen K562 ve HL-60 hücrelerindeki ROS oluşumu 2'-7' DCFH-DA'ın DCF-DA'ya oksidasyonu ile değerlendirildi ve bazal şartlardan elde edilen değerler blank olarak kabul edilerek 10^6 hücre başına nisbi floresans şiddeti olarak ifade edildi. Veriler birbirinden bağımsız 5 çalışmanın ortalama \pm SD değeri olup, (A) K562 ve (B) HL-60 hücrelerinin hücre içi ROS oluşumunu göstermektedir.

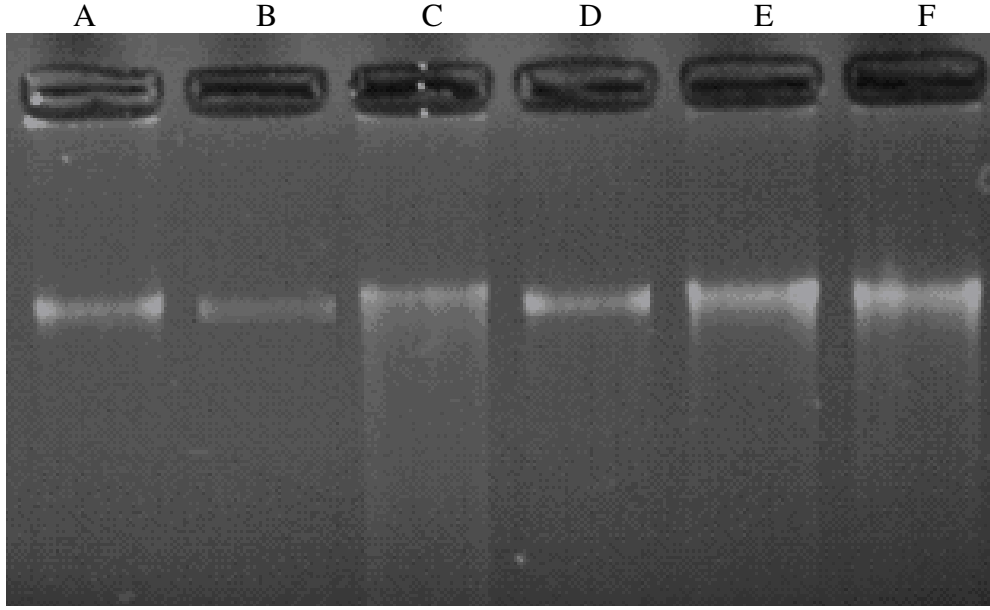
4.3. K562 VE HL-60 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE WARFARİNİN DNA FRAGMENTASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Tablo 4.3. Warfarinin K562 ve HL-60 hücrelerinde DNA fragmentasyonu üzerine (ELİSA) etkisi

Warfarin konsantrasyonu	Absorbans _(450-655 nm)
K562	
• Kontrol (warfarin içermeyen)	0.045
• 50µM	0.078
• 100µM	0.098
HL-60	
• Kontrol (warfarin içermeyen)	0.037
• 50µM	0.067
• 100µM	0.075

Sonuçlar iki farklı çalışmanın ortalama absorbans değerlerini göstermektedir

Warfarinin K562 ve HL-60 hücre kültürlerinde apoptosis göstergesi olarak kullanılan DNA fragmentasyonu üzerine etkisi ELİSA ve elektroforetik yöntemler ile incelendi. ELİSA yöntemindeki sonuçlara göre (Tablo 4.3) yapılan değerlendirmede 50 µM ve 100 µM warfarinle 72 saat inkübe edilen K562 ve HL-60 hücrelerinde DNA fragmentasyon düzeylerinin bazal düzeye göre K562 hücrelerinde %73-117, HL-60 hücrelerinde %81-102 arttığı görülmektedir. Ayrıca warfarinle inkübe edilmiş örneklerden elde edilmiş DNA 'ların elektroforetik değerlendirilmesinde hücelere warfarin verilmesiyle smear (yayma) görüntüsünün artırması görülmektedir. Bu artış 100 µM konsantrasyonda daha belirgindir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Warfarinin K562 ve HL-60 hücrelerinde DNA fragmentasyonu üzerine (Elektroforetik yöntemle) etkisi. 37 °C 72 saat inkübasyon (A) Warfarin içermeyen K562 hücreleri, (B) 50µM warfarin içeren K562 hücreleri, (C)100 µM warfarin içeren K562 hücreleri, (D) Warfarin içermeyen HL-60 hücreleri, (E) 50 µM warfarin içeren HL-60 hücreleri, (F) 100 µM warfarin içeren HL-60 hücreleri. Şekildeki görüntü 4 farklı çalışmadan birini temsil etmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Aerobik organizmalarda, mitokondri, elektron transport zincirinde açığa çıkan serbest radikallerden dolayı oksidantların ana kaynağıdır (96, 97) ve mitokondrial O_2^- oluşumunun arttığı koşullarda veya antioksidan sistemler yetersiz kaldığında hücre içerisinde ROS 'un birikmesi ile hücre büyümesi ve çoğalmasını uyarabilir. ROS'un hem mtDNA hem de nDNA'nın hasara uğramasına ve kanser gelişmesine neden olabileceği öne sürülmüştür (79, 80). Bununla birlikte kanser hücrelerinde artan oksidatif stresin, mtDNA ve nDNA'da mutasyon oluşumuna neden olarak proto-onkogenleri, bazı transkripsiyon faktörlerini aktive ettiği, genomda kararsızlığa, kemoterapide dirençle ve metastazla ilişkili olabileceği de ileri sürülmüştür (77).

KLL hastalarında izole edilen primer lösemi hücrelerinde mtDNA mutasyonlarına bağlı olarak ROS üretiminde artış belirtilmiştir (79, 98). Kanser hücreleri metabolik ROS üretiminde normal hücrelerden daha aktiftir ve oksidatif stres altında daha kararlıdırlar (79, 99, 100).

Bununla birlikte çeşitli kanser hücrelerinde yapılan çalışmaların sonucu olarak bu hücrelerde ROS'un azaldığı da öne sürülmektedir (81, 82). Bu düşüşün mitokondrideki solunum fonksiyonundaki yetersizlikten kaynaklandığı görüşü çeşitli araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır. Bunun altında yatan biyokimyasal ve moleküler mekanizmaların son derece kompleks ve tanımlanmamış olduğu dikkati çekmekle

birlikte, bu yetersizliğin mtDNA'daki mutasyonlardan, elektron taşıma zincirindeki bozuluktan, enerji metabolizmasında rolü olan enzimlerin hatalı ekspresyonu ve hücrel mikro çevredeki O₂ yetersizliğinden kaynaklanabileceği ile ilgili bulgular mevcuttur (79, 101, 102). Buna ek olarak çeşitli kanser hücrelerinde Mn,Cu/Zn-SOD gibi antioksidan enzimlerinin ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir. Bu tür artışların tümörlü hücreyi oksidatif stresten korunmaya neden olacağı ileri sürülmüştür (103).

Hem ROS oluşumundaki yetersizlik hem de antioksidan sisteminin aktivasyonu hücreyi ölüme kadar götürebilen oksidatif hasarın yıkıcı etkilerinden kanserli hücreyi koruyabilir. Radyoterapi ve çeşitli kanser ilaçlarıyla tedavi yaklaşımlarında kanserli hücrelerde oksidatif stresin sonucu olarak oksidatif hasar artabilmekte ve kanser hücrelerinin ölümü hızlanabilir (sağlanabilir) bilmektedir. Doxorubisin, bleomycin, mitomycin-C gibi ilaçların etki mekanizmaları içerisinde oksidatif hasarın olduğu gösterilmiştir (98, 103).

Berkarda ve arkadaşları ALL ve KLL hastalarına 20 mg tek dozluk warfarin verdikten sonra lenfositlerini elektron mikroskopunda değerlendirmişlerdir. Aynı dozu uyguladıkları normal bireylerden elde ettikleri lenfositlerin mitokondrilerinde herhangi bir değişiklik gözlemezlerken lösemik hücrelerde mitokondrial yıkımı gösteren bir takım önemli değişikliklerin olduğunu bildirmişlerdir. Berkarda ve arkadaşları bu değişikliğin warfarinin elektron transfer etme özelliğinden kaynaklanabileceğini ve ilacın bu şekilde mitokondride oksijen kullanımını artırmak suretiyle solunumu uyarak oksidatif stres oluşturabileceğini öne sürmüşlerdir (104).

Antikoagülanlar, trombus oluşumunu önleyerek dolaylı yoldan antimetastatik bir etki ortaya çıkarabilmektedirler (50,51,105,106). Warfarinin de antimetastatik bir etkiye sahip olduğunu gösteren klinik ve hayvan çalışmalarının sonuçları mevcuttur (105, 107). Berkarda ve arkadaşlarının sözü edilen çalışması ilacın aynı zamanda doğrudan bir etkisi olabileceği sonucunu da ortaya çıkarmaktadır. Ancak warfarinin tümör hücreleri üzerindeki etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma olduğu dikkati çekmektedir.

Pubmed üzerindeki yaptığımız literatür çalışmalarında warfarinle oksidatif stres arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma göze çarpmamaktadır.

Berkarda ve arkadaşlarının çalışmasına ışık tutmak amacıyla bir eritrolösemik hücre soyu olan K562 hücrelerinde ilacın çeşitli dozlarıyla oksidatif stres ve hücre sitotoksitesi oluşturma özelliği araştırıldı (104). Çalışmamızda kontrol hücre olarak sağlıklı bireylerden elde edilen lenfositler, warfarinin antikoagülan kontrolü olarak da asetil salisilik asit (aspirin) kullanıldı.

Lüsigenin ve lüminol aralarında O_2^- , H_2O_2 , singlet oksijen gibi çeşitli reaktif oksijen türlerinin bulunduğu ortamlarda oksitlendiklerinde kemüliminesans çıkaran bileşiklerdir. Öte yandan 2',7'DCFH-DA oksidasyonuna neden olan çeşitli reaktif oksijen türleri bildirilmiştir. Bunlar arasında H_2O_2 spesifik olmakla birlikte O_2^- , ROO^- , NO^- radikalleri bulunmaktadır (90-93). Kemüliminesans ve 2',7'DCFH-DA sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde, yüksek konsantrasyonda warfarinin hücre dışında reaktif oksijen türlerinin oluşumunu etkilemezken, hücre içinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttığı söylenebilir. Ancak elimizdeki bulgulardan warfarinin hangi özel reaktif oksijen türlerinin oluşumunu etkilediğini söylemek mümkün değildir.

ROS oluşumunun pek çok değişik reaksiyon sonucu oluşan ve çeşitli faktörlerin etkisi altında olan bir sistem olduğu dikkate alınırsa warfarin etkisiyle oluşan artışın kaynağının ne olduğunu söyleyebilmek için daha fazla çalışma yapmaya gerek duyulmaktadır.

Berkarda ve arkadaşlarının çalışmalarında warfarinin mitokondride lizize yol açtığı gözlemlenmesi, ilacın mitokondri üzerinden bir etkiyle mi ROS oluşumuna neden olabileceği sorusunu akla getirebilmektedir (104). Eğer bu görüşü dikkate alırsak, ROS oluşumunun asıl kaynağı olan elektron taşıma zincirinde warfarinin elektron taşıma özelliğinden dolayı bu mekanizmayı etkilediği ya da hücre içi oksidatif stresi artırarak dolaylı bir yoldan ROS artışına neden olduğu düşünülebilir. Ancak bu sorular irdelenirken Berkarda ve arkadaşlarının çalışmalarında kullanılan hastaların mesela oksidatif etkili bir kemoterapötik ilaç alıp almadığının makalelerinde belli olmadığını göz önünde bulundurmak gerekir.

Oksidatif stres ile hücre çoğalması ve ölümü arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda bildiri yayınlanmıştır. Oksidatif hasarın hücre çoğalmasını etkileyen ve hücre ölümünü artıran sitotoksik bir etkisi olduğu iyi bilinmektedir (89). Bizim deneysel koşullarımızda warfarinin yüksek konsantrasyonlar da sınırlı bir hücre ölümü görüldü. Ancak hücre metabolik aktiviteyi gösteren MTT testi ile warfarinin hücre çoğalması üzerine etkisi incelendiğinde 72. saatlik kültürde ilacın hücre çoğalmasını % 10-51 kadar azalttığı gözlemlenmiştir. Warfarinin hücre çoğalması üzerine bu etkisinin oksidatif stresle ilişkili olup olmadığı yine cevap bekleyen sorular arasındadır. Çeşitli toksik ajanların apoptozu artırdığı iyi bilindiğinden toksik etkinin araştırıldığı çalışmalarda bu parametrenin bulguların daha iyi değerlendirilmesine olanak verebilmektedir (108-110). Bununla birlikte hücre ölümünün değerlendirilmesinde kullanılan ve bizimde çalışmamızda kullandığımız tripan blue testinde hücre canlılığının değerlendirilmesi hücrelerin boyayı alıp almadığına göre yapılmaktadır. Apoptozun son aşamasındaki hücrelerin bu testle değerlendirilmemesi zorluğu ile çalışmamızda apoptoz göstergesi olarak kabul edilen DNA fragmentasyonu yöntemini warfarinin sitotoksik etkilerini göstermek amacıyla kullandık. Çalışmamızda ELİSA ve elektroforetik olarak warfarinin >50µM konsantrasyonlarında DNA fragmentasyonunu hem k562 hem de HL-60 hücre soylarında arttırdığını gözlemledik.

Literatürde warfarin ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların yetersizliğinden dolayı bulgularımızı kıyaslama imkanı bulunamamıştır.

Bu çalışmanın sonuçlarını değerlendirirken eksik olan şu yönlerini de dikkate almak gerekir.

1. Çalışmanın in vitro olması nedeniyle bulgularımız in vivo şartları yansıtmayabilir.
2. Bu çalışmada warfarinin her ne kadar oksidatif stresi arttırdığı bilinse de bunun hücre metabolik hasar üzerine etkisi araştırılmamıştır.
3. Hücrelerden hazırlanabilecek mitokondrial kesimde oksidatif stresin ve hasarın tespiti sonuçları, warfarinin mitokondri üzerine etkisini açıklamamızda daha çok yardımcı olabilecektir.
4. Deneysel koşullarımızda lenfositlerin ve asetil salisilik asitin DNA fragmentasyonu üzerindeki etkisi araştırılmamıştır.

5. Literatüre baktığımızda farklı hücre soyları çeşitli ilaçlara karşı farklı cevaplar oluşturabilmektedir. Bu nedenle sonuçlarımız tüm hücre soylarının veya kanser tiplerinin warfarine karşı cevabını yansıtmayabilir.
6. Radyoterapi ve oksidatif stres oluşturarak etki eden kemoterapötik ilaçlarla birlikte warfarinin alımının hücre sitotoksitesi üzerine etkisinin ne olacağı in-vitro koşullarda araştırılmamıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz tüm bulguların ışığında sonuç olarak;

Farmakolojik konsantrasyonun üzerindeki dozlarda, warfarinin K562 hücrelerinde hücre içi oksidatif stresi artırdığı, hücre çoğalması ve DNA fragmentasyonu üzerinde sitotoksik bir etki oluşturduğu söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Halliwell B. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. Lancet, 1984; 23: 1396-97
2. Hochstein P. Atallah AS. The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. Mutat. Res. 1988; 202: 363-375
3. Southorn P. Powis G. Free Radical in Medicine I Chemical and biological reactions. Mayo Clin. Proc. 1988; 6: 23-30
4. Southorn P. Powis G. Free radical in Medicine II. Involvement in human disease. Mayo Clin. Proc. 1988; 63 :390-408
5. Uysal M. Serbest radikaller; lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik gelişim 1998;11: 336-341
6. Konukoğlu D. Serbest radikaller ve önemleri. Aile hekimliği 1997; 1(4): 197-200
7. Çavdar C, Sifi A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 1997; 3-4: 92-95
8. Kökoğlu E. Serbest radikal reaksiyonlarının kanserdeki rolü. Klinik gelişim 1998;11: 358-364
9. Seven A, Candan G. Serbest radikeller ve lipid peroksidasyonu. Klinik gelişim 1995; 8(10): 3906-3611

10. Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Colhns AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.* 1996; 56: 1291-1295
11. McCard JM, Fridouich I. The biology and phytochemistry of oxygen radicals. *Annals Int. Med.* 1978; 89: 122-127
12. Garzetti GG; Tranquilli AL; Cugini AM; Altered lipid composition, increased lipid peroxidation and altered fluidity of membrane as evidence of platelet damage in preeclampsia *obstetrics & Gynec.* 1993;81: 337-40
13. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem. J.* 1984; 222: 1-15
14. Akalın Z. Aterosklerotik Damar Hastalıklarında Oksidatif DNA Hasarının İncelenmesi, Yüksek Lisans tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2003
15. Yalçın AS, Sabuncu N, Kılıç A, Gülcan G, Emerk K. Increases plasma and erythrocyte lipid peroxidation in hyperlipidemic individuals. *atherosclerosis* 1989; 80: 169-170
16. Kayalı R. Streptozosin ile indüklenmiş Diyabetik Sıçanlarda mitokondriyal Oksidatif Protein hasarı, doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2003
17. Marnet LJ. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Res* 1999;424: 83-95
18. Marnet LJ. Oxy radicals, Lipid peroxidation – DNA damage. *Toxicology* 2002; 181-182: 83-95
19. Peksın AV. Interaction of reactive oxygen species with DNA. *Biochemistry(Moscow)*1997; 62: 1341-1347
20. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003; 17: 1195-1214
21. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays* 2004; 26: 533-542
22. Fenech M, Crott J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and result for hydrogen peroxide mutagenesis 1999;14(6): 605-612
23. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and disease. *Biochem J.* 1984; 219: 1-14
24. Halliwell B. Reactive oxygen species in living system source, biochemistry and role in human disease, *Am. J. Med.* 1991; 91(3c): 145-225

25. Duthie SJ, Collins AR. The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using comet assay) in human cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22(4): 717-724
26. Freidberg EC, McDaniel LD, Schultz RA. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004; 14: 5-10
27. Meister A. Glutathione ascorbate and cellular protection. *Cancer Res.* 1994; 54:1969-1975
28. Villani Pi, Altavista PL, Castaldi L, Leter G, Cordelli E. Analysis of DNA oxidative damage related cell proliferation. *Mutant Res.* 2000; 464: 229-237
29. Freeman BA, Crappo JD. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 412-417
30. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik gelişim* 1998; 11: 342- 346
31. Ceballos L, Lapon M, Hirsch E. Superoxide dismutase and Parkinson's disease. *The Lancet*, 1990; 335: 1035-1036
32. Cros CE; Halliwell B.; Borish ET. Et al: Oxygen radicals and human disease. *Annals. Int. Med.* 1987; 107: 526-45
33. Sadıqov ST. Canlılarda moleküler düzenleme mekanizmaları. Kayseri, Erciyes Üniversitesi Matbası 2001: 86-87
34. Yenerman M. Genel Patoloji. IIcilt, 3.Baskı, İstanbul İ:Ü İstanbul Tıp Fak.Vakfı 1994: 1245-1297
35. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliack A, Vanky F. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloidleukemia *Int J Cancer.* 1976; 18(4): 421-431
36. Koeffler HP, Gold DWW. Human Myeloid Leukemia Cell lines. *Blood Vol* 1980: 56(3)
37. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myolegenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 1975; 45(3): 321-33
38. Assaf YA, Domiano Ae, Zotta E, Ibarra c, Kotsias BA. CFTR in k562 leukemic cells *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285(2):480-488
39. Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RS. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *T. Biol Chem.* 1951; 193: 265-275
40. Nakajima O, Hashimoto Y, Iwasaki S. Enhancement by retinoid of hemin induced differantiation of human leukemia K562 cell line. *FEBS* 1993; 330: 81-84

41. Singhal SS, Awasthi S, Oandya U, Piper JT, John Saini MK, Cheng JZ, Awasthi YC. The effect of Curcumin on glutathione-linked enzymes in K562 human leukemia cells. *Toxicology letters* 1999; 109: 87-95
42. Anand S, Verma H, Kumar L, Singh N. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia lymphocytes by hydroxyurea and adriamycin. *Cancer Letter*. 1995; 88: 101-105
43. Saydam G, Aydin HH. Involvement of protein phosphatase 2A in interferon alfa2b induced apoptosis in K562 human CML cells. *Leukemia Research*, 2003; 27: 709-717
44. Bobek V, Boubelik M, Fiserova A, Luptovcava M, Vannucci L. et al. Anticoagulant drugs increase natural killer cell activity in lung cancer. *Lung Cancer* 2005; 47: 215-223
45. Falanga A. Biological and clinical aspects of anticancer effects of antithrombotics. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2004; 33: 389-392
46. Xie WZ, Leibl M, Clark MR, Dahrmonn P, Kuze T, Gieseler F. Activation of the coagulation system in cancerogenesis and metastasation *Biomadicine & Pharmacothreapy* 2005; 59: 70-75
47. O'Meara RA. Coagulative properties of cancer. *Irish J Med Sci* 1958; 6: 474-9
48. Veronica A Carroll, PHD, Bernd R. Binder, MD. The role of Plasminogen Activation system in cancer. *Semin ThrombHemos* 1999; 25(2)
49. Joseph S. Palumbo, Keith W. Kombrinck, Angela F. Drew, Timothy S. Grimes, John H. Kiser, Jay L. Degen, Thomas H. Bugge. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood* 2000; 196(10): 3302-3310
50. Bobek V, Kovarik J. Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 213-219
51. Hejna M, Raderer M, Zielinski CC. Inhibition of Metastases by Antikoagülants. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 22-36
52. Lip Gy, Chin BS, Bland AD. Cancer and prothrombotic state. *Lancet Oncol* 2002; 3: 27-34
53. Deitcher SR. Cancer and Thrombosis: Mechanisms and Treatment. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2003; 16(1/2): 21-31
54. Horton JD, Pharm D, Bushwick BM, MD. Warfarin Therapy: Evolving strategies in Anticoagulation. *Am fam Physician* 1999; 60(3): 27-34
55. Gao D, Maurin MB. Physical Chemical Stability of Warfarin Sodium *AAPS PharmSci.* 2001; 3 (1): E3

56. Fuster V, Wayne AR, O'Rourke R. The Heart . *Cilt3* 2004;1411
57. Ulutin T, Cengiz M, Yüksel A. *Tıbbi biyoloji ders notları 1. İstanbul. Nobel tıp kitap evi* 2000: 97-100
58. Wallin R, Rannels SR Identification of vitamin K-dependent carboxylase activity in lung type II cells but not in lung macrophages . *Biochem. J.* 1988; 250: 557-563
59. Esmon Ct, Sutties JW. Vitamin K-dependent carboxylase solubilization and properties. *The Journal of Biologicalchemistry* 1976; 251(20): 6238-6243
60. Sadowski JA, Esmon Ct, Sutties JW. Vitamin K-dependent carboxylase requirements of the rat liver microsomal enzyme system. *The Journal of Biologicalchemistry* 1976; 251(9): 2770-2776
61. Ngui JS, Chen Q, Shou M, Wang RW, Stearns RA, Baillie TA, Tang W. In Vitro Stimulation of Warfarin Metabolism by Quinidine: Increases in the Formation of 4*- and 10-Hydroxywarfarin. *Drug Metabolism and Disposition.* 2001; 29(6) :877-876
62. Kotter AP, Peppelenbosch MP, Brandjes DPM, Lumbatobing M. Dichotomal effect the coumadin derivative warfarin on inflammatory signal transduction. *Clinical and diagnostic labrotory immunolgy* 2002; 9(6): 1396-1397
63. Haas S. Medical indications and considerations for future clinical decision making. *Thrombosis Research* 2003; 109: 31–37
64. Higuchi Y, Matsukawas. Appearance of 1-2 Mbp giant DNA fragments as on early common response leading to cell death induced by varius substance which cause oxidative stress. *Free radic. Biol. Med.* 1997; 23: 90-99
65. Houten BV, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2006; 5(2): 145-52
66. Passarella S, Atlante A, Valenti D, de Bari L. The role of mitochondrial transport in energy metabolism, *mitochondrion* 2003; 2: 319-343
67. Orth, Schapira AHV. Mitochondria and degenerative disorders, *American Journal of Medical Genetics* 2001; 106: 27-36
68. Manfredi G, Beal MF. The role of mitochondria in pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Brain Pathology* 2000; 10: 462-472
69. Wallace DC. Mitochondrial diseases in mam and mouse. *Science* 1999; 283: 1482-1488

70. Champe RC, Harvey RA. Lippincott's Biyokimya. Biyoenerjetikler ve Oksidatif Fosforilasyon. 2. baskı İstanbul, Nobel kitapevi 1997:61-75
71. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. Metabolizma ve Enerji İstanbul. Palme yayıncılık 2002: 77-80
72. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress, *Free Radical Biology & medicine* 1999; 26: 463-471
73. Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C et al. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66: 1627-1634
74. Jackson MJ, Papa S, Bolanos J, Bruckdorfer R, Carlesn H et al. Antioksidants, reactive oxygen and nitrogeb species, gene induction and mitochondria function. *Moleculer Aspects of Medicine* 2002; 10: 209-285
75. Penta, JS, Johnson FM, Wachsman JT. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat. Res.* 2001; 488: 119-133
76. Aral C, Kaya H, Ataizi-Çelikel Ç, Akkiprik M, Sönmez Ö, Güllüoğlu BM, Özer A. A novel approach for rapid screening of mitochondrial D310 polymorphism. *BMC Cancer* 2006; 6: 21
77. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 1995; 358: 1-3
78. Modica-Napolitano JS, Singh KK. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion* 2004; 4: 755-762
79. Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer, *Mol Cancer* 2002 ;9: 1-9
80. Hu Y, Rosen DG, Zhou Y, Feng L, Yang G et al. Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *Biol. Chem.*, 2005; 280: 39485 – 39492
81. Xu R, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 2005; 65(2): 613-621
82. Muller-Hocker J, Aust D, Rohrbach H, Napiwotzky J, Reith A, Link TA, Seibel R, Holzel D, Kadenbach B. Defects of the Respiratory Chain in the Normal Human Liver and in Cirrhosis During Aging. *Hepatology* 1997; 26(3): 709-719

83. Gatterman N, Dadak M, Hofhaus G, Wulfert M, Berneburg M et al. Severe impairment of nucleotide synthesis through inhibition of mitochondrial respiration. *Nucleosides Nucleotide Nucleic Acids*. 2004; 23(8-9): 1275-1279
84. Cook JA, Gius D, Wink DA, Krishna MC, Russo A, Mitchell JB. Oxidative Stress, Redox, and the Tumor Microenvironment. *Seminars in Radiation Oncology* 2004; 14(3): 259-266
85. Noor R, Mittal S, Igbal J. Superoxide dismutase-applications and relevance to human diseases. *Med Scimonit* 2002; 8(9): 210-215
86. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl.*1968; 21: 77-89
87. Baysal k.hücre kültürü teknikleri, TÜBİTAK İleri Moleküler Hücre Biyolojisi teknikleri Uygulamalı Eğitim kursu, 2004
88. FreshenyI. Application of cell cultures to toxicology. 2001; 17: 213-230
89. Luczak K,Balcerzyk A, Saszynski M, Bartosz Grzeqorz. Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells in vitro cell. *Biology International* 2004; 28: 483-486
90. Cam K, Sımsek F, Yuksel M, Turker L, Haklar G ve ark. The role of reactive oxygen species and apoptosis in the pathogenesis of varicocele in a rat model and efficiency of vitamin E treatment. *international journal of andrology* 2004; 27: 228–23
91. Oh SH, Lim SC. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 212: 212–22
92. Ferretti G, Bacchetti T, DiLudovico F, Viti B, Angeleri VA, Danni M, Provinciali L. Intracellular oxidative activity and respiratory burst of leukocytes isolated from multiple sclerosis patients. *Neurochemistry International* 2006; 48: 87–92
93. Ohashi T, Mizutani A, Murakami A, Kojo S, Ishii T, Taketani S. Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Letters* 2002;511:21-27
94. Olivee C, Board P. Glutathione S-conjugate transport by cultured human cells. *Biochimica et Biophysca acta* 1994; 237: 529-536

95. Sadava D, Winesburg J. Contaminants of PC_SPES are not responsible for cytotoxicity in human small-cell lung carcinoma cells. *Cancer Letters* 2005; 220: 171-175
96. EL Midaoui A, Elimadi A, Wu L, Haddad PS, Champlain J. Lipic acid prevents hypertension, hyperglycemia and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *American Journal of Hypertension* 2003;16: 173-176
97. Suziki S, Hinokioo Y, Ohtomo M, Onoda M, Hirai S et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and relationship to its diabetic complication. *Diabetes Research and Clinical Practise* 1999; 45: 161-168
98. Dias N, Bailly C. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. *Biochemical Pharmacology* 2005; 70: 1–12
99. Mansfield KD, Simon MC, Keith B. Hypoxic reduction in cellular glutathione levels requires mitochondrial reactive oxygen species. *J Appl Physiol* 2004; 97: 1358-136
100. Lluís JM, Morales A, Blasco C, Colell A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JS. Critical Role of Mitochondrial Glutathione in the Survival of Hepatocytes during Hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(5): 3224-3232
101. Pelicano H, Feng L, Y Zhou, Carew JS, Hileman et al. Inhibition of mitochondrial respiration. *The journal of biological chemistry* 2003; 278(39): 37832-37839
102. Simonnet H, Demont J, Pfeiffer K, Guenneche L, Bouvier R et al. Mitochondrial Complex I is deficient in renal oncocytomas. *Carcinogenesis* 2003; 24(9): 1461-1466
103. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 36(6): 718-744
104. Berkarda B, Arda O, Tasyurekli M, Derman U. Mitochondrial-lytic action of warfarin in lymphocytes. *International J. of Clinical Pharmacology* 1992; 30(8): 277-279
105. Zacharski LR, Prandomi P, Monreal M. Warfarin versus low-molecular weight heparin therapy in cancer. *The Oncologist* 2005;10(1): 72-79
106. McCulloch P, George WD. Warfarin inhibition of metastasis: The role of anticoagulation. *Brj Surg* 1987; 74(10): 879-883
107. Falanga A, Piccioli A. Effect of anticoagulant drugs in cancer. *Curr Opin Pulm Med.* 2005; 11(5): 403-407
108. Choucroun P, Gillet D, Doronge G, Sawicki B, Dewtte JD. Comet assay and early apoptosis. *Mutant. Res.* 2001; 478: 89-86

109. Jajte J, Grzegorzczak J, Zymlony M, Rojkowska F. Effect of 7 MT magnetic field and iron ions on rat lymphocytes apoptosis, necrosis and free radicals process. *Bioelectrochemistry* 2002; 57: 107-111
110. Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 306: 1527-1535

ÖZGEÇMİŞ

05.07.1979 Malatya doğumlu. 2002 yılında İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümün'den mezun oldu. Aynı yıl Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2003 yılından itibaren İ.Ü. İleri Analizler Laboratuvarında görev yapmaktadır.

.

Sevide ŞENCAN

Adres: İ.Ü Mühendislik Fak. İleri Analizler Laboratuvarı

Avcılar/ İSTANBUL

E-mail: ssencan@istanbul.edu.tr