



T.C.

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOPOLİMER İLAÇ KONJUGATLARININ KEMİK KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİSİTE, ANTİTÜMÖR VE
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI VE
APOPTOZ SÜRECİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE
BELİRLENMESİ**

TUĞÇE NAİME GEDİK

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİVAS-2016

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

**KOPOLİMER İLAÇ KONJUGATLARININ KEMİK KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİSİTE, ANTİTÜMÖR VE
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI VE
APOPTOZ SÜRECİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
İLE BELİRLENMESİ**

TUĞÇE NAİME GEDİK

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. ÖMER POYRAZ**

SİVAS-2016

“Kopolimer İlaç Konjugatlarının Kemik Kanseri Hücreleri Üzerine Sitotoksikite, Antitümör ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması ve Apoptoz Sürecinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi” adlı Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Zeynep SÜMER

Üye (Danışman) Prof.Dr. Ömer POYRAZ

Üye Prof.Dr. Rıza DURMAZ

Üye Prof.Dr. Bengül DURMAZ

Üye Yrd. Doç. Dr. Tutku TUNÇ

ONAY

Bu tez çalışması 08/01/2016 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zahid Tefvik AĞAOĞLU
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır. Bu tez çalışması Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: T-632).

ÖZET

KOPOLİMER İLAÇ KONJUGATLARININ KEMİK KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİSİTE, ANTİTÜMÖR VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI VE APOPTOZ SÜRECİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE BELİRLENMESİ

TUĞÇE NAİME GEDİK

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof.Dr. Ömer POYRAZ

2016. 100 sayfa

Tüm ölüm nedenlerine bakıldığında, kanser hastalıkları, hem erkeklerde hem de kadınlarda ikinci sırayı almaktadır. Kemik kanseriye diğer kanser türlerine göre daha genç yaşlarda görülen ve göz ardı edilebilen bir kanser türüdür.

Çalışmamızda kullanılacak olan Maleik Anhidrit kopolimerinin anti-tümör aktivite, anti-viral aktivite, anti-bakteriyel aktivite, anti-fungal aktivite gibi oldukça fazla biyolojik aktivitesi bulunmaktadır. Apoptoz (fizyolojik hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinen fizyolojik bir olaydır.

Bizim çalışmamızda; Maleik anhidrit alil fenil eter-hidroksiüre konjugatının (MAAFE-HX) antitümör, sitotoksiste ve antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Antimikrobiyal ve antifungal aktiviteyi araştırmak için disk difüzyon yöntemi 5 kontrol mikroorganizma olan *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis*(ATCC 29212), *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*(ATCC 43300),*E. coli*(ATCC 25922), *P. aeruginosa*(ATCC 27853), *C. albicans*(ATCC 10231)üzerinde uygulanmış; kopolimer ilaç konjugatımızın antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı gözlenmiştir. İlaç(hidroksiüre) ve kopolimer ilaç uygulanan MG-63 kemik kanseri hücrelerine 24 saatlik inkübasyonun ardından XTT hücre canlılığı analizleri yapılmıştır.

Konjugatın uygulandığı hücrelerde daha az canlı hücre olduğu görülmüştür. Buna göre konjugatın kemoterapi ilacına göre daha fazla antitümör aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca hücrelerin apoptoza gitme durumlarını belirlemek için ise hedef genlerin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu(rt-PCR) ile belirlenmiştir. Hedef genlerden fazla eksprese olması halinde apoptozu inhibe eden B hücre lenfoma-2(Bcl-2)'nin konjugat uygulanan hücrelerde sadece ilaç uygulanan hücrelere göre daha fazla baskılandığı görülmüştür. Diğer yandan kaspaz 3,7 ve apoptotik peptidaz aktive eden faktör-1(APAF-1) genlerinin ekspresyonlarının ise konjugat uygulanan hücrelerde ilaç uygulananlara göre indüklendiği belirlenmiştir. İlaç ve kopolimer ilaç konjugatı uygulanan hücrelerdeki bu fark ise anlamlı bulunmuştur($p<0.05$).

Sonuç olarak sentezlediğimiz kopolimer ilaç konjugatının MG-63 kemik kanseri hücreleri üzerine olan antitümör etkisinin ilaca göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda hücrelerin apoptoza gitme sürecinde etkili olan genlerinde konjugat uygulanmış hücrelerde ekspresyonlarının artarak, kanser hücrelerinin apoptoza gitmesini tetiklediği belirlenmiştir. Bu durum kopolimer ilaç modifikasyonlarının daha ayrıntılı bir şekilde araştırılmasının gelecekte kanser tedavileri için yeni bir umut olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: kopolimer ilaç konjugatı, antimikrobiyal etki, apoptoz, polimeraz zincir reaksiyonu

ABSTRACT

INVESTIGATION OF COPOLYMER-DRUG CONJUGATES CYTOTOXICITY, ANTITUMOR, ANTIMICROBIAL ACTIVITIES ON BONE CANCER CELL LINES AND DETERMINING APOPTOSIS PROCESS BY POLYMERASE CHAIN REACTION

TUĞÇE NAİME GEDİK

Department of Microbiology

Ph.D. Thesis

Supervisor: Prof.Dr. Ömer POYRAZ

2016. 100 pages

When we investigate all the causes of death among women and men, cancer illness have listed on the second place. On the other hand, bone cancers are seen at young ages in comparison with the other cancers and have been ignored.

Maleic anhydrit copolymers, which will be used in our study, have many biological activities like anti-tumoral, anti-viral, anti-bacterial and anti-fungal. Apoptosis is a physiological phenomena which is also known as self destruction of cell. To investigate the antimicrobial and antifungal activities; disc diffusion method was applied with *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212), *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *C. albicans* (ATCC 10231), it was observed that our copolymer drug conjugate has no antimicrobial and antifungal activity. After the 24 hours of incubation with drug and copolymer conjugate, XTT vitality test was performed on MG-63 osteosarcom cells.

As a result of our studies, cells which was treated by copolymer drug conjugate showed less vitality. So it was stated that the cells which was treated by conjugate has better antitumor activity than the cells which was treated by only drug. Also to investigate apoptosis mechanism and genes which are responsible from apoptosis, target genes expression levels were determined using Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction(rt-PCR).

B cell lenfoma-2(Bcl-2) expression, which inhibates apoptosis, seen downregulated on cells which was treated by copolymer drug conjugate. On the other

hand, cells which was treated by conjugate, APAF-1, caspase 3 and 7 expression levels seen more upregulated so far as the cells which was treated by drug. Difference between cells which was treated by drug and cells which was treated by copolymer drug conjugate was found significant($p < 0.05$).

In conclusion; it was found that the copolymer drug conjugate which was synthesized has better antitumor effects than only drug on MG-63 osteosarcom cells. Furthermore, the genes which activates apoptosis was found upregulated on the cells which was treated by copolymer drug conjugate and triggered apoptosis. Thus to investigate copolymer conjugates better would help us to develop promising cancer treatments on the future.

Keywords: copolymer drug conjugate, antimicrobial activity, apoptosis, polymerase chain reaction.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın belirlenmesi, uygulanması, yazımı aşamalarında bana yol gösteren, katkı sağlayan ve her şekilde desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Ömer POYRAZ' a teşekkür eder ve derin minnetimi sunarım.

Çalışmanın her aşamasında yardımcı olan, desteğiyle her daim bana güç veren ve hiç yalnız bırakmayan, enerjisiyle beni ayağa kaldıran ve hayata tutunmamı sağlayan canımhocam Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tutku TUNÇ'a teşekkür ederim.Çalışmamda gerek tez konusunda gerekse manevi olarak bana destek olan Prof. Dr. Zeynep SÜMER hocama teşekkür ederim.

Doktora eğitimimde emeği geçen Prof. Dr. Zahir BAKICI ve Prof. Dr. Yasemin ÖZTOP hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.Çalışmamda gerek faal gerekse manevi olarak katkılarda bulunan Yrd. Doç. Dr. Gülderen KARAKUŞ ile Yrd. Doç. Dr. Meral YILMAZ'a teşekkür ederim. Tez çalışmalarımda bana destek olan tüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu süreçte hep yanımda olan, babama, kardeşime vebeni yetiştirip bu günlere getiren, hep benim tezimi bitirdiğim günü bekleyen, istediği halde şu anda yanımda olamayan ama yine de beni izlediğini düşündüğüm biricik melek anneme teşekkür ederim.

“Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri(CÜBAP) tarafından T - 632 proje numarası ile desteklenmiştir”.Verdikleri destekten dolayı Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel AraştırmaProjeleri (CÜBAP) birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1-GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Kanser	3
2.1.1. Kemik Kanseri	3
2.1.1.1 Kemik Tümörlerinin Tipleri	4
2.1.2.Kanser Tedavisi	5
2.2.Polimerler ve Kullanımları	5
2.2.1.Polimerlerle ilgili kavramlar	6
2.2.2.Maleik Anhidrit	6
2.3 Antimikrobiyal Maddeler	7
2.3.1 Antimikrobiyal Maddelerin Sınıflandırılması	8
2.3.1.1. DNA Oluşumu ve Transkripsiyonu İnhibe Edenler(Nükleik Asit İnhibisyonu)	9
2.3.1.2. Hücre Duvarı Sentezini İnhibe Edenler	9
2.3.1.3.Sitoplazmik Membranı İnhibe Edenler	10
2.3.1.4. Ribozom Fonksiyonunu İnhibe Edenler	10
2.4.Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri	10
2.4.1. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	12
2.5. Hücre Kültürü	15
2.5.1. Hücre Kültürü Sınıflandırması	15
2.5.2.Hücre Kültürü Çalışmalarının Kullanım Alanları	17
2.5.3. MG-63 Hücre Serisi	17
2.5.4. L929 Hücre Serisi	17
2.6. Sitotoksosite Testleri	18
2.6.1.Hemositometre ile Hücre Sayımı ve Canlılık Çalışması	19
2.6.2.Tripan Mavisi Boyası Canlılık Testi	20
2.6.3.Neutral Red	20

2.6.4.MTT Testi.....	20
2.6.5.XTT Testi.....	21
2.7. Apoptosis.....	21
2.7.1. Apoptozun Aşamaları	22
2.7.2.Apoptozun Sınıflandırılması	24
2.7.3. Apoptozun Genetik Mekanizması	25
2.7.4. Apoptozda Etkili Genler	26
2.7.4.1. p53'ün Rolü	26
2.7.4.2. Bcl-2/Bax 'ın Rolü	27
2.7.4.3. Kaspazların Rolü.....	28
2.7.5. Apoptozda Etkili Sistemler	29
2.7.5.1. Granzim veya Perforin Sistemi.....	29
2.7.5.2.Fas - Fas Ligandı veya CD95 Yolu.....	29
2.7.6.Hastalıklarda Apoptozun Rolü	30
2.7.7.Tedavide Apoptoz	30
2.7.8.Apoptozu Belirleme Yöntemleri	31
2.7.8.1.Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler.....	32
2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	33
2.8.1. PCR Yöntemleri	35
2.8.1.1.Hot-Start PCR.....	35
2.8.1.2.Multipleks PCR.....	35
2.8.1.3. Nested PCR.....	36
2.8.1.4.Arbitrarily Primed PCR.....	36
2.8.1.5.Broad-Range PCR.....	36
2.8.1.6.RT(Revers transkriptaz) PCR.....	37
2.8.1.7.Real Time PCR	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. DeneYlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler ve Cihazlar	39
3.1.1. Kullanılan Aletler ve Cihazlar.....	39
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	40
3.2. Kopolimerin Sentezlenmesi.....	41
3.3. Kopolimerin Yapısal Karakterizasyonu	41
3.4. Kopolimerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması.....	41
3.4.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayini.....	42
3.5. Hücre Kültürü	43
3.5.1. Hücrelerin Açılması ve Çoğaltılması.....	43
3.5.2. Hücrelerin Dondurulması.....	43

3.5.3. Hücrelerin Sayılması /Canlılığının Tespit Edilmesi.....	44
3.6. Sitotoksosite Testleri.....	44
3.6.1. Antitümör Aktivite Testleri / MG-63 Kemik Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi	45
3.7. Hücrelerin Apoptoza Gıtme Durumunun PCR ile belirlenmesi.....	46
3.7.1.Hücrelerin Hazırlanması	46
3.7.2. Hücrelerden RNA izolasyonu	46
3.7.3. cDNA Eldesi	47
3.7.4. Kantitatif Real Time PCR işlemi.....	48
3.8. İstatistiksel Analizler.....	49
4.BULGULAR.....	50
4.1. Kopolimer İlaç Çiftinin Yapısal Karakterizasyonu	50
4.1.1. KopolimerİlaçÇiftinin FTIR analizi	50
4.1.2. Kopolimerİlaç Çiftinin ¹ HNMR Analizi.....	51
4.2. Kopolimerin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	52
4.3.Kopolimer-İlaç Konjüгатının MG-63 Kemik Kanseri Hücre HatlarıÜzerine Antitümör Etkisinin Araştırılması	56
4.3.1. XTT Yöntemi	56
4.3.1.1. MA-AFE-HX Kopolimer İlaç Konjüгатının MG-63 Hücreleri Üzerine Antitümör Aktivitesi	57
4.4. Kopolimer-İlaç Konjüгатının ve İlacın L929 Fibroblast Hücre HatlarıÜzerine Sitotoksik Etkisinin Araştırılması.....	61
4.4 Gen Ekspresyon Analizleri.....	65
5. TARTIŞMA	69
6.SONUÇ.....	77
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	87
EKLER	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Sitotoksisite testlerinin hücre üzerine etkileri.....	18
Şekil 2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu basamakları [115].....	34
Şekil 3.1: Real-Time Profiler PCR Array Format R [119].	49
Şekil 4.1. Maleik anhidrit-alil fenil eter kopolimer ilaç çiftinin FTIR spektrumu	51
Şekil 4.2. Maleik anhidrit-alil fenil eterkopolimer ilaç çiftinin proton NMR spektrumu.	52
Şekil 4.3. MA-AFE'nin <i>Staphylococcus aureus</i> 'a antibakteriyel etkisi	53
Şekil 4.4. MA-AFE'nin <i>Escherichia coli</i> 'ye antibakteriyel etkisi.....	53
Şekil 4.5. MA-AFE'nin <i>Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> 'a antibakteriyel etkisi.	54
Şekil 4.6. MA-AFE'nin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya antibakteriyel etkisi	54
Şekil 4.7. MA-AFE'nin <i>Enterococcus faecalis</i> 'e antibakteriyel etkisi.....	55
Şekil 4.8. MA-AFE'nin <i>Candida albicans</i> 'a antifungal etkisi.....	55
Şekil 4.9. MG-63 hücrelerinin kopolimer ilaç uygulanmadan önceki morfolojik görüntüsü	56
Şekil 4.10. MG-63 hücrelerinin kopolimer ilaçla 24 saatinkübasyonu sonrası morfolojik görüntüsü	57
Şekil 4.11. MAAFE-HX'in farklı konsantrasyonlarının MG-63 hücrelerini öldürme yüzdesi	58
Şekil 4.12. Hidroksiürenin farklı konsantrasyonlarının MG-63 hücrelerini öldürme yüzdesi	59
Şekil 4.13. Hidroksiüre ve MAAFE-HX 'in farklı konsantrasyonlarınınMG-63 hücrelerini öldürme yüzdesi.....	60
Şekil 4.14. L929 hücrelerinin kopolimer ilaç uygulanmadan önceki morfolojik görüntüsü	61
Şekil 4.15. L929 hücrelerinin kopolimer ilaçla 24 saatinkübasyonu sonrası morfolojik görüntüsü	62
Şekil 4.16. MAAFE-HX konjugatının farklı konsantrasyonlarının L929 hücrelerini öldürme yüzdesi	63
Şekil 4.17. Hidroksiürenin farklı konsantrasyonlarının L929 hücrelerini öldürme yüzdesi	64
Şekil 4.18. Hidroksiüre ve MAAFE-HX kopolimer ilaç konjugatının farklı konsantrasyonlarının L929 hücrelerini öldürme yüzdesi	65
Şekil 4.19.İlaç ve konjugat uygulanan MG-63 hücrelerinde ekspresyon düzeyleri.	66
Şekil 4.20. ilaç (kontrol grubu) ve kopolimer ilaç(grup1) uyguladığımız MG-63 hücrelerinde kaspaz 3,7 ile APAF-1'in ekspresyon düzeyleri.....	67
Şekil 4.21. İlaç (kontrol grubu) ve kopolimer ilaç(grup1) uyguladığımız MG-63 hücrelerinde Bcl-2'nin ekspresyon düzeyleri.	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar.....	39
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal maddelerin adı ve markaları.....	40
Çizelge 4.1 : MAAFE-HX (Hidroksiüre) kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının MG-63 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % inhibisyon oranları	58
Çizelge 4.2 : HX (Hidroksiüre) ilacının çeşitli konsantrasyonlarının MG-63 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % inhibisyon oranları.....	59
Çizelge 4.3 : HX ilacının ve MAAFE-HX kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının MG-63 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % inhibisyon oranları	60
Çizelge 4.4: MAAFE-HX kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları.....	62
Çizelge 4.5 : HX (Hidroksiüre)ilacının çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları	63
Çizelge 4.6 : HX (Hidroksiüre)ilacının ve MAAFE-HX kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları	64

KISALTMALAR DİZİNİ

MG-63	Kemik Kanseri hücre hattı
L929	Fare fibroblast hücre hattı
MA	Maleik anhidrit
AFE	Alil fenil eter
HX	Hidroksiüre
MAAFE-HX	Maleik Anhidrit Alil Fenil Eter-Hidroksiüre kopolimer ilaç konjugatı
FTIR	Fourier Transform Infrared
¹HNMR	Proton Nükleer Magnetik Rezonans
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid
XTT	Sodyum 3'-[1-[(fenilamino)-karbonil]-3, 4-tetrazolyum]-bis (4-methoksi-6-nitro)benzen-sulfonikasit hidrat)
APAF-1	Apoptotic protease activating factor-1
Bcl-2	B cell Lenfoma-2
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
cDNA	Complementary DNA

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser gerek dünyada gerekse ülkemizde oldukça geniş bir popülasyonu etkisi altına alan, hayatı tehdit eden ve yaşam standartlarını düşüren bir hastalıktır. Her geçen gün bu hastalığın tanı ve tedavisinde yeni yöntemler geliştirilmektedir [1,2].

Kanser çeşitleri arasında en sık rastlanılan tür akciğer kanseridir. Bu hastalığı sırasıyla; meme, kolon, karaciğer, prostat, serviks ve mide kanserleri izlemektedir. Kemik kanseriye daha nadir görülen bir kanserdir. SSS, meme, kemik, lenf ve testis kanserleri diğer kanserlere göre daha genç yaşlarda ortaya çıkmaktadır [3,4]. Kemik kanseri özellikle çocukluk döneminde karşılaşılan bir kanserden sonra immün sistemin baskılanmasına bağlı olarak genelde ikincil olarak görülen bir kanser türüdür. Kemik ve yumuşak doku tümörlerinin tüm kanserler içindeki yeri %1'e yakındır. Kemik kanserinin özellikle çocukluk çağlarında da görülmesi ve bu kanserde genetik mekanizmaların etkili olması tedavisini zorlaştırmaktadır. Tedavide cerrahi işlemle tümörün alınması, kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemler uygulanmaktadır [3-5].

Kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapi ilaçları spesifik bir bölgede toplanmazlar. Ayrıca bu ilaçların intravenöz olarak vücuda verilmesi durumunda sistemik olarak tüm dokulara yayılırlar. Buna bağlı olarak ise değişik yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Dolayısıyla birçok kemoterapi ilacının klinik olarak kullanımı, toksik yan etkileri yüzünden düşük terapötik indekse sahip olmaları nedeniyle sınırlanmıştır. Bu nedenle ilaçların vücutta gitmeleri gereken yerlerde lokalize olmalarını sağlamak ve yan etkilerini azaltmak amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmektedir [6-9].

Üstelik tedavide kullanılan yöntemler olan kemoterapi ve cerrahi işlemlere rağmen tekrarlama ihtimalinin yüksek olması da kemik kanseri tedavisinde yeni yaklaşımların ne derece önemli olduğunu bize göstermektedir. Hücre ve hücreyle ilgili elzem işlevlerde rol alan mikrotübüller, antikanser ilaçların asıl hedefidir [4,10].

Antikanser ilaçlarda yaklaşım; özellikle tümörün ilerlemesi ile ilgili moleküler yöntem ve aşamaları değiştirecek ajanlar tasarlamak ve geliştirmeye yöneliktir. Ancak bunun dışında son yıllarda üzerinde çalışılan ikinci yaklaşımda sözü edilen, kanser tanı ve tedavi yöntemlerinin iyileştirilmesi için geleneksel ilaçlara alternatif olarak polimer ilaç çiftleri geliştirilmektedir. Bu yöntemde ilaç etken maddesi kimyasal konjugasyonla bağlanarak, ilacın kontrollü olarak tümör hücresine verilebileceği ve etkisinin istenen yönde artırılması yanında istenmeyen yan etkilerinin de azaltılabileceği amaçlanmaktadır [11,12].

Çalışmamızda kullanılan Maleik Anhidrit (MA), fonksiyonel özelliği nedeniyle oldukça fazla tepkime verme yeteneğine sahip olmasının yanı sıra, polifonksiyonel maddeler ile de etkileşerek çok sayıda fonksiyonel özelliğe sahip yeni makromoleküllerin sentezlenmesini sağlayan bir monomerdur. Çalışmamızda maleik anhidrite bağlayarak etkinliğine bakacağımız maddemiz ise alil-fenil-eter(AFE) 'dir. Çalışmamızda genel kullanım kemoterapi ilaçlarından biri olan hidroksiüre ile sentezlediğimiz kopolimer ilaç konjugatımızın etkinliği karşılaştırılacak, avantajları ve dezavantajları belirlenecektir [9,13,14].

Bu polimer-ilaç çiftlerinin yapısal karakterizasyonu yapıldıktan sonra antibakteriyel, antifungal aktivitelerine bakılacak, toksik ve antitümör etkileri araştırılacaktır.

Apoptoz; inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendilerini yok ettikleri, çeşitli regüle edilen, programa dayalı ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada hücre dengesini koruyan bir olay olarak tanımlanabilir. Apoptoz, Yunanca'da yaprak dökümünü tanımlayan apo(=ayrı) ve ptozis(=düşen) kelimelerinin biraraya gelmesiyle oluşmuştur [15-17].

Apoptozun önemi, farklı biyolojik olaylarda zararlı veya hasar görmüş hücrelerin yangısal yanıt olmadan yok edilmesini sağlamasından ve canlının fizyolojik dengesine katkıda bulunmasından kaynaklanmaktadır. Canlı ortamında hücrelerin iz bırakmadan ortadan kalkmasını sağlayan ölüm şekli olan apoptoz, insanlardaki kaydadeğer patolojilerin tedavisi bakımından önem arzeden bir mekanizmadır. Bu süreçte, kaspaz ailesi üyeleri, p53 geni ve Bcl-2/Bax ailesindeki genler ve diğer apoptotik sistemler ve mekanizmalar önemli yer tutmaktadır [17,18].

Apoptozun belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmakla birlikte bu çalışmalardan biri olan gen ekspresyon çalışmaları da önemli yer tutmaktadır. Bu gen ekspresyonunu belirlemek için çalışmamızda rt-PCR yöntemi kullanılmıştır.

Bizim çalışmamızda saf hidroksiüre ve kopolimer ilaç konjugatımız olan MAAFE-HX'in uygulandığı kemik kanseri hücresinde apoptoza gitme süreçleri de incelenerek ve etki mekanizmaları ve sorumlu olan genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kanser

Kanser; çeşitli şekillerde farklılaşmış hücrelerin, buldukları yerde ya da uzak noktalarda önlenemeyecek şekilde ve kontrolsüz olarak çoğalmaları ile ortaya çıkan hastalıklar grubudur.

Kanser gerek dünya çapında gerekse ülkemizde geniş bir popülasyonu etkilemektedir. Dünya’da kansere bağlı ölümler kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı almaktadır. Kanser 35-74 yaşları arasındaki kadınların en önemli ölüm sebebidir. Erkeklerde mortalitenin en sık sebebi akciğer kanseridir. Bunu prostat ve kolon kanseri izler. Kadınlarda ise meme kanseri en sık ölüm sebebi olup bunu akciğer ve kolorektal kansere bağlı ölümler izler [1,19].

Kanser, kontrolsüz biçimde bölünen hücrelerin birikerek tümör adı verilen yapıları oluşturması şeklinde gözlemlenebilir hale gelmektedir. Bilindiği gibi tümör hücreleri iç veya dış etmenler ile normal doku hücrelerinde olan değişiklikler sonucunda bu hücrelerin başkalaşarak görünüm ve işlev yönünden atipik hücreler haline gelmesi ile oluşan hücrelerdir. Normal organizmada tümör spesifik lenfositler gibi kanser denetim mekanizmaları bulunmaktadır. Ancak bu mekanizmaların bozulması, bağışık yanıtın önleyici etkileri ile tümör hücrelerinin yerleşip çoğalmaya yönelik çabaları arasındaki dengenin bozulmasına ve kanserin klinik tablosunun meydana çıkmasına yol açmaktadır [20,21].

2.1.1. Kemik Kanseri

Kemik tümörlerinin çoğunda neden bilinmemektedir. Tümör hücreleri sağlam dokuların yerine geçerek kemiğin güçsüzleşmesine ve çeşitli kırıklara yol açabilir. Bu durumda tümörler sağlıklı dokulara saldırarak vücut içinde yetmezliklere neden olabilirler hatta tümörlerin mevcut oldukları organlara bağlı olarak hayati tehlikeye sebep olurlar. Kemik tümörleri genelde benign yani iyi huylu görülürler. Benign tümörlerin insan sağlığına çok fazla zararlı etkileri yoktur. Diğer yanda kötü huylu tümörler ise tüm vücuda yayılarak ölümcül sonuçlar doğurabilir ya da metastaz yapabilirler [4,22].

2.1.1.1 Kemik Tümörlerinin Tipleri

Benign Yapılı Tümörler

- Non-ossifying fibroma
- Basit kemik kisti
- Osteokondrom
- Dev hücreli tümör
- Enkondrom

Malign Yapılı Tümörler

Metastatik Tümörler: Kemiğe başka bir organdan yayılmış malign karakterde tümörlerdir. Genelde hastalarda yoğun ağrı hissi veya çeşitli kırılma patolojileriyle karakterizedir. Sıklıkla meme, akciğer ve prostat kanserlerinden kemiğe yayılmalar görülmektedir [22,23].

Multipl Miyelom: Multipl miyelom kemik kanserleri arasında en çok görülen türdür. Tutulum kemik iliğinde görülür. Genelde yaşı ilerlemiş kişilerde rastlanmaktadır [23].

Osteosarkom: Osteosarkom ise kemik kanserleri sıklığı açısından ikinci sırada yer almaktadır. Özellikle adolesan dönemde ortaya çıkar ve genelde dizde görülür. Kalça ve omuzda da nadiren saptanabilmektedir [5,23].

Ewing sarkomu: Çoğunlukla çocukluk ve adolesan dönemlerde görülmektedir. Yumuşak dokuları tutmakla birlikte kemik doku da zarar görmektedir. Genelde pelvis ve kaburga kemiklerinde rastlanmaktadır [23].

Kondrosarkom: Genellikle orta yaşlı veya yaşı ilerlemiş hastalarda omuz ve kalçada görülenkötü huylu bir tümördür [5,22,23].

Habis kemik tümörlerinin daha çok küçük yaşlarda ortaya çıkması nedeni ile literatürde daha çok çocukluk çağı kanserleri içinde insidans bilgilerine rastlanmaktadır. İstatistiklerde, habis kemik tümörleri milyonda 8.6 olarak verilmiştir. Habis kemik tümörleri içinde ön sırada osteosarkomlar yer alırken, ikinci sıraya Ewing-PNET(primitif nöroektodermal tümör) yerleşmektedir [5,24].

Bizim çalışmamızda da kemik tümörlerinden en sık rastlananlardan biri olan osteosarkom yani MG-63 hücre serileri kullanılacaktır.

2.1.2.Kanser Tedavisi

Kanser tedavisinde tümörün karakterine bağı olarak geniş bir yelpazede çeşitli tedaviler uygulanmaktadır. Bu tedaviler arasında özelliklekemoterapi, radyoterapi, gen terapisi,immünoterapi ve monoklonal antikor terapileri kullanılmaktadır [9].

Bunlardan da en sık kullanılanı radyoterapi ve kemoterapidir. Radyoterapi tümörtedavisinde lokal etki etmektedir ve spesifik tümör kitlesi hedeflenerekgerçekleştirilmektedir. Kemoterapi ise radyoterapinin aksine genel biryaklaşımdır ve kullanılan ilaçlar tüm vücut hücrelerini etkilemektedir. Kemoterapidekullanılan ilaçlar etki mekanizmalarına göre; alkalize edici ajanlar, mitotikinhibitörler, hormonal ajanlar, antimetabolitler, misellanöz ajanlar ve karsinolitikantibiyotikler olarak sınıflandırılmaktadırlar [25,26].

Kemik kanserinin sıklıkla malign formları görülmekte ve metastazlarına sıklıkla rastlanmaktadır. Kanser hastalarında metastaza bağı kemik tümörlerinin oluştuğı ancak göz ardı edildiğı bildirilmiştir. Bu amaçla kemik kanserinin metastatik olarak düşünülmesi ve buna göre uygun görüntüleme yöntemleriyle bu hastaların teşhis edilmesi ile uygun tedavi hayati bir öneme sahiptir [27].

2.2.Polimerler ve Kullanımları

Polimerler; biyomedikal bir madde olarak gerek tıp alanında gerekse mühendislik ve diğ er alanlarda önem arz etmektedir. Aminoasitlerin birleşmesiyle oluşan proteinler de kararlı yapıya sahip olan doğal polimerlerdir [28].

Son yıllarda tıp alanındaki araştırmalarda polimerler oldukça kullanışlı hale gelmiştir. Eşsiz fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle kopolimerlerin, biyolojik ortamlarda farklı biyolojik aktiviteler gösterdikleri bilinmektedir. Polimerler fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre suda çözünebilir özellikte olabileceğı gibi, çözünmeyebilir özellik de gösterebilir. Suda çözünmeyen polimerlerin suda oldukça az çözünen ilaçlarla oluşturdukları polimerler genellikle suda oldukça iyi çözünmektedir. Bu özellik düşük mol kütleli ilacın, hedefe (doku, hücre v.b.) olan özgünlüğünü artırarak daha kullanışlı ve faydalı olmasını pozitif yönde etkilemiştir [9,29,30].

2.2.1. Polimerlerle ilgili kavramlar

Genel yapıları göz önüne alındığında, polimerler, çok sayıda aynı veya farklı monomerlerin ya da grupların kovalent bağlarla birbirine bağlanmasıyla oluşturdukları yüksek mol kütleli oldukça büyük bileşiklerin genel adıdır.

Polimerik yapıları oluşturmak üzere bir araya gelen en küçük yapısal molekül birimlerine ise monomer denir, monomerlerin aynı ya da farklı olmasına göre polimerler aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır [31].

- 1) **Homopolimer:** Polimer zincirinde tek tip monomer biriminin yinelenmesiyle oluşan yapıların genel adıdır.
- 2) **Kopolimerler:** Polimer zincirinde farklı tip monomer birimleri kullanılarak meydana gelen yapıdır.
- 3) **Terpolimerler:** Kopolimer zincirlerinde kimyasal yapıları birbirinden farklı üç monomer birimi kullanıldığında meydana gelen yapılardır [9,31].

2.2.2. Maleik Anhidrit

Kimyasal yapısı nedeniyle oldukça fonksiyonel özelliğe sahip olmasına rağmen maleik anhidrit (MA) çoğu monomerin aksine, normal koşullarda homopolimerleşmeyen, yani kendi kendine kopolimer oluşturamayan, bilinen en iyi elektron alıcı (electron acceptor) monomerdur. Oldukça doğal ve kullanışlı bir bileşik olan MA; elma asidinin kuru damıtılmasından elde edilmiştir [32,33].

$C_4H_2O_3$ genel formülüne sahip olan maleik anhidrit (MA), diğer monomere göre elektron alıcısı olma özelliğini daha karakteristik bir biçimde sergilemektedir. Bu polimerler polianhidritler adıyla da anılırlar. Halka açılma özellikleri nedeniyle su ve alkol gibi yapılarla değişik birleşikler oluşturabilirler. Bütün bu özelliklerinin yanında ayrıca düşük fiyata sahip olmaları da bu polimerleri cazip hale getirmekte ve kullanımını yaygınlaştırmaktadır [34,35].

Nanoparçacıklar için çözüldürücü ajan olmalarının yanısıra, yüzey modifikasyonu, makromoleküler ilaç taşıyıcı sistemler, tanı amaçlı görüntüleme ajanları, implantlar, diğer uygulamalarıdır. MA üzerinde tekrarlanan oldukça reaktif anhidrit halkası nükleofilik bileşiklerin hidroksil (-OH) ya da amino (-NH₂) gruplarına halka açılma tepkimesi ile bağlanarak ester/karboksilik asit ya da amid/ karboksilik asit yapılarının oluşmasına neden olur [34,36,37].

Bizim kullanicımız madde olan Maleik anhidrit alil fenil eter hidroksiüre kopolimer ilaç konjüгатının belirli sitotoksik, antitümör ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir.

2.3 Antimikrobiyal Maddeler

Kimyasal maddelerin organizma dışındaki ortamda mikroorganizmaların üzerine olan etkilerine bakılarak hasta sağaltımından yararlanma fikri oldukça eskidir. Kemoterapi ilk olarak Afrika Uykü Hastalığı'na karşı tedavi seçenekleri arayan Paul Ehrlich zamanında düşünölmeye başlanmıştır. Çok küçük miktarlar(sağaltım dozları) ile patojenler üzerinde hasar oluşturma özelliğine parazitotrop etki denilmekte, konak üzerine ise çok az hasar oluşturma özelliğine ise organotrop etki denilmekte, bu özellikleri sağlayarak tedavide uygulanan kimyasallara “kemoterapötikler” adı verilmektedir. Yani seçici olarak, patojen yada zararlı organizmalara karşı toksik etkiye neden olurken sağlıklı dokulara ise zarar vermeyen ya da çok az zarar veren maddelerdir [21].

Kemoterapide kullanılacak olan antimikrobiyal madde minimum konsantrasyonda optimum düzeyde etkili olmalı ve en düşük dozda dahi toksisitesi az olmalı ya da hiç olmamalıdır. Bu etkinin uygulanabilmesi için; antimikrobiyal maddenin hedefinin konak organizma yerine mikroorganizma hücreleri olması lazımdır [9]. Bakteriler prokaryot hücrelerdir, memeli hücreleri ise ökaryotik hücre yapısı gösterirler. Prokaryot hücrede bulunan, fakat ökaryotlarda bulunmayan yapıyı kendine hedef alan antimikrobiyal maddeler (örn; Penisilinler) seçici toksik etkiye sahiptir. Oysa ökaryot hücre yapısı gösteren ve dolayısı ile yapısal olarak memeli hücrelerine benzeyen mantar ve protozoonlara etkili antimikrobiyal maddeler için seçici toksisiteden söz etmek hatalı olur [38,39].

Bakteri hücresinin insan hücrelerinden ayrıldığı dört büyük nokta bulunmakta olup bu noktalar klinik olarak etkin ilaçların etkisine temel oluşturur. Bunlar hücre duvarı ribozomalar, nükleik asitler ve hücre zarıdır [39].

Ökaryot hücreler de mikroorganizmalarda olduğu gibi sitoplazmaya, seçici geçirgen zarlara sahiptir. Bu nedenle kemoterapötik maddenin patojen mikroorganizmayla konağı ayırması için seçici toksik etkiye sahip olması gerekir [38,40].

Kemoterapide diğ er tedavilerden farklı olarak, doğ rudan hastalık etkeninin yok edilmesi amaçlanmıştır. Bu tedavi yönteminin bilinçsiz kullanımı direnç gelişimine neden olabileceğ i için, dikkatli olarak kullanılması önem arz etmektedir [9].

Birbirinden farklı kemoterapötik ilaçlarda seçicilik derecesi farklılık göstermektedir. Seçicilik özelliğ i en iyi olan ilaçlar penisilinlerdir. Mikroorganizmalar üzerinde güçlü üremeyi durdurucu ya da öldürücü etki gösterdikleri halde, memeli hücreleri üzerinde toksisiteyi zayıftır. Antimikrobiyal tedavide temel oluşturan bu kavram konağ a zarar vermeden zararlı organizmaların ortadan kaldırılmasını tanımlamaktadır. İnsan hücreleri ile mikroorganizmalar arasındaki metabolizma farklarının araştırılmasıyla seçici toksisite kavramı ortaya çıkmıştır [39,40].

Kemoterapötikler etki mekanizmalarına göre ş u şekilde gruplandırılabilir [39] :

A) Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu

1) Antibakteriyel etkinlik

- Peptidoglikan çapraz bağlanmasının (transpeptidasyon) inhibisyonu
- Peptidoglikan sentezinin diğ er basamaklarının inhibisyonu

2) Antifungal etkinlik

- Beta glukon sentezinin inhibisyonu

B) Protein sentezinin inhibisyonu

1) 50S ribozomal alt birime etki

2) 30S ribozomal alt birime etki

C) Nükleik asit sentezinin inhibisyonu

1) Nükleotid sentezinin inhibisyonu

2) DNA sentezinin inhibisyonu

3) mRNA sentezinin inhibisyonu

D) Hücre zar işlevinin değ iştirilmesi

1) Antibakteriyel etkinlik

2) Antifungal etkinlik

2.3.1 Antimikrobiyal Maddelerin Sınıflandırılması

Antimikrobiyal maddelerin sınıflandırılmasında aktivite gösterdikleri bölgeler esas alınır. Buna göre mikroorganizmalarınbüyümeleri ve bölünmeleri için birçok biyomolekülü sentez etmeleri gerekir. Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizmalarda büyüme ve bölünme aşamasında özel hedefler üzerinde etkili olurlar [21,38].

Buna göre;

- 1) DNA oluşumu ve transkripsiyonu inhibe edenler, (Nükleik asit inhibisyonu)
- 2) Hücre duvarı sentezini inhibe edenler,
- 3) Stoplazmik membranı inhibe edenler,
- 4) Ribozom fonksiyonunu inhibe edenler olmak üzere incelenirler [21].

2.3.1.1. DNA Oluşumu ve Transkripsiyonu İnhibe Edenler(Nükleik Asit İnhibisyonu)

a) DNA sentezini bloke etmek için folik asit sentezinin inhibe edilmesiyle olur. Örnek olarak Sülfonamidler verilebilir. Bu ilacın formülü folik asit yapısındaki esansiyel metabolik madde olan paraamino benzoik aside (PABA) benzemektedir. Paraamino benzoik asit mikroorganizmalar için elzem bir metabolittir. Esansiyel metabolitler, hücrenin sorunsuz bir şekilde fonksiyon göstermesi için gerekli olan ve hücreler için hayati öneme sahip maddelerdir. Meydana gelen kimyasal rekabet nedeniyle PABA ile yer değiştiren Sülfonamidler, folik asitin yapısı ve görevini bozarlar. Folik asit sentezinin inhibisyonuyla timidin ve pürin oluşması da engellenir. Böylece hücrenin birbirine bağlı tüm işlevleri durur.

b) RNA polimerazın inhibisyonuyla,

c) Timidilat sentatazı bloke ederek transkripsiyonun önlenmesiyle

d) DNA ile sıkı bileşikler yaparak (Mitomisin)

e) DNA giraz enzimine bağlanarak süper sarmal oluşmasını durdurarak danükleik asit sentezi engellenebilir [21,41].

2.3.1.2. Hücre Duvarı Sentezini İnhibe Edenler

Duvar antibiyotiklerinin etkili oldukları bölge peptidoglikan bölgesidir. Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu, transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerinin görevlerinin bloke edilmesiyle peptidoglikan sentezinin durması esasına dayanır [21]. Peptidoglikan sentezi üç evrede gerçekleşir. İlk evrede sitoplazmada düşük molekül ağırlıklı moleküllerin sentezi olur. Birçok antimikrobiyal madde hücre duvarı sentezini bu erken safhada etkiler. İkinci evre, membrana bağlı enzimler tarafından kataliz edilir. Önceden üretilen düşük molekül ağırlıklı maddelerin sitoplazmik membranda bir lipit taşıyıcıya transferi sağlanır. Bu lipit taşıyıcı alt birimlerin membrandan dış yüzeye geçişini sağlar.

Bazı antimikrobiyal maddeler bu taşıyıcı molekülü etkileyerek düşük molekül ağırlıklı moleküllerin geçişine engel olurlar. Hücre duvarı sentezinde üçüncü evre, alt

birim polimerizasyonu ve yeni oluşan peptidoglikanların hücre duvarına transpeptidasyon reaksiyonu ile yapışma olayıdır [41].

Bakteriler penisilinlerden korunmak için penisilin bağlayan proteinler sentezlerler. Bunun dışında penisilinlerden etkilenmemek için penisilin parçalayan enzimler olan beta-laktamazları yaparlar. Ancak Metisilin ve Kloksasilin gibi penisilinler beta laktamazlardan zarar görmezler hatta onları bağlayabilirler [21].

2.3.1.3. Sitoplazmik Membranı İnhibe Edenler

Kemoterapötikler sitoplazmik zar üzerine ya zarı eritici ya da seçici geçirgenliği bozucu etki yaparlar. Hayvan hücresi sitoplazmik zarı ile mantar ve bakterilerinki benzer nitelikte olduğundan seçici toksik etki burada önemlidir. Membran permeabilitesini bozarak nükleik asitlerin ve katyonların hücre dışına çıkmasına ve hücre ölümüne neden olurlar [40,41].

2.3.1.4. Ribozom Fonksiyonunu İnhibe Edenler

Bu etki ribozomların 30S ve 50S birimlerine bağlanarak olmaktadır. 30 S alt birimine bağlananlara örnek olarak gentamisin, streptomisin, kanamisin örnek olabilirken; 50S alt birimine bağlanan Kloromfenikol ve Klindamisin gibi antibiyotiklerdir [41].

2.4. Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri

Biyolojik aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi)' ndan temin edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan mikroorganizmalar ve kaynakları aşağıda verilmiştir.

- 1) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- 2) *Escherichia coli* ATCC 25922
- 3) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- 4) *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus* ATCC 43300
- 5) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- 6) *Candida albicans* ATCC 10231

Staphylococcus aureus: *Staphylococcus aureus* mikroskop altında incelendiğinde üzüm salkım gibi yapılar gösteren gram pozitif bir bakteridir. Sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüzdür. Kan çıbanı, arpacık, farenjit, menenjit, sinüzit ve besin zehirlenmesi gibi

hastalıklara neden olmaktadır. Tedavisinde Penisilinaz Dirençli Penisilinler ve Klindamisin veya Kinolon ile kombine tedavi protokolleri önerilmektedir.[42].

Escherichia coli: *Escherichia coli*, çomak şeklinde, 1-2 µm uzunluğunda ve 0,1-0,5 µm çapında olan gram negatif bir bakteridir. Sporsuz, hareketli ve fakültatif anaerob bir bakteridir. Diğer flora bakterileri ile dengede olduğu sürece hastalık oluşturmeyen *Escherichia coli* normal bağırsak florasında bulunur. Sistit, piyelit, pyelonefrit, apandisit, peritonit, septisemi, endokardit ve diyare gibi hastalıklara neden olmaktadır. *E. coli* GSBL üreten ve kazandığı direnci yayabilen bir mikroorganizmadır. *Escherichia coli* basilinin neden olduğu hastalıklarda; Aminoglikozit, Ampisilin, Kloramfenikol, Tetrasiklin, Polimiksin, Sülfonamidler gibi antibiyotiklerden yararlanılmaktadır [42-44].

Pseudomonas aeruginosa: *Pseudomonadaceae* familyasından olan *Pseudomonas aeruginosa*; aerob, hareketli, sporsuz, kapsülsüz ve gram negatif basillerdir [43]. Oksidaz pozitif olmaları bakımından *Enterobacteriaceae* familyasından ayrılırlar. Bu bakteriler, besiyerlerinde optimum 30-37° C'de ve hafif alkali ortamda kolayca ürerler. Isıya dayanıksızdırlar. Sularda, toprakta, insan ve hayvanların bağırsağında bulunabilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın neden olduğu hastalıklar; sistit, piyelit, pyelonefrit, menejit, konjunktivit, keratit, blefarit, panoftalmi, bronisit, bronkopnömoni, asteomiyelit ve psedomembranoz kolittir. Tedavide çoğunlukla Gentamicin, Karbenisilin, Azlosilin, Mezlosilin, Imipenem, Polimiksin kullanılmaktadır [42,43].

Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Metisiline dirençli *S. aureus*; Penisilinlere, Karbapenemlere, tüm Sefalosporinlere, Beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına ve Monobaktamlara dirençli kabul edilmektedir. Bu suşlar ayrıca Tetrasiklinler, Makrolidler, Kloramfenikol, Klindamisin ve Kinolonlar gibi antibiyotiklere kolaylıkla direnç kazanabilmektedirler [45].

Metisilin; ısı gibi fiziksel etkenlere karşı duyarlı ancak stafilokoklara etkili bir antibiyotiktir. Test ortamında 2 °C'lik bir ısı değişimi bile yanlış test sonuçlarına yol açabilmektedir. Bu yüzden, mikrobiyolojik çalışmalarda daha stabil olan Oksasilin antibiyotiği kullanılabilir. Böylece uygun laboratuvar şartlarında belirlenen Oksasilin direnci *Staphylococcus aureus* suşunun metisilin dirençli (MRSA) olduğunu göstermektedir [42,45].

Enterococcus faecalis: Kok şeklinde, katalaz negatif, gram pozitif tekli, ikili ya da kısa zincirli hareketsiz, fakültatif anaerob bir bakteridir. En iyi ürediği ısı 35° C'dir. Doğada yaygın olarak bulunur. Bazı yapısal karakterleri sayesinde zorlu çevre koşullarında üreyebilirler. Gastrointestinal sistemin doğal flora üyelerinden biridir. Hastane enfeksiyonlarında sıklıkla izole edilir. Yaşlılarda, altta yatan hastalığı olanlarda ve bağışık yetmezliği olan hastalarda enfeksiyonlara neden olurlar. Son yıllarda vankomisine dirençli çok sayıda suş bildirilmiştir. Buna rağmen tedavide halen en çok kullanılan antibiyotik Vankomisindir [42,43].

Candida albicans: *C. albicans*, bir maya mantarı türüdür. Kemoterapi gören, organ nakli olan ya da AIDS gibi hastalıklara sahip immün suprese hastalarda sistematik ve fırsatçı mantar enfeksiyonlarının başlıca nedenleri arasındadır. *Candida albicans* insan ağız florasında ve sindirim sistemi florasında yaşayan bir mikroorganizmadır. Bağışıklık sistemi zayıflarsa veya mantarların çoğalmasını sağlayan şartlar oluşursa *C.albicans* istilacı, küf gibi ipliksi biçimine dönüşür. Tedavide en çok Amfoterisin B, Ketokonazol ve Flukonazol kullanılmaktadır [42].

2.4.1. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, belli bir mikroorganizma türüne karşı kullanılacak olan antimikrobiyal maddenin in-vitro olarak etkinliğini belirlemek amacıyla uygulanan testlerdir. Klinikte tedavi, antimikrobiyal duyarlılık testlerinin sonuçlarına bakılarak belirlenmektedir [46].

Antibiyotik duyarlılık testi ilk olarak 1929'da Fleming tarafından ortaya konmuştur. Fleming, bir petri kutusunda katı besiyerini, ortadan kenara çok daha yakın bir yerden, dik olarak kesmiş ve bir şerit halinde dışarı almıştır. Bu şekilde açtığı boşluğa küf özütü (Penisilin gibi) içeren besiyerini yerleştirmiş, daha sonra bu boşluğa dik bir açıda paralel olarak değişik bakteri kültürlerini (*Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Pneumococcus* ve başkaları gibi) yayma yöntemiyle ekmiştir. Ekim işleminden sonra kültürleri incelemiş üreme ve inhibisyon zonlarını değerlendirmiştir [46].

Antibiyotik duyarlılık testleri için difüzyon ve dilüsyon yöntemleri gibi birçok yöntem ve değişik modifikasyonları bulunmaktadır. Herbir yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu amaçla sonuçların iyi bir şekilde yorumlanabilmesi bir standardizasyonun saptanmasına gerek duyulmuştur [46, 47].

Antibiyotik duyarlılık deneylerinde "difüzyon" ve "dilüsyon" olmak üzere iki metod kullanılmaktadır [46].

A. Difüzyon testleri

1) Disk difüzyon

2) Epsilometer (E) testi

B. Dilüsyon testleri

1) Tüp dilüsyon testi

2) Agar dilüsyon testi

Disk difüzyon testi: Rutinde antibiyotik duyarlılığını belirlemek için en sık kullanılan yöntemdir. Disk difüzyon testi Kirby Bauer tarafından geliştirilmiş olup ucuz ve kolay uygulanabilir. Bu testin temelinde; antibiyotik emdirilmiş kağıt disklerin organizmanın ekiminin yapıldığı besiyerine yerleştirilmesi ve diskteki antibiyotiğin besiyerine difüze olması yer almaktadır. Kullanılan disklere belli miktarlarda antibiyotik emdirilmiştir ve bu şekilde inokülasyon yapılmış katı besiyerlerine yerleştirilir. Zamanla antibiyotikler besiyerine difüze olurken mikroorganizma da üremeye başlar. İnkübasyondan sonra ilacın inhibitör konsantrasyonunun etkili olduğu diskin çevresinde üreme görülmez. Mikroorganizmanın antibiyotiğe olan duyarlılığı ne kadar çok ise disk çevresindeki inhibisyon zonu da o kadar geniş olmaktadır. İnhibisyon zonu çapı mm cinsinden ölçülerek, standart tablolara göre değerlendirmeler yapılır. Böylece belirli bir mikroorganizmanın kullanılan antibiyotiğe karşı olan duyarlılık ve dirençlilik durumu belirlenmektedir [46,47].

Bu yöntemde, mikroorganizma buyyonda 2 saat süreyle 37°C'de inkübe edilir. Bulanıklığı ise 0.5 McFarland (10^8 mikroorganizma / ml)'e olacak şekilde ayarlanarak standardize edilir (McFarland standartları, sıvı besiyerindeki bakteri sayısını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu değer sıvı besiyerine inoküle edilen bakteri miktarına eş bulanıklığı gösterir ve McFarland tarafından baryum klorür ve sülfirik asit kullanılarak geliştirilmiştir). Daha sonra hazırlanan süspansiyondan Mueller-Hinton agar yüzeyine steril eküvyon ile ekim yapılır. Antibiyotik içeren diskler steril pens yardımıyla besiyeri yüzeyine yerleştirilir. Bu işlemde diskler arasında 22 mm, petri kenarından ise 14 mm mesafe olacak şekilde yerleştirilmelidir ve zonların birbiri üzerine denk gelmemesine dikkat edilmelidir. Son olarak ise besiyerleri 18-24 saat süreyle 35°C'de inkübasyona bırakılır ve oluşan inhibisyon zonları ölçülür [46,48,49].

2. E-test: Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), bir mikroorganizmanın üremesini önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanabilmektedir. E-test katı besiyerinde difüzyon ile MİK değerinin belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir [46,48].

E-test yönteminde; bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland olacak şekilde ayarlandıktan sonra Mueller Hinton besiyerine eküvyonla yayılır. Daha sonra besiyerine belli bir antibiyotik gradienti içeren E-test şeritleri yerleştirilir. Plaklar 35-37°C'de 18-24 saat kadar inkübasyona bırakılır. Şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta MİK değeridir [46,47].

Dilüsyon testleri

Bir antimikrobiyal maddenin bir mikroorganizmanın üremesini önlemek ya da mikroorganizmayı öldürmek için gerekli olan minimum konsantrasyonunu belirlemek için uygulanan testler dilüsyon testleridir. Günümüzde "tüp dilüsyon" ve "agar dilüsyon" olmak üzere iki dilüsyon yöntemi uygulanmaktadır [48].

Tüp Dilüsyon

Tüp dilüsyon yöntemleri de kendi aralarında "makrodilüsyon" ve "mikrodilüsyon" olarak ikiye ayrılırlar. Bu yöntemlerin prensibi aynıdır. Makrodilüsyonda test tüpleri, mikrodilüsyonda ise "U" ya da "V" tabanlı "mikroplate"ler kullanılmaktadır. İlk olarak test edilecek antibiyotiklerin sıvı besiyerinde dilüsyonları hazırlanır. Mikroorganizmanın standart bir inokulumu hazırlandıktan sonra, farklı oranlarda dilüe edilmiş antimikrobiyal madde her bir tüpe eşit miktarlarda eklenir. Bir tüp hiç bakteri ekilmemiş ve sadece besiyeri bulunacak şekilde ayarlanırken, diğer bir kontrol tüpü ise antibiyotik eklenmeden hazırlanır. 35-37°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından tüpler bulanıklık yönünden incelenir. Gözle görülebilen bulanıklığın olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak değerlendirilir [46-48].

Agar Dilüsyon

Bu yöntemlerde, tüp dilüsyon yöntemleriyle aynı prensibe göre uygulanmaktadır. Farklı olarak agar dilüsyon yönteminde hazırlanan antibiyotik sulandırımınının agarın içine konularak petri plaklarına dökülmesidir. Bu şekilde her bir petride farklı

konsantrasyonlarda antibiyotik bulunur. Bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland olacak şekilde ayarlandıktan sonra sulandırılarak 10^7 CFU / ml bakteri yoğunluğu elde edilir. Bu mikroorganizma solüsyonlarından besiyerlerine ekim yapılır. Ekim yapılan plaklar 35-37° C'de bir gece inkübasyona bırakılır. MİK üremenin engellendiği en düşük antibiyotik konsantrasyonudur [47-49].

Çalışmamızda; kolay ve pratik olması ve daha doğru, güvenilir ve hassas olması gibi özellikleri nedeniyle Disk Difüzyon Yöntemi uygulanmıştır.

2.5. Hücre Kültürü

Canlı bir doku veya organdan alınan küçük bir parçanın in-vitro olarak büyütülmesi ve çoğaltılması işlemine hücre kültürü denilmektedir.

Hücre kültürü ilk kez 1907 yılında kurbağa sinir hücrelerinin incelenmesinde kullanılmıştır. Daha sonra tavuk kalp hücrelerinde denenmiştir. Bu uygulamaların yaygınlık kazanmasıyla birçok canlı ve hücre için başarıyla geliştirilen hücre kültürleri, 1940'larda viroloji (virüs bilimi) çalışmaları için de kullanılmaya başlanmıştır. Böylece araştırmacılar viral bir hastalık olan çocuk felcine karşı aşı geliştirerek 1954 yılında Nobel Tıp Ödülüne layık görülmüşlerdir. 1943 yılında ise ilk kez fare hücre serisi oluşturulmuştur. İnsan hücresi olarak ise ilk kez 1951 yılında servikal karsinomlu (rahim kanalı kanserli) bir hasta olan Henrietta Lacks adındaki hastadan alınan kanser hücresi, hücre kültürü ortamında çoğaltılmış ve hastanın isminin kısaltmalarıyla "HeLa hücre serisi" olarak adlandırılmıştır. Dünya genelinde yapılan çalışmalarda; fareden pluripotent embriyonik kök hücreleri 1986'da Martin, Evans ve arkadaşları tarafından, insan embriyonik kök hücreleri ise 1998'de Thomson, Gearhart ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir [50,51].

2.5.1. Hücre Kültürü Sınıflandırması

Hücre kültürleri genel olarak tek tabaka ve süspansiyon hücre kültürleri olmak üzere ikiye ayrılır. Süspansiyon hücreler kültür ortamında asılı olarak büyürler. Bu hücrelerin kültür şişesine bağlanma zorunluluğu yoktur, asılı kalarak hayatta kalabilir hatta çoğalabilirler. Bu hücrelere kan, dalak, kemik iliği hücreleri örnek olarak verilebilir. Süspansiyon içinde asılı olan hücreler küçük toplar şeklinde gözlemlenirler. Süspansiyon kültürlerin aynı anda çok sayıda hücreyi büyütebilmek ve hücreleri kolay toplayabilmek gibi avantajları bulunmaktadır [52, 53].

Monolayer hücre kültüründe hücreler tek tabaka halinde yüzeye yapışarak çoğalırlar. Ektodermal ve endodermal embriyonik hücrelerden türeyen hücreler tek tabakalı ve yapışkan olarak büyürler. Bu hücrelere fibroblast ve epitel hücreleri örnek olarak verilebilir. Bu hücreler değişik şekillerde olabilirken genellikle düz olarak görünürler. Monolayer kültürlerde hücrelerin yüzeylere yayılması ve yapışması mikroskopik incelemelerde ve fonksiyonel testlerde kolaylık sağlar [52].

Hücreler çoğalma özelliklerinden dolayı ise primer, sekonder ve devamlı hücre kültürleri olmak üzere üçe ayrılır;

1) Primer hücre kültürü; alınan organ ve dokulardan hazırlanarak ilk üretilen hücre kültürüdür. Bu hücrelere tavşan ve maymun böbrek hücresi, göbek kordonu endotel hücreleri, EMF (Embriyonik Mouse Fibroblast) hücreleri, primer hepatosit ve primer düz kas hücreleri örnek olarak verilebilir [50,52].

2) Sekonder hücre kültürleri ise, primer hücrelerin pasajlanarak çoğaltılmasıyla oluşan kültürlerdir. Diploid hücre kültüründeki hücrelerin yaklaşık %75'i orijinal olarak elde edilen normal hücre türü ile aynı karyotipe sahiptir. MRC-5 fetal akciğer fibroblast ve WI-38 insan akciğer fibroblast kültürleri diploid hücre kültürlerine örnek verilebilir [54].

3) Sürekli hücre kültürleri; hücre soyundaki hücrelerin transformasyona uğratılarak (veya kendiliğinden) ölümsüz olma ve sınırsız çoğalma kapasitesine sahip olmasıyla oluşan kültürlerdir. Bir hücre kültürünün devamlı sayılabilmesi için en az 50 subkültürünün yapılmış olması gerekir. Sürekli hücre hatlarının sınırlı hatlara göre daha yüksek klonlama özelliği, artmış tümörijenitesi, daha yüksek büyüme hızları ve çok çeşitli kromozom yapıları bulunmaktadır [50,52].

Omurgalı hücrelerin çoğu; hücre kültürlerinde belli sayıda bölündükten sonra apoptoza girer ve bölünme durur. İnsan fibroblastları da kültürde 25–40 kez bölündükten sonra bölünmeleri durur. Bu şekilde bölünmenin durması telomerler denen yapıların kısalmasından kaynaklanmaktadır. Kromozomların DNA ve protein içeren terminal kısımları olan telomerler, diğer DNA dizilerinden fonksiyonel ve yapısal olarak farklıdır. Telomer sentezinde görevli enzim ise telomeraz (telomer terminal transferaz veya revers transkriptaz) enzimidir [55,56].

İnsan somatik hücrelerinin telomeraz salınımını durdurmaları nedeniyle telomerler kısalmakta ve buna bağlı olarak hücrelerin yaşamı sınırlanmaktadır. Ancak telomeraz enzimini kodlayan bir gen insan somatik hücrelerine katılırsa bu hücreler sonsuz bir şekilde çoğalabilir ve ölümsüz hücre serileri olarak adlandırılabilirler.

Kanser hücreleri asılı olarak yüzeye tutunmadan çoğalabilirler ve çok sayıda hücre meydana getirebilirler. Bu sebeple kanser hücrelerinin aşırı çoğalmasında ve ölümsüzlüğünde rol oynadığı düşünülen telomeraz aktivitesinin gelecekte kanser teşhisinde marker olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bu enzimi düzenleyen genlerin belirlenmesiyle kanser tanı ve tedavisinde umut veren gelişmelerin olması beklenmektedir [55-57].

2.5.2. Hücre Kültürü Çalışmalarının Kullanım Alanları

Hücre kültürü çalışmaları günümüzde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıdaki gibi sıralanabilir [50].

- Aşı ve monoklonal antikor üretimi
- Kanser araştırmaların
- Çeşitli enzim ve hormonların üretimi
- Hücre içi aktivite ölçümü
- DNA ve RNA replikasyonu araştırması
- Enerji metabolizmasının araştırılması
- Çeşitli ilaçların hücre siklusuna etkisi
- Hormon reseptör komplekslerinin davranışları
- Sinyal iletim mekanizması ve hücre haberleşmesi
- Enfeksiyonlar ve viral transformasyonun araştırılması
- Özel ürünlerin sentezlenip salgılanması
- Hücre popülasyon kinetiği
- Sitogenetik analizlerde
- Genetik manipülasyon ve immortalizasyon
- Tüp bebek ve kısırlık tedavileri

2.5.3. MG-63 Hücre Serisi

MG- 63 osteosarkom (kemik kanseri) hücresi olup 14 yaşında erkek bir Kafkasyalı'dan elde edilmiştir. Üremelerinde %5-10 fetal bovin serumu(FBS) ihtiyaç duyarlar [58].

2.5.4. L929 Hücre Serisi

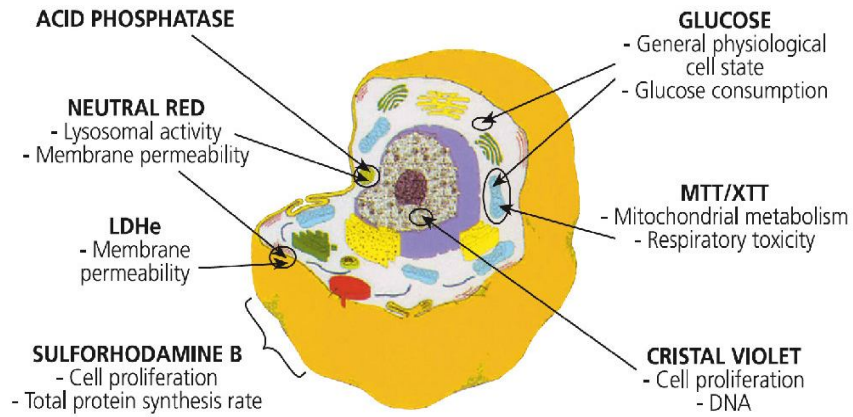
L929 1940 yılında W.R. Earle tarafından oluşturulan esas L serisinin alt klonudur. L serisi 100 günlük C3H/An erkek farenin bağı dokusunun normal subkutanöz bölgeden ve

yağ dokusundan elde edilmiştir. Kültürü genelde %10 Fetal Bovine Serum (FBS) içeren besiyerinde yapılır [58].

2.6. Sitotoksosite Testleri

Deneysel toksikolojik çalışmalar, kimyasal maddelerin canlı hücreler üzerinde meydana getirdiği yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla yapılır. Canlı hücre sayısının ve hücre proliferasyonunun doğru ve hızlı tespiti hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda deneysel aşamada önemlidir. Hücre canlılığı, bir örnekteki canlı hücrelerin sayısı olarak tanımlanabilmektedir [59,60].

Genellikle hücre sayımında canlı ve ölü hücreleri birbirinden ayırmak için hemosimetrenin yanında tripan blue gibi canlılığı belirleyen bir boya kullanılmaktadır. Ancak bu vital boyalar net değerler almazlar. Bu yöntemin az miktarda hücre süspansiyonuna ihtiyaç duyulması, kolay uygulanabilir, pratik ve uygun olması gibi avantajları bulunmaktadır [60].



Şekil 2.1. Sitotoksosite testlerinin hücre üzerine etkileri [61].

Hücrelerde sayımın dışında protein, DNA, protein nitrojen ya da lipidlerin net ağırlığı gibi hücre bileşenlerinin belirlenmesi ile de toksisite deneyleri yapılabilmektedir [51].

Tek tabakalı kültürlerde veya hareketsiz hücrelerde direk hücre sayımı yapılamıyorsa indirek ölçümler yapılabilir. Bu ölçümlere örnek olarak glukoz veya oksijen tüketim hızı ile laktik asit, pirüvik asit ve CO₂ miktarlarının belirlenmesi verilebilir [51,62].

Bu değerler ölçölürken költürde hücrelerin gidişatı sürekli olarak izlenmektedir. Bu biyokimyasal ölçütler kullanılırken enaz iki yada daha fazla ölçüt birlikte değerlendirilmelidir. Bahsedilen sentez hızı (protein, DNA ve RNA sentezi) ölçümü radyoizotop kullanılarak yapılabilir. DNA ve RNA sentezi gibi ölçümler çeşitli radyoizotoplar yardımıyla yapılabilir ancak genel ölçümler için tercih edilmektedir [51,60,62].

Her bir deneysel amaç için farklı olarak uygulanabilecek olan bir çok yöntem bulunmaktadır. Genel olarak kullanılan sitotoksikite testleri şu şekildedir; [60].

- Agar Difüzyon Testi
- LDH Testi (laktat dehidrogenaz)
- MTS Testi (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
- MTT Testi (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- XTT Testi (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)
- WST-1 Testi (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)
- Trypan Blue Testi
- Neutral Red Testi

Bu deneylerde ideal yöntem yoktur. Ancak birden fazla yöntemin birlikte kullanılmasıyla optimum sonuçlar elde edilebilmektedir [62].

2.6.1.Hemositometre ile Hücre Sayımı ve Canlılık Çalışması

Hemositometre, hücre költürlerinde yapılan işlemlerden sonra hücre büyümesi ve canlılığının optimum düzeyde olup olmadığının incelenmesi için yapılan çalışmalarda, hücre sayısının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntem hücre sayımında rutinde en sık kullanılan yöntemdir. Üzerinde sayım kamaraları bulunan lama hücre süspansiyonundan konulduktan sonra üzerine lamel kapatılmakta ve mikroskopta incelenmektedir. Lam üzerinde çizgi ile kesin olarak kazanmış 1 mm kareler ve buna ilaveten daha küçük kareler içerir. Mikroskopta kareler içindeki hücreler sayılmakta ve buna göre süspansiyonun mililitresindeki hücre miktarı hesaplanmaktadır[62].

2.6.2.Tripan Mavisi Boyası Canlılık Testi

Tripan Mavisi Boyası sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebilir. Her bir muamele edilen grubun yaşama yüzdesi ölü hücrelerin (mavi) ve canlı hücrelerin (boya almamış) sayılmasıyla belirlenir. Analiz edilen parametre; hasarlı, sızıntı yapan plazma membranıdır. Bu testin avantajları arasında ışık mikroskobu ile canlı hücrelerin ölülerden ayırt edilmesinde kullanılan standart bir metot olması, hızlı ve ucuz olması, total hücre popülasyonundan çok küçük bir hacmin test analizi için gerekli olması sayılabilir. Boya ile hücre süspansiyonu 1:1 oranında karıştırılır ve 37°C'de 5 dakika tutulur. Daha sonra thoma lamında mikroskopta sayılır. Canlı hücreler tripan mavisi boyasını geçirmez. Hücre membranının herhangi bir nedenle zarar görmesi halinde söz konusu boya hücre içeriğine girer ve sitoplazmayı boyar. Bu durumda mikroskobik incelemede canlı hücreler parlak ve şeffaf renktedir, ölü hücreler ise mavi olarak boyanır [9,62,63].

2.6.3.Neutral Red

Canlı hücrelerin lizozomlarına girerek onları boyayan bir boya olan Neutral Red (3-amino-7-dimethyl-2-methylphenazine hydrochloride) suda çözünebilir özelliktedir. Bu testte hücrelerin üzerine Neutral Red eklendikten sonra inkübasyona bırakılmakta ve canlı hücreler kırmızı olarak mikroskop altında gözlenebilmektedir [63].

2.6.4.MTT Testi

Mikroplate testleri hücrenin canlılığı ve çoğalmasına bağlı olarak geliştirilmiştir. Mikroplate formatında sıklıkla metabolik aktivite ve DNA sentezi gibi parametreler ölçülmektedir. Metabolik aktivite ölçümünde genelde mitokondrial aktivite belirlenmektedir [62].

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) testinde canlı olan hücrelerin mitokondrileri MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmektedir. Bu reaksiyon frajil bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağımlıdır [62-64].

MTT, suda çözünme özelliği olmayan, canlı hücrelere tutunan ve bu hücrelerin mitokondrilerinde reaksiyon oluşturan bir maddedir.Canlı hücrelerin tetrazolium halkasını parçalanması ile normalde soluk sarı renge sahip olan MTT boyası koyu mavimor renge dönüşmektedir.Hücrelerin MTT boyasını indirgeme özelliği hücre canlılığının göstergesidir ve MTT testi sonucunda görülen boya yoğunluğu ile canlı

hücre sayısı birbirine paraleldir. MTT dönüşümündeki artış ELISA Reader Cihazı ile sayılabilmektedir [64-66].

MTT yöntemi sıklıkla toksik ajanların etkinliğinin belirlenmesi, sitokinlerin ya da besiyeri bileşimindeki maddelerin hücreler üzerine etkisinin araştırılmasında kullanılmaktadır [66,67].

2.6.5.XTT Testi

Tetrazolyum tuzları prensibine dayanan bir diğer kolorimetrik metot ise XTT (sodyum 3'-[1-[(fenilamino)-karbonil]-3, 4-tetrazolyum]-bis (4-metoksi-6-nitro)benzen-sulfonikası hidrat) testidir. Bu test diğerlerine göre kolay uygulanabilir, hızlı güvenilir ve duyarlıdır. Yöntem, metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu olan XTT'yi turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır. Test prosedürü hücrelerin 96 kuyucuklu plaklarda kültüre edilip, XTT ajanının eklenip, 2-24 saat inkübasyonda bekletilmesi prensibine dayanmaktadır. İnkübasyondan sonra ise sonuç ELISA ile okunmaktadır [9,63,67].

2.7. Apoptosis

Eski bir Yunan terimi olan apoptoz, yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Bu terim fizyolojik nedenlerden kaynaklanan, programlı hücre ölümünü anlatır. Patolojik hücre ölümü olan ve ATP miktarının azalması, hücre homeostazının hızla bozulduğu, inflamasyon yanıtının geliştiği nekrozdan tamamen farklı olarak, apoptoz; inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada dengeyi koruyan bir olaydır [16,17,68].

Hücrenin intiharı olarak tanımlanan apoptoz; hücre tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla, hücre dışı etkenler ve genetik faktörlerle tetiklenen bir sistemdir. Apoptoza uğramış hücre miktarı organizmanın sağlıklı ya da sağlıksız oluşunu belirlemekle beraber hücrede homeostazi sağlamaktadır. Bu durum demektir ki; apoptoz oranının azalması ile hücre sayısı artar aksine eğer apoptoz oranı artarsa hücre sayısı azalır ve istenmeyen doku tahribatı meydana gelir [68,69].

İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından “fizyolojik hücre ölümü” ifadesi tanımlandıktan sonra yine ilk olarak Wyllie ve Kerr tarafından glukokortikoidlere maruz kalan timüs hücreleri üzerinde yapılan deneysel bir çalışma ile gösterilmiştir. Apoptoz, 20 yıldan fazla embriyolojik gelişimin temel süreci olarak

bilinmiş, araştırmacıların 1990'lı yılların başlarında, gelişimini tamamlamış hayvan hücrelerinde de apoptozu tanımlamasıyla konu daha ilgi çekici bir hale gelmiştir [17,70,71].

Bu sistematik hücre ölümünün hücrelerde bulunan genetik verilerde yer alan intihar programının sinyalleriyle, oksidatif stres gibi olaylarla tetiklendiği düşünülmekle birlikte mekanizması tam olarak aydınlatılamamaktadır [17].

Hücrede çoğalma işlemi durur ve DNA onarımı meydana gelmezse apoptosis ile sonuçlanan olaylar serisi başlar. Bu esnada hücre tipi, hücredeki hasarın boyutu ve hücrenin tümör oluşturabilme yeteneğine bağlı olarak apoptotik süreç değişebilmektedir. Programlı hücre ölümü ile immün sistem mekanizmalarının gerçekleşmesi ve hücrenin dengede kalması sağlanmaktadır [72]. Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklardan, ülseratif kolitler ve AIDS gibi kronik hastalıklara ve hatta immünolojik hastalıklara kadar birçok hastalık; aktive olmuş lenfositlerin kendi antijenlerini apoptoz yardımıyla ortadan kaldırmaları sonucu apoptoza uğrayan hücre miktarındaki artışa bağlı olarak meydana gelmektedir. Meydana gelen bu artış ise hücredeki dengenin bozulmasına neden olabilmektedir [68,73,74].

Ayrıca apoptoz mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlar genel olarak: büyüme faktörleri, onkojenler, tümör süpresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir. Viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler gibi ajanlar, büyüme faktörlerinin baskılanması, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, TNF (tümör nekroz faktör), TGF-B (Transforming Growth Factor), Fas/FasL sisteminin aktive olması ve p53'ün aktive olması apoptozu etkileyen uyaranlara örnek olarak verilebilir [17,75,76].

2.7.1. Apoptozun Aşamaları

Apoptoz süreci; genlerin DNA hasarına karşı cevabı, ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı) ve proteolitik enzimin direkt olarak hücreye girişi (granzim) olarak üç farklı şekilde ilayebilir. Bu süreçte üç elzem bileşen vardır.

Bu bileşenler; Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteini, kaspazlar ve Bcl-2 ailesi proteinleridir. Apoptoz sürecinde meydana gelen morfolojik değişikliklerden sorumlu olan bu bileşenler; DNA fragmentasyonu, mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması ve kromatin kondensasyonu gibi farklı şekillerde etkili olmaktadır [77,78].

Apoptotik uyarıyı alan hücrenin şekli yuvarlaklaşmaya başlar, sitoplazması büzülür ve hızla bulunduğu ortamdan uzaklaşmaya çalışır. Apoptosis de bu şekilde diğer hücrelerden uzaklaşarak temasın ortadan kalkması ve hücrelerin büzülmesi ile karakterizedir. Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durmasına bağlı olarak sıvı hareketi sağlanamaz ve hücreler büzülürler [17,78]. Apoptotik olarak uyarılan hücrenin mikrovillusları kaybolur ve ortam ile olan bağlantıları kesilir. Elektron mikroskopunda meydana gelen değişiklikler izlenirse ilk olarak plazma membranının şeklinin bozulduğu ve kabarcıklar meydana getirdiği görülür ki; bu yapıya "zeiosis" adı verilmiştir. Membranda meydana gelen tomurcuklanma gibi değişikliklerde transglutaminaz enzimi de görev almaktadır. Hücre zarında iç yüzeyden dışarıya fosfatidilserin translokasyonu olur. Plazma ve çekirdek kondansasyonunu takiben kromatinin kümelenmesi şekillenir. Kromatindeki değişikliklerin bağlamasının hemen öncesinde sitozolik kalsiyum düzeyinde önemli bir artış olmaktadır [78].

Hücre parçalandıktan sonra nükleer materyal içeren zarla çevrili "apoptotik cisimcikler" denilen yapılar oluşur. Hücre zarında bulunan lipit tabakada fosfolipitler asimetrik özellik göstermektedirler. Fosfatidilserin (PS), fosfatidiletanolamin (PE) ve fosfatidilkolinler (PC) hücre zarında asimetrik olarak dağılmışlardır. Bu asimetrik yapı ATP'ye bağlı translokaz yardımıyla korunmaktadır. Apoptoz esnasında translokaz yetmezliği iç tabakada bulunan PS'nin dış yüzey tabakaya yerleşmesine neden olmaktadır. Böylece apoptotik cisimciğin fagosite edilmesi uyarılır ve bu cisimcikler sitokin salgılanmadan ya da inflamasyon uyarılmadan makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler [16,17,74].

Apoptotik uyarıya bağlı olarak sürecin başlamasından apoptotik cisimciklerin oluşumuna kadar meydana gelen olaylar zinciri birkaç dakika sürer. Ancak meydana gelen cisimciklerin fagositozu için ise 12-18 saat kadar uzun bir süre gerekebilmektedir [79,80]. Apoptoz esnasında meydana gelen DNA çözülmesi, kromatin yoğunlaşmasına bağlı apoptoz mekanizmasında önemli role sahiptir [81,82]. Apoptoz uyarımından 1 saat kadar sonra DNA'nın tek iplikçiğinde geri dönüşü olmayan ve karakteristik bir parçalanma meydana gelir. Fakat apoptozun gerçekleşmesi için DNA parçalanması zorunlu değildir. Normal hücrelerde de ani bir uyarı ya da basit bir olay da programlı hücre ölümüne neden olabilmektedir. Yani hücrelerin sahip olduğu bu intihar programını uygulayıp uygulamayacaklarını belirleyen çeşitli moleküller bulunmaktadır [68].

2.7.2. Apoptozun Sınıflandırılması

Hücre lizozomunun ne şekilde fonksiyon gösterdiğine bakılarak apoptozun sınıflandırılması yapılır [68].

Tip-1 Hücre Ölümü (heterofaji): Hücre çekirdeğinin ve sitoplazmasının yoğunlaşmasıyla başlamaktadır. Nükleus yoğun kromatin kitlesi içerir ve bu yoğunlaşma çekirdek yarı piknotik olana kadar artar. Yüksek büyütmede DNA iplikçiklerinden oluşan paketlerin yoğun kromatin alanına daha yakın oldukları görülür. Nükleustan sonraki en önemli değişiklik hücre zarının katlanmasıdır. Fagositoz sonrası ise lizozomlar hücre içeriğini parçalarlar. Kısaca heterofaji hücre ölümünde hücrenin kendi lizozomlarının belirgin bir rolü yoktur. Hücre diğer hücrelerin lizozomlarının yardımıyla parçalanmaktadır. Tip-1 hücre ölümü, özelleşmiş hücrelerin çoğunluğunda görülmektedir [83,84].

Tip-2 Hücre Ölümü (otofaji): Bu tip hücre ölümünde, hücrenin sindirimi çoğunlukla kendi lizozomlarıyla olur. Bol miktarda otofajik vakuoller oluşmaktadır ve bu vakuoller genişleyerek mitokondri ve endoplazmik retikulumu da içine alabilir. Golgi organeli ise genişleyerek nükleosit disfosfataz aktivitesinin artmasına neden olur [85,86]. Otofajik hücre ölümünde primer lizozomlar görev almaktadır. Daha sonra lizozomlarda bulunan hidrolitik enzimler otofajik vakuollere boşaltılır. Apoptoza uğrayan hücreler endositoza uğrarlar. Tip-2 hücre ölümünde de hücre zarında çeşitli kabarcıklar ve mikrovillus kayıpları görülebilmektedir. Schweichel ve Merker, otofajik tip hücre ölümünün amfibi kuyruğundaki metamorfozda ya da emriyonal gelişim sürecindeki epitelde olduğu gibi dejenerasyona uğramış dokularaortaya çıktığını söylemişlerdir [86-88].

Tip-3 Hücre Ölümü: Bu tip hücre ölümü de kendi içinde ikiye ayrılır:

a-Non-lizozomal Vezikül Parçalanması: Bu tip hücre ölümünde, öncelikle hücre içindeki organeller şişer daha sonra ise hücre dışı boşluklar sitoplazmik kısımlarla birleşir. Hücre, organeller ve hücrenel yapılar elektron mikroskopuyla bile görülemeyecek kadar küçültülerek parçalanırlar. Bu tip ölümde hücreler kendi lizozomları tarafından parçalanmamaktadır ancak fagositozun da nasıl olduğu kesinleşmemiştir. Schweichel ve Merker, hücre ölümünün bu şeklini kıkırdakta kalsifikasyon olmuş hücre içi maddelerin rezorpsiyonundan önce görmüşlerdir [87,89].

b-Sitoplazmik Tip Parçalanma: Bu tip hücre ölümü, non-lizozomal hücre ölümüne organelerin genişlemesi ve sitoplazmada meydana gelen olaylar yönünden benzer. Ancak çekirdek dejenerasyonu farklı bir şekilde olmaktadır. Bu hücre ölümünde çekirdekte ve hücre içinde parçalanma yerine ödem ya da diffüz dejenerasyon görülür. Sitoplazmik tip hücre ölümünde nükleusta erken evrede yoğunlaşma meydana gelmez [88,89]. Bu tip hücre ölümünde Tip-2 ve Tip-3a'da olduğu gibi mitokondrial içerikte azalma olmaktadır. Ancak Tip-2 hücre ölümünden farklı olarak bu hücre ölümünde otofajik vakuoller görülmez. Sitoplazmik tip hücre ölümünde, endoplazmik retikulumun genişlemesi ve mitokondirin şişmesi gibi bazı özellikler nekroza benzemektedir. Fakat bu konunun mekanizması ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir [88,90].

Bazı vakalarda apoptotik bir uyarın olmasına rağmen hücre tahribatı farklı şekillerde meydana gelmektedir. Tahminen bu işlem ya sitoplazmadaki litik enzimlerden ya da sitoplazmik enzimlerin lizozom membranıyla temas etmesinden kaynaklanır. Fakat bu olayın en azından 3 farklı yolu vardır:

1-Lizozom tarafından bu enzimlerin salınması (intihar çantası hipotezi)

2-Lizozomdan serbestleşmesinin farklı yollarla sitoplazmada bol miktarda enzim bulunması. Engellemenin bu türünde sitoplazmik hidrolazların ve asit fosfatazların artışı söz konusudur. .

3-Sitoplazmada zaten bulunan enzimlerin aktivasyonu [78,90].

2.7.3. Apoptozun Genetik Mekanizması

Apoptoz olayının gerçekleşmesi sırasında meydana gelen genetik olaylar, toksik ilaçların hücre ölümünü bu yolla gerçekleştirdiği açık olduğundan, hem de bu işlemde tümör supresör genleri ile onkoproteinlerin birlikte iş görmesi açısından önemlidir. Apoptozun genetik mekanizmasında çeşitli aşamalar bulunmaktadır. Bu aşamalar aşağıdaki gibi sıralanabilir;

1-Ölüme karar verme

2- Hücre ölümünü gerçekleştirme

3- Parçalanma

4- Fagositoz [68].

Apoptozun genetik mekanizması ilk kez *Caenorhabditis elegans* isimli nematodun gelişim aşamalarında belirlenmiştir. *C. elegans*'ın gelişim sürecinde 1090 somatik hücre oluşmaktadır; fakat bunlardan 131 hücre ölmektedir. Bu programlı hücre

ölümünü gerçekleştiren genler, araştırmacılar tarafından ced-3 ve ced-4 olarak tanımlanmıştır. Bu genlerden biri ya da her ikisi de mutasyona uğradığı zaman bu hücre yaşamaya devam etmektedir [91,92].

Ced-3 geni bir sistein proteazı şifrelemektedir ve memelilerdeki sistein proteazlardan ICE (Interleukin-1 β -Converting Enzyme)'ye benzemektedir. Ced-4 ise kalsiyuma bağlı bir proteini şifrelemekte ve memelilerde apaf-1 ile homoloji göstermektedir. Ced-9'un insandaki homoloğu olan Bcl-2 proto-onkojen gen ailesi ise apoptozu durdurmaktadır [91-93]. Bugün nematodlardan başka bitki, hayvan gibi bütün canlı gruplarında apoptoz çalışmaları sürmektedir. Apoptozun regülasyonu nematodlardan insana kadar çoğu aynı gen kontrol süreci ile oldukça sıkı bir biçimde korunmaktadır. Ölüm sinyali, gen ekspresyonu ile düzenlenebilmesine rağmen, süreç genotoksik hasar (kemoterapi, radyasyon vb) veya sitokinlerin olmaması gibi farklı uyaranlarla harekete geçirilebilir. DNA tek veya çift iplik parçaları ve nükleotit azlığı, DNA-bağlı transkripsiyon faktör p53 ile başlayan bir dizi olayı aktive eder ve hücre apoptotik yola girer [68,94].

2.7.4. Apoptozda Etkili Genler

2.7.4.1. p53'ün Rolü

İnsanda apoptoz, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir mekanizmaya sahiptir. p53 apoptozu indüklemeye özelliği olan bir proteindir. Birçok anti-tümör ilaç, hedef olarak hücre DNA'sını seçer ve p53 seviyesini artırır. Bu aktivasyon ya hasarın tamirine ya da apoptoza yol açar [75,95]. Bu aktivasyon aynı zamanda kromozom-17'nin kısa kolundaki bir genin (17p53) üretimi ile ilgilidir. Bu genin mutasyonu p53 salgılanmasına büyük ölçüde katkıda bulunur ve apoptozu uyarılmasına da yardımcı olur. p53 tümör baskılayıcı bir gen olarak çalışmaktadır bu nedenle bu gende meydana gelen mutasyonlar tümör hücrelerinin yaşama süresinin uzamasına neden olmaktadır. Toksik etkilerle meydana gelen hücre hasarı, transkripsiyonu düzenleyici etkiye de sahip olan p53'ü aktive etmektedir. Böylece p53, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıyabilmekte, ya hasar için gerekli zamanı elde etmek için hücre siklusunun durmasını sağlamakta, ya da hasar tamir edilemeyecek kadar fazlaysa hücreleri apoptoza yönlendirmektedir. p53 geni ile aynı fonksiyonlara sahip olan p63 ve p73 genleri de tespit edilmiştir [96,97].

2.7.4.2. Bcl-2/Bax 'ın Rolü

Bcl-2/Bax gen ailesi apoptozun düzenlenmesini sağlamaktadır. Bu ailenin 20 kadar üyesi tanımlanmıştır. Bu aile, bazıları apoptozu inhibe eden (antiapoptotik) Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo ve Mcl-1 gibi genlerden, bazıları ise apoptozu indükleyen Bax gibi proapoptotik genlerden meydana gelmiştir [98,99].

Bcl-2 ve Bcl-XL, sitokrom C ve apoptoz uyarıcı faktör (AIF) gibi faktörlerin mitokondriden serbest hale gelmesini engelleyerek ya da kaspazların salınımlarını durdurarak apoptozu inhibe etmektedir. Diğer yandan Bax ya da Bak gibi proapoptotik genler ise, mitokondri zarının por açıklığını değiştirme yoluyla sitokrom C'nin mitokondriden serbest hale gelmesini sağlayarak ve kaspazların serbestleşmesini uyararak apoptozu aktive ederler[100,101].

Hücrelerin apoptoza eğilimli olup olmamaları heterodimer ya da homodimer formunda bulunan Bcl-2 ailesi genlerine bağlıdır. Örneğin Bcl-2 salgılanması ile Bcl-2 homodimerleri oluşur ve apoptoz inhibe edilir. Diğer yandan Bax geninin sentezlenmesi ile apoptoz aktive edilmektedir [100].

Son yıllarda araştırmalar apoptozda etkili olan genlerden dolayı mitokondri üzerine yoğunlaşmıştır. Mitokondriler çift zarlı organellerdir. Bcl-2, 24-26 kDa'luk protein kodlayan bir proto-onkogendir ve proteini, çekirdek zarında ve mitokondirinin sitoplazmaya dönük olan dış zarı üzerinde konumlanmıştır. Bu proteinler, zarın parçalanmasından hücreyi korurken aynı zamanda da iyon alışverişini düzenlerler [78,102].

Yine antiapoptotik genler içinde bulunan Bcl-XL'in ise mitokondrinin zarar görmesini engellediği böylece de apoptozu inhibe ettiği düşünülmektedir. Bcl-2 ailesi üyeleri ayrıca pro-oksidan gibi davranarak apoptoz üzerindeki reaktif oksijen düzeylerini regüle etmektedir[78,103].

Bax proteinlerinin sitoplazmada da varlığı belirlenmiştir. Bu proteinler apoptotik sinyali almasının ardından, "permeabilite geçiş poru" yani mitokondri zarınayönelerek buraya bağlanırlar. Bu bağlanmanın sonucu olarak selektif iyon geçirgenliği azalabilmektedir. Böylece sitokrom C ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) faktörleri mitokondrinin zarında meydana gelen değişikliklerden dolayı sitoplazmaya geçerler. Bu faktörlerden AIF, nükleer fragmentasyonun ve kromatin kondansasyonunun meydana geldiği çekirdeğe doğru ilerlerken, sitokrom C ise apoptotik mekanizmanın son kısmında görev almaktadır. Sitokrom C, Apaf-1'in aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu amaçla Apaf-1 'e bağlanan sitokrom C ise prokaspaz-9'u aktive eder. Oluşan bu

kompleks "apoptosom" olarak isimlendirilmektedir. Prokaspaz-9'un aktive olmasıyla hücre ölümünü gerçekleştirecek olan bir seri kaspaz da indüklenmektedir. Sitokrom C'nin dışında Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanmaktadır. Bu olay apoptozun neden enerji gereksinimi duyduğunu açıklamaktadır [16,104].

2.7.4.3. Kaspazların Rolü

Proteinleri aspartik asit bulunan kısımlarından kesen kaspazlar, bu nedenle c-asp-ases olarak isimlendirilmişlerdir. Kaspazların kısıtlı proteolizisi hücrede lizisin şekillenmesini engeller ve apoptotik cisimcikler oluşur. Apoptoz mekanizmasında yer alan üç temel grup; ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimler (kaspazlar) olarak bilinmektedir.

Ölüm reseptörleri, TNF (Tumour Necrosis Factor) gen ailesinde bulunmaktadır. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri, ölüm alanı (Death Domain) adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar. CD95, TRAIL (TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand)-R1, TRAILR2, TNF-R1, DR3 ve DR6 olmak üzere altı tane ölüm reseptörü bulunmaktadır. [16,105,106].

Adaptör proteinler ise reseptör aracılığıyla gelen sinyalleri alarak kaspazlara bağlanır ve kaspazların aktivasyonunu sağlarlar. TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) bu reseptörlerin en iyi bilinenleri olmakla beraber karaciğerde bol miktarda bulunmaktadır. Fas'ın etki etmesi ile kaspaz dizisi (kaskadı) aktive olmakta ve kaspazla aktivasyonu sağlanan olan DNaz (caspase activated DNase; CAD) ise DNA yıkımına neden olmaktadır. Memeli hücrelerinde sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif prokürsörler olarak bulunur. Diğer adı ile ICE proteazlardır ve bir proteaz aktivasyon dizisi (şelalesi) başlatarak sitoplazmik proteinlerin yıkımında rol almaktadır [16,17].

Sitokrom C'nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur. Şimdiye kadar sitozolde bulunan 14 kaspaz tanımlanmıştır; inflamasyonu uyaran ve ilk kez bir proteaz olarak tanımlanan ICE, prokaspaz-1 olarak isimlendirilmiştir [107].

Kaspazlar başlıca 3 tiptirler:

I- Başlatıcı kaspazlar; (Kaspaz 2, 8, 9, 10),

II- Efektör kaspazlar (Kaspaz 3, 6, 7),

III- İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) [108].

Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunanlar proteolizisin "başlatıcıları" ya da "uygulayıcıları" olarak sınıflandırılırlar. Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve ölüme yönlendirirler ama infazı gerçekleştirmezler bunu yapacak olanları aktifleştirirler, infazı gerçekleştiren uygulayıcı (effektör) kaspazlardır. Uygulayıcı kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler [108].

Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgül olduğu bilinmektedir. Kaspaz inhibitörlerinin (IAP) ise direkt olarak efektör kaspazları hedef alıp bloke ederek hücre ölümünün inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca IAP (Inhibitors of Apoptosis) ailesinin kaspazlardan ayrı olarak, transkripsiyon faktörlerin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibitörler malign hücrelerde aşırı olarak gözlenirler [16,17,105].

2.7.5. Apoptozda Etkili Sistemler

2.7.5.1. Granzim veya Perforin Sistemi

Patojenle infekte hücreler ve tümör hücrelerinin yok edilmesinde bu salgısal apoptotik yol etkili olmaktadır. Perforinler ve Granzimler, sitotoksik T lenfositler (CTL) ve Naturel Killer (NK) hücrelerinin sitoplazmik salgı granülleri içinde bulunan proteinlerdir. Perforinlerin salgılanması için CTL reseptörünün hedef hücreye bağlanması lazımdır, böylece salgılanan perforinler hedef hücre üzerinde dairesel bir por oluştururlar. Oluşan bu perforin poru, hücre içindeki kalsiyum seviyesinde ani bir artışa sebep olur. Diğer yandan Granzim B ise hedef hücreye girebilmek için reseptör yardımıyla açılan vezikül içindeki deliği kullanır. Hücre içine giren Perforin proteini, vezikülden Granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Böylelikle, Granzim B hızlı bir şekilde DNA fragmentasyonunu ve apoptoz ile birlikte prokaspaz aktivasyonunu başlatır. Bununla birlikte Granzim A ise Perforinle birlikte kaspaz bağımsız yolda apoptozda görev almaktadır [104].

2.7.5.2.Fas - Fas Ligandı veya CD95 Yolu

Apoptozun salgıdan bağımsız mekanizması, hücre zarı üzerinde bulunan "ölüm reseptörlerinin" aktivasyonu ile ilişkilidir. Tümör nekroz faktör ailesinin bir üyesi olan Fas (CD95), bir hücre yüzey reseptörüdür. Fas çoğu hücre tipinde apoptotik sinyalin bir uyarıcısı olarak görev almaktadır. Fas ligandı (FasL) da yine Fas gibi TNF ailesine ait bir üyedir. FasL özellikle sitotoksik T hücrelerinin ve NK hücrelerin üzerinde bulunur.

Apoptoz mekanizması FasL'nin Fas reseptörüne bağlanması ile başlamaktadır. Bu mekanizma, tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması, virüsle infekte olmuş hücrelerin öldürülmesi, bir immün tepki sonunda aktive olmuş T hücrelerinin uzaklaştırılması gibi olaylarda önemli rol oynamaktadır. Fas ve TNFR-1'in sitoplazmik uzantısı, bir ölüm alanını (Death Domain, DD) içermektedir. Fas'ın sitoplazmik kısmı, FADD (Fas Associating protein with a Death Domain protein) ve RIP (Receptör Interacting Protein) ile sürekli bir etkileşim içindedir. Prokaspaz-8'in aktivasyonu ise bu TRADD ve RIP proteinleri tarafından apoptozun uyarılmasıyla meydana gelir. Bu şekilde aktivasyonu sağlanan kaspaz-8 ise daha sonra diğer kaspazların aktivasyonunda görev alır [16,108].

2.7.6.Hastalıklarda Apoptozun Rolü

Apoptoz birçok fizyolojik ve patolojik olayda etkin rol oynamaktadır. Fizyolojik olayların başında hücre yapım-yıkımı gelir. Bağışıklık sistemi hücrelerinin seçiminde de apoptoz önemli rol oynamaktadır. Apoptozun en klasik örneği sayılan yenidoğan timusunun involusyonu sonucunda T lenfositlerin yaklaşık % 98'i seleksiyona uğramaktadır. Ayrıca B hücrelerinde de apoptozun baskılandığı belirtilmektedir. Bunun fizyolojik önemi, B lenfositlerinin duyarlı olduğu uyaranla yeniden karşılaşması durumunda hazır bulunmasını sağlamaktır. Patolojik olarak sayabileceğimiz olaylarda ise; tümörlerde hem regresyon hem de büyüme aşamasında rol oynar [15,109].

Apoptozun artmasıyla ilgili hastalıklara örnek olarak; Nörodejeneratif bozukluklar (Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı), hematolojik bozukluklar (Aplastik Anemi), otoimmün bozukluklar (Romatoid Artrit, Sjögren Sendromu), bakteriyel ve viral enfeksiyonlar (Ebola virüs, *N.meningitidis*) verilebilir. Apoptozun azalmasıyla ilgili hastalıklara ise kanserler (Blastom, Karsinom, Lösemi, Lenfoma), otoimmün bozukluklar (Sistemik Lupus Eritomatozus), ateroskleroz, metabolik bozukluklar (Wilson hastalığı), viral enfeksiyonlar (Adenovirus, Poxvirus) örnektir [17].

2.7.7.Tedavide Apoptoz

Günümüzde hastalıkların çoğu hücre ölümüne bağlı olarak meydana gelmektedir. Bu yüzden apoptoz olayına ve apoptotik sürece müdahale edilirse ve apoptotik mekanizmalar düzenlenirse yeni tedavi yaklaşımları geliştirilebilir. Olası tedavi yaklaşımları üç kategoride toplanabilir: (1) gen tedavisi (p53'ün yedeklenmesi vb), (2) apoptoz moleküllerinin düzenleyicilerini hedefleyen moleküllerin enjeksiyonu (Growth faktörler ve çözülebilir FasL vb), (3) apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu

düzenleyen farmakolojik küçük moleküllere müdahale edilmesi (Bcl-2 vb). Günümüzde steroid içermeyen antiinflamatuvarlar gibi apoptotik mekanizmaları etkilediği bilinen birçok ilaç bulunmaktadır. Aslında hücrelere toksik olan ilaçlar ve radyoterapi programları tümör hücrelerinde apoptozu başlatmaktadır. Ancak apoptoza karşı oluşan direnç tedavinin başarısız olmasına neden olmaktadır. Ayrıca kemoterapi ve radyoterapi gibi tedaviler, sağlıklı hücrelerde de apoptoza neden olabilmektedir ve kemik iliği üzerinde olumsuz yan etkileri vardır. Bu nedenle son zamanlarda geliştirilen yeni birçok tedavi denemeleri klinik öncesi çalışmalarda ümit vermektedir [68,99].

2.7.8. Apoptozu Belirleme Yöntemleri

Hücrede apoptozu belirlemek için kullanılan bu yöntemler aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

1. Işık Mikroskobu
 - a. Hematoksilen Boyama
 - b. Giemsa Boyama
2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop
 - a. Propidium İyodür (PI)
 - b. Hoechst Dye
3. Elektron Mikroskobu
4. Faz Kontrast Mikroskobu

İmmunohistokimyasal Yöntemler

1. Anneksin V Yöntemi
2. TUNEL Yöntemi
3. M30 Yöntemi
4. Kaspaz-3 Yöntemi

Biyokimyasal Yöntemler

1. Agaroz Jel Elektroforezi
 - DNA fragmentasyonu
2. Western Blotting
 - Substrat kırılmaları
 - Aktif kaspaz'ın belirlenmesi
 - Sitokrom c salıverilmesi

3. “Flow” Sitometri

İmmunolojik Yöntemler

1. ELISA

- DNA Fragmentasyonu
- M30 Düzeyi

2. Fluorimetrik Yöntem

- Kaspaz Aktivasyonu

Moleküler Biyoloji Yöntemleri (Gen Ekspresyon Yöntemleri)

- DNA Microarrays [108,110,111].

Bizde çalışmamızda apoptoz sürecinde bu yöntemlerden gen ekspresyon yöntemini kullanarak eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu(rt-PCR) ile araştırdık.

2.7.8.1.Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler

Moleküler tanımlama yöntemleri, son zamanlarda ortaya çıkan teknolojik gelişmelerle mikrobiyoloji alanında da çeşitli çalışmalara ışık tutmaktadır. Bu yöntemlerin çok yaygın kullanılmamasının nedenleri olan maliyet ve kalifiye personel ihtiyacı gibi faktörlere rağmen kendisine özgü çeşitli avantajlara sahip olan bu yöntemler dünyada gittikçe artan sıklıklarla kullanılmaya başlanmıştır. Aynı şekilde, son yıllarda ülkemizde de moleküler yöntemlerin kullanıldığı bilimsel araştırmalar hız kazanmıştır [112].

Moleküler tanı; organizmanın genetik kodundaki genom ve proteininde biyolojik belirteçleri analiz eden bir tekniktir. Bu teknik genetik duyarlılığın belirlenmesinde, konağın enfeksiyona duyarlılığından sorumlu faktörlerin incelenmesinde, virülans ve bulaşıcı olabilme yönünden farklılık gösterebilen spesifik suşların tanımlanması, toplumlar ve akraba grupları arasında hastalığın yayılması, kontrolü ve etiyojisine moleküler seviyede tanımlanan genetik faktörlerin katkısı ve enfeksiyon hastalıklarının yayılmasının önlenmesi gibi durumlarda önem arz etmektedir. Moleküler yöntemlerle direnç genleri, gen mutasyonu, gen ekspresyon analizi ile ilgili araştırmalar yapılabilmektedir. Bu yöntemlerden biri olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu ise en çok kullanılan, duyarlı, güvenilir yöntemlerden biridir [112-114].

2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincirleme tepkimesi (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), DNA içerisinde yer alan ve dizisi bilinen iki segment arasındaki spesifik bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Bu teknik ile bir DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını elde etmek mümkün olmaktadır. PCR, 1985 yılında Cetus adlı biyoteknoloji firmasında çalışan Kary Mullis adlı araştırmacı tarafından bulunmuştur. Bu reaksiyon, polimeraz enzimi ve gerekli bileşenlerin bulunması halinde DNA'nın karşıt sıraları sentezleyebilme yeteneği ile gerçekleşir. Böylece hedef DNA dizisi çoğaltılırken, seçilmeyen diziler baskılanabilir. Böylece DNA dizisinin tanımlanması daha kolay hale gelmektedir [113,114].

PCR tekrarlanan 3 basamak şeklinde gerçekleşir. Bu basamaklar;

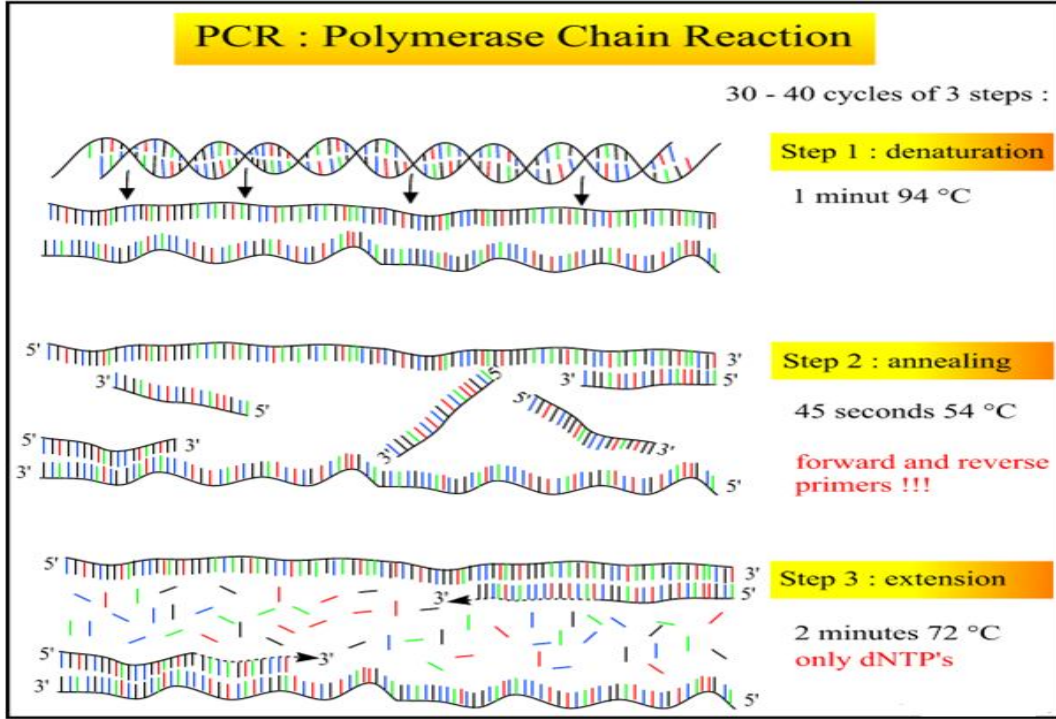
1. Denatürasyon
2. Annealing
3. Uzama

1. Denatürasyon; Amplifiye edilecek DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonudur (90-95 °C). Kalıp DNA (template DNA), 90-95 °C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılarak tek iplikçikli hale gelmektedir. Ancak bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapılarak DNA zinciri ayrılabilir [112,115].

2. Annealing (55-60 °C); Primerlerin DNA üzerindeki hedef bölgelerle özgül hibridizasyonuna olanak verecek sıcaklıktaki annealing yani birleşme reaksiyonudur. Bu işlemde sıcaklık düşürülür ve ortamdaki primerlerin tek iplikçikli olan DNA'ya bağlanması sağlanır, bu aşamada hedef dizilere primerler bağlanır ve yeniden çift iplikçikli hale gelir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir [116].

3. Uzama; Tamamlayıcı zincir sentezi olarak tanımlanan bu aşamada ortama eklenen Taq DNA polimeraz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık olan 72°C'de primerlerin uzaması sağlanmaktadır. PCR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır. Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir PCR devrini temsil eder. Bu üç adımı içeren her bir döngünün sonunda PCR ürünleri 2 katına

çıkılmaktadır. PCR işlemi, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılır [116,117].



Şekil 2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu basamakları [115].

PCR;

- DNA dizi analizinde ve DNA haritalanmasında,
- Genetik hastalıkların teşhisinde,
- DNA parmak izi analizinde,
- İnsan Genom Projesi ve diğer Genom Projelerindeki araştırmalarda,
- Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde,
- Tarımda,
- Sistemik ve evrim çalışmalarında kullanılmaktadır [112].

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Avantajları

- Hızlı ve özgüdür.
- Eskimiş, kurumuş, az miktarda DNA içeren örneklerle bile uygulanabilir.
- Toksin oluşturan etkenlerin, saptanması güç toksinlerin, bakteri alt tiplerinin, laboratuvar koşullarında üretilmesi güç virüslerin teşhisine uygundur.
- Antibakteriyel direnci olan bakterilerin saptanmasına uygundur.

- Babalık testinden, popülasyon genetiği ve epidemiyolojik çalışmalara varıncaya kadar geniş kullanım alanı bulunmaktadır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Dezavantajları

- Ortamdaki istenmeyen DNA'nın primer ile ortak dizilime sahip olma riski vardır.

- Deneyimli personel gerektirir.

- Cihaz ve malzemeleri pahalıdır [112,118].

2.8.1. PCR Yöntemleri

2.8.1.1.Hot-Start PCR

PCR'ın yüksek düzeyde özgüllüğünden emin olmanın yolu özgül olmayan amplifikasyonun önlenmesidir. Bu durum, tipik olarak hem bu bağlanmanın meydana geldiği yerin engellenmesiyle, hem de düşük derecelerde özgül olmayan primer-primer bağlanmasının olabileceği başlangıçtaki DNA polimerizasyonunun önlenmesi ile gerçekleşebilir. Hot Start PCR, primer bağlanma ısısından daha yüksek ısılarda amplifikasyon reaksiyonunun başlatılması işlemidir ve ilk zamanlarda elle yapılan yöntemlerde önceden ısıtılmış primerler ve kalıbın ısı döngü cihazına konup, polimerazın eklenmesiyle uygulanmıştır. Tipik olarak bu işlem ilk denatürasyon döngüsünde reaksiyon ısıtılana kadar polimeraz aktivitesini engelleyen taq-spesifik monoklonal antikorların kullanılmasıyla yapılır [113,118].

2.8.1.2.Multipleks PCR

PCR'ın bu modifikasyonunda birden fazla DNA segmentinin, birden fazla primer çifti kullanarak aynı amplifikasyon reaksiyonunda çoğaltılması söz konusudur.Sıklıkla çok sayıda ampirik deneme gerekir.Çok sayıda hedefin birlikte amplifikasyonu farklı amaçlar için kullanılabilir. Tanısal amaçlar için Multipleks PCR, internal kontrolleri tayin veya tek bir örnekteki çok sayıda patojenin tespit edilmesi amacıyla uygulanabilir. Multipleks PCR deneyleri, hedef nükleik asitlerin sınırlı olmadığı insan ve kanser genetiğinde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte infeksiyöz organizmaların saptanması için geliştirilen Multipleks PCR deneyleri çok daha karmaşıktır ve daha düşük duyarlılıkta sonuçlanabilmektedir [113].

2.8.1.3. Nested PCR

Eğer düşük kalitede DNA veya sınırlı sayıdaki kopya ile kalıp DNA amplifiye edilmek istenirse, PCR duyarlılığı ile ilgili problemler ortaya çıkabilir. Nested-PCR (nPCR) ile DNA amplifikasyonunun duyarlılığı ve spesifikliğı yükseltilebilir. Nested PCR 'da iki takım amplifikasyon primeri kullanılır. Birinci takım, 15-30 döngü içeren ilk amplifikasyon aşaması için gereklidir. İlk reaksiyonun ürünleri, ilk primer çiftinin ürünü içerisindeki sekansa özgül ikinci bir primer takımı ile birlikte ikinci bir amplifikasyon aşamasına tabi tutulur. Nested PCR toplam döngü sayısının fazlalığı nedeniyle yüksek oranda duyarlıdır. Teorik olarak tek bir primer takımının aynı sayıdaki döngü ile amplifikasyonuna göre daha özgüdür [112].

Nested amplifikasyonunun en büyük dezavantajı ilk amplifikasyon aşamasının tamamlanmasından sonra ürünlerin ikinci tüpe transferi sırasında yüksek kontaminasyon riski taşımasıdır. Bu transfer aşaması, iki amplifikasyon karışımının mum veya yağ ile fiziksel olarak ayrılması veya ikinci primer takımının ilkinine göre bağlanma ısısının daha yüksek tutulmasıyla engellenebilir [118].

2.8.1.4. Arbitrarily Primed PCR

Bu yöntem aynı zamanda rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (random amplified polymorphic DNA) yöntemi olarak da adlandırılır ve düşük sıcaklıktaki ortamda genomik DNA 'yı amplifiye etmek için tek, kısa rastgele seçilmiş bir primeri kullanır. Tamamlayıcı zincirde sadece primerlerin bağlandığı bölgeler amplifiye edilir. AP-PCR çeşitli türlerdeki suşların, tür içerisindeki değişik serotiplerin ve serotip içindeki çeşitli alt tiplerin ayrılmasında kullanılır. Bu yöntem günümüzdeki en basit DNA temelli alt tiplendirme yöntemidir [113-115].

2.8.1.5. Broad-Range PCR

Bu yöntem infeksiyon tanısında filogenetik olarak bilgi verici olan genetik hedefler içerisindeki korunmuş sekansları kullanır. Yeni bulunmuş, nazlı veya kültüre edilemeyen patojenler bu yöntem ile infekte insan dokusu veya kanından direkt olarak saptanır. HSV, bakteriyel menenjit, ateşli hastalardaki bakteriyemiye hedef alan evrensel primer setleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin dezavantajları; kontaminasyon riski, maliyet ve taksonomik konulardır [112].

2.8.1.6.RT(Revers transkriptaz) PCR

Revers transkriptaz PCR RNA hedeflerin amplifikasyonu için geliştirilmiştir. Bu işlemde RNA hedefleri önce RT ile DNA'ya çevrilmekte ve daha sonra PCR ile amplifiye edilmektedir.*Thermus thermophilus*'dan elde edilen ısıya dayanıklı DNA polimeraz etkin revers transkripsiyon aktivitesine sahiptir. Bu enzimler ayrı bir RT adımına gerek duyulmadan RNA hedeflerinin amplifikasyonunda kullanılabilir. Reaksiyon ısısının yüksekliği primer hibridizasyonundaki sıklığı artırır ve primer uzaması veya bağlanmasını engelleyebilecek olan RNA ikincil yapısının oluşmasını önler [115-118].

2.8.1.7.Real Time PCR

Real time demek; reaksiyon boyunca veri toplanması ve analizinin aynı anda devam etmesi demektir. Real-time yöntemler, amplifikasyon ve tayin işlemlerinin aynı reaksiyon odasında veya tüpünde yer aldığı ve sıklıkla aynı anda yapıldığı homojen yöntemlerdir. Bu yöntem ampikonun el ile işleme aşamalarını azaltır ve böylece taşınmaya bağlı kontaminasyon riskini düşürür [113,114,118].

Aynı zamanda heterojen yöntemlere göre otomasyona çok daha uygundur. PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan thermocycler adı verilen cihazların hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Real-Time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemi ortaya çıkarmıştır. Real-Time PCR reaksiyonu esnasında her bir PCR siklisunda yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp reaksiyonu aşama aşama sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir [118].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kopolimer ilaç konjugatı olan MAAFE-HX'in antimikrobiyal, antitümör ve sitotoksik aktivitelerine bakıldı ve bu konjugatın yapısal karakterizasyon özellikleri belirlendi. Daha sonra MAAFE-HX'in apoptozda sorumlu olan genlerin üzerine olan etkisini anlamak için rt-PCR ile gen ekspresyon düzeylerine bakıldı.

Konjugatın antimikrobiyal aktivitesine Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda disk diffüzyon yöntemi kullanılarak bakıldı. Antitümör ve sitotoksik aktiviteleri belirlemek için ise hücre kültürü çalışıldı. Bu amaçla antitümör aktivite MG-63 kemik kanseri hücre serisi üzerinde araştırılırken, sitotoksik aktivite ise L929 fibroblast hücre serisi üzerinde araştırıldı. Hücre kültürü çalışmaları Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda ve Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Bu aktiviteleri araştırmak amacıyla XTT testi uygulandı ve ELISA ile optik yoğunluk ölçüldü. MAAFE-HX'in yapısal karakterizasyonunu belirlemek için FTIR ve ¹H-NMR çalışmaları Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapıldı.

Diğer yandan gen ekspresyonlarının belirlenmesi için hücre kültürü çalışmaları ve RNA izolasyonu Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda ve Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Çalışmanın sonraki kısmı olan cDNA sentezi ve rt-PCR çalışmaları ise Ankara ATQ Biyoteknoloji Laboratuvarlarında yapıldı. Çalışmamız için gerekli malzemeler ve kimyasallar T-632 nolu proje ile Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından temin edildi.

İstatistiksel çalışmalarda SPSS (Statistical Packages of Social Sciences version 16.0 for Windows) programı kullanıldı. Bu amaçla Mann-Whitney U testi ve Student's T testi kullanıldı. "p<0,05" değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışmamız, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 15.01.2015 tarihli toplantısında 2015-01/02 karar numarasıyla onaylanmıştır.

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar

KİMYASAL CİHAZIN ADI	MARKA
CO ₂ 'li inkübatör (37°C, % 5 CO ₂ 'li)	NUAIRE -USA Autoflow
Laminar flow (steril kabin)	BİLSER Class II
Invert (ters) mikroskop	LEICA
ELISA cihazı (spektrofotometre)	RAYTO-RT 2100C
Su banyosu	MICROTEST
Santrifüj	NÜVE NF 200
Ön soğutmalı santrifüj	HARRIER -18/80 Precool MSE
Mikro santrifüj	SANYO -MicroCentaur MSE
Vorteks	VELP Scientifica 2x3
Otoklav	HIRAYAMA -Hiclave HV- 85L
Derin dondurucu (-20°C)	ARÇELİK
Derin dondurucu (-80°C)	NÜVE DF 490
Hassas terazi	O HAUS Adventurer Pro
Otomatik mikropipetler (10-100µl,20-200 µl,100-1000 µl)	GILSON
pH-metre	METTLER-TOLEDO-620 Lab
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	STUART -BIBBY
Ultraviyole spektrofotometre	SCHIMATZU -UV-1800
Fourier Transform İnfrared	MATTSON -1000
Nükleer Manyetik Rezonans	¹ H-NMR,BRUKERAvanceIII
McFarland Cihazı	BIOSAN
Epanorf santrifüj cihazı	BIOSAN
QIAgility	QIAGEN
PCR kabini- Aura PCR	BIOAIR
Vortex – Combi spin	BIOSAN FVL-2400N
Rotor Disc Heat Sealer	QIAGEN
Rotor Gene cycler cihazı	CORBETT RESEARCH

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal maddelerin adı ve markaları.

KİMYASAL MADDENİN ADI	MARKA
RNeasy Plus Mini RNA Isolation Kit	Qiagen
RT2 First Strand cDNA Kit	Qiagen
Profiler PCR Array	Qiagen
RT2 q PCR SYBR Green Mix	Qiagen
Dulbecco Fosfat Buffer Saline (DPBS)	PAA Cell Culture Company
Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM) – with L- glutamine, Low glucose	Capricorn Scientific
Dulbecco Modified Eagles Medium (without phenol red)	Wisent Bio Products
Fetal Bovine Serum (FBS)	Capricorn Scientific
Penicillin-Streptomycin (PS)	Capricorn Scientific
Trypsin-EDTA	Gibco by Life Technologies
Trypan Blue	Invitrogen
XTT (sodyum 3'-[1-[(fenilamino)-karbonil]-3, 4-tetrazolyum]-bis (4-metoksi-6-nitro)benzen-sulfonikası hidrat)	Cayman Chemical Company
Hydroxyurea	Sigma Science
Brain Heart Infusion Broth (BHI)	BIOMARK Lab.
Sabouraud Dextrose Broth (SDB)	OXOID
Mueller - Hinton Agar (MHA)	MERCK
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	Neogen
Vancomycin	OXOID
Imipenem	OXOID
Sulfamethoxazole-Trimethoprim	OXOID
Flukanozol	Generica
Dimetil sulfoksit (DMSO)	MERCK

3.2. Kopolimerin Sentezlenmesi

Tez kapsamında yapılması planlanan kopolimerin sentezlenmesi için iki farklı monomer olan maleik anhidrit (MA) ile alil fenil eter (AFE) kullanıldı. AFE'nin homopolimerleşmemesi için oda sıcaklığında ve kahverengi cam şişelerde saklanması gerekmektedir. 100 mL' lik bir balona 4,9 g MA monomeri konularak 10 mL etil metil keton içerisinde çözülerek üzerine 4,63 mL AFE eklendi. Toplam hacim 15 mL etil metil keton eklenmesiyle 25 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında sürekli çalkalama ile homojen bir karışım elde edildi. Her iki monomer yaklaşık 1:1 mol oranında tepkimeye sokuldu. Bu karışım, manyetik karıştırıcı ve manyetik balık kullanılarak, sıcaklık ayarının da belli aralıklarla artırılmasıyla 24 saat bekletildi. Yaklaşık 70°C - 80°C dolayında kahverengiye yakın, bal kıvamında viskoz bir karışım elde edilir edilmez tepkime sonlandırıldı. Ardından bu karışım 100 mL' lik behere alınarak 25 mL etil alkol ile yavaşça çöktürüldü. Çökmeye başlayan beyaz renkli MA-AFE kopolimeri defalarca etanol ile yıkandıktan sonra, süzülerek bir petri kabına alındı; açık havada ve oda sıcaklığında kurutuldu. Tepkimeye girmeden arta kalan AFE monomerinin kendi kendine homopolimerleşmesi ile oluşabilecek polivinilasetatın ortamdaki ve kopolimerden uzaklaştırılması için, kopolimer 20 mL etil asetat içinde 24 saat bekletildi; petrol eteri ile çöktürüldü, ardından vakum filtrasyon sistemi kullanılarak analitik süzgeç kağıdından süzüldü. Ortamdaki çözünmüş olan uzaklaştırılması için çökelek vakum etüvde 55°C' de 24 saat kurutularak saflaştırıldı [29].

3.3. Kopolimerin Yapısal Karakterizasyonu

Maleik anhidrit-alil fenil eter kopolimerinin yapısal karakterizasyonu Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR) ve Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (¹H-NMR) ile yapıldı. Örneklerin spektrumu DMSO çözücü ortamında alındı.

3.4. Kopolimerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması

Maleik anhidrit-alil fenil eter (MA-AFE) kopolimerinin biyolojik aktivitesi, 5 farklı bakteri türü (antibakteriyel) ve maya mantarı (antifungal) üzerinde araştırılmıştır. Biyolojik aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi)' ndan temin edilmiştir.

- 1) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- 2) *Escherichia coli* ATCC 25922
- 3) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- 4) *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus* ATCC 43300
- 5) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- 6) *Candida albicans* ATCC 10231

3.4.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Çalışmamızda kopolimerin biyolojik aktivitelerini belirlemek için pratikte en çok kullanılan yöntemlerden biri olan disk difüzyon yöntemi kullanıldı.

Bakteri suşları Brain Heart Infusion besiyerine inoküle edilerek 37°C’de, mantar suşları da Sabouraud Dextrose Broth’a inoküle edilerek 25°C’de 24 saat süreyle inkübe edildi. Bu kültürlerden alınan mikroroganizma solusyonları, içerisinde buyyon bulunan steril tüplere alınarak McFarland cihazında 0.5 standardına göre ayarlandı.

Kopolimerimiz 8 mg tartıldı ve 2 ml DMSO’da çözüldü. Yüksek dozdan başlanarak 1 ml DMSO içeren steril tüplerde sulandırılmaları yapıldı. Sulandırılmaları, otomatik pipetle steril 6 mm’lik boş disklere (OXOID blanc disc) 25 µl miktarında emdirildi.

Daha sonra hazırlanan besiyerlerimiz; Mueller - Hinton Agar ve Sabouraud Dextrose Agar 12 cm’lik steril agar plaklarına 25 ml olacak şekilde dağıtıldı. Katılaştıran agar yüzeyine, 0.5 McFarland standardına göre hazırlanan bakteri ve maya solüsyonlarından steril eküvyon çubuk yardımıyla tüm yüzeye yayma ekimi yapıldı. Yüzeylerinin kurumaması için bir süre beklendikten sonra hazırlanan sulandırılmaları yapılmış numune çözeltileri emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak aralarında 20 mm kalacak şekilde yerleştirildi. Negatif kontrol için sadece DMSO emdirilmiş steril diskler kullanıldı.

Pozitif kontrol için hazırlanan, bakterilerde Imipenem, Sulfamethoxazole-Trimethoprim ve Vancomycin antibiyotik diskleri, maya için Flukanazol emdirilmiş diskler kullanıldı. Daha sonra ekilen plaklar 37 °C’de 24 saat, maya aşılama plakları 25 °C’de 48 saat inkübe edildi. Süre sonunda besiyeri üzerinde disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirildi.

3.5. Hücre Kültürü

Sentezlemiş olduğumuz kopolimer ilaç konjugatımız olan MA-AFE'nin antitümör aktivitesini incelemek için MG-63 hücreleri kullanıldı. Ayrıca toksik aktivite için L929 fibroblast hücre hattı kullanıldı. MG-63 hücre hattı ile L929 hücre hattı Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi 'nden temin edilmiştir.

3.5.1. Hücrelerin Açılması ve Çoğaltılması

- 1) -80°C' de kriyo içinde bulunan hücreler 37°C' ye alındı.
- 2) Kriyotüp içerisine hızlı bir şekilde besiyeri ilave edildi ve 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı.
- 3) Tüp içerisine 8 ml daha besiyeri ilave edilerek 1800 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi.
- 4) Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve peletin üzerine 5 ml besi yeri eklenerek 25 cm²' lik flasklara alındı.
- 5) Flasklar, 37°C' deki % 5 CO₂ içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı. 48 saatte bir besi ortamları yenilendi. Hücreler bütün flask yüzeyini yoğun bir şekilde kapladığında ise başka flasklara pasaj yapıldı.
- 6) Bu amaçla flasklarda bulunan sıvı döküldü ve flasklar iki kez fosfat buffer ile yıkandı.
- 7) Daha sonra hücrelerin üzerine 1 ml tripsin ilave edildi ve flasklar 5-10 dakika inkübatörde bekletildi.
- 8) İnkübatörden çıkan flasklar inverted mikroskopla incelendi ve tüm hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edildi.
- 9) Flaskda bulunan tüm hücreler kalktıktan sonra üzerine yaklaşık 10 ml kadar DMEM, FBS ve Penisilin streptomisin karışımından ilave edildi.
- 10) Flask içerisinde bulunan hücre-ortam karışımının 5 ml' si başka bir flaska aktarılarak pasajlama işlemi tamamlanmış oldu.
- 11) Daha sonra flasklar inkübatöre kaldırılarak inkübasyona bırakıldı ve çoğalmaları sağlandı.

3.5.2. Hücrelerin Dondurulması

- 1) Flasklarda bulunan hücrelerin üzerindeki besi ortamı döküldü. Flasklar fosfat buffer ile yıkandıktan sonra tripsin ile 5- 10 dakika kadar muamele edildi ve hücreler flask yüzeyinden kaldırıldı.

- 2) Hücreler 15 ml' lik falkon tüplere alınarak 1800 rpm' de 6 dakika süre ile santrifüj edildi.
- 3) Santrifüj sonrası, her bir falkon tüpe ait 1,5 ml' lik kriyotüpler hazırlandı.
- 4) 9:1 oranında (%10' luk), FBS : DMSO karışımından oluşan ortam hazırlandı.
- 5) Tüplerde bulunan süpernatant kısım uzaklaştırılarak falkon tüpler buz üzerine alındı. Falkon tüplerde bulunan hücreler üzerine 750 µl FBS : DMSO karışımı eklenerek resüspanse edildi.
- 6) Buz içerisinde bulunan kriyotüpler içerisine bu karışım aktarılarak -80°C'ye kaldırıldı.

3.5.3. Hücrelerin Sayılması /Canlılığının Tespit Edilmesi

Thoma lamı, üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış 16 büyük kareden oluşan yivler bulunan özel mikroskop lamıdır. Her büyük karenin alanı 1 mm² 'dir. Lam üzerine konulan sıvının derinliği 0.1 mm'dir. Sonuçta her büyük kare üzerindeki sıvı hacmi 10⁴ ml' dir.

Thoma lamının alt ve üst kısmındaki iki adet büyük 16 karedeki hücreler sayılıp aritmetik ortalamalar alındı. Daha sonra aşağıdaki formül ile istenilen dilüsyon yapıldı.

$$\text{Dilüsyon Miktarı} = \frac{\text{Başlangıçtaki Dilüsyon} \times \text{Ortalama Sayılan Hücre} \times 10.000}{\text{İçin Katılan Miktar} \times \text{Sayısı} \times (\text{Sabit})}$$

ml'de İstenilen Hücre Sayısı

3.6. Sitotoksisite Testleri

İlaç ve kopolimer-ilaç çiftinin MG-63 ve fibroblast hücreleri üzerine sitotoksisitesinin incelenmesi amacıyla XTT testi uygulandı. Çalışmamızda ilaç olarak hidroksi üre, kopolimer olarak ise Maleik Anhidrit- Alil Fenil Eter kullanıldı.

XTT testi için de canlılığı ölçülecek hücreler düz tabanlı 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Yüzey kaplaması tamamlandıktan veya yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra (24 veya 48 saat) ortama polimer ilave edildi. Madde ile 48 saat inkübasyonun ardından XTT (2,3,-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil+-2H- tetrazolium-5-kaboksa-nilit tuzu) ajanı reaktif I: cell proliferation kit II (XTT, labelling agent, roche) ve aktivasyon ajanı reaktif II: cell proliferation kit II XTT, electron coupling reagent, Roche)' ndan oluşmaktadır. Reaktifler 50 / 1 XTT ajanı (Labelling reagent) / Aktivasyon ajanı

(electron coupling reagent) olacak şekilde karıştırılarak XTT solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyondan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 450 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı.

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = \frac{\text{Ölçülen optik dansite değeri}}{\text{Kontrol optik dansite değeri}} \times 100$$

Fibroblast hücreleri için hücre ölümü yüzdesi (% inhibisyon); kontrol optik dansite değerinden her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin çıkarılması ve sonucun kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrol optik dansite değeri} - \text{Ölçülen optik dansite değeri}}{\text{Kontrol optik dansite değeri}} \times 100$$

3.6.1. Antitümör Aktivite Testleri / MG-63 Kemik Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Flasktaki, hücreler yeterince çoğaldıktan sonra tripsinize edildi. Santrifüj edip süpernatant kısmı döküldükten sonra, hücre sayımı yapıldı. Hücreler ml'de 1×10^5 hücre olacak şekilde DMEM (fenol red'siz) besiyeri içerisinde deneyde kullanılacak miktarda hazırlandı. Besiyerinin üzerine %10 FBS + %1 Penisilin-Streptomisin eklenerek süspansiyon oluşturuldu. Hazırlanan hücre süspansiyonundan her kuyucuğa 100 µl (1×10^4 hücre/kuyucuk) eklendi. Kuyucuk sayısı kopolimer-ilaç çiftleri ve ilacın her konsantrasyonu için 6'şar kuyucuk olacak şekilde hesaplandı. Süspansiyonun dağılımının eşit olduğu mikroskop ile incelendikten sonra, 37°C'lik CO₂ etüvüne kaldırıldı ve 24 saat inkübe edildi.

3.6.1.1. XTT Testinin Uygulanması

İnkübasyon sonunda hücrelerin yüzey kaplamalarının ve genel durumlarının normal olduğu tespit edildikten sonra kopolimer-ilaç çifti ve sadece ilaç içeren çözeltiler hazırlandı ve gösterilen konsantrasyonlarda 100'er µl olarak kuyucuklara eklendi.

Pozitif kontrole 100 µl DMEM (fenol red'siz) + %10 FBS + %1 Penisilin-Streptomisin süspansiyonu, negatif kontrole ise DMSO eklendi.

Bütün kuyucuklardaki son hacim 100 µl DMEM (fenol red'siz) + %10 FBS + %1 Penisilin-Streptomisin süspansiyonu ile 200 µl' ye tamamlandı. İşlem tamamlandıktan sonra plak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. XTT solusyonu bir önceki bölümde açıklandığı gibi hazırlandı. Bu solüsyondan her kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. ELISA cihazı ile 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü.

3.7. Hücrelerin Apoptoza Gıtme Durumunun PCR ile belirlenmesi

3.7.1.Hücrelerin Hazırlanması

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda her bir örnek için yaklaşık 10^5 hücre sayısına ulaşmaya kadar hücrelerimiz çoğaltıldı. Daha sonra hücreler flasklardan alınarak tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. Uygulanan santrifüj işleminden sonra süpernatant döküldü ve pelete besi ortamı eklendi. Daha sonra hücrelerden 200 µl kadar 24'lük plağa alındı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda hücrelerin plak yüzeyine yeterince tutunup tutunmadıkları invert mikroskopla gözlemlendi. Plak yüzeyine tutunan hücrelerin yarısına ilacımızın optimum sulandırımından eklenirken, diğer yarısına ise kopolimer ilacımızın optimum konsantrasyonundan 100 µl eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonucunda hücreler pipet yardımıyla alınarak 2 ayrı 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Toplanan hücre konsantrasyonunun 10^5 olup olmadığını anlamak için her iki tüpten de bir miktar hücre ependorflara alındı ve tripan blue ile boyandı. İşlem sonunda ölü hücreler belirlenerek istenen hücre konsantrasyonuna ulaşıp ulaşılmadığına bakıldı. İstenen sonuca göre RNA izoalsyon aşamasına geçildi.

3.7.2. Hücrelerden RNA izolasyonu

RNeasy plus Mini RNA Isolation Kit (Qiagen)'in prospektüsünde verilen bilgiler doğrultusunda çalışmalara başlandı [119]. Buna göre;

- 1) Santrifüj tüplerinde bulunan hücrelerin üzerine DMEM eklendi.
- 2) 18000 rpm'de 6 dakika kadar santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve dipte kalan hücreler pipet yardımıyla ependorf tüplerine alındı.
- 3) Ependorfların üzerine 1ml kadar fosfat buffer eklendi ve mini santrifüjde 6 dakika santrifüj edildi ve daha sonra üst sıvı döküldü.

- 4) Ependorflardaki peletlerin üzerine 350µl Buffer RLT Plus eklendi ve 30 saniye vortekslendi.
 - 5) Daha sonra lizatlar g DNA eliminatör spin kolonuna aktarıldı.
 - 6) 30 saniye 10000 rpm’de santrifüj edildikten sonra üstteki kolonlar atıldı ve dipteki sıvılarla işleme devam edildi.
 - 7) Dipte kalan sıvıların üzerlerine 350 µl %70’lik etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
 - 8) Örneklerden 700 µl alınarak RNeasy spin kolona aktarıldı, kapakları kapatıldı ve 15 saniye 10000 rpm’de santrifüj edildi ve alttaki sıvıların kaldığı kolonlar atıldı.
 - 9) 500 µl Buffer RPE RNeasy spin kolonlarına eklendi, 15 saniye 10000 rpm’de santrifüj edildi ve alttaki kolonlar atıldı.
 - 10) 500 µl Buffer RPE RNeasy spin kolonlarına eklendi, 2 dakika 10000 rpm’de santrifüj edildi.
 - 11) RNeasy spin kolonları 1.5ml’lik toplama tüplerine alındı. Üzerlerine 30-50 µl RNase içermeyen su eklendi ve 10000rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
- Böylece bir tüp ilaçlı ve 1 tüp ise kopolimer ilaçlı olmak üzere RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra Nanodrop cihazında absorbans ve konsantrasyonları ölçüldü.

	<u>260/280nm</u>	<u>260/230nm</u>	<u>Konsantrasyon (ng/ml)</u>
İlaç;	1.91	1.44	26.42
Kopolimer ilaç;	1.7	1.66	261

Daha sonra tüpler cDNA izolasyonu ve PCR aşamalarında kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

3.7.3. cDNA Eldesi

cDNA’yı elde etmek için RT2 First Strand cDNA Kit kullanılarak üretici firmanın verdiği bilgiler doğrultusunda işlemler yapıldı [119].

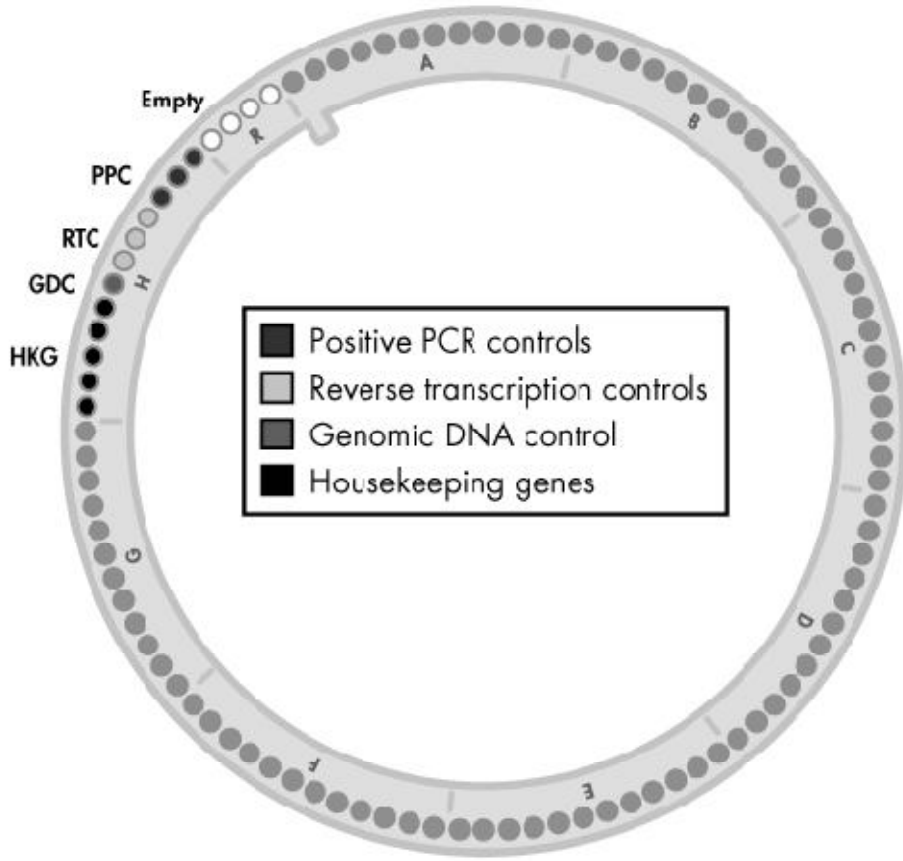
1)İlk olarak kit içindeki maddeler içindekilerin dibe toplanması için 10-15 saniye kadar santrifüj edildi.

2)-20°C’de sakladığımız RNA örneklerimizden 1’er µl, genomic DNA eliminasyon bufferdan 2µl, RNase içermeyen sudan ise 7 µl alınarak toplam hacmi 10’ar µl olacak şekilde genomik DNA eliminasyon mix’ i hazırlandı.Pipetaj yapıldı.

- 3) Daha sonra genomik DNA eliminasyon mix'i 42°C'de 5 dakika inkübe edildi ve sonra hemen buz ortamına alınarak 1 dakika bekletildi.
- 4) Diğer yandan Buffer BC3'ten 8µl, kontrol P2'den 2µl, reverse transkriptazdan 4 µl ve RNase içermeyen sudan ise 6µl eklenerek reverse transkripsiyon mix elde edildi.
- 5) Elde edilen bu reverse transkripsiyon mixinden 10'ar µl alınarak içinde 10 µl genomik DNA eliminasyon mix' i bulunan tüplere eklendi. Pipetaj yapıldı.
- 6) Daha sonra 42 °C'de 15 dakika ve 95 °C'de 5 dakika olacak şekilde inkübasyon yapıldı.
- 7) Örneklerin üzerlerine 91'er µl RNase içermeyen su eklendi. Pipetaj yapıldı.
- 8) Daha sonra örneklerimiz buza alınarak Real-Time PCR aşamasına geçildi.

3.7.4. Kantitatif Real Time PCR işlemi

- 1) İlk olarak SYBR Green Mastermix, su, ve cDNA sentez örneklerimiz 10–15 saniye kadar santrifüj edildi.
- 2) SYBR Green Mastermix'den 1150µl, cDNA sentez örneklerimizden 102µl ve RNase içermeyen sudan ise 1048µl alınarak 5ml'lik tüpe aktarıldı. Böylece PCR mix'i hazırlanmış oldu.
- 3) Real time Profiler PCR plakları Qiagility cihazına yerleştirildi, Hazırlanan PCR mix'i de aynı cihaza konuldu. Program ayarlanarak kuyucuklara 20'şer µl dağıtıldı (Şekil3.1).
- 4) Daha sonra plakaların üzerine kapama filmi konuldu ve Rotor Disc Heat Sealer cihazında iyice filmin oturması sağlandı.
- 5) Son olarak plakalar Rotor-Gene Cyler cihazına konularak döngüsü aşağıdaki gibi ayarlandı:
1 siklus; 95°C'de 10 dakika(Taq polimeraz aktive olur)
40 siklus; 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 30 saniye
İşlem sonunda her bir kuyucuk için threshold cycle (CT) değerleri okundu. Daha sonra bu değerler analiz programına yüklenerek sonuçlar değerlendirildi.



Şekil 3.1: Real-Time Profiler PCR Array Format R [119].

3.8. İstatistiksel Analizler

Sonuçların istatistiki değerlendirilmesi SPSS (Statistical Packages of Social Sciences version 16.0 for Windows) programı, Mann-Whitney U Testi ve Student's T test ile yapıldı. "p<0,05" değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Çalışmamızda kopolimer ilaç çiftimiz olan MAAFE-HX'in yapısal özellikleri, antimikrobiyal ve antitümör aktiviteleri ve sitotoksik etkisi araştırılmış, bu konjugatın apoptotik süreçte görevli olan genler üzerine olan etkisi incelenmiştir. Buna göre ilaç çiftinin; *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212), *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *C. albicans* (ATCC 10231) üzerine antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı Disk Difüzyon Yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca kopolimer ilaç konjugatının antitümör ve sitotoksik etkileri XTT yöntemiyle belirlenmiş, buna göre ilaç konjugatının saf ilaca göre daha yüksek antitümör etkiye ve daha düşük toksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Konjugatın yapısal karakterizasyonu FTIR ve ¹H-NMR ile incelenmiş, polimerleşme açısından uygun olduğu ve halkaların açılma durumunun belirgin olduğu görülmüştür. Ayrıca kopolimer ilaç konjugatı ve saf ilaç uygulanan MG-63 kemik kanseri hücrelerinin apoptotik mekanizmalarında etkili olan hedef genlerin ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Kopolimer ilaç konjugatı uygulanan hücrelerde APAF-1, kaspaz 3 ve 7'nin ekspresyon düzeylerinin saf ilaç uygulanan hücrelere göre daha yüksek olduğu, diğer yandan apoptozu inhibe eden bir gen olan Bcl-2'nin ekspresyonunun ise konjugat uygulanan hücrelerde saf ilaç uygulananlara göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak sentezlenen kopolimer ilaç konjugatı olan MAAFE-HX'in kanser tedavisi yaklaşımlarına alternatif bir ilaç olabileceği düşünülmektedir.

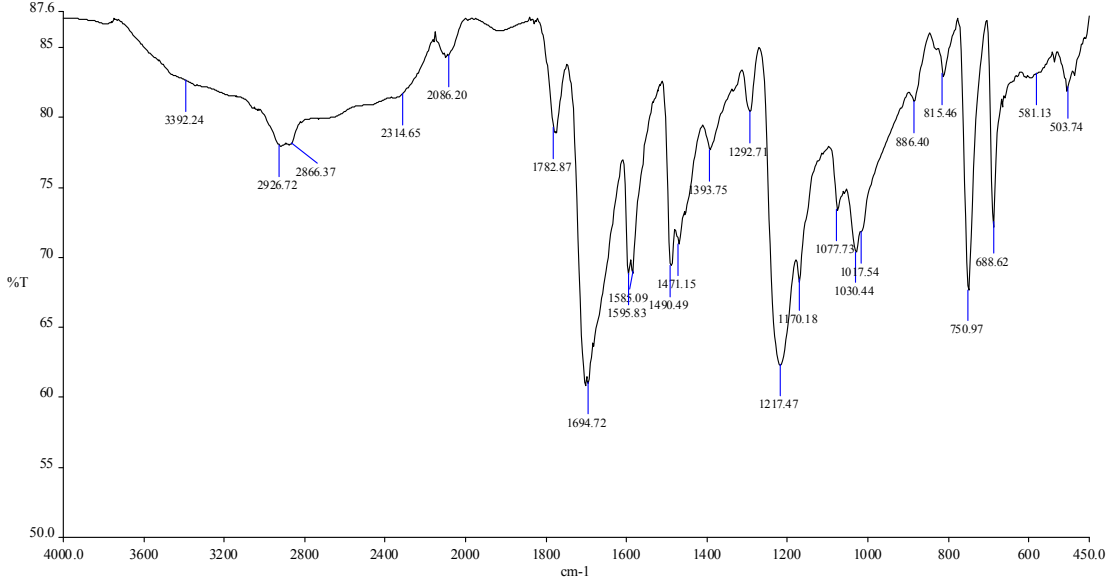
4.1. Kopolimer İlaç Çiftinin Yapısal Karakterizasyonu

Maleik anhidrit-alil fenil eter kopolimerinin yapısal karakterizasyonu Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR) ve Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (¹H-NMR) ile yapıldı.

4.1.1. Kopolimer İlaç Çiftinin FTIR analizi

MAAFE kopolimerinde karakteristik olarak yer alması gereken maleik anhidritin anhidrit grubuna ait karbonil grubu (C=O) piki olan titreşimler 1818-1750 cm⁻¹ aralığında gözlenmiştir. Konjugasyondan sonra sisteme hidroksiürenin (HX) girmesiyle birlikte 3392, 2926cm⁻¹ (-COOH), 1782 cm⁻¹ (5 üyeli C=O), 1694cm⁻¹ (amid), 1585 cm⁻¹ (primer amin), 1393 cm⁻¹ (aromatik fenil halkası), 688 ve 815 cm⁻¹

¹(süstitüe benzen) olmak üzere konjugasyon gerçekleşmiştir. Tüm sonuçlar konjugasyonun amidleşme mekanizması üzerinden yürüdüğünü doğrulamaktadır.

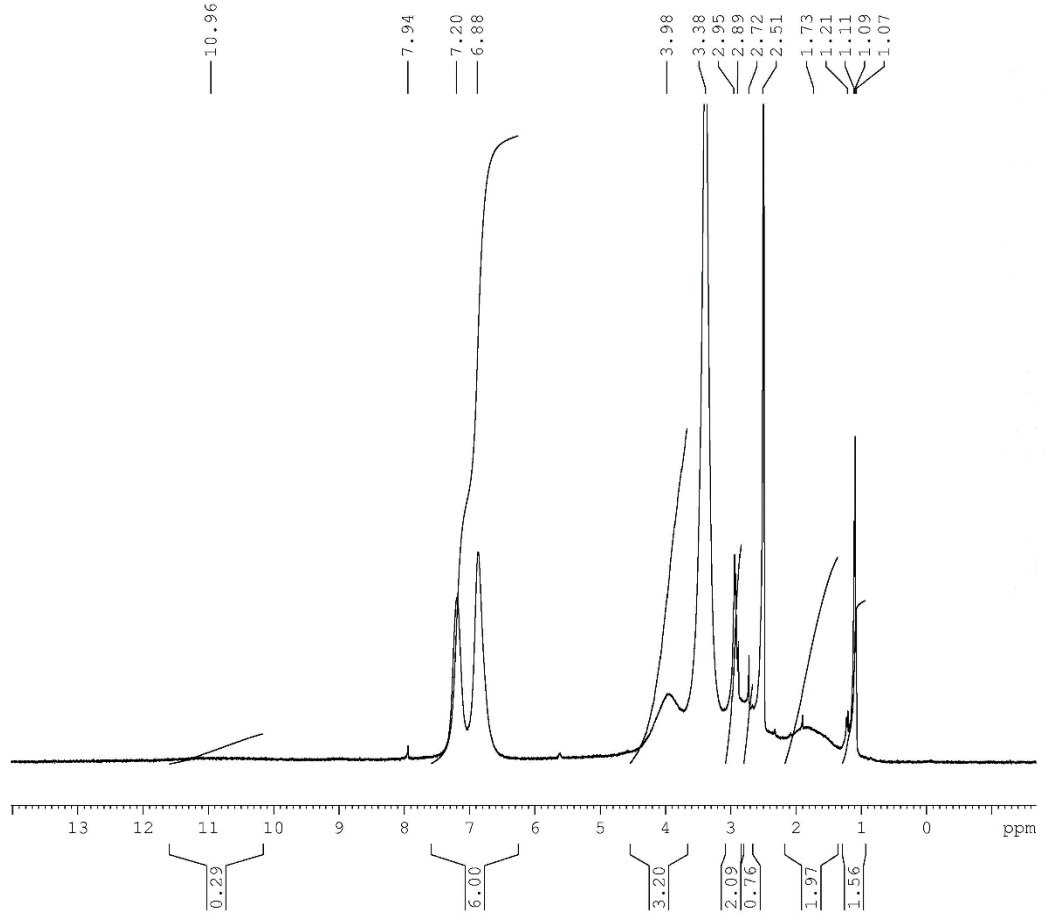


Şekil 4.1. Maleik anhidrit-alil fenil eter kopolimer ilaç çiftinin FTIR spektrumu

4.1.2. Kopolimer İlaç Çiftinin ¹H NMR Analizi

MAAFE kopolimerinde karakteristik olarak yer alması gereken maleik anhidritin anhidrit grubuna ait karbonil grubu (C=O) açılmış onun yerine 10.96 ppm civarında –COOH (karboksil grubu) gözlenmiştir. Aromatik proton hidroksiüreden geldiği için konjugasyon için 7.20 ve 7.94 ppm oldukça önemli bir kanıttır. 6.88 ppm amid piki de amidleşme mekanizmasını doğrulamaktadır. Hidroksiüreden kaynaklı –OH grubu da 3.98 ppm’de görülmüştür. Tüm sonuçlar konjugasyonun amidleşme mekanizması üzerinden yürüdüğünü doğrulamaktadır.

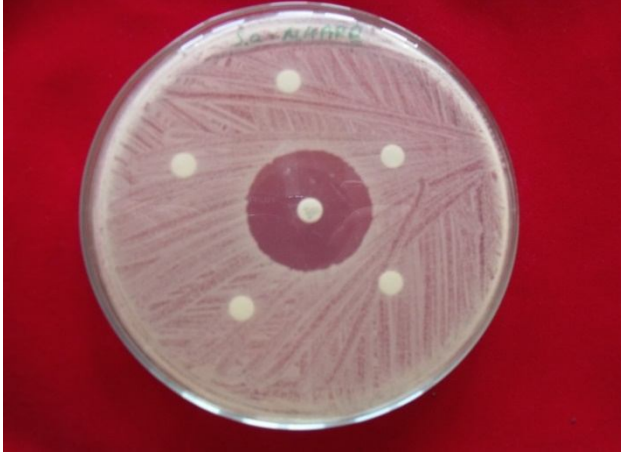
maafe-hx



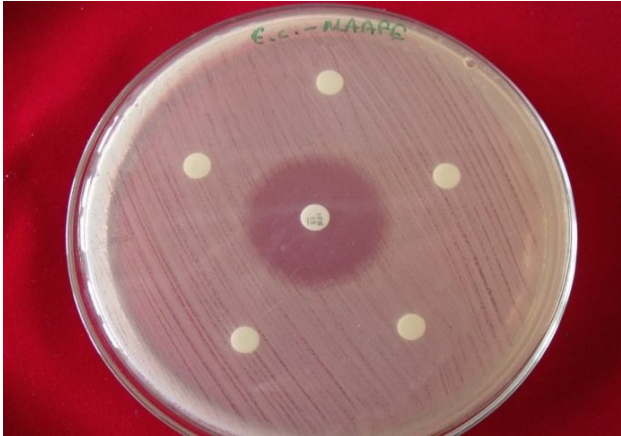
Şekil 4.2. Maleik anhidrit-alil fenil eterkopolimer ilaç çiftinin proton NMR spektrumu.

4.2. Kopolimerin Antimikrobiyal Aktivitesi

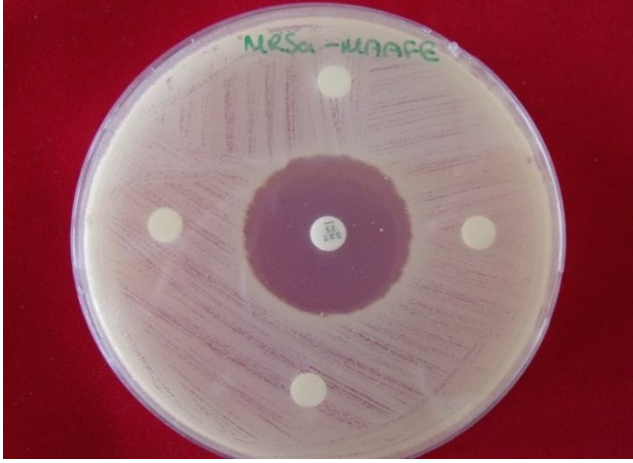
Maleik anhidrit-alil fenil eter kopolimerinin antimikrobiyal aktivitesini incelemek için *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212), *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *C. albicans* (ATCC 10231) ile Disk Difüzyon Yöntemi kullanılarak çalışılmıştır. MA-AFE kopolimerinin optimum sulandırımının 25 µl oranında emdirildiği diskler etrafında inhibisyon zonu oluşmamıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotik disklerinin etrafında inhibisyon zonları oluşmuştur.



Şekil 4.3. MA-AFE'nin *Staphylococcus aureus*'a antibakteriyel etkisi; plağın ortasına pozitif kontrol olarak konulan antibiyotik diski etrafında önlenim zonu oluşurken, diğer yandan saat yönünde olacak şekilde MA-AFE'nin 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16'lık sulandırılmılarından 25µl emdirilen diskler diskler etrafında ise zon oluşmamıştır.



Şekil 4.4. MA-AFE'nin *Escherichia coli*'ye antibakteriyel etkisi; plağın ortasına pozitif kontrol olarak konulan antibiyotik diski etrafında önlenim zonu oluşurken, diğer yandan saat yönünde olacak şekilde MA-AFE'nin 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16'lık sulandırılmılarından 25µl emdirilen diskler diskler etrafında ise zon oluşmamıştır.



Şekil 4.5. MA-AFE'nin *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*'a antibakteriyel etkisi;plağın ortasına pozitif kontrol olarak konulan antibiyotik diski etrafında önlenim zonu oluşurken, diğer yandan saat yönünde olacak şekilde MA-AFE'nin 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16'lık sulandırımından 25µl emdirilen diskler etrafında ise zon oluşmamıştır.



Şekil 4.6. MA-AFE'nin *Pseudomonas aeruginosa*'ya antibakteriyel etkisi;plağın ortasına pozitif kontrol olarak konulan antibiyotik diski etrafında önlenim zonu oluşurken, diğer yandan saat yönünde olacak şekilde MA-AFE'nin 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16'lık sulandırımından 25µl emdirilen diskler etrafında ise zon oluşmamıştır.



Şekil 4.7. MA-AFE'nin *Enterococcus faecalis*'e antibakteriyel etkisi;plağın ortasına pozitif kontrol olarak konulan antibiyotik diski etrafında önlenim zonu oluşurken, diğer yandan saat yönünde olacak şekilde MA-AFE'nin 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16'lık sulandırılmalarından 25µl emdirilen diskler diskler etrafında ise zon oluşmamıştır.



Şekil 4.8. MA-AFE'nin *Candida albicans*'a antifungal etkisi;MA-AFE'nin 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16'lık sulandırılmalarından 25µl emdirilen diskler diskler etrafında ise zon oluşmamıştır.

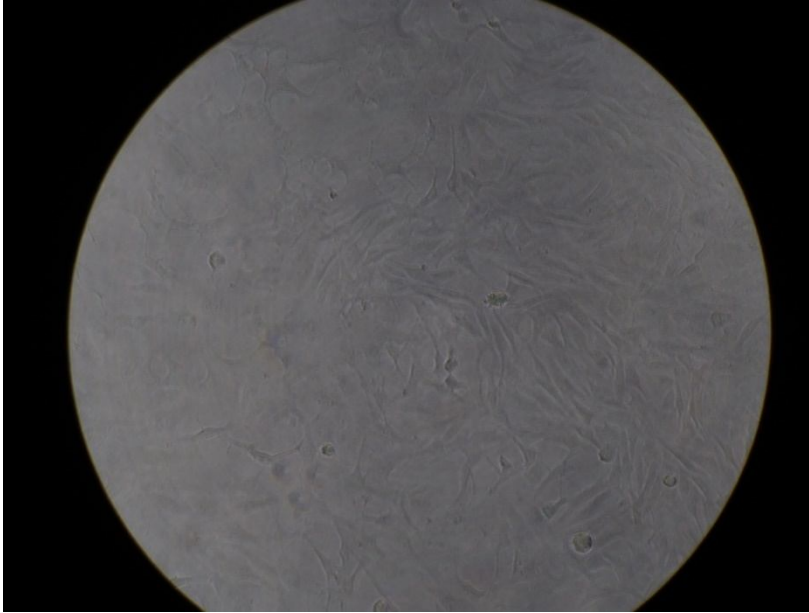
Sonuçlarımıza göre MA-AFE kopolimerinin bu mikroorganizmalar üzerine antibakteriyel ve antifungal etkisi tespit edilmemiştir.

4.3.Kopolimer-İlaç Konjüгатının MG-63 Kemik Kanseri Hücre Hatları Üzerine Antitümör Etkisinin Araştırılması

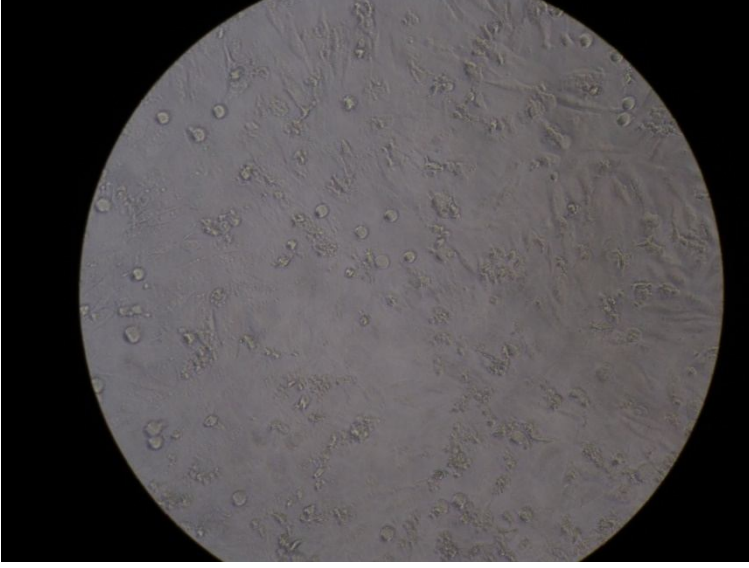
MG-63 hücreleri çoğaltılarak mikropklara ekildi, 37 °C 'de inkübe edildi. Daha sonra üzerlerine MA-AFE-HX eklendi ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda hücrelerin morfolojik durumları invert mikroskopta incelendi.

4.3.1. XTT Yöntemi

MG-63 hücreleri çoğaltılarak mikropklara ekildikten sonra plağın yarısına ilaç(hidroksiüre), diğer yarısına ise kopolimer ilaç hazırlanan farklı konsantrasyonlarda eklendi ve plak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Şekil 4.9'da MG-63 hücrelerinin konjugat uygulanmadan önceki durumuna bakıldığında hücrelerin çoğunun canlı bir şekilde görüldüğü belirlendi. Diğer yandan şekil 4.10'da ise MG-63 hücrelerinin MA-AFE-HX eklendikten sonra orijinal şekillerini kaybettiği ve yüzen ölü, yuvarlak hücrelerin olduğu görüldü.



Şekil 4.9. MG-63 hücrelerinin kopolimer ilaç uygulanmadan önceki morfolojik görüntüsü



Şekil 4.10. MG-63 hücrelerinin kopolimer ilaçla 24 saat inkübasyonu sonrası morfolojik görüntüsü

İnkübasyondan sonra XTT solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyondan her kuyucuğa eklendi ve 4 saat inkübe edildi. ELISA cihazı ile 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü.

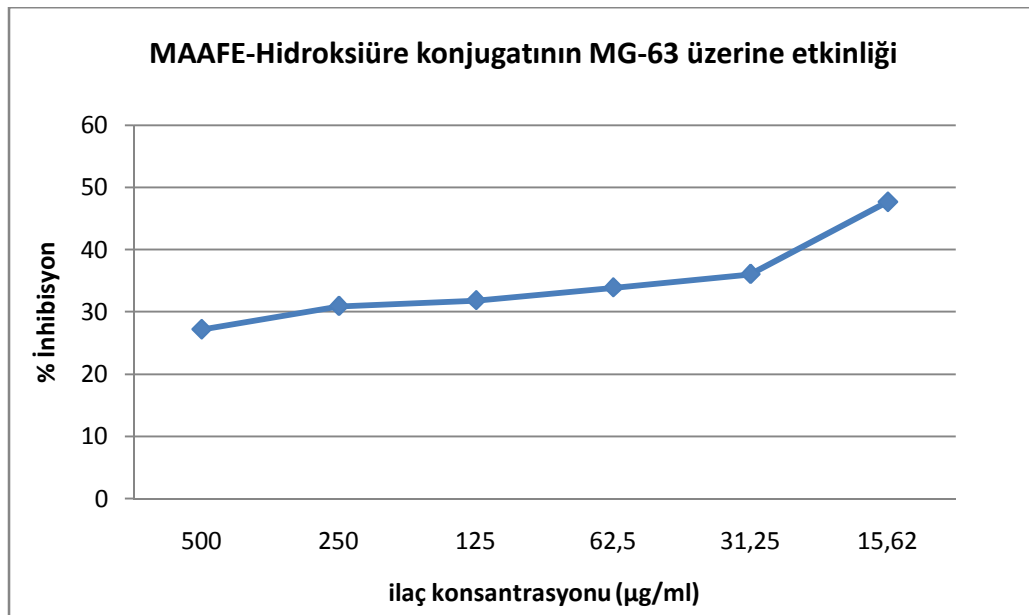
4.3.1.1. MA-AFE-HX Kopolimer İlaç Konjugatının MG-63 Hücreleri Üzerine Antitümör Aktivitesi

XTT solüsyonu eklendikten sonra ilaç ve kopolimer-ilaç çiftlerinin farklı konsantrasyonlarının oluşturduğu renk değişimi ELISA da 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Formülden yararlanılarak % İnhibisyon hesaplandı ve ilgili grafik elde edildi (Çizelge 4.1, şekil 4.11).

Çizelge 4.1 :MAAFE-HX kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının MG-63 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % inhibisyon oranları

İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	İnhibisyon (%)
500 µg/ml	0,7049	27,23
250 µg/ml	0,6689	30,95
125 µg/ml	0,6568	31,88
62,5 µg/ml	0,6398	33,95
31,25 µg/ml	0,6191	36,09
15,62 µg/ml	0,5068	47,68
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,9687	0
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1945	79,92

MAAFE-HX kopolimer ilaç konjugatının MG-63 hücreleri üzerindeki antitümör etkisi,çeşitli konsantrasyonlarına bağlı olarak inhibisyon (kanser hücrelerini öldürme)yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede kopolimer ilacın konsantrasyonu arttıkça antitümör aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Bu durum bize bu konjugatın düşük konsantrasyonlarda daha etkili olduğunu göstermektedir.

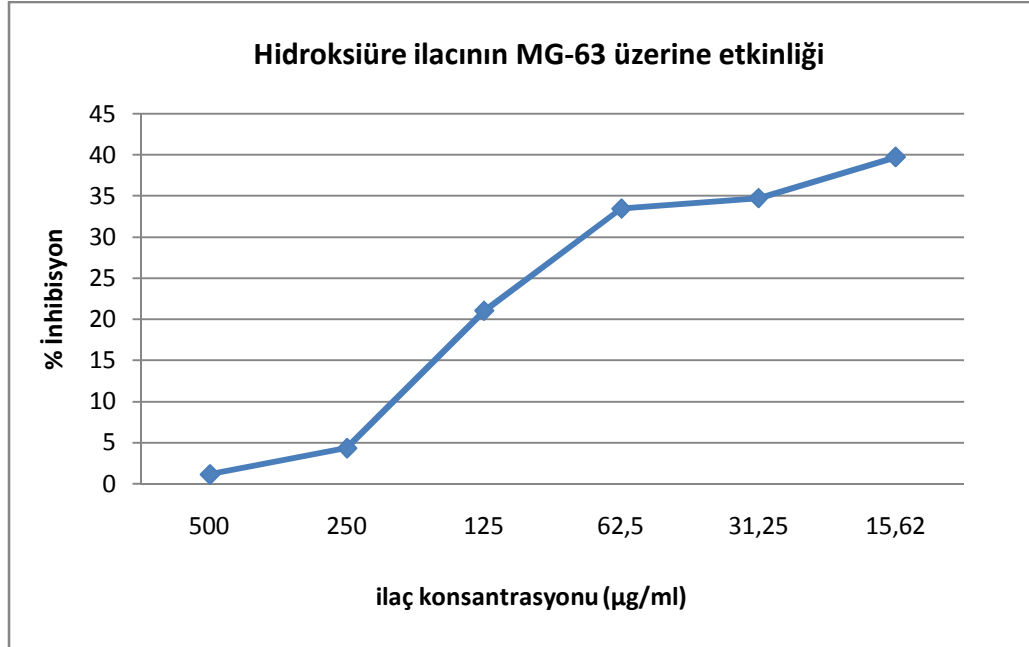


Şekil 4.11. MAAFE-HX'in farklı konsantrasyonlarınınMG-63 hücrelerini öldürmeyüzdesi

Şekilde görüldüğü gibi kopolimer ilaç düşük konsantrasyonlarda daha etkilidir. Daha düşük dozda kullanımının ise tedavide toksisiteye düşürebileceği düşünülebilir.

Çizelge 4.2:HX (Hidroksiüre) ilacının çeşitli konsantrasyonlarının MG-63 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % inhibisyon oranları

İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	İnhibisyon (%)
500 µg/ml	0,9578	1,13
250 µg/ml	0,9268	4,32
125 µg/ml	0,7650	21,03
62,5 µg/ml	0,6446	33,46
31,25 µg/ml	0,6323	34,73
15,62 µg/ml	0,5873	39,73
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,9687	0
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1945	79,92

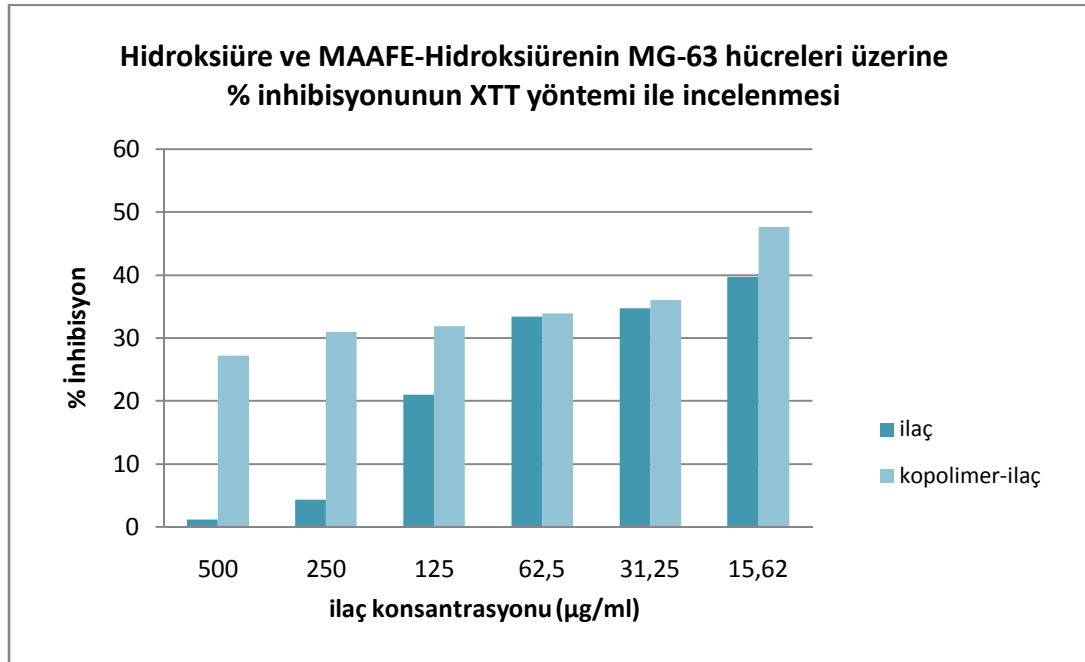


Şekil 4.12. Hidroksiürenin farklı konsantrasyonlarınınMG-63 hücreleriniöldürmeyüzdesi

Saf ilaç olan hidroksiüre uygulanan kanser hücrelerinde 15,62 µg/ml dozunda %39.73'lük bir inhibisyon gözlenmiştir. Aynı konsantrasyonda kopolimer ilacın öldürme oranı ise daha yüksek olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3 :HX (Hidroksiüre) ilacının ve MAAFE-HXkopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının MG-63 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % inhibisyon oranları

(Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması (İLAÇ)	Optik Dansite Ortalaması (KOPOLİMER-İLAÇ)	İnhibisyon (%) (İLAÇ)	İnhibisyon (%) (KOPOLİMER-İLAÇ)
500 µg/ml	0,9578	0,7049	1,13	27,23
250 µg/ml	0,9268	0,6689	4,32	30,95
125 µg/ml	0,7650	0,6568	21,03	31,88
62,5 µg/ml	0,6446	0,6398	33,46	33,95
31,25 µg/ml	0,6323	0,6191	34,73	36,09
15,62 µg/ml	0,5873	0,5068	39,73	47,68
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,9687	0,9687	0	0
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1945	0,1945	79,92	79,92



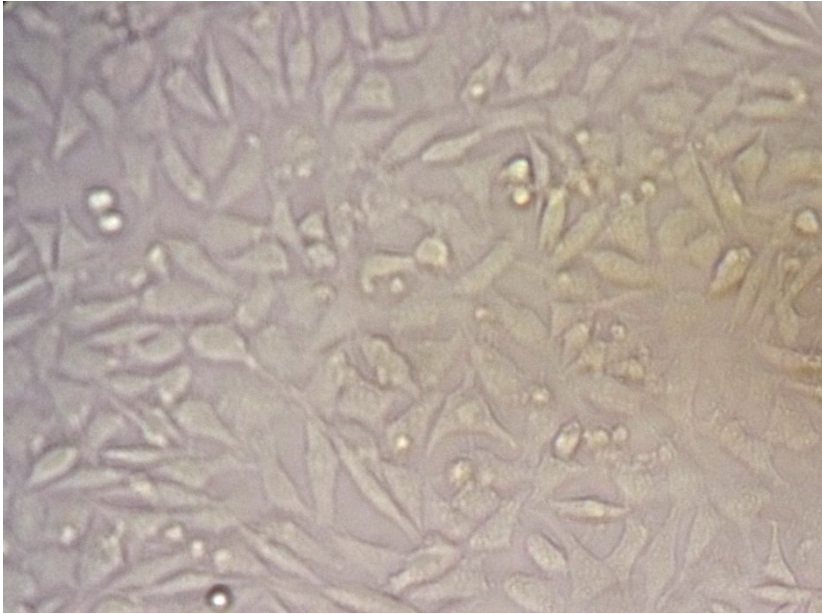
Şekil 4.13. Hidroksiüre ve MAAFE-HX ‘in farklı konsantrasyonlarınınMG-63 hücrelerini öldürme yüzdesi

Çizelge 4.3 ile şekil 4.13'deki verilere göre kopolimer ilaç çiftinin inhibisyon yüzdeleri saf ilaca göre yüksek bulunmuştur. 500 µg/ml konsantrasyonda ilacın inhibisyon düzeyi %1.13 iken, kopolimer ilacın ise %27.23 olarak bulunmuştur. İlaç ve kopolimer ilaç konjugatları arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Yine aynı şekilde maksimum inhibisyonun sağlandığı dozda da kopolimer ilaç çiftinin inhibisyon yeteneğinin saf ilaca göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak kopolimer ilaç çiftimiz olan MAAFE-HX'in antitümör aktivitesinin saf ilaca göre yüksek olduğu belirlenmiştir.

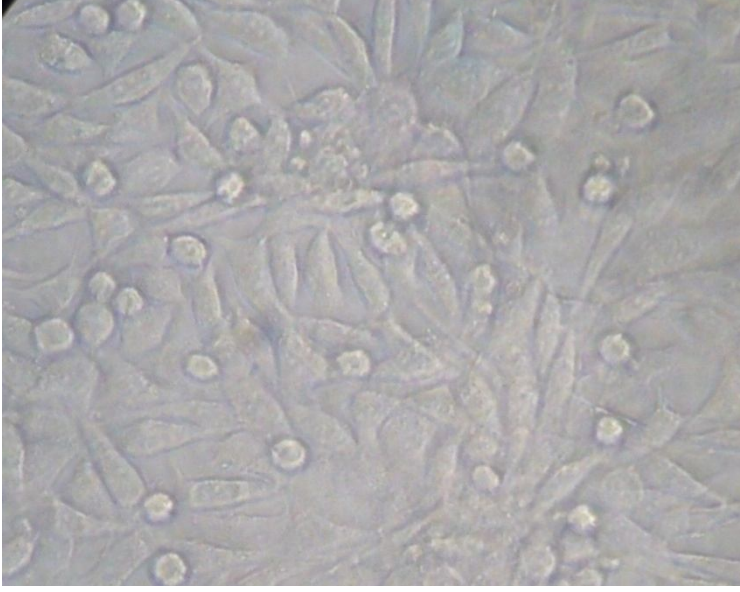
4.4. Kopolimer-İlaç Konjugatının ve İlacın L929 Fibroblast Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Etkisinin Araştırılması

L929 hücreleri hazırlanarak mikropalak kuyucuklarına ekildi, kopolimer-ilaç çiftleri ve sadece ilaç içeren çözeltiler hazırlandı ve farklı konsantrasyonlarda 100'er µl olarak kuyucuklara eklendi ve plak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İşlem sonucunda hücrelere XTT testi yapıldı.

Şekil 4.14'te L929 fibroblast hücrelerinin konjugat uygulanmadan önceki durumuna bakıldığında hücrelerin canlılığının yüksek olduğu az sayıda ölü hücre görüldüğü belirlendi. Diğer yandan şekil 4.15'te ise, L929 fibroblast MA-AFE-HX eklendikten sonra kısmi olarak da olsa yüzen ölü hücrelerin arttığı saptandı.



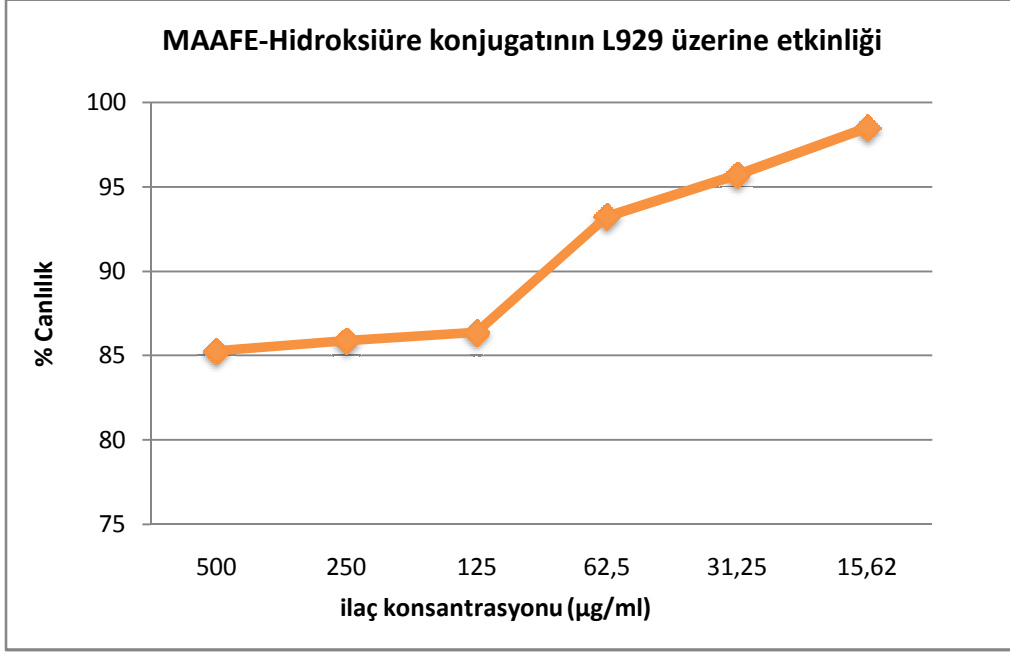
Şekil 4.14. L929 hücrelerinin kopolimer ilaç uygulanmadan önceki morfolojik görüntüsü



Şekil 4.15.L929 hücrelerinin kopolimer ilaçla 24 saatinkübasyonu sonrası morfolojik görüntüsü

Çizelge 4.4:MAAFE-HXkopolimer-ilac çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları

İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	Canlılık (%)
500 µg/ml	0,4243	85,26
250 µg/ml	0,4274	85,88
125 µg/ml	0,4298	86,36
62,5 µg/ml	0,4641	93,25
31,25 µg/ml	0,4763	95,71
15,62 µg/ml	0,4906	98,51
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,4977	100
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1145	23,01

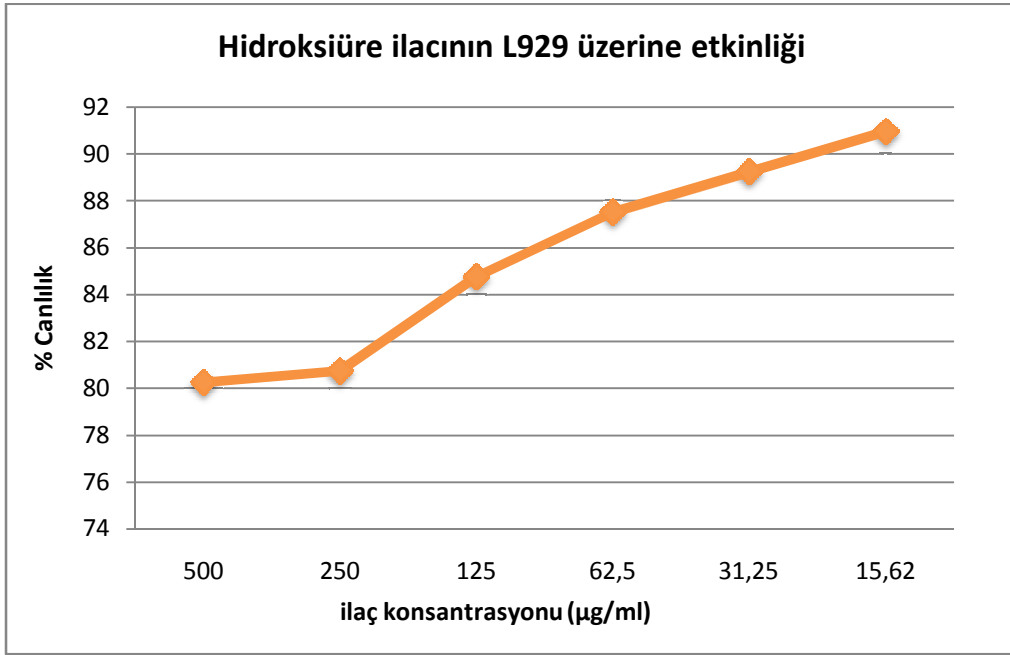


Şekil 4.16. MAAFE-HX konjugatının farklı konsantrasyonlarının L929 hücrelerini öldürme yüzdesi

Çizelge 4.4 ve Şekil 4.16’te görüldüğü gibi, kopolimer ilaç konjugatının konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığı yüzdesi artmakta, yani toksik etkisi azalmaktadır. Ancak bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir.

Çizelge 4.5 :HX (Hidroksiüre) ilacının çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları

İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	Canlılık (%)
500 µg/ml	0,3994	80,25
250 µg/ml	0,4018	80,74
125 µg/ml	0,4219	84,77
62,5 µg/ml	0,4356	87,53
31,25 µg/ml	0,4442	89,25
15,62 µg/ml	0,4509	90,96
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,4977	100
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1145	23,01



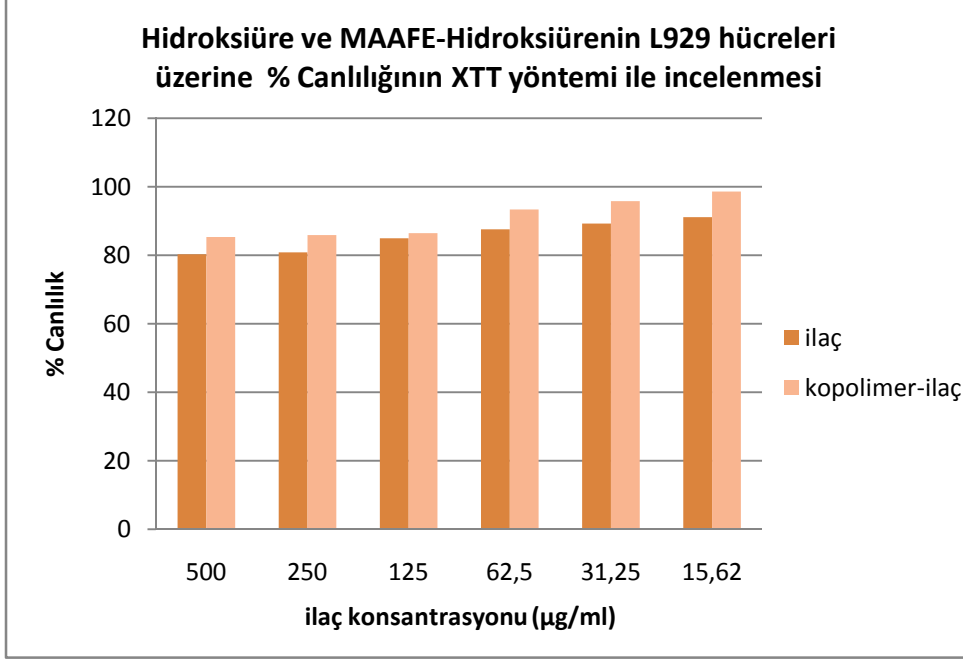
Şekil 4.17. Hidroksiürenin farklı konsantrasyonlarının L929 hücrelerini öldürme yüzdesi

Çizelge 4.5 ve şekil 4.17’de görüldüğü gibi, 500 µg/ml daki canlılık 80.25 iken, 15,62 µg/ml ‘de ise %90.96 olarak bulunmuştur. Hidroksiüre konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığı yüzdesi artmakta, yani toksik etkisi azalmaktadır.

Çizelge 4.6 :HX (Hidroksiüre) ilacının ve MAAFE-HX kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları

(Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması (İLAÇ)	Optik Dansite Ortalaması (KOPOLİMER-İLAÇ)	Canlılık (%) (İLAÇ)	Canlılık (%) (KOPOLİMER-İLAÇ)
500 µg/ml	0,3994	0,4243	80,25	85,26
250 µg/ml	0,4018	0,4274	80,74	85,88
125 µg/ml	0,4219	0,4298	84,77	86,36
62,5 µg/ml	0,4356	0,4641	87,53	93,25
31,25 µg/ml	0,4442	0,4763	89,25	95,71
15,62 µg/ml	0,4509	0,4906	90,96	98,51
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,4977	0,4977	100	100
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1145	0,1145	23,01	23,01

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi ilaç maksimum doz olan 500 µg/ml'de hücrelerin %80.25'i canlı iken; kopolimer ilaçta ise bu oran %85.26'dır. Yine aynı şekilde diğer dozlarda da kopolimer ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranı daha yüksek olarak bulunmuştur. Ancak bu fark anlamlı olarak bulunmamıştır ($p > 0.05$).



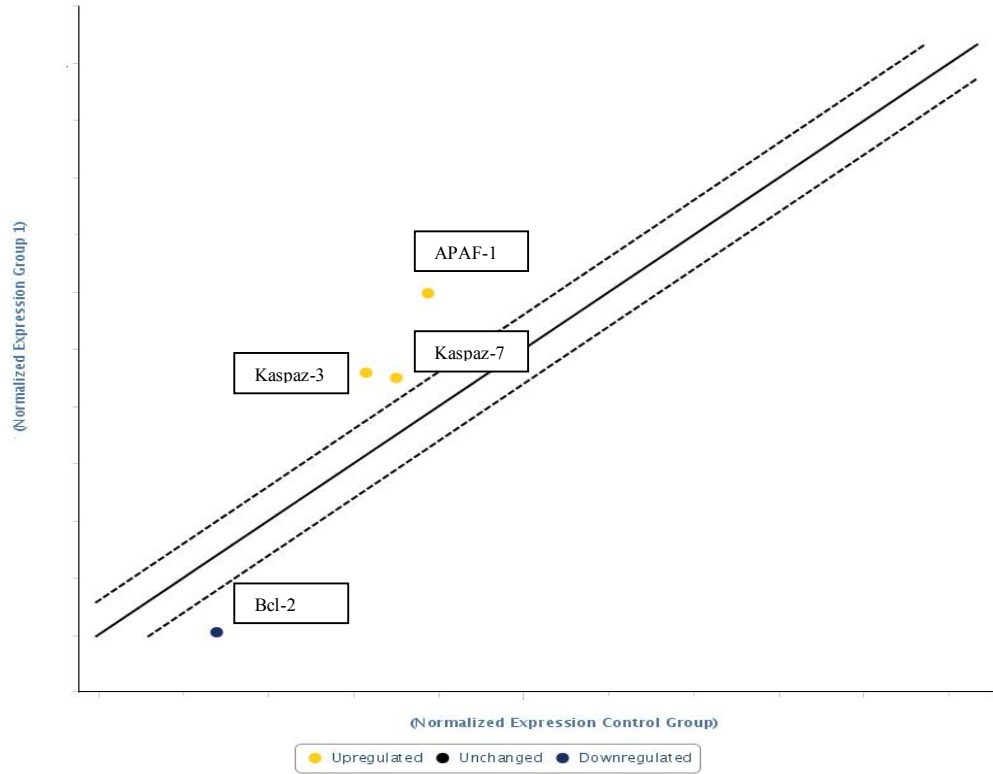
Şekil 4.18. Hidroksiüre ve MAAFE-HX kopolimer ilaç konjugatının farklı konsantrasyonlarının L929 hücrelerini öldürme yüzdesi

Sonuç olarak fibroblast hücrelerinde, kopolimer ilaç çiftinin maksimum konsantrasyonda dahi saf ilaca göre daha fazla canlı hücre bulundurduğu belirlenmiştir. Bu da kopolimer ilaç konjugatımız olan MAAFE-HX'in normal hücrelere toksik etkisinin saf ilaçtan daha az olduğunu göstermektedir.

4.4 Gen Ekspresyon Analizleri

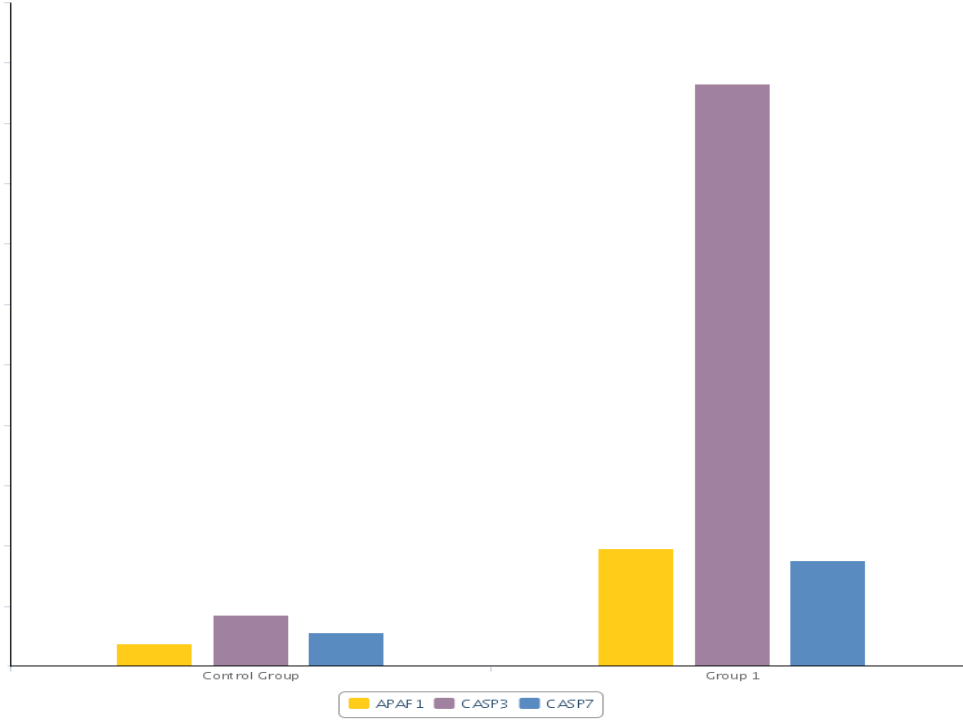
MG-63 hücreleri mikropklarda hidroksi üre ve MA-AFE ile muamele edildikten 24 saat sonra toplanmış ve bunlardan RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra cDNA izolasyonu yapıp son olarak da Real-Time PCR ile genlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Burada ilaç uygulanan hücrelerimizi kontrol grubu; kopolimer ilaç uyguladığımız hücrelerimizi ise grup 1 olarak kıyasladık.

Buna göre fazla eksprese olması halinde apoptozu inhibe eden Bcl-2'nin MA-AFE uygulanan hücrelerde hidroksiüre uygulanan hücelere göre daha fazla baskılandığı görülmüştür. Diğer yandan kaspaz 3,7 ve APAF-1genlerinin ekspresyonlarının ise konjugat uygulanan hücelerde ilaç uygulananlara göre indüklendiği belirlenmiştir (Şekil 4.19) İlaç ve kopolimer ilaç konjugatı uygulanan hücelerdeki bu fark ise anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).



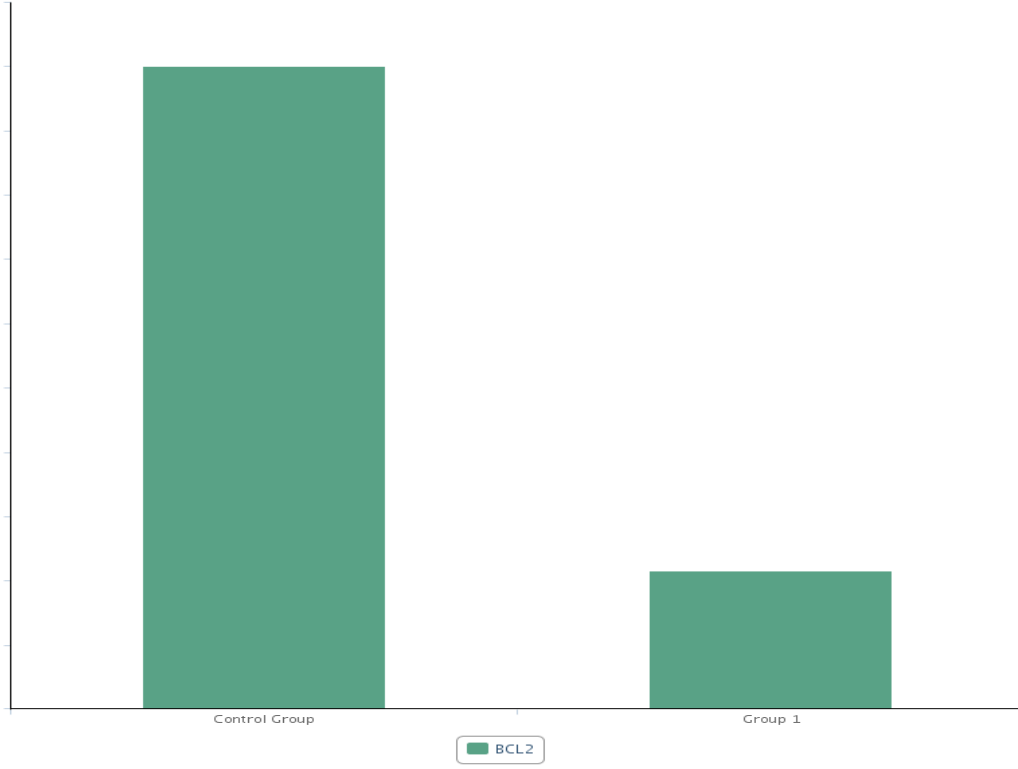
Şekil 4.19.İlaç ve konjugat uygulanan MG-63 hücelerinde ekspresyon düzeyleri; eğrinin altında kalan noktalar baskılanan genleri, üstünde kalanlar ise indüklenen genleri göstermektedir.

Şekil 4.19'da eğrinin altında kalan noktayı Bcl-2 'yi göstermektedir. Buna göre kopolimer ilaç konjugatının bu geni baskılayarak apoptoz sürecini tetikleyebileceği düşünülmektedir. Diğer yandan eğrinin üstünde kalan noktalar ise kaspaz 3, 7 ve APAF-1'i göstermektedir. Yani kopolimer ilaç konjugatı apoptotik yolağı aktive eden genleri indüklediği görülmektedir.



Şekil 4.20.ilaç(kontrol grubu) ve kopolimer ilaç(grup1) uyguladığımız MG-63 hücrelerinde kaspaz 3,7 ile APAF-1'in ekspresyon düzeyleri

Şekil 4.20'ye göre,kontrol grubunda apoptozu indükleyici genler olan APAF-1 ile kaspaz3 ve 7 'nin ekspresyonunun grup 1'e göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durumda bize kopolimer ilaç konjugatımızın apoptoz indükleyen genleri aktive ettiğini göstermiştir.



Şekil 4.21.İlaç(kontrol grubu) ve kopolimer ilaç(grup1) uyguladığımız MG-63 hücrelerinde Bcl-2'nin ekspresyon düzeyleri.

Sadece ilaç uygulanan grubumuz olan kontrol grubunda Bcl-2'nin ekspresyonu anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bilindiği gibi Bcl-2 apoptozu inhibe eden bir genidir. Ve grup 1'de kopolimer ilacın bu genin ekspresyonunu baskıladığı görülmektedir. Yani apoptotik mekanizma tetiklenmektedir.

5. TARTIŞMA

Kanser hastalığının tedavisinde, son yıllarda birçok ilaç ve hedefe yönelik tedaviler geliştirilmesine rağmen, ilerlemiş kanser hastalarının tedavi imkânları oldukça düşüktür. Bu durumun nedeni ise kanser mekanizmasının oldukça kompleks olması ve henüz bu mekanizmada bilinmeyen ve aydınlatılması gereken bir çok nokta olmasından kaynaklanmaktadır [120].

Kanser tedavisinde sağkalım oranını arttırmak ve mortaliteyi azaltmak amacıyla farklı birçok tedavi modelleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlere; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi-hormon tedavisi ve yeni tedavi yöntemlerinden immunoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörlerinin kullanımı, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri kullanımı örnek olarak verilebilir [121,122].

Günümüzde kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapi maddeleri tüm vücuda yayılmasından dolayı toksik etkileri ile sağlıklı hücrelere de etkili olmakta ve bu hücreleri apoptosise götürebilmektedir. Bu yüzden toksik etkisi azaltılmış yeni polimerlerin araştırılması günümüzde önem kazanmıştır. Ancak bu polimerlerin de kanserli hücreleri nasıl ve hangi yollarla, sistem ya da genlerle aktive ettiğinin anlaşılması tedavi yaklaşımlarının önünü açacaktır[123].

MA içerikli kopolimerler serbest radikal polimerizasyon tepkimeleri ile başlatıcılar kullanılarak sentezlenmektedir. Polianhidritler olarak da bilinen MA kopolimerleri reaktif anhidrit halkası nedeniyle halka açılma tepkimeleri için oldukça elverişlidirler. Bu özelliklerine ek olarak ekonomik olmaları da onları birçok alanda yaygın olarak kullanılabilir hale getirerek ticari olarak da artık ulaşılabilir haldedirler [37].

Çalışmamızda kullandığımız hidroksiüre gibi kemoterapi ilaçlar hedefe yönelik olmaktan ziyade tüm dokulara saldırmaktadır. Bu nedenle bunların yan etkileri de çok olmaktadır. Ringsdorf tarafından ortaya atılan suda çözülen polimer fikriyle tedavi yöntemlerinin geliştirilebileceği düşünülmektedir. Biyoaktif polimerler olarak da bilinen bu makromoleküllerin ilaç etken maddeleri ile etkileştirilerek geliştirilmesiyle kanser tedavisinin yani antitümör aktivitenin artırılması, düşük kan düzeyi sağlanarak yan etkilerinin azaltılması amaçlanmaktadır [9].

Karakuş G., yaptığı çalışmada 5 farklı Maleik anhidrit ilaç konjugatlarıyla çalışmış, bunların sağlıklı fare fibroblast hücre serisi (L929) ve laktat dehidrogenaz (LDH) üzerine toksik olmadığını söylemiştir. MAAA/AF konjugatının antimikrobiyal testlerini yapmış olup *Entereococcus faecium*, *Enterohaemorrhagic Escherichia*

coli(EHEC), *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* suşları üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [37].

Yüksel B., yaptığı tez çalışmasında maleik anhidrit monomeri içeren Poli(NVP-co-MA) kopolimeri sentezlemiş ve antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır. Buna göre sentezlenen kopolimerin artan derişimine bağılı olarak antimikrobiyal aktivitenin de arttığı disk difüzyon yöntemi ile göstermiştir [124]. Biz çalışmamızda maleik anhidrit kullanarak MA-AFE'yi sentezledik. Ancak herhangi bir aktivite tespit edemedik. Araştırdığımız kaynaklarda da direk olarak MA-AFE nin antimikrobiyal aktivitesiyle ilgili bir çalışmaya rastlamadık.

İn-vitro çalışmalar kombine kopolimer ilaç sistemlerinin sitotoksik aktivitesinin tek ilaçlı tedaviye göre 100 kat daha fazla olduğunu ve antitümör etkisinde yine aynı şekilde belirgin olarak daha baskın olduğunu göstermektedir [125].

Yapılan diğerk bir çalışmada Karakuş ve ark., maleik anhidrit stiren kopolimerinin antiproliferatif aktivitesini incelemiş ve C6 hücresine karşı seçici etki gösterdiğini, Hela hücresine karşı ise aynı etkinliğin gözlemlenmediğini bildirmişlerdir [126].

Hongrapipat J.ve arkadaşları, HPMa kopolimer konjugatını insan over kanseri üzerinde denemiş çeşitli kombinasyonların in-vivo olarak da antitümör aktivitesinin belirlenebileceğini öne sürmüştür [127].

Vandana ve ark., ise hidroksipropil-metakralamid kopolimerine aminoglutethimid bağlamış ve bu konjugatın MCF-7 hücrelerinin apoptoza gitme durumunu tetiklediğini ve bu yapının hormon bağılantılı kanserlerin tedavisinde kullanılabileceğini söylemişlerdir. Siew ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada fibroblast hücrelerinde polikopolimer ilacının etkinliğini araştırmış ve canlılığının daha fazla olduğunu ortaya koymuştur [128,129].

Kaneda ve arkadaşları, farelerdeki tümörlerde tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) bağılı divinil eter maleik anhidrit (DIVEMA) kopolimerinin antitümör aktivitesini araştırmış ve bu kompleksinantitümör aktiviteyi arttırdığını bildirmişlerdir [130].

Biz de çalışmamızda antitümör ve sitotoksik aktiviteyi araştırdık ve kopolimer ilacımızın normal ilaca göre daha fazla antitümör etkiye sahip olduğunu bulduk.

Lee J.H., çalışmasında uygun kopolimer-ilac kombinasyonlarının tanımlanması için moleküler mekanizmaların gösterdiği sonuçlar doğrultusunda başarılı olunabileceğinin altını çizmiştir [131].

Bu nedenle bizde çalışmamızda denediğimiz yeni kombinasyonumuzu desteklemesi için apoptosisi gen ekspresyon analizi ile araştırdık.

Apoptoz genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Apoptozun hücrelerde belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler Hematoksilen Boyama veya Giemsa Boyama gibi morfolojik görüntüleme yöntemleri, TUNEL yöntemi gibi immünohistokimyasal yöntemler, flow sitometri yada aktif kaspazın belirlenmesi gibi biyokimyasal yöntemler, ELISA gibi immünolojik yöntemler ve RNA veya DNA'ya dayalı gen ekspresyonlarının belirlenmesini sağlayan moleküler biyolojik yöntemlerdir [108].

Pautke C. ve arkadaşları ise, kemik tümörlerinin daha iyi anlaşılması, tanısı ve tedavisi için osteosarkom hücreleri olan MG-63, Saos-2 ve U-2 OS'un karakterizasyonunu belirlemeyi amaçlamıştır. Bu amaçla çeşitli immünokimyasal yöntemler ile alkalen fosfataz (ALP) aktivitelerini araştırmışlar ve bu hücrelerin sağlıklı hücrelere göre farklı ALP aktivitelerine ve farklı immünokimyasal özelliklere sahip olduklarını bulmuşlardır. Ancak çalışmanın daha net sonuçlarının elde edilmesi için ise moleküler yöntemlerle gen ekspresyonlarının iyi bir şekilde bilinmesi gerektiğinin üzerinde durmuşlardır [132].

Atmaca H. ve Uzunoğlu S., yaptıkları derlemede kanserde sirkadiyan ritim genlerinin rolünü araştırmışlar bu amaçla *CRY2* geninin ekspresyonundaki değişikliklerin, DNA hasarının kontrolü ve hücre döngüsünde rol alan genlerin ekspresyonunu doğrudan etkilediğini göstermişlerdir. Sirkadiyan ritmi düzenleyen genlerin ayrıca transkripsiyon faktörleri, tümör baskılayıcı genler ve bazı kaspazların sentezi gibi hücre döngüsünde rol alan olayları da kontrol ettiğini bildirmişlerdir. Bu nedenle de sirkadiyan ritim genlerinin hücre çoğalması ve apoptoz gibi kanserle ilişkili biyolojik olayları önemli ölçüde etkilediğini belirtmişlerdir. Bu etkinin ise ancak genlerin ekspresyonlarının moleküler olarak ortaya konmasıyla belirleneceğini söylemişlerdir [133,134].

Doğan İ. ve ark., fibroblast hücre hattı olan L929'da topoizomerez inhibityonunun DNA hasarını ve apoptosisin üzerine etkisini araştırmıştır. Bu çalışmada hücrelere topoizomerez inhibitörü olan etoposid eklenmiş ve 24 saat sonra akrinin turuncusu/etidyum bromür floresan boyalar ve kaspaz 3/7 aktivite deneyleri ile apoptoz değerlendirilmiş ve sorumlu genleri belirlemek içinse Real-Time PCR ile mRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Sonuç olarak etoposidin apoptozu uyardığını

ve burada etkili olabilecek genleri ve bunların ekspresyon düzeylerinin önemli olduğunu ortaya koymuşlardır [135].

Vural P., yaptığı derlemede Transforming Growth Factor- β (TGF β) 'nın sinyalizasyon yolunun bozulmasının kanserde büyük önem taşıdığından bahsetmiştir. Antiproliferatif, proapoptotik ve inflamatuvar cevabı baskılayıcı özellikleri ile TGF β tümör supresyonu sağlamaktadır. Kanserde antitümör ve anti-inflamatuvar cevap baskılanır ve metastaz oluşabilir. Dolayısıyla TGF β 'nın apoptoz ve kanserdeki rolünün bilinmesi için yapılacak genetik ve moleküler çalışmalarla yeni tedavi seçeneklerinin ortaya çıkacağını söylemiştir [136].

Tan J. ve ark., yaptıkları çalışmada polikomp represif kompleks-2'nin kanser hücrelerindeki apoptoz durumunu araştırmıştır. Bu amaçla meme kanserinde geniş çaplı bir gen ekspresyonu analizi yapmışlar sonuç olarak ise bu ilacın apoptosisi indüklediğini gözlemlemişlerdir [137].

Son yıllarda kullanılan kemoterapi ilaçlarının toksik etkisi dolayısıyla geleneksel ve bitkisel temelli yeni ajanların geliştirilmesi ve bunların etki mekanizmaları ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Bu amaçla Chemoprevention denen, tümör indüksiyonunu önlemeyi, kanserin inhibisyonunu sağlamayı ya da kanser progresyonunu geciktirmeyi amaçlayan ilaçların ya da diğer ajanların (doğal ya da sentetik) kullanımı üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bunlar hormonal, bitkisel ya da diyetle ilgili ajanlar olabilir [138].

Katsube N. ve arkadaşları, HL60 insan lösemi hücrelerinde ve HCT116 kolon kanseri hücrelerinde kamburüzüm ekstraktının apoptoz üzerine olan etkinliğini araştırmışlardır. Bu amaçla hücreleri 24'lük plaklarda ekstrakt ilavesinden sonra 24 ve 48 saat inkübe etmişler ve sonuçları DNA ekstraksiyonu sonrası agaroz jel elektroforezi ile incelemişlerdir. Sonuç olarak HL60 hücrelerinde kamburüzüm ekstraktının apoptozu indüklediği gözlemlenirken, HCT116 hücrelerinde ise apoptotik hücrelerin indüklenme oranı lösemi hücrelerine göre oldukça düşük bulunmuştur. Bu indüklenme etkisinin ise kamburüzümün içerdiği ve antioksidan etkiye sahip olan antisiyonidin ile ilişki olabileceğini öne sürmüşlerdir [139].

Sarımsağın temel bileşeni olan allisin, son yıllarda kanser hücrelerinde apoptoz açısından sıklıkla incelenmektedir. Park S.Y. ve arkadaşları allisin ile muamele edilmiş insan gastrik kanser hücreleri üzerinde kaspaz bağımsız hücre ölümünü araştırmışlardır. Hücrelerçeşitli konsantrasyonlarda allisin ile 6 ile 48 saat arası muamele edilmiş; 12-24 saat arasında hücrelerde morfolojik değişiklikler gözlenmeye başlanmıştır. MTT ile

hücrelerin canlılığını incelemişler, morfolojik apoptosisi ve DNA fragmentasyonunu ise apoptotik DNA kitiyle jelde yürüterek belirlemişlerdir. Burada Bax genlerinin etkili olduğunu ve allisinin kaspaz bağımsız olarak da kanserli hücre büyümesini engellediğini ve apoptosisi indüklediğini bulmuşlardır [140].

Kaymaz B. ve arkadaşları, akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi olan CCRF-CEM'e kapsaisin uygulandıktan sonra apoptoz analizinin gerçekleştirilmesinin yanı sıra; JAK/STAT (Janus Kinaz/Sinyal İleticisi Transkripsiyon Aktivatörü) sinyal iletim yolağı elemanlarından STAT3, STAT5A, -5B, JAK2 ve IL-6'nın mRNA seviyesindeki gen ekspresyon profillerini çıkartarak, kapsaisinin olası moleküler etki mekanizmasının aydınlatılmasını amaçlamıştır. Hücrelere kapsaisin verilmiş 72 saat sonra total RNA izole edilip cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve hedef genlerin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı qRT-PCR ile belirlenmiştir. Genlerin ekspresyon seviyeleri madde verilmemiş kontrol grubu hücrelerle kıyaslanmıştır. Kapsaisin uygulanmış lösemi hücreleri ile kontrol grubu hücrelerin apoptotik durumu kıyaslandığında, kapsaisin ile muamele edilen gruptaki hücrelerde apoptozun anlamlı ölçüde indüklendiği belirlenmiştir. Hedef genlere ait mRNA ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, STAT3, STAT5A, -5B, JAK2 ve IL-6 ekspresyonlarında anlamlı azalmalar saptanmıştır [141].

Oommen S. ve ark., yine allisin ile ilgili yaptıkları çalışmada insan serviks kanser hücreleri olan HeLa ve SiHa hücrelerinde kaspaz ilişkili apoptozu araştırmışlardır. Bu amaçla hücreleri allisinle muamele ettikten sonra apoptozu DNA fragment analizi, Western Blot ve kaspaz aktivite tayin kitiyle incelemişlerdir. Sonuç olarak allisinin kaspaz 3, 8 ve 9'un aktivasyonunu indüklediğini ve allisin uygulanan hücrelerde antiproliferatif etkinliğin arttığını gözlemlemişlerdir [142].

Arslyanyüreği H. ise, yeşil çayın temel bileşeni olan Epigallocatechin-gallate (EGCG)'ın C6 glioma hücrelerinde programlanmış hücre ölümüne veya apoptoza yönelmeyi sağlayıp sağlamadığını araştırmıştır. Hücreler EGCG ile muamele edildikten sonra apoptotik oluşumu TUNEL metodu ile gözlemlenmiştir. Sonuç olarak ise EGCG'nin normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerine karşı seçici apoptotik etkiye (selective apoptotic effect) sahip olduğunu ve kanser tedavisinde araştırılması gereken bir madde olduğu yorumunu yapmıştır [143].

Sheng H. ve arkadaşları, insan kolon kanser hücreleri olan HCA-7 ve HCT-116'ya prostoglandin uygulamışlar ve bunun Bcl-2 ekspresyonundaki apoptotik etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, immüno blot analizi ve florokrom boyama gibi morfolojik görüntüleme yöntemlerini kullanmışlardır. Sonuçta; prostoglandinin, kolon

kanser hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunu indüklediğini ancak Bcl-x ve Bax ekspresyonunu etkilemediğini bulmuşlardır [144].

Son zamanlarda popüler olan diğer bir konuda nanopartiküllerin ilaçlarla birlikte kanser tedavilerinde kullanımınıdır. Viral nanopartiküller, liposomal ajanlar, polimer ilaç konjugatları gibi nanopartiküller, bağlı oldukları ilaçları yönlendirirler ve tümör hücrelerini seçerek onlara ulaştırmayı sağlarlar. Bu pasif hedeflemenin dışında ligandların ya da antikörlerin de nanopartikül olarak kullanıldığı aktif hedefleme stratejileri de geliştirilmektedir. Diğer yandan kemoterapi ilaçlarına karşı direnç gösteren hücrelerin sorunu da bu yöntemlerle ortadan kaldırılabileceği düşünülmektedir [145].

Yapılan çalışmalar Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun p53 ile indüklenen apoptosisi engellediğini göstermiştir. Clarke M.F. ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, Bcl-2'nin fonksiyonel inhibitörü olan Bcl-xs içeren rekombinant Adenovirus vektörünü hem çeşitli kanser hücrelerine hemde sağlıklı kemik iliği hücrelerine uygulamışlardır. Hücrelerdeki Bcl-x, İmmünblot yöntemiyle araştırılmış ve hücre canlılığına tripan blue ile bakılmıştır. Sonuç olarak bu rekombinant virüsün kanser hücrelerindeki apoptosisi indüklediğini, diğer yandan normal kemik iliği hücrelerinde ise seçici olarak bu etkiyi yapmadığını gözlemişlerdir [146]. Bizim çalışmamızda da kopolimer ilaç konjugatı denenerek daha hedefe yönelik ve toksik etkisi daha az olan tedavilerin önü açılmak istenmiştir.

Duncan R., yaptığı derlemede, N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) - doksorubisin kopolimer konjugatının klinikte denenen ilk kopolimer ilaç konjugatı olduğunu ve bu alanda gelişmelerin halen devam ettiğini bildirmiştir [147].

Zhao H. ve ark., folat bağlı konjugat parçacıklarının farklı tümör hücrelerindeki seçiciliğini araştırmışlardır. Bu amaçla Doxorubisin bağlı parçacıkları 3 kanser türünde ve birde fibroblast hücrelerine uygulamışlardır. Hücre canlılığını MTT testiyle belirlerken, hücrelerin apoptoza gitme durumları flow-sitometri ile belirlenmiştir. Sonuç olarak folat-Dox konjugatı uygulanan kanser hücrelerinde apoptozun arttığı aksine fibroblastlarda ise bu etkinin olmadığını bulmuşlardır. Sonuç olarak ise bu konjugatın seçici hedefleme özelliği olduğu yorumu yapılmıştır [148].

Minko T. ve arkadaşları, insan over kanseri hücreleri üzerinde HPMA kopolimerine doksorubisin(Dox) bağlı konjugatın etkinliğini araştırmışlardır. Kanser hücreleri fare modelleri üzerinde denenmiş ve tümör kitleleri ölçülmüştür.

Hücre ölümü DNA fragmentasyonu ve ELISA ile incelenmiş aynı zamanda sorumlu genlerin ekspresyon analizleri de PCR ile araştırılmıştır. Buna göre konjugatın uygulandığı hücrelerde apoptozun indüklendiği söylenmiştir. Belirleyici genlerden p53, Apaf-1 ve kaspazların ekspresyonunun konjugat tarafından aktive edildiğini Bcl-2'nin ise baskılandığı gözlenmiştir. Sonuç olarak kullanılan HPMa-Dox konjugatının over kanserlerinde apoptosis sürecini indüklediği yorumlanmıştır [149].

Kohler N. ve ark., yaptıkları çalışmada çeşitli manyetik nanopartikülleri metotreksata(MTX) bağlayarak hücre canlılığını insan meme kanseri hücresi olan MCF-7 ve serviks kanseri hücresi olan HeLa hücreleri üzerinde uygulayarak incelemişlerdir. Sonuç olarak MTX bağlı konjugatın hem MCF-7 hemde HeLa hücrelerinde canlılığı azalttığını, literatürdeki diğer MTX içeren ilaçlara göre ise bu farkın anlamlı olduğunu bulmuşlardır [150].

Minko T. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, son zamanlarda popüler olan pluronik blok kopolimeri (P85)kemoterapi ilacı olan doksorubusin ile birleştirerek Dox-P85 formülasyonunu oluşturmuşlardır. Daha sonra bu kopolimer ilaç kompleksiniçoklu ilaçlara direnç gösteren hücelere(multi-drug resistance cells-MDR) uygulamışlardır. Diğer yandan da bir kısım hücelere ise sadece doksorubusin uygulanmıştır. Apoptozun erken ve geç dönemleri Anneksin -V ve TUNEL yöntemiyle gözlemlenmiştir. Aynı anda paralel olarak Bcl-2, BCL-XL, BAX, P53, APAF-1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 genlerinin de ekspresyonları Real-Time PCR ile belirlenmiştir. Sonuç olarak sadece doksorubusin uygulandığı hücrelerde apoptozun sınırlı olarak indüklendiği belirtilirken, Dox-P85 formülasyonunun uygulandığı hücrelerde ise proapoptotik aktiviteyi tetiklediği ve antiapoptotik hücre savunmayı engellediği gözlenmiştir. Bu sonuca göre kopolimer ilaç formülasyonunun MDR hücrelerin tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir [151].

Gökçe Ö. ve ark., insan servikal kanser Hela hücrelerinde vinorelbinin apopototik etkisini araştırmıştır. Vinorelbin (Navelbin) mikrotübüller üzerinden etki gösteren moleküllerden birisidir ve çeşitli kanserlerde kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Çalışmada, insan serviks kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerine 5-100µm kadar vinorelbin uygulanmış, 24 saat inkübasyondan sonra ise ilacın hücrelerdeki apopototik etkileri belirlenmiştir. Bu amaçla hücrelerde XTT canlılık analizi yapılmış ve Vinorelbin uygulanan hücrelerde B hücre lenfoma 2 (Bcl-2) ve Siklin D1 (CCND1) genlerinin mRNA ifade düzeyleri de araştırılmıştır.

Sonuç olarak ise uygun dozda vinorelbin uygulamasının apoptozu inhibe eden Bcl-2 ile proto-onkogen olan CCND1 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bcl-2'nin aşırı ifade edilmesinin apoptozu geciktirdiği, birçok hücre ve dokuda *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir. Buna göre uygun dozdaki bu ilaç uygulamasının apoptozu indükleyebileceği düşünülmektedir [10,152].

Bizde çalışmamızda MG-63 hücrelerimize hem bir kemoterapi ilacı olan hidroksiüre, hemde sentezlediğimiz kopolimerçifti olan MAAFE-HX'i diğer makalelerdeki gibi 24 saat uyguladık. Daha sonra hücre canlılığını tripan blue ve XTT deneyleriyle belirledik. Sonuçlarımızdayukarıdaki çalışmalarda olduğu gibi kopolimer ilaç konjüгатı uygulanan hücrelerde hücre canlılığının daha az olduğunu yani apoptozu indüklediğini belirledik. Yine paralel olarak apoptozdan sorumlu olan genler olan kaspazlarve APAF-1 genlerinin ekspresyon düzeylerine baktık. Çalışmamızda da yapılan araştırmalara benzer olarak kopolimer ilaç uyguladığımız hücrelerde bu genlerin ekspresyonunun sadece ilaç uyguladığımız hücelere kıyasla oldukça fazla oranda indüklendiğini ve bu nedenle hücrelerin apoptoza gittikleri sonucuna vardık. Sonuç olarak araştırmamızın verileri literatür çalışmalarıyla uyuşmaktadır.

6.SONUÇ

Çalışmamızda, yeni sentezlenen maleik anhidrit kopolimer ilaç konjugatının antitümör, antimikrobiyal, antifungal aktiviteleri araştırıldı. Aynı zamanda MG-63 kemik kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik aktivitesine bakıldı ve apoptoz mekanizmasında görevli genler olan Bcl-2, APAF-1, kaspaz 3 ve 7 ‘nin ekspresyon analizleri rt-PCR yöntemiyle belirlendi.

MA-AFE hidroksiüre konjugatının(MAAFE-HX) *S. aureus*, *E. faecalis*, *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. Albicans* mikroorganizmaları ile disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal duyarlılık testleri yapıldı. Ancak kopolimerin bu mikroorganizmalar üzerine herhangi bir antimikrobiyal ve antifungal etkiye sahip olmadığı görüldü. Sentezlediğimiz kopolimer-ilaç konjugatının L929 fare fibroblast hücre serileri üzerine toksik etkisini belirlemek için XTT testi yapıldı. Buna göre kopolimer ilaç konjugatımızın fibroblastlar üzerine saf ilaca kıyasla daha az toksik etkiye sahip olduğu bulundu.

Diğer yandan antitümör aktiviteye bakmak için kopolimer ilaç konjugatı uygulanmış ve saf ilaç uygulanmış hücrelere XTT analizi yapıldı. Bu analize göre kopolimer ilaç konjugatının antitümör aktivitesinin saf ilaca göre anlamlı olarak daha fazla olduğu bulundu. Ayrıca ilaç ve kopolimer ilacın MG-63 hücreleri üzerine etkili optimum dozları da hesaplandı.

Apoptosis mekanizmasında sorumlu olan genlerden olan Bcl-2, APAF-1, kaspaz 3 ve 7 ‘nin ekspresyon analizlerini yapılması için öncelikle hücre kültürü hazırlandı. Daha sonra hücreler ilaçların optimum konsantrasyonları ile muamele edildi. 24 saat inkübasyondan sonra hücrelerden öncelikle RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra bu RNA’lardan cDNA sentezlendi ve polimeraz zincir reaksiyonu aşamasına geçildi. Kantitatif PCR ile sadece ilaç uygulanan hücreler ve kopolimer ilaç konjugatı uygulanan hücrelerdeki gen ekspresyonları kıyaslandı.

Apoptozu inhibe eden gen olan Bcl-2 ‘nin ekspresyonunun kopolimer ilaç uygulanan hücrelerde saf ilaç uygulanan hücrelere göre daha düşük olduğu saptandı. Diğer yandan apoptozu aktive eden APAF-1, kaspaz 3 ve 7’nin ise MAAFE-HX uygulanan hücrelerde ilaca göre ekspresyonunun arttığı saptandı.

Buna göre kopolimer ilaç çiftimizin apoptozda sorumlu genleri tetiklediği ve buna bağlı olarak kanser hücrelerini apoptozza götürdüğü düşünülmektedir.

Sonuç olarak sentezlediğimiz MAAFE-HX konjugatının saf ilaca göre daha az toksik olduğu, antitümör aktivitesinin daha fazla olduğu ve apoptozdan sorumlu genlerin

ekspresyonlarında da etkili olduğu bulunmuştur. Bu nedenle kopolimer ilaç konjugatının gelecekte kanser tedavilerinde yeni bir yaklaşım olarak kullanılabilineceği düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Ecirli, Ş, Borazan A. , Tek, B., Deveci, A., Polat, H. (2002). Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine 1993-99 Yılları Arasında Kabul Edilen Hastalar Arasında Erişkin Kanser Vakalarının Değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*;22(4):349-53.
- [2] Burgut, R., et al. (1994). Türkiye'de 16 merkezin kanser verilerinin değerlendirilmesi. *Tübitak*, 1994: 27-67.
- [3] Benayahu, D., Shur, I., Marom, R., Meller, I. and Issakov, J. (2001). Cellular and molecular properties associated with osteosarcoma cells. *J Cell Biochem*.84: 108-14.
- [4] Hawkins, Michael M.; Wilson, L. Margaret Kinnier; Burton, Hazel S.; Potok, Michael H. N.; Winter, David L.; Marsden, H. Basil; Stovall, Marilyn A., Radiotherapy, alkylating agents, and risk of bone cancer after childhood cancer. *Journal Of The National Cancer Institute (bethesda)*. 1996;88(5): 270-278
- [5] Hawkins, MM., Draper, GJ., Kingston, JE. (1987). Incidence of second primary tumours among childhood cancer survivors. *Br J Cancer*.56:339-47.
- [6] Li, C., Wallace, S. (2008). Polymer-Drug Conjugates: Recent Development in Clinical Oncology *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60: 886–898.
- [7] Duncan, R. (May 2003). The Dawning Era of Polymer Therapeutics, *Drug Discovery, Nature Reviews*. 2: 347-360.
- [8] Young, B. L., Deog, J. K., Chang H. A. (2010). HEMA-Docetaxel or Gemcitabine Conjugates and Uses Therefore. *US Patent Application Publication*.
- [9] Tunç T. (2013). Antineoplastik İlaç İçeren Maleik Anhidrit Kopolimer Konjugatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri, İlaç Salım Davranışları ve Meme Kanseri Hücre Serileri Üzerine Antitümör Aktivitelerinin İncelenmesi, Doktora Tezi. Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas.
- [10] Gökçe, Ö., Yılmaz, A., Gürbüz, V., Konaç, E., Ekmekçi, A. (2011). İnsan Servikal Kanser Hela Hücrelerinde Vinorelbin'in Apoptotik Etkisi, *D.E.Ü Tıp Fakültesi Dergisi*. 25(1), 05 – 14
- [11] Larsen, A.K., Escargueil, A.E., Skladanowski, A. (2000). Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther* 85:217-29.
- [12] Breslow, D.S. (1976). *Biologically Active Synthetic Polymers*. Pure & App. Chem., Pergamon Press, VoL 46, pp. 103-113.
- [13] Jeong, J. H., Byoun, Y. S., Ko, S. B., Lee, Y. S. (2001). Chemical Modification of poly(styrene-alt-maleic anhydride) with Antimicrobial 4-aminobenzoic acid and 4-Hydroxy benzoic acid, *7*: 310-315.
- [14] Zengin, H. B. (1999). Bazı maleik anhidrit kopolimerlerinin değişik amid ve imid türevlerinin sentezi ve ısıl bozunması. Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı, Sivas.
- [15] Hızal, N. (1997). Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü). *Sürekli Tıp Eitimi Dergisi* 6:196-7.
- [16] Israels, L.G., Israels, ED. (1999). Apoptosis. *The Oncologist*. 4:332-9
- [17] Tomatır, A.G. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü, *T Klin J Med Sci*. 23:499-508
- [18] Rode, HJ. (2008). Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation. 4th ed. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH.
- [19] Tyler, T., (2010). Drug Interactions in Metastatic Breast Cancer. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 17(3):236-45.

- [20] Franks, L. M., Knowles, M. A. (2005). What is cancer? Knowles, M. A., Selby, P. J., Introduction to The Cellular and Molecular Biology of Cancer, Oxford University Press, USA, 1,4.
- [21] Bilgehan, H. (2008). Temel Mikrobiyoloji ve Başışıklık Bilimi, 12. Baskı, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 227-49.
- [22] Pautke, C., Schieker, M., Tischer, T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W. and Milz, S. (2004). Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts, *Anticancer Research*. 24: 3743-3748.
- [23](<http://www.kanserveyasam.org/kanser-hakkinda/kanser-turleri/adan-zye-kanser-turleri/k/kemik-tumorleri/>)
- [24] Yüçetürk, G., Sabah, D., Keçeci, B., Kara, A.D., Yalçınkaya, S. (2011). Kemik ve yumuşak doku tümörlerinin dağılımları. *Acta Orthop Traumatol Turc*; 45:135-43.
- [25] Kiltie, A. (2005). Radiotherapy and molecular radiotherapy, Knowles, M. A., Selby, P. J., Introduction to The Cellular and Molecular Biology of Cancer, Oxford University Press, USA, 414.
- [26] Rose, P. G. (2002). Chemoradiotherapy for Cervical Cancer, *European Journal of Cancer*, 38, 270-278.
- [27] Balcı, T.A., Uzar, E., Koç Z.P, Demirel B.B., Tařdemir, B. (2011) İskelet Sistemindeki Metastaz Dağılımlarının Tüm Vücut Kemik Sintigrafisi ile Değerlendirilmesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, 25(2),67-71.
- [28] Seçkin, T. (2011). İşlevsel Biyolojik Malzemelerin Hazırlanmasında Atom Transfer Radikal Polimerleşmesinin (ATRP) Kullanımı, *Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1 (1): 1-8
- [29] Spridon, D., Panaitescu, L., Ursu, D., Uglea, C. V., Popa, U., Ottenbrite, R.O. (1997). Synthesis and Biocompatibility of Maleic Anhydride Copolymers: Maleic Anhydride-Vinyl Acetate, Maleic Anhydride-Methyl Methacrylate and Maleic Anhydride-Styrene. 43: 175-181
- [30] Duncan, R. (2003). The Dawning Era of Polymer Therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 347-60.
- [31] Saçak, M. (2006). Polimer Kimyası, Gazi Kitabevi, Ankara, 525.
- [32] Breslow, D.S. (1976). Biologically Active Synthetic Polymers, *Pure Appl. Chem.*, 46:103-13.
- [33] Denizli, A., Kiremitçi, M., (1988). Kontrollü Salınım Teknolojisinin Kemoterapötik Uygulamaları. *ANKEM Derg.*, 2 (1): 77-85.
- [34] Popescu, I., Suflet, D.M., Pelin, I.M., Chitanu, G.C. (2011). Biomedical applications of maleic anhydride copolymers. *Rev Roum Chim.* 56: 173-88.
- [35] Saad, G.R., Morsi, R.E., Mohammady, S.Z., Elsabee, M.Z. (2008). Dielectric relaxation of monoesters based poly(styrene-co-maleic anhydride) copolymer. *J Polym Res.* 15: 115-23.
- [36] Liu, H.Y., Cao, K., Yao, Z., Li, B.G., Hu, G.H. (2007). Variations of the glass transition temperature in the imidization of poly(styrene-co-maleic anhydride). *J Appl Polym Sci* 104: 2418-22.
- [37] Karakuş, G. (2015). Bazı Maleik Anhidrit İçeren Kopolimerlerin Amin Yapılı İlaç Etken Maddeleri İle Türevlendirilmesi, Yapısal Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktiviteleri. *Marmara Pharm J.* 19: 121-125.
- [38] Derbentli, S. (2003). Antimikrobiyal Maddelerin Genel Özellikleri, Antimikrobiyal Maddeler, Gazi kitabevi, Ankara, 141-142.
- [39] Levinson W. (1995). Çeviri; Özgünen T. *Tıbbi Mikrobiyoloji*, Barış Yayınları, İstanbul. 74-76.

- [40] Bökesoy, T.A. (2000). Çakıcı, I. ve Melli, M., Farmakoloji Ders Kitabı , Türk Farmakoloji Derneği, 521-635.
- [41] Levinson, W. ve Jawetz, E. (1997). Mikrobiyoloji Çeviri Kurulu ; Dündar, I.H., Erken, E., Kılıç, B., Memişoğlu, H.R., Özcan, K., Özgünen, T. ve Yarkın, F. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji, Barış Kitabevi, İstanbul, 131-3.
- [42] Murray, P., (2009). Klinik Mikrobiyoloji, Atlas Yayınevi, (Çeviri Editör: Başustaoğlu, A.) 390-443s
- [43] Bilgehan, H. (2009). Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 5.Baskı, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, 116-19.
- [44] Duman, Y., Güçlüer, N., Serindağ, A., Tekerekoğlu, M.S. (2010). Escherichia coli Suşlarında Antimikrobiyal Duyarlılık ve Genişlemiş Spektrumlu-Beta Laktamaz (GSBL) Varlığı, Cilt 15, Sayı 4, Sayfa(lar) 197-200
- [45] Ekşi, F., Gayyurhan, E.D., Bayram, A. (2008). Gaziantep Üniversitesi Hastanesinde İzole Edilen Staphylococcus Aureus Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları ANKEM Derg. 22(4):203-208
- [46] <http://www.klinik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf>
- [47] Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. (1992). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, J.B.Lipincott Company, fourth edition, 609-35.
- [48] Beşe, M. (1989). Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri, 45-47.
- [49] Kahlmeter, G., Brown, D.F., Goldstein, F.W., MacGowan, A.P., Mouton, J.W., Odenholt, I., Rodloff, A., Soussy, C.J., Steinbakk, M., Soriano, F., Stetsiouk, O. (2006). European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect; 12: 501-503.
- [50] Uçar, F., Ovalı, E. (2003). Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, Isparta, 1-8.
- [51] Freshney, R.I. (1994), Culture of Animal Cells, A manual of Basic Technique, Wiley-Liss, Inc: New York, USA, 480.
- [52] John, R. W. (2000). Human cancer cell lines: fact and fantasy Nature Reviews Molecular Cell Biology 1, 233-236
- [53] Buehring, G.C, Eby, E.A. (2004). Eby MJCell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it? In Vitro Cell Dev Biol Anim. Jul-Aug;40(7):211-5.
- [54] Ryan, K.J., (1994). Medical Microbiology, Printice-Hall International Inc, USA, 231-32.
- [55] Kurtuluş, A., Bozcuk, A.N. (2002). Telomer Ve Hüresel Yaşlanma, Turkish Journal Of Geriatrics. Geriatri 5 (3): 111-114.
- [56] Yıldız, M.G., Aras, S. , Duman D.C. (2009). Telomerlerin Yaşlanma Ve Kanser İlişkisindeki Rolü, Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 66 (4): 187-195
- [57] Dikmen, G., Doğan, P. (2003). Telomerase And Cancer Türkiye Klinikleri J Med Sci 23(4):334-41.
- [58] (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/86051601>)
- [59] Oktar, N. 2009. K562 Hücre Dizisinde Fosfin Bileşiklerinin Sitotoksik Etkisinin MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromidile) ile Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana.
- [60] Saygı, S.(2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. Gülhane Tıp Dergisi, 45 (3) : 291 – 298.
- [61] http://bioantares.com/Cytotoxicity_Screening.html

- [62] Doyle, A., Griffiths, J.B. (1998). Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. John Wiley&Sons. 1998; 57-61:62-64.
- [63] Fisher, D., Francis, G.E., Rickwood, D. (1998). Cell Separation A practical approach, Oxford University Press.259:21-27.
- [64] Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J, Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. ve Boyd, M.R. (1988). Feasibility of Drug Screening With Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay, *Cancer Res*, 48:589-601.
- [65] Van de Loosdrecht, A.A., Nennie, E., Ossenkoppele, G.J. ve Belen, R.H., (1991). Langenhuijsen and Macrophages in a Modified Calorimetric MTT Assay, a Methodological Study. *J Immunol Methods*, 141: 15-22.
- [66] Wilson, J.K., Sargent J.M., Elgie A.W., Hill J.G. ve Taylor C.G. (1990). A Feasibility Study of The MTT Assay for Chemosensitivity Testing in Ovarian Malignancy”, *Br J Cancer*, 62:189-194.
- [67] Mosman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods*.65:55-63.
- [68] Altunkaynak, B.Z., Özbek, E. (2008). Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi*: 6 (2) :93 -104
- [69] Schwartzman, R.A., Cidlowski, J.A.(1993). Apoptosis:the biochemistry and molecular biology ofprogrammed cell death. *Endocrine Review* 14: 133-150.
- [70] Kidd, V.J. (1998). Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annual Review of Physiology*. 60:533-73.
- [71] Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology*. 60:619-42.
- [72] Evan, G., Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*. 281: 1317-1321.
- [73]Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M., Venkatachalam, M.A. (1999)Apoptosis definition, mechanism and relevance to disease. *Am J Med*. 107: 489-506.
- [74] Carson, D.A., Ribeiro, J.M. (1993). Apoptosis and disease. *Lancet*. 341: 1251-1254.
- [75] Thompson, C.B. (1995). Apotosis in the pathogenesis of autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 267: 1456-1462.
- [76] Mountz, J.D., Zheu, T., Su, X., Wu, J., Cheng, J. (1996). The role of programmed cell death as anemerging new concept for pathogenesis of autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 8: 2-14.
- [77] King, K.L., Cidlowski, J.A. (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual Review of Physiology*. 60:601-17.
- [78] Büyükgebiz, O., Caferler, J.S. (2001). Apoptoz. *Sendrom*. 13:102-7.
- [79] Walker, N.I., Harnon, B.W., Gobe, G.C., Kerr, J.F. (1988). Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*. 13: 18-54.
- [80] Wyllie, A.H. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 68: 251-306.
- [81] Steller H. (1995). Mechanism and genes of cellular suicide. *Science*. 267: 1445-1449.
- [82] Ruaslathi, E., Reed, J.C. (1994). Anchorage dependence integrins and apoptosis. *Cell*, 77: 477-8.
- [83] Clarke, P.G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol*. 181: 195-213.

- [84] Erickson, G.F. (1997). Defining apoptosis: players and systems. *J Soc Gynecol Investig.* 4(5): 219-28.
- [85] Gozuacik, D., Kimchi, A. (2007). Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol.* 78: 217-45.
- [86] Hornung, J.P., Koppel, H., Clarke, P.G. (1989). Endocytosis and autophagy in dying neurons: an ultrastructural study in chick embryos. *J Comp Neurol.* 283(3): 425-37.
- [87] Clarke, P.G. (1984). Identical populations of phagocytes and dying neurons revealed by intravascularly injected horseradish peroxidase, and by endogenous glutaraldehyde-resistant acid phosphatase, in the brains of chick embryos. *Histochem J.* 16(9): 955-69.
- [88] Beaulaton, J., Lockshin, R.A.(1982). The relation of programmed cell death to development and reproduction: comparative studies and an attempt at classification. *Int Rev Cytol.* 79: 215-35.
- [89] Schweichel, J.U., Merker, H.J.(1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* 7: 253-66.
- [90] Wyllie, A.H., Beattie, G.J., Hargreaves, A.D. (1981). Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J.* 13(4): 681-92.
- [91] Hart, S. (1994). The drama of cellular death. *Bioscience,* 44:451-5.
- [92] Fadeel, B., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (1999). Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 266 :699-717.
- [93] Ashkenazi, A., Dixit V.M. (2001). Death receptors: Signaling and Modulation. *Science,* 281:1305-8 1998.
- [94] Gilchrist, D.G. (1998). Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology,* 36:393-414.
- [95] Fisher, D.E. (1994). Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell,* 78(4): 539-42.
- [96] Beroud, C., Soussi, T. (1998). P53 gene mutation soft wore and database. *Nucleic Cad. Res.* 26: 200-204.
- [97] Kaellin, W.G. (1999). The emering p53 gene family. *J Nati Cancer Inst.* 91: 594-598.
- [98] Chao, D.T., Korsmeyer, S.J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology.* 16:395-419.
- [99] Renehan, A.G., Booth, C., Potten, C.S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal/(Clinical Research Ed.) (BMJ)* 322
- [100] Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria? *Genes Cell,* 3: 697-707.
- [101] Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, M.A., Rehemtulla, A. (2001). Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene.* 2001; 20(2): 167-77.
- [102] Roulston, A., Marcellus, R.C., Branton, P.E. (1999). Viruses and Apoptosis. *Annual Review of Microbiology.* 53:577-628.
- [103] Budihardjo, I., Oliver, H.L.M. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 15:269-90.
- [104] Johnson, D.E. (2000). Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia.* 14:1340-44.
- [105] Hampton, M.B., Orrenius, S. (1998). Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors,* 8:1-5.

- [106] Hetts, S.W. (1998). To die or not to die. *The Journal of The American Medical Association (JAMA)* 279:300-7
- [107] Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 69:217-45.
- [108] Coşkun, G., Özgür, H. (2011). Apoptoz Ve Nekrozun Moleküler Mekanizması Arşiv 20: 145
- [109] Ganea, D. (1996). Apoptosis and the immune response (book review). *Bioscience*, 46:705.
- [110] Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O.A., Baltacı, D., Oktay, M., Çolakoğlu, S. (2012). Apoptozis Hakkında Bilinenler, *Düzce Tıp Dergisi*, 14(2): 87-101
- [111] Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, (2) 73-78.
- [112] Çetinkaya, E., Ayhan, K. (2012). Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler, *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi /Karaelmas Science and Engineering Journal*, 2 (1), 53-62.
- [113] Schochetman, G., Jones, KW. (1988). Polimerase Chain Reaction. *J. Infect. Dis.*, 158: 1154-1157.
- [114] Walker, J., Dounan, G. (1989). DNA Probes: A new role in diagnostic microbiology. *J. Appl. Microbiol.*, 67: 229-230.
- [115] Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski and M. Zoller. (1992). The polymerase chain reaction In: *Recombinant DNA. Second Edition. New York.* 79-98.
- [116] Hadidi A, L. Levy, Podleskis E. V. (1995). Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In: *Molecular Methods in Plant Pathology*, pp.167-187. Eds. R. P. Singh, U. S. Singh. Boca Raton: CRS Press.
- [117] Innis, M.A. and D.H. Gelfand. (1990). Optimization of PCRs In Innis, M.A, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J (eds.). *PCR protocols A guide to methods and applications.* Academic Press. 3-12 pp.
- [118] Türkyılmaz, S., Esendal, Ö. 2002. Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları. *Kafkas Ün. Vet. Fak. Derg.*, 8(1): 71-76.
- [119] <https://www.qiagen.com/tr/pcr/primer-sets/rt2-profiler-pcr-arrays/>
- [120] Aktaş, S.H., (2010). Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri Ve Mide Kanserinde Vegf Düzeylerine Etkisinin İn Vivo Ve İn Vitro İncelemesi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Yüksek Lisans Tezi, 2-15, Ankara.
- [121] Dellabona, P. Moro, M., Crosti, MC, Casorati, G. and Corti, A. (1999). Vascular attack and immunotherapy: a 'two hits' approach to improve biological treatment of cancer. *Gene Therapy* 6, 153-154.
- [122] Terrero, M.N. and Li, S. (2004). Growth factor receptors: targets for gene therapy and immunotherapy for cancer treatment. *Gene Ther Mol Biol Vol* 8, 175-180.
- [123] Sanchis, J., Canal, F., Lucas, R. (2010). Polymer–Drug Conjugates for Novel Molecular Targets, *MJ. Nanomedicine*. 5(6):915-935.
- [124] Uzluk, E. (2008). Bazı Polimerlerin Sentezi, Karakterizasyonu Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı, Ankara.
- [125] Chandna, P., Khandare, J.J., Ber, E., Rodriguez-Rodriguez, L., Minko, T. (2010). Multifunctional tumor-targeted polymer-peptide-drug delivery system for treatment of primary and metastatic cancers. *Pharm Res. Nov*;27(11):2296-306
- [126] Karakuş, G. , Yağlıoğlu, A.Ş. , Karahan, M. , Aydın, S. (2012). Maleik Anhidrit-Stiren Kopolimerinin Prokainamid Hidroklorür ile Türevlendirilmesi, Karakterizasyonu

ve Antiproliferatif Aktivitesinin İncelenmesi, Iv. Ulusal Polimer Bilim Ve Teknoloji Kongresi 5-8 Eylül 2012 Çanakkale, Sayfa 14.

[127] Hongrapipat, J., Kopečková, P., Liu, J., Prakongpan, S., Kopeče, J. (2008). Combination Chemotherapy and Photodynamic Therapy with Fab' Fragment Targeted HPMA Copolymer Conjugates in Human Ovarian Carcinoma Cell. *Mol Pharm.* 5(5):696-709.

[128] Vandana M., Sahoo S.K. (2010). Long circulation and cytotoxicity of PEGylated gemcitabine and its potential for the treatment of pancreatic cancer, *Biomaterials Vol:* 31, 9340-9356.

[129] Siew, E.L., Rajab N.F., Osman, A.B., Sudesh, K., Inayat-Hussain, S.H. (2007). In vitro biocompatibility evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4- hydroxybutyrate) copolymer in fibroblast cells. *J Biomed Mater Res A.* 81(2):317-25.

[130] Kaneda, Y., Yamamoto, Y., Kamada, H., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., Hirano, T., Mayumi, T. (1998). Antitumor activity of tumor necrosis factor alpha conjugated with divinyl ether and maleic anhydride copolymer on solid tumors in mice. *Cancer Res. J Vol: Jan 15;*58(2):290-5.

[131] Jun H. L. and Anjan Nan. (2012). Combination Drug Delivery Approaches in Metastatic Breast Cancer *Journal of Drug Delivery Volume,* 17 pages

[132] Nelissen, J.M., Torensma, R., Pluyter, M., Adema, G.J., Raymakers, R.A., van Kooyk, Y. et al (2000). Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts) Molecular analysis of the hematopoiesis supporting osteoblastic cell line U2-OS. *Exp Hematol* 28: 422- 32.

[133] Atmaca, H. and Uzunoğlu S. (2011). Kanserde sirkadiyan ritim genlerinin rolü , *Journal of Cell and Molecular Biology* 9(2):1-10.

[134] Rana, S., Mahmood, S., Okamura, H., Doi, M., Fustin, J.M., Yamaguchi, Y. and Matsuo, M. (2010). Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circadian Rhythms.* 8: 3 Mammalian circadian clock system: Molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. *Adv Drug Deliv Rev.* 62 (9-10): 876-84,

[135] Yar A. S., Ergin V., Menevşe, S., Menevşe A., Ekmekçi, A. (2013). L929 Fibroblast Hücre Hattında Topoizomeraz İnhibisyonunun DNA Onarımı ve Apoptozis Üzerine Etkisi. *Türk J Biochem* 38 (2) ; 229–237.

[136] Vural, P. (2010). Transforming Growth Factor beta nın Kanserde Baskılayıcı Rolü, *Türk Klinik Biyokimya Derg* 8(1): 35-42.

[137] Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Xia, J., Wei C., Puay, L.L., Murthy, R.K, Patrick Boon Ooi Tan, Edison T. Liu, and Qiang Yu. (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells *Genes & Dev.* 21:1050-1063

[138] Divrik, T. (2015). Prostat kanseri için koruyucu ilaç yaklaşımları; chemoprevention-ilaçlar, *Üroonkoloji Bülteni,*1:12-15.

[139] Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M. (2003) J. Agric Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins. *Food Chem.* 51, 68–75.

[140] Park, S.Y., Cho S.J., Kwon, H.C., Lee, K.R., Dong-Kwon, Rhee, Suhkneung, Pyo. (2005). Caspase-independent cell death by allicin in human epithelial carcinoma cells: involvement of PKA, *Cancer Letters* 224 123–132.

[141] Kaymaz, B.T., Çetintaş V.B., Kosova, B. (2013). İnsan T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi Hücrelerinin Kapsaisin ile İndüklenmiş Apoptozunda Rolü Olabilecek JAK/STAT Sinyal İletim Yolağı Elemanlarının Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi, , *Kafkas J Med Sci* 2013; 3(3):129–135

- [142] Oommen, S., Anto, R.J, Srinivas, G., Karunakaran, D. (2004). Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells *European Journal of Pharmacology* 485:97 – 103.
- [143] Arslanyüreği, Hasan.(2009). Epigallocatechin-gallat`In C6 glioma hücrelerine apoptotik etkileri,İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- [144] Sheng, H., Shao, J., Jason D. Morrow, Beauchamp, R.D., Raymond N. (1998). DuBois Modulation of Apoptosis and Bcl-2 Expression by Prostaglandin E2 in Human Colon Cancer Cells, *Cancer Research*, 58. 362-366.
- [145] Cho, K., Wang, X., Nie S., Zhuo (Georgia) C., and Dong, M. (2008]. Shin Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, *Clin Cancer Res* 14(5).
- [146] Benedict, M.A., Eipers, P.G., Sumantran, V., Gonzales, M. , Doeden, M., Fukunaga, N., Davidson, B., Dick, J.E. Minni, A.J., Boisev, L.H., Thompsoni, C.B., Wicha, M., Nuneza, G. (1995). Recombinant bCl-Xs adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 92, pp. 11024-11028.
- [147] Duncan, R.,(2006). Polymer conjugates as anticancer nanomedicines, , *Nature Reviews Cancer* 6, 688-701.
- [148] Zhao, H., Yue L., Yung, L., Selectivity of folate conjugated polymer micelles against different tumor cells. *International Journal of Pharmaceutics* 349:256–268.
- [149] Minko, T. , Kopeckov, P., Kopecek, J.(2000]. Efficacy of the Chemotherapeutic Action of HPMA Copolymer-Bound Doxorubicin in a Solid Tumor Model of Ovarian Carcinoma ~ *Int. J. Cancer*: 86, 108–117.
- [150] Kohler, N., Sun, C., Wang, J., Zhang, M. (2005). Methotrexate-Modified Superparamagnetic Nanoparticles and Their Intracellular Uptake into Human Cancer Cells, *Langmuir*, 21(19): 8858-64.
- [151] Minkoa, T. , Batrakovab, E.V. , Lib, S. , Lib, Y. , Pakunlua, R.I. , Yu, V., Kabanov A.V. (2005). Pluronic block copolymers alter apoptotic signal transduction of doxorubicin in drug-resistant cancer cells, *Journal of Controlled Release*. 105:269 – 278.
- [152] Jacobson, M.D, Burne, J.F, Raff, M.C. (1994). Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J*. 13: 1899-1910.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Tuğçe Naime Gedik
Doğum Yeri ve Tarihi	Ankara-1987
Medeni Durumu	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Lojmanları, F Blok, No:9 SİVAS
E-posta Adresi	gedik.tugce@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durum

Lise	Sivas H.M.Sabancı Lisesi, 2004
Lisans	Atatürk Üniversitesi, 2008
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ABD, 2011

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kopolimer İlaç Konjugatlarının Kemik Kanseri Hücreleri Üzerine Sitotoksitesite, Antitümör ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması ve Apoptoz Sürecinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA-PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2015-01/02	Tarih: 15.01.2015		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden gerekli izin alınarak gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Helsinki Bildirgesi, Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Zeynep Sümer

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Zeynep Sümer	Mikrobiyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Şahande Elagöz	Patoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Naim Nur	Halk Sağlığı	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ercan Özdemir	Fizyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Diğdem Eren	Diş Hastalıkları ve Tedavisi	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hatice Ulusoy	Sağlık Yönetimi	Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sulhattin Arslan	Göğüs Hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Gülşay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Pakize Cantürk Kılıçkaya	Eczacılık Farmasötik Biyoteknoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Zeynep Sümer
İmza:

GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	<i>Kopolimer İlaç Konjugatlarının Kemik Kanseri Hücreleri Üzerine Sitotoksisite, Antitümör ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması ve Apoptoz Sürecinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi</i>
-----------------------	--

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Cumhuriyet Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başhekimlik Girişi Kampüsü, TR-58140 Merkez/Sivas
	TELEFON	0 346 258 00 25
	FAKS	0 346 258 00 24
	E-POSTA	gokaek2014@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ömer Poyraz / Tuğçe Naime Gedik doktora öğrencisi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Doktora tezi			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Zeynep Sümer
İmza: