

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Safiye KAYA

İN VİTRO ORTAMDA ÜRETİLEN HL-60 HÜCRE SOYU
ÜZERİNE SORAFENİB VE LİTYUM KLORÜRÜN
BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Aysun EKİNCİ

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL – 2011

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimimi tamamlamamda verdikleri destekten dolayı

İstanbul Üniversitesi Rektör'ü Sayın Prof. Dr. Yunus SÖYLET'e,

İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekan'ı Sayın Prof. Dr. Özgün ENVER'e,

Anabilim Dalı'ndaki eğitim hayatım boyunca idareci vasfı, akademik tavrı, her konuda profesyonel yaklaşımıyla kendime örnek aldığım; hoşgörüsüne sığınarak düşüncelerimi özgürce paylaşabildiğim İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkan'ı saygı değer hocam Prof. Dr. Gülden BURÇAK'a,

Tezimin hazırlanmasında bana yol gösteren, özveride bulunan, akademik hayatının son dönemini beraber paylaşma fırsatı bulduğum; insana olan saygısı, hayata olan bakış açısıyla kendisini tanımaktan onur ve mutluluk duyduğum danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Safiye KAYA'ya,

Eğitim programımızın oluşturulmasında emeği geçen Prof. Dr. Dildar KONUKOĞLU başta olmak üzere eğitimime katkıda bulunmuş olan Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma,

Tezime verdiği katkıdan dolayı İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayhan BİLİR'e, Hücre Kültürü Laboratuvarı çalışanlarına ve Doç. Dr. Nuray YAZIHAN'a,

Biyokimya Anabilim Dalı'nda beraber çalışma fırsatı bulduğum sevgili asistan Doktor arkadaşlarıma,

Tezimin yazımı aşamasında desteğini esirgemeyen, her konuda yardımcı olan değerli arkadaşım Dr. Hayriye ERMAN'a,

Bana manevi güç veren, sevgi ve saygılarını bir an olsun esirgemeyen, onlarla olmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli aileme,

Kararlarımın her daim arkasında duran, bana olan inancını ve desteğini koşulsuz gördüğüm, en zor günlerimin yoldaşı, değerli eşim Uzm. Dr. Cenap EKİNCİ'ye

Saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım...

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4726

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
GRAFİKLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	5
2.1.1. Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları	5
2.1.2. Sferoid	7
2.2. LÖSEMİ ve TİPLERİ	7
2.2.1. Lösemi Semptomları ve Tanısı	9
2.2.2. Lösemnin Tedavisi	10
2.2.3. Akut Miyelositik Lösemi	11
2.3. APOPTOZİS	14
2.3.1. Apoptozis ve Nekrozis	14
2.3.2. Apoptozisteki Major Etkenler	16
2.3.2.1. Ölüm Faktörleri ve Ölüm Reseptörleri	16
2.3.2.2. Bcl-2 Ailesi	17
2.3.2.3. Kaspazlar	18
2.3.2.3.1. Kaspaz İnhibitörleri	21
2.3.2.3.1.1. Survivin	22
2.3.2.4. Sitokrom-c	22
2.3.2.5. p53	23
2.3.2.6. Granzimler	24
2.3.3. Apoptozis Mekanizmaları	24
2.3.3.1. Kaspazlara-Bağımlı Gelişen Apoptozis Mekanizması	24
2.3.3.1.1. Ölüm Reseptörü Aracılı (Extrinsic) Apoptotik Yol	24
2.3.3.1.2. Mitokondriyal (Intrinsic) Apoptotik Yol	25
2.3.3.2. Kaspazlara Bağımlı Olmadan Gelişen Apoptozis Mekanizması	26

2.3.4. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	26
2.4. HÜCRE FARKLILAŞMASI.....	28
2.4.1. Hematopoetik Sistemin Farklılaşması.....	28
2.4.2. Hücre Yüzey Belirleyicileri.....	30
2.5. AKIM SİTOMETRE.....	30
2.6. LİTYUM.....	33
2.6.1. IMPaz ve IPPaz İnhibisyonu.....	35
2.6.2. MAP Kinaz Sinyal İletim Yolu.....	37
2.6.3. Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal İletim Yolu ve Kanser	38
2.6.4. GSK-3 İnhibisyonu.....	40
2.7. SORAFENİB.....	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasallar ve Malzemeler.....	45
3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler.....	45
3.1.2. Akım Sitometrik (Flow Cytometric) Anneksin-V-FITC/PI Boyamasında Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Kitler.....	46
3.1.3. ELISA Yöntemi İçin Kullanılan Cihazlar, Aletler, ve Kitler.....	46
3.1.4. Geçirimli (Transmission) Elektron Mikroskobu (TEM) Yönteminde Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasallar ve Malzemeler.....	47
3.2. Kullanılan Yöntemler.....	47
3.2.1. İnsan Akut Promyelositik Lösemi Hücre Kültürü.....	47
3.2.2. Gruplar ve Doz Belirleme Deneyleri.....	48
3.2.3. Tutunma (Proliferasyon) Deneyi ve Canlılık (Vitalite) Tayini.....	49
3.2.4. Akım Sitometrik Anneksin-V-FITC/PI Boyaması İle İlaçların Programlı Hücre Ölümüne Etkilerinin Saptanması.....	50
3.2.5. Kaspaz-3 Düzeyinin Kolorimetrik ELISA İle Ölçümü.....	51
3.2.6. GSK-3 β Düzeyinin EIA İle Ölçümü.....	57
3.2.7. Sinyal İletim Yolu Proteinlerinin ELISA İle Değerlendirmesi.....	62
3.2.8. İlaçların Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) İle Hücre İnce Yapısı (Ultrastrüktürü) Üzerine Etkilerinin Saptanması.....	64
3.3. İstatistik İnceleme.....	64
4. BULGULAR.....	65
5.TARTIŞMA.....	92

6. ÖZET	104
7. SUMMARY	105
8. KAYNAKLAR	106

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Kaspaz enzimlerinin substratları.....	21
Tablo 3.1. Kaspaz-3 kolorimetrik ELISA yöntemi için uygulama.....	56
Tablo 3.2. 100 µl başına µmol cinsinden p-Nitroanilin çözeltisi miktarları.....	56
Tablo 4.1. Her dört gruptaki 24., 48. ve 72. saat ortalama hücre sayıları ve SEM değerleri.....	65
Tablo 4.2. Dört ayrı gruptaki apoptotik hücre oranlarının 24., 48. ve 72. saat yüzde dağılımı ve SEM değerleri.....	67
Tablo 4.3. Her dört gruptaki kaspaz-3 seviyelerinin 24. ve 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri.....	71
Tablo 4.4. Her dört gruptaki fosforile GSK-3β seviyelerinin 24. ve 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri.....	73
Tablo 4.5.1. Her dört gruptaki p-AKT ve t-AKT seviyelerinin 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri.....	74
Tablo 4.5.2. Her dört gruptaki p-p38 ve t-p38 seviyelerinin 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri.....	76
Tablo 4.5.3. Her dört gruptaki p-ERK ve t-ERK seviyelerinin 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri.....	77
Tablo 4.5.4. Her dört gruptaki p-IκBα ve t-IκBα seviyelerinin 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri.....	78
Tablo 4.5.5. Her dört gruptaki p-c-jun ve t-c-jun seviyelerinin 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri.....	80
Tablo 4.6. Hücre sayısı üzerine ilaçların 24., 48. ve 72. saatteki etkilerinin tüm verileri..	81
Tablo 4.7. Apoptozis üzerine ilaçların 24. saatteki etkilerinin her gruba ait üç kuyucuk ortalama verileri.....	82
Tablo 4.8. Apoptozis üzerine ilaçların 48. saatteki etkilerinin her gruba ait üç kuyucuk ortalama verileri.....	82
Tablo 4.9. Apoptozis üzerine ilaçların 72. saatteki etkilerinin her gruba ait üç kuyucuk ortalama verileri.....	82
Tablo 4.10. Toplam apoptozisin 24., 48. ve 72. saatteki tüm verileri.....	83
Tablo 4.11. Kaspaz-3 üzerine ilaçların 24. ve 72. saatteki etkilerinin tüm verileri.....	84

Tablo 4.12. Fosforile GSK-3 β üzerine ilaçların 24. ve 72. saatteki etkilerinin tüm verileri	85
Tablo 4.13. Hücre iletim yolundaki proteinler üzerine ilaçların 72. saatteki etkilerinin tüm verileri	86

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Hematolojik malignitelerin patogenezi.....	8
Şekil 2.2. Apoptozis ve nekrozis.....	15
Şekil 2.3. Ölüm faktörleri ve reseptörleri.....	17
Şekil 2.4. Kaspazların sınıflandırılması.....	19
Şekil 2.5. Kaspaz ve substrat reaksiyonu.....	20
Şekil 2.6. Ölüm reseptörü aracılı (extrinsic) apoptotik yol.....	25
Şekil 2.7. Mitokondriyal (intrinsic) apoptotik yol.....	26
Şekil 2.8. Akım sitometre cihazının işleyiş şeması.....	32
Şekil 2.9. Lityum'dan etkilenen hücre içi yolların birbirleriyle olan ilişkisi.....	34
Şekil 2.10. Hücre içerisinde uyarı-salgılama bağlantısı.....	35
Şekil 2.11. Sinyal iletim yollarına PKC'nin katılımı.....	37
Şekil 2.12. MAPK ailesi ve sinyal iletimi.....	39
Şekil 2.13. Sorafenib'in etki mekanizması.....	44
Şekil 3.1. Apoptotik Jurkat hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi.....	57
Şekil 3.2. GSK-3 β standartlarının hazırlanması.....	60
Şekil 3.3. GSK-3 β standart eğrisi.....	61
Şekil 4.1. 24.saat apoptotik hücre oranlarının histogram olarak gösterilmesi.....	68
Şekil 4.2. 48.saatte apoptotik hücre oranlarının histogram olarak gösterilmesi.....	69
Şekil 4.3. 72.saatte apoptotik hücre oranlarının histogram olarak gösterilmesi.....	70
Şekil 4.4. Kontrol grubu geçirimli elektron fotoğrafı (Büyütme $\times 12000$).....	87
Şekil 4.5. Kontrol grubu geçirimli elektron fotoğrafı (Büyütme $\times 5000$).....	88
Şekil 4.6. Sorafenib grubu geçirimli elektron fotoğrafı (Büyütme $\times 5000$).....	89
Şekil 4.7. LiCl grubu geçirimli elektron fotoğrafı (Büyütme $\times 5000$).....	90
Şekil 4.8. Sorafenib ve LiCl kombinasyon grubu geçirimli elektron fotoğrafı (Büyütme $\times 6000$).....	91

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 4.1. Tüm gruplardaki zamana bağlı hücre sayıları.....	66
Grafik 4.2. Dört ayrı gruptaki apoptotik hücre oranlarının 24., 48. ve 72. saat dağılımı.....	67
Grafik 4.3. Her dört gruptaki kaspaz-3 seviyelerinin 24. ve 72. saatteki dağılım grafiği....	72
Grafik 4.4. Her dört gruptaki fosforile GSK-3 β seviyelerinin 24. ve 72. saatteki dağılım grafiği.....	73
Grafik 4.5.1. Her dört gruptaki p-AKT ve t-AKT seviyelerinin 72. saatteki dağılım grafiği.....	75
Grafik 4.5.2. Her dört gruptaki p-p38 ve t-p38 seviyelerinin 72. saatteki dağılım grafiği.....	76
Grafik 4.5.3. Her dört gruptaki p-ERK ve t-ERK seviyelerinin 72. saatteki dağılım grafiği.....	77
Grafik 4.5.4. Her dört gruptaki p-I κ B α ve t-I κ B α seviyelerinin 72. saatteki dağılım grafiği.....	79
Grafik 4.5.5. Her dört gruptaki p-c-jun ve t-c-jun seviyelerinin 72. saatteki dağılım grafiği.....	80

SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AIF	: Apoptozisi indükleyen faktör
ALL	: Akut lenfositik lösemi
AML	: Akut miyelositik lösemi
Anneksin-V-FITC	: Anneksin-V-Floresein izotiyosiyanat
AP-1	: Aktivatör protein-1
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
APL	: Akut promiyelositik lösemi
ATCC	: Amerikan hücre kültür koleksiyonu
ATP	: Adenozin-3-fosfat
ATF	: Aktive edici transkripsiyon faktörü
A β	: β amiloid protein
BPNaz	: Bifosfat nükleotidaz
BSA	: Sığır serum albumin
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CRE	: cAMP yanıt elemanı
CREB	: CRE bağlanan protein
DAG	: Diaçilgliserol
DMEM-F12	: Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu ile birlikte besleyici karışım Ham's F-12 Medyumunu
ERK	: Hücre dışı sinyal tarafından düzenlenen kinaz
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm bölgesi
FasL	: Fas ligand
FBP	: Früktoz 1,6-bifosfat
FBS	: Fötal sığır serumu
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FGM	: Fosfoglukomutaz
GSK-3	: Glikojen sentaz kinaz-3
GTP	: Guanozin trifosfat
HIF1	: Hipoksi oluşturan faktör 1
IAP	: Apoptoz inhibitörü
ICAD	: Kaspaz ile aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü

ICE	: İnterlökin 1 β dönüştürücü enzim
ID ₅₀	: İnhibisyon dozu % 50
I κ B α	: I kappa B alfa
IKK	: I kappa B kinaz
IMPaz	: İnozitol monofosfataz
IP ₃	: İnozitol 1,4,5-trifosfat
IPPaz	: İnozitol polifosfat fosfataz
JAK	: Janus kinaz
JNK	: c-jun NH ₂ -terminal kinaz
KML	: Kronik miyelositik lösemi
KLL	: Kronik lenfositik lösemi
Li ⁺	: Lityum iyonu
LiCl	: Lityum klorür
MAP	: Mitojenin aktifleştirdiği protein
MAPK	: Mitojenin aktifleştirdiği protein kinaz
MEK	: Mitojenik hücre dışı sinyali düzenleyen kinaz
MEKK	: MAPK/ERK kinaz kinaz
Mcl-1	: Bcl-2 bağlantılı myelositik hücre lösemisi sekansı
MKK	: MAPK kinaz
MKKK	: MAPK kinaz kinaz
MTS	: Multiselüler tümör sferoid
NF- κ B	: Nükleer faktör-kappa B
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	: Fosfat tamponu içeren % 0,9'luk NaCl
PDGF	: Trombosit türevi büyüme faktörü
PDGFR	: Trombosit türevi büyüme faktörü reseptörü
P-gp	: P-glikoprotein
PI	: Propidyum iyodür
PIDD	: Ölüm bölgesi içeren p53 uyarıcı protein
PI3K	: Fosfoinozitol-3-kinaz
PIP ₂	: Fosfatidil inozitol-4,5-bifosfat
PKC	: Protein kinaz C
PLC	: Fosfolipaz C

PP1	: Protein fosfataz 1
p38	: p38 kinaz
RAIDD	: Ölüm bölgesi içeren RIP ile ilgili protein
RTK	: Tirozin kinaz reseptörü
SEM	: Standart hata
SD	: Standart sapma
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
STAT	: Sinyal çevireci ve transkripsiyon aktivatörleri
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
TNF- α	: Tümör nekroz edici faktör alfa
TRADD	: TNFR ile ilişkili ölüm bölgesi
VEGFR	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
Wnt	: Kanatsız

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lösemiler kemik iliğinde normal hücrelerin yerine neoplastik hücrelerin geçmesi ile karakterize hematopoetik hücrelerin kötü huylu oluşumlarıdır. Akut lösemiler olgun hücrelerin azalması ve lökosit prekürsörlerinin (lösemik blastlar) birikimi ile karakterizedir. Akut lösemide lösemik blastların birikimi, transforme olan hücrelerin hızlı çoğalmasıyla birlikte işlevsel olan son hücreler yönünde olgunlaşmamasına bağlıdır. Tedavide amaç lösemik hücre topluluğunun geride kalan az sayıdaki normal kök hücresinin düzelmesine imkan verecek şekilde azaltılmasıdır. Akut myelositik lösemi (AML) ağır seyreden bir hastalıktır. Yoğun kemoterapi ile hastaların çoğunda remisyon sağlanabilmesine rağmen, bunların büyük kısmında hastalık tekrarlar ve yalnız %10-15 inde uzun süreli hastalısız yaşam beklenebilir (1).

Hücre kültürü, bir organ veya dokudan alınan belirli bir grup hücrenin, uygun fizikokimyasal ve biyolojik işlemler sonucu in-vitro koşullarda üretilmesi tekniğidir. Hücre kültürü ile ilgili çalışmalar 1907 yılında Ross Harrison'un kurbağa embriyolarında yapmış olduğu çalışmalara dayanır (99). İlerleyen yıllarda uygun kültür besi ortamlarının geliştirilmesi ve besi ortamının içine antibiyotik eklenmesi kontaminasyon sorununu çözmüş ve bu teknolojinin, hastalıkların patogenezinin araştırılmasında, ilaç denemelerinin ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde birinci basamak çalışma içine girmesinin yolunu açmıştır (99). Günümüzde yapılan biyomedikal araştırmalarda primer kültür ya da hücre soyu, çalışmaların ilk fazını oluşturur. Primer kültürler sınırlı pasaj kapasitesinden dolayı fazla uzun yaşatılamazlar ancak, hücre hatlarının sınırsız pasaj yeteneğine sahip olduklarından dolayı çok uzun süre (hatta sonsuz) kullanma avantajı vardır (99). Hücre hatları bir organ veya dokuya özgül hücrelerin kuvvetli bir virus antijeninin promoteri ile immortalizasyon işlemlerinden geçtikten sonra oluşan ve sürekli bölünme yeteneği olan ölümsüz hücrelerdir (99).

Hücre hatları genel olarak süspansiyon ve monolayer kültürler olarak iki grupta toplanırlar. Süspansiyon kültürler daha çok kan ve kemik iliği gibi yumuşak doku tümörlerinin hücre hatlarını oluştururlar ve bu hücreler, içinde buldukları kaba yapışmazlar. Monolayer kültürler ise fibroblast, epitel, sinir doku gibi tümörlerin hücre hatlarıdır ve içinde buldukları kaba yapışlılar (99).

Hücreler geldikleri kökene göre farklı zamanlarda bölünürler. Bundan dolayı kültür besi ortamı, beslenme, üreme ve yaşam ortamı gibi şartlar hücreden hücreye değişiklik gösterir(99).

HL-60 Hücre Soyusu: Ulusal Kanser Enstitüsü'nden Steven J. Collins ve ekibi 1977 yılında ilk kez Beyaz ırktan, 36 yaşındaki AML hastası bir kadının periferik beyaz kan hücrelerinden HL-60 hücre hatlarını geliştirdiler. Bu hücre hattı insan miyeloid lösemik hücrelerinin ilk uzun süreli pasajlanabilir süspansiyon hücre kültürüdür, *malign* hücrelerin özelliklerini gösterir ve onkogenleri eksprese eder (100). Kültür içindeki hücreler oval ve yuvarlak görünümlüdürler, nadiren *pseudopod* bulunduklarından heterojendirler. Büyüklükleri 9-25 µm arasında değişir. Geniş bir çekirdeğe sahip olmasına rağmen nadiren de olsa 2-4 çekirdekli, net kromatin görünümlü yapısı vardır. Sitoplazmaları azurofilik granüllerden dolayı bazofilik yapıya sahiptir. İn-vivo granülositlerin bir özelliği olan PAS (Periodik Asit-Schiff) ve asit fosfataz ile pozitif boyanırlar ama nötrofilik granülosit ve monositlerin özelliği olan alkalın fosfataz ve α-Naftol AS-D asetat (nonspesifik) esterazları eksprese etmezler (100).

Sorafenib (Nexavar, BAY 43-9006) son dönemde kanser tedavisinde kullanılan spesifik etki gösteren yeni bir ajandır. Etkilerini c-Raf ve b-Raf gibi protein kinazları inhibe etmek üzere tasarlanmış oral bir ajandır. Ras/Raf sinyalleşme yolu tümör hücrelerinin proliferasyonu ve anjiyogenez için bir medyatördür. Bir protein kinaz inhibitörü olan aynı zamanda tümör damarlanmasında etkili olan VEGF reseptörleri üzerinde de etkin olduğu bilinmektedir. Yapılan değerlendirmelerde Sorafenib'in VEGFR-2, PDGFR-β, FLT3, ve c-KIT'i içeren birçok tirozin kinaz reseptörünü inhibe ettiği de saptanmıştır (2).

Lityum (Li⁺) manik depresif hastalık (bipolar bozukluk) profilaksi ve tedavisinde antipsikotik olarak kullanılan bir ilaçtır. Li⁺'un hücredeki kalsiyum konsantrasyonuna bağlı olarak, Wnt/katenin yolu üzerinden serin kinaz aktivitesine sahip glikojen sentaz kinaz-3 beta (GSK-3β) enzimini Wnt gibi inhibe ederek neoplastik ajan olarak yada indükleyerek antineoplastik ajan olarak davrandığı saptanmıştır (3, 4).

Çalışmamızda lösemi hücrelerindeki etkileri araştırmak üzere Avrupa Hücre Kültür Koleksiyonu hücre bankasından sağlanan insan HL-60 Akut Promyelositik Lösemi (APL) hücre soyusu kullanıldı.

Lityum Klorür (LiCl) ve Sorafenib ilaçlarının her biri için 1; 10; 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde steril bidistile suda hazırlanmış taze çözeltileri 100'er µl'lik eşit hacimlerde hücrelere verildi. Her bir ilacın her bir dozu için 3'er kuyucuğa ekim yapıldı. Tüm gruplar 24, 48 ve 72. saatler için ekildi ve 37 °C'de % 5 CO₂ hava karışımında rutubetli ortamda inkübe edildi.

24, 48 ve 72. saatler sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler ayrı ayrı toplanıp santrifüj edildi. Süpernatant kısımları atıldıktan sonra 1 ml medyum ile süspansiyon haline getirilip sayma kamarası (hemasitometre) ile sayıldı. Toplam hücre sayıları kaydedildi.

ID₅₀ (İnhibisyon dozu %50) değeri belirlendikten sonra iki ilacın beraber verileceği grup için yeni bir deney yapıldı. ID₅₀ değeri hem Lityum Klorür hem de Sorafenib için 100 µM olarak saptandı. Tutunma (proliferasyon) ve canlılık tayini için her 24 saat bitiminde hücreler santrifüj tekniği ile toplanarak hemasitometreye alınıp sayıldılar. Canlı hücre sayısı % 0.1'lik tripan mavisi (vital boya) ile 1/1 oranında hazırlanan hücre süspansiyonu kullanılarak elde edilen preperatın ışık mikroskopunda sayılması ile saptandı.

Sorafenib ve LiCl'ün ayrı ayrı ve kombine kullanımında APL hücre soyu HL-60 üzerinde yarattıkları etkileri hücre kültürü, akım sitometri analiz, ELİSA ve geçirimli elektron mikroskopi yöntemleri ile incelendi.

Sorafenib ve LiCl'ün ayrı ayrı ve kombine kullanımında APL HL-60 hücreleri üzerine apoptotik etkilerini değerlendirmek için Anneksin V-FITC/PI boyama kiti kullanılarak akım sitometri yöntemi ile ölü, canlı ve apoptotik hücreler sayıldı. Sonuçlar CellQuest ve WinMDI adlı analiz programları ile değerlendirildi.

Hücrelerin apoptozis ile öldüğünün kanıtı olan kaspaz-3 aktivitesi ELISA yöntemi ile tayin edildi. İlaçların apoptozis sonucunda hücrelerde oluşturduğu morfolojik değişiklikler Geçirimli (Transmission) Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılarak incelendi.

Hücredeki sinyal iletim mekanizmaları üzerine olan etkileri araştırmak için ELISA yöntemi ile fosforile GSK-3β, fosforile AKT, total AKT, fosforile p38, total p38, fosforile ERK, total ERK, fosforile IκBα, total IκBα , fosforile c-jun, total c-jun, fosforile STAT3 ve total STAT3 proteinleri ölçüldü.

Sonuçların istatistik incelenmesi SPSS 13 paket program kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama±SEM (Standart Error of Mean) olarak gösterildiler. Gruplar

arasındaki farklılıklar, Student *t*-test analiz yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Olasılık değerleri $p < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildiler.

Literatürde Sorafenib'in ve Li^+ 'un HL-60 APL hücre soyu üzerinde etkinliğini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. HL-60 hücre soyuna Sorafenib ve $LiCl$ 'un birlikte uygulanması ilk defa bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma ile her iki ilacın ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının HL-60 hücre soyu üzerine etkinliği aydınlatılarak, klinikte APL hastalarının tedavisine yeni bir yaklaşım ve katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürleri hücrelerin tek hücreyi kapsayacak şekilde, doku olarak düzenlenmede in vitro çoğalmasdır. Organizmadan doğrudan doğruya alınan organ, doku veya hücrelerden üretilen kültürlere primer kültürler adı verilir. Primer kültürler, buldukları yerde çoğalıp başka bir yere bölünerek aktarıldıktan (hücre pasajı) sonra hücre soyu (cell line) adını alırlar.

Primer hücre kültürlerinden veya hücre soylarından özel seçim veya klonlama yöntemi ile belirleyici bazı özellikleri olan hücreler elde edilir. Bu hücrelerin kültürde yaşamları süresince belirleyici özellikleri devam eder; hücrelerin pasaj yapılmış olması, onların belirleyici özelliklerini etkilemez.

Hücre suşları veya hücre soyları diploid veya heteroploid olabilirler, hücrelerin heteroploid oluşları onların habis hücreler olduklarını veya in vitro çoğalmalarının sınırsız oldukları anlamına gelmez. Hücre kültüründe sınırsız çoğalan hücre soy veya suşları, devamlı hücre soyları (established cell line) şeklinde tanımlanarak, yaşam süreleri sınırlı diploid veya heteroploid hücre soylarından ayrılırlar. Üç gün ara ile en az 70 defa pasaj yapılan hücre soyları “devamlı hücre soyu” olarak kabul edilmektedirler.

Günümüzde, hücre kültürleri esas olarak iki yolla üretilmektedir: Tek tabaka hücre kültürleri ve süspansiyon halinde hücre kültürleri. Tek tabaka hücre kültürleri, cam veya plastik zemin üzerine tutunarak yaşayan, işlevlerini sürdüren ve üreyen hücrelerdir. Süspansiyon halindeki hücre kültürlerinde, hücreler hayatsal işlev ve üremelerini süspansiyon halinde buldukları ortamda sürdürebilir. Doku kültürü ve yöntemleri kullanarak, hücre yapısı, fizyolojisi, patojen hücre ilişkileri, iyonlaştırıcı ışınların hücre düzeyinde incelenmesi ve çeşitli radyobiyojik problemlere bağlı olarak tümör büyümesinin açıklığa kavuşturulmasına çalışılır. Hücre kültürlerinde, in vivo şartlarda mümkün olmayan, kısa zaman aralığında gerçekleştirilmesi istenen fiziksel ve kimyasal etkenler incelenebilir.

2.1.1. Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları

Bugün için moleküler tanı ve tedavi amaçlı başta olmak üzere çok sayıda, özellikle araştırma amaçlı olmak üzere doku ve hücre kültürlerinden yararlanılmaktadır.

Doku ve hücre kültürlerinin sağladığı avantajlar şöyledir:

- Aşı üretimi
- Antikor üretimi
- İlaçların sitotoksik ve sitotaktik etkilerinin ölçülmesi
- Hücre içi metabolizma olaylarının araştırılması
- Hormonların hücresel düzeyde etkilerinin araştırılması
- Kalıtım maddesi ve protein sentezi ile yapılan araştırmalar
- Hücre içi enerji metabolizması ile yapılan araştırmalar
- Hücre yüzey reseptörlerinin çalışılması
- Hücre sinyal mekanizmalarının çalışılması
- Hücrelerin beslenme özelliklerinin çalışılması
- Enfeksiyonun hücresel düzeyde etkilerinin çalışılması
- Hücresel farklılaşma ve yaşlanma ile ilgili araştırmalar
- Programlı hücre ölüm mekanizmaları ve bunlara hormonların, ilaçların çeşitli değişkenlerin etkilerinin araştırılması.
- Tümör hücrelerinin ilaç duyarlılığının saptanması ile ilgili araştırmalar.
- Radyoterapinin hücresel düzeydeki etkileri.
- Embriyonik araştırmaları, üreme tekniklerinin geliştirilmesi ve pratikte kullanımı
- Hücre populasyon kinetiği ile ilgili yapılan araştırmalar
- Sitolojik, sitogenetik analizler ve genetik uygulamaların yapılması
- Gen aktarımı ile yapılan araştırmalar
- Hücre tutunma moleküllerinin çalışılması
- Hücresel düzeyde madde taşınmasının moleküler mekanizmaları
- Kök hücre araştırmaları
- Hücre ve doku mühendisliği ile ilgili yapılan araştırmalar ve uygulamalar.

Bugün için artık tek tabakalı ve süspansiyon hücre kültürlerinin ele alınarak klinik faydalarını en üst düzeye çıkarmak üzere orijinal doku mikro çevre özelliklerini yansıtan üç boyutlu kültür metotları geliştirilmiştir. Bu metotların içinde yumuşak agarda koloni oluşturma yöntemi ve multiselüler tümör sferoid (MTS) yöntemleri gibi metotlar gelmektedir. Bu metotların en önemli avantajları arasında orijinal doku özelliklerini yansıtma sayılabilir.(5).

2.1.2. Sferoid

MTS modeli laboratuvar koşullarında tümörlerin üç boyutlu yapısını yansıtır (6). MTS modeli in vitro monolayer hücre kültürleri ve solid tümörler için model oluşturarak, in vivo tümörler ve monolayer kültürler arasında bağlantı kurulmasına yardımcı olurlar (6,7). Sferoid kültürleri hem üç boyutlu organizasyonu hem de intakt dokuların farklılaşmış fonksiyonlarını monolayer kültürlerden daha iyi yansıtır.

Sferoid kültürlerin diğer bir avantajı da her bir ayrıntının kolayca gözlemlendiği morfolojik şekle sahip olmalarıdır. Bu morfolojik şekiller, difüze eden makromolekülleri gözlemlenmede ve çevresel şartları analiz etmede bize bir şans verir (6).

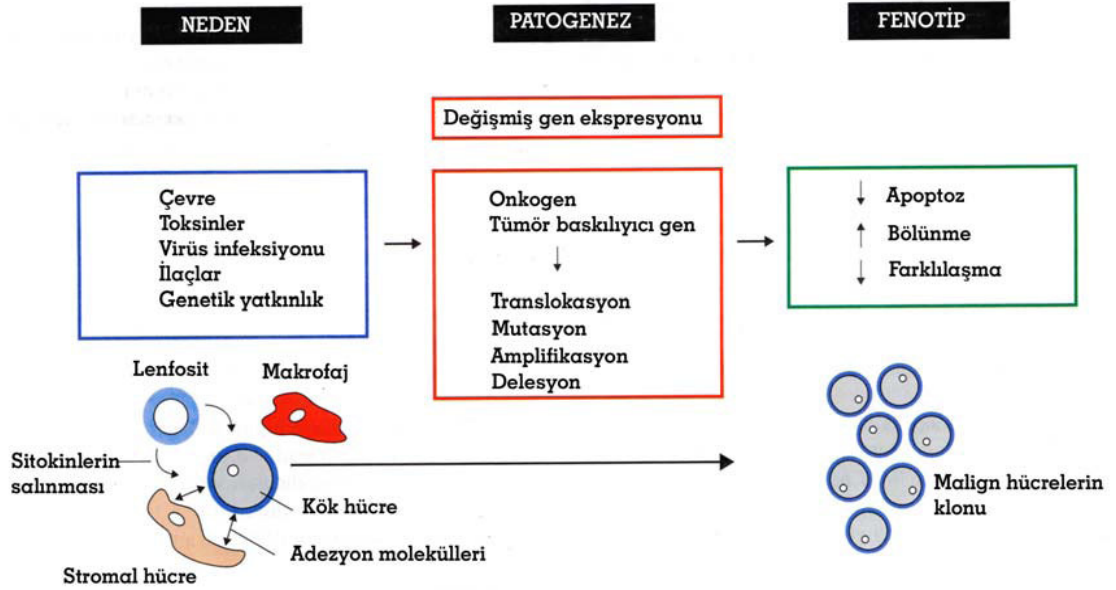
2.2. LÖSEMİ ve TIPLERİ

Kanser, hücre ölüm programı bozulmuş, kontrolsüz bölünen hücrelerin aşırı çoğalması sonucu oluşan neoplastik bir hastalıktır. Kanser kelime anlamı olarak Yunancada “canceros” yani yengeç anlamındadır. Kanser oluşumu, genetik değişimleri, proto-onkogen aktivasyonunu, tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunu içeren çoklu bir süreçtir (8). Kanseri kötü huylu yapan iki özelliği vardır. Birincisi; kanser hücrelerinin komşu dokuları işgal etmesi ve ikincisi; vücuttaki diğer organlara yayılmasıdır ki en kötü olanı da budur ve metastaz olarak adlandırılır.

Paleopatoloji bulgularına göre kanser ile ilgili ilk kanıtlar tarih öncesi devirlere kadar dayanmaktadır. Günümüzden 100.000.000 yıl önce yaşamış olan dinazorların fosillerinde osteojenik sarkomalara rastlanmıştır (9). Aynı şekilde bunlardan birkaç milyon yıl sonra yaşamış olan monosaruslarda osteomalara işaret edilmektedir. Pleistosen’de yaşayanların fosillerinde pelvik kemiklerinde de osteosarkomların olduğu gözlemlenmiştir (10).

Eski Mısır papirüslerinde insan meme kanserlerine ilişkin bilgiler vardır (4). Bilim adamları kanseri ilk kez 19. yüzyılda sınıflamaya başlamışlardır. Günümüzde, enfeksiyonlar, kimyasal ve fiziksel ajanlar ve genetik yatkınlık insan kanserlerinin önemli nedenleri arasında yer almaktadır (11).

Lösemi, Yunancada “Beyaz Kan” anlamında kullanılan, lökosit adı verilen hücrelerin kanseridir. Aynı zamanda bu olgunlaşmamış şekilli kan hücrelerinin kötü huylu bir hastalığı olarak da bilinir (12). Lösemiler ya da kan kanserleri en sık görülen on tip kanser arasında yer alır. Lösemide, çok sayıda lökosit kemik iliğindeki kök hücrelerden yapılır, ancak olgunlaşamazlar (Şekil 2.1) (13). Bu olgunlaşmayan hücreler normal işlevlerini göremezler. Kemik iliğinde başlayan kanser, kana, lenf nodlarına, dalağa, karaciğere, merkezi sinir sistemine, testis ve diğer organlara yayılır.(13,14)



Şekil 2.1. Hematolojik malignitelerin patogenezi (13).

Lösemiler kendi içinde akut (hızlı ilerleyen) ve kronik (yavaş ilerleyen) olmak üzere iki ana sınıfta incelenirler. Etkilenen lökosit tipine göre ise miyeloid ve lenfoid olarak da sınıflandırılabilirler. Löseminin dört önemli tipi vardır (14).

1. **Akut Lenfositik Lösemi (ALL):** En sık çocukluk çağında görülen lösemi tipidir. 65 yaşın üzerindeki erişkinleri de etkilemektedir.
2. **Kronik Lenfositik Lösemi (KLL):** Genellikle 55 yaş ve üzeri erişkinleri etkiler. Zaman zaman genç erişkinlerde de hastalık görülür. Çocukluk çağında neredeyse hiç görülmez.
3. **Akut Miyelositik Lösemi (AML):** Hem çocuklar hem de erişkinlerde görülür.
Bu lösemi tipi bazen akut non-lenfositik lösemi (ANLL) olarak da adlandırılır. Sekiz farklı alt grubu (M0-M7) vardır.
4. **Kronik Miyelositik Lösemi (KML):** Çoğunlukla erişkinlerde görülmesine rağmen, nadir olarak çocukları da etkiler.

2.2.1. Löseminin Semptomları ve Tanısı

Löseminde, kemik iliği lösemik blastlar ürettiğinden eritrosit, trombosit, lökosit gibi sağlıklı kemik iliği elemanları yeterince üretilemez. Bu yüzden anemiye bağlı solukluk, zayıflık ve bitkinlik, trombositlerin azalmasıyla (<50.000/μl) çürükler ve kanamalar ortaya çıkar. Blastlar işlevsel olarak anormal olduklarından hastalar enfeksiyonlara açıktır (15).

Bütün kan hücreleri gibi lösemik hücreler de vücutta dolaşırlar. Lösemik blastların sayısına ve bulunduğu yere bağlı olarak hastalar farklı belirtiler gösterebilir. Akut lösemide, belirtiler hızlı ve ağırdır. Anormal hücreler beyin (Merkezi Sinir Sistemi) veya omurilikte toplanırsa hastalık baş ağrısı, kusma, konvüzyon, kas kontrolünün zayıflığı ve kasılmalar ile, testislerde toplanırsa şişme ile kendini belli eder. Genel olarak lösemik hücreler toplandıkları yere bağlı olarak, buldukları doku ve organları etkilerler. Bazı hastalarda, deri ve gözde şişme, sindirim sistemi, solunum sistemi, boşaltım sistemi ve diğer sistemlerde işlev bozuklukları görülebilir. Ayrıca trombositopeniye bağlı kanamalar da olabilir (13-16).

Löseminde yaygın görülen semptomlar (16):

- Anemi sonucu oluşan yorgunluk, uyuşukluk ve solgunluk

- Lökosit işlevlerinin bozulması sonucu oluşan sıklıkla ve uzun süreli tekrarlayan şiddetli enfeksiyonlar
- Trombosit azalması sonucu kendiliğinden kanama ve sıklaşan morarmalar
- Deri altında oluşan peteşi olarak adlandırılan kırmızı noktalar
- Kanamalı ve şişmiş diş etleri
- Gece terlemeleri
- Kemik ve eklem ağrıları
- İştah ve kilo kaybı
- Şişmiş ve hassaslaşmış lenf bezleri
- Karaciğer ve dalak büyümesi

Lösemi tanısında, mikroskopik inceleme en önemli yöntemdir. Periferik kan yayması lösemiye belirleyebilir fakat tipini belirlemede yetersizdir. Kemik iliği aspirasyon materyali yayması, akım sitometre ile immüfenotiplleme, detaylı sitokimyasal boyamalar ve mikroskopik inceleme, sitogenetik ve moleküler analiz, lösemi tipini belirlemede etkin tanı yöntemleridir (15).

2.2.2. Löseminin Tedavisi

Löseminin tedavisi hastalığın şiddetine, lösemik hücrelerin özelliklerine, alt tipine, daha önce alınan tedavilere, hastanın yaşına, semptomlarına bağlı olarak değişiklik gösterir ve kompleks bir tedavi protokolü gerektirir (15-16).

Akut lösemilerde kemoterapi ilk tedavi tercihidir ve hastanın durumuna bağlı olarak radyoterapi eklenebilir. Günümüzde AML vakalarında remisyon indüksiyonu ve konsolidasyonu takiben hematopoetik kök hücre nakli ile tedavi şansı artmaktadır (15-16).

Genel olarak çocukluk dönemi ALL'lerde uzun süreli iyileşme oranı %70-80 iken, erişkin ALL'lerde bu oran ancak %40-45 dolayındadır. Eski yıllarda AML'lerde, uzun süreli yaşam oranı ise yaklaşık %20 dir. Yüksek doz kemoterapi, kemik iliği

transplantasyonu, uzun süreli yaşam oranını en fazla %50-70'e çıkarsa da ortalama %40-50 dolaylarında bir iyileşme şansı vardır. KML'lerde, yalnızca allojenik kemik iliği nakli ile iyileşme mümkündür. KLL'lerde ise, tam bir iyileşme sağlanamaz (15-16).

Kemoterapi, kanserli hücrelerin büyümesini ve bölünmesini durduran sitotoksik ilaçlar ile yapılan bir tedavidir. Damar ve ağız yoluyla verildiklerinden normal hücrelerin büyümeleri ve bölünmeleri üzerinde de etkilidirler (15-16). AML'de uygulanan tedavi protokolü çok kısa bir sürede yüksek dozda olmasına rağmen ALL'de uzun süreli kemoterapi gerekir. Birçok kemoterapi protokolünde, remisyona indüklenmesini takiben konsolidasyon tedavileri ile anti-lösemik yanıt güçlendirilmekte ve daha sonra idame tedavisi ile kemoterapi sürdürülmektedir.

2.2.3. Akut Miyelositik Lösemi (AML)

Akut miyeloblastik lösemi (AML), dört önemli lösemi tipinden biri olup kemik iliğindeki normal hücrelerin azalmasıyla tanınır. Kemik iliğindeki blast hücreleri % 30 oranını aştığında lösemi tanısı konulmaktadır ve hastalığın şiddeti blast oranı ile doğru orantılıdır. Hastalık tedavi edilmezse, tanıyı takiben birkaç hafta ya da birkaç ay içinde ölüme sonuçlanmaktadır. Bu ciddi ölümcül hastalığın bir çoğu henüz bilinmeyen nedenlerden kaynaklandığı, özellikle 1945'te Japonya'da Hiroshima ve Nagasaki'ye atom bombasının atılmasından yıllar sonra sayısal artış gösterdiği gözlenmiştir. Radyoterapi alan kanser hastalarında da remisyondan yıllar sonra lösemi gelişmesi de, radyasyonun lösemi etiyolojisinde önemli bir etken olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kimyasal ajanlardan benzen ve bazı anti-kanser ilaçları da AML gelişiminde etkilidir. Virüslerin bazı hayvanlarda lösemiye yol açtığı ve ayrıca bazı onkogenik virüslerin (Herpesvirus, Human T-cell Lymphoma Virus type-I gibi) sitoplazmik kinazları fosforile ederek STAT (Signal Transducer and Activation of Transcription) sinyal yolu üzerinden onkogenik aktivasyon yolu ile, insan hematopoetik hücrelerinde farklılaşmayı engelleyerek AML'ye neden olduğunu doğrulayan bilgiler mevcuttur (17-18).

AML çocukluk çağı lösemilerinin yaklaşık %15'ini oluşturur. Bu olguların %25-30'u 10-15 yaş arasındaki çocuklardır. Ayrıca, "Down Sendromu, Bloom Sendromu, Ataksi Telenjiyektazi , Nörofibromatozis, Klinefelter Sendromu, Turner Sendromu ve

Kseroderma Pigmentozum” gibi kromozomal bozukluklarla seyreden hastalıklarda da AML riski yüksektir.

FAB (French American British Association) sınıflandırmasına göre AML M0-M7 olmak üzere sekiz alt grupta toplanır (17-18).

FAB Sınıflandırmasına Göre AML:

M0: Akut miyeloblastik lösemi (farklılaşmamış)

M1: Akut miyeloblastik lösemi (olgunlaşma göstermeyen)

M2: Akut miyeloblastik lösemi (minimal olgunlaşma gösteren)

M3: Akut promiyelositik lösemi (2 alt tipi vardır)

APL : Hipergranüler akut promiyelositik lösemi

APL-V (M3V) : Mikrogranüler akut promiyelositik lösemi

M4: Akut miyelomonositik lösemi

AML-M4Eo : Artmış eozinofili ile seyreden AMMoL

M5: Akut monositik lösemi

M5a : Akut monoblastik lösemi (hafif farklılaşmış)

M5b : Akut monositik lösemi (farklılaşmış)

M6: Eritrolösemi

M7: Akut megakaryoblastik lösemi

AML’de genetik bulgular, özelleşmiş alt tiplerinde görülen kromozomal değişikliklere dayanır. En çok görülen kromozomal değişiklikler, M3 tipi olan promiyelositik lösemi (PML)’ye özgü olan t(15;17) translokasyonu, M2 tipinde görülen t(8;21) translokasyonu, eozinofili ile karakterize M4 tipinde inv(16) inversiyonu, M5a tipindeki t(8;16) translokasyonudur. Resiprokal translokasyonlar sonucu oluşan kırılma noktalarının analizinde yeni füzyon gen transkript ürünlerinin varlığı ortaya çıkarılmıştır(14).

AML’nin en belirgin moleküler mekanizmaları arasında DNA aktivasyonunu etkileyen özel mutasyonlar ve gen amplifikasyonları yer almaktadır. Hematopoetik

hücrelerde, bölünme, ölüm, farklılaşma, hücre döngüsü kontrol noktaları ve tamir gibi kompleks sistemlerdeki dengeler bozulunca AML ortaya çıkmaktadır. Özellikle farklılaşmada kritik öneme sahip AML-1 ve c-myc gibi genler bu mekanizmalar ile etkilenmektedir (13-14, 16, 19-20).

FLT3 (fms-like tyrosine) reseptör geni *internal tandem duplikasyonları (ITD)* ve mutasyonları AML'de en sık görülen moleküler değişikliklerdir (21-22). AML'li hastaların %20'sinde FLT3 geninin internal tandem duplikasyonu bulunmakta ve kötü prognoza işaret etmektedir (23-24).

Yaklaşık her üç AML hastasının ikisinde KIT geni mutant olarak bulunmaktadır. AML hastalarının 1/3'ünde ise çeşitli tipte delesyon ve insersiyon mutasyonları bildirilmiştir (25).

AML hastalarının %15'inde WT-1 (*Willm's Tumor-1*)'in kötü prognozla ilişkili mutasyonları bulunur. Bu mutasyonlar sıklıkla heterozigot yapıdadır ve WT1'in DNA'ya bağlanmasını engelleyerek genin normal aktivitesini baskılar (26).

CEBP-A geni, CCAAT/ enhancer binding protein-a (C/EBPa)'yı kodlar ve tümör baskılayıcı ve proliferasyon inhibitör olarak bilinen bir transkripsiyon faktörüdür (28-29). Hematopoetik hücrelerin farklılaşması sırasında artış gösterir fakat AML1-ETO ya da BCR-ABL translokasyonları durumunda bu genin ekspresyonu azalır. AML vakalarının %7'sinde bu gende mutasyon bulunmaktadır ve karyotipik anomalilere neden olur. CEBP-A ekspresyonunda azalmaya neden olan AML1-ETO translokasyonlu vakalarda bu gende mutasyon saptanmamıştır (27).

AML1'in RunX bölgesinde bulunan yanlış anlamlı bir mutasyondan dolayı DNA bağlanma ve transaktivasyonun engellenmesi sonucu, AML-M0 fenotipi gözlenmektedir. Bu mutasyon sonucu, olgunlaşmadan sonlanmış proteinler inaktif hale gelir (28-29).

Bazı genetik hastalıklarda AML ve Miyelo Displastik Sendrom (MDS)'a yatkınlık söz konusudur. Örneğin, Down sendromlular, monozomi-7'li Fanconi anemi hastaları, i(7q)'lu Scwachman sendromlular bu grupta sayılabilir (16).

2.3. APOPTOZİS

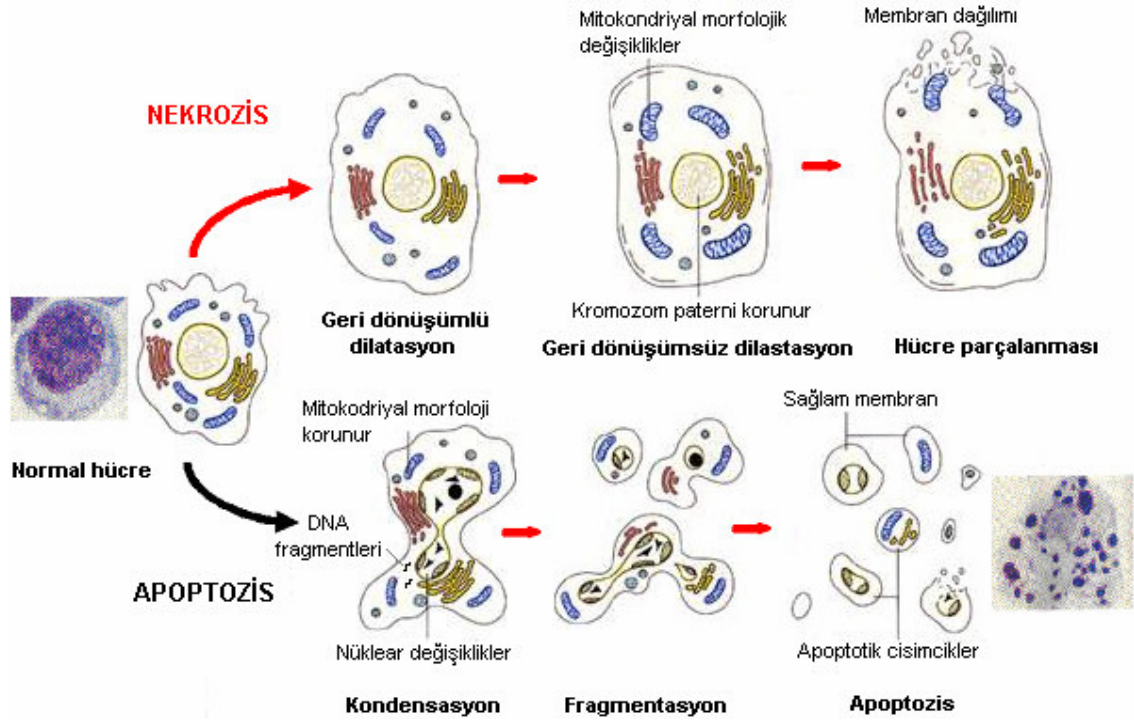
Yunanca'da "ağaçların yapraklarını dökmesi" anlamına gelen apoptozis, ilk kez literatürde 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından "mitozun karşıt anlamı" olarak kullanılmıştır (30). Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinir ve fizyolojik bir olaydır. Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Malign hastalıklar, klasik olarak kontrolsüz aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen, beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında biriktirdikleri mutasyonların etkisi ile malign hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar. (31,32).

2.3.1. Apoptozis ve Nekrozis

Apoptozis, klasik hücre ölüm şekli olan nekrozisden birçok özelliği açısından oldukça farklı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Nekrozis, fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen, apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Diğer bir ifadeyle, apoptozis hem sağlıklıta hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır. Apoptozis, morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken (cell swelling), apoptotik hücre tam tersine küçülür (cell shrinkage). Nekrozisde kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır (chromatin aggregation) ve kondanse olur (chromatin condensation). Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı bütünlüğünü korur ve üzerinde küçük cepçikler (membrane blebs) oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere (apoptotik bodies) parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır, değişen miktarlarda çekirdek veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozisde plazma membranının bütünlüğünün bozulması hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama salınması sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları

hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz.

Apoptozisin en önemli özgül yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180–200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının (ladder pattern) ortaya çıkmasına neden olur. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır (phosphatidylserine translocation). Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar. (33,31,34,32).



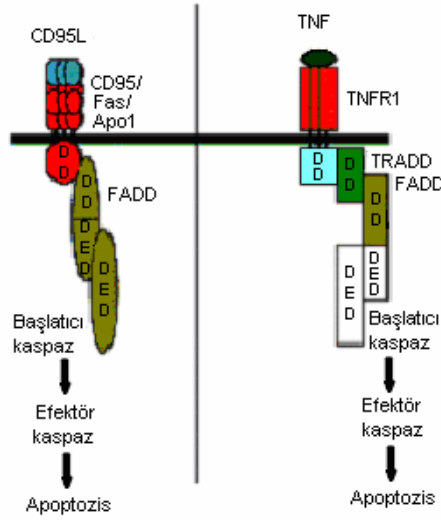
Şekil 2.2. Apoptozis ve nekrozis (31 ve 35'den uyarlanmıştır).

2.3.2. Apoptozisdeki Major Etkenler

2.3.2.1. Ölüm Faktörleri ve Ölüm Reseptörleri (TNF Ailesi ve TNFR Ailesi)

Sitokinler, protein yapısında olup hedef hücrelerde özgül reseptörlere bağlanarak hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol ederler. Önemli apoptotik faktörlerden Fas Ligand (FasL) ve TNF- α (Tümör Nekrozis Faktör-alfa), sitokinlerin bir grubu olan TNF ailesinin üyesidirler. (36,37). FasL ve TNF- α , apoptozisi başlatmak üzere hedef hücrede özgül reseptörlere bağlanırlar. FasL'ın reseptörü olan Fas, APO-1 veya CD-95 adıyla da bilinen bir tip-1 membran proteindir. Fas, TNF reseptör ailesinin bir üyesidir ve bu ailenin diğer üyeleri arasında TNFR-1, TNFR-2 sayılabilir. TNF ligandı, reseptörleri TNFR-1 veya TNFR-2 ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. TNFR-1, pek çok dokuda bu sinyalin aktivasyonundan ve iletiminden sorumludur. TNF, TNFR-1 ile bağlandıktan sonra apoptotik sinyal iletimi gerçekleşir ve bu apoptotik yolun sonunda kromozomal DNA yıkımı ile hücre ölümü meydana gelmektedir. (38).

TNFR-1 ve Fas'ın sitoplazmik parçasında bulunan yaklaşık 80 aminoasitlik homolog bölgeler, ölüm sinyalinin iletimini sağladıklarından ölüm bölgeleri olarak adlandırılmışlardır. Bu bölgeler, FADD (Fas ile ilişkili ölüm bölgesi) veya MORT1 ve TRADD (TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgesi) olarak adlandırılır. TRADD, TNFR-1 ve TNFR-2 reseptörlerinin, FADD ise Fas reseptörünün ölüm bölgesidir. Bu bölgeler aracılığıyla kaspaz-8'i aktive ederek kaspaz kaskadını başlatıp apoptozise neden olurlar. (36,37). (Şekil 2.3.)



Şekil 2.3. Ölüm faktörleri ve reseptörleri (39'dan uyarlanmıştır).

2.3.2.2. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (*pro-apoptotik*: Bax, Bad, Bid, Bcl-xS, Bak, Bim, Bik, Bmf), bir kısmının ise inhibe ettiği (*anti-apoptotik*: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1) geniş bir ailedir. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo- veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu (survival) bu ailenin pro-apoptotik (apoptozisi indükleyici) ve anti-apoptotik (apoptozisi baskılayıcı) üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax'ın (ikisinin oranının) bazı hematolojik malignansilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin aktivasyonu veya inhibisyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir (31,32).

Proapoptotik Bcl-2 üyeleri mitokondriden sitokrom-c salınmasını indüklerken, antiapoptotik üyeleri sitokrom-c salınmasını baskılar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi, yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks) bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cepi oluşturur. Amfipatik α -heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer Bcl-2 ailesinin BH3 bölgesine bağlanırlar Pro-apoptotik üyeler kendi içlerinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt gruplardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (Örn; Bax, Bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Bu bölgenin, apoptozisin diğeri

hücrel yollarla ilişki kurduğu düşünülmektedir. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak “intrinsic” sitokrom-c'nin alınmasını baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin antiapoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom-c salınması gerçekleşir. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir (40).

Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2, hücrelerin normalden uzun yaşam sürelerine neden olur. Böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax ve Bad sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler (pore) oluşumunu indükler, böylece seçici iyon geçirgenliği kaybolur, sonuçta sitokrom-c ve apoptozis-indükleyici faktör olarak bilinen AIF'ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar. Bcl-2'nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi baskılayabildiği bulunmuştur (38,40).

2.3.2.3. Kaspazlar

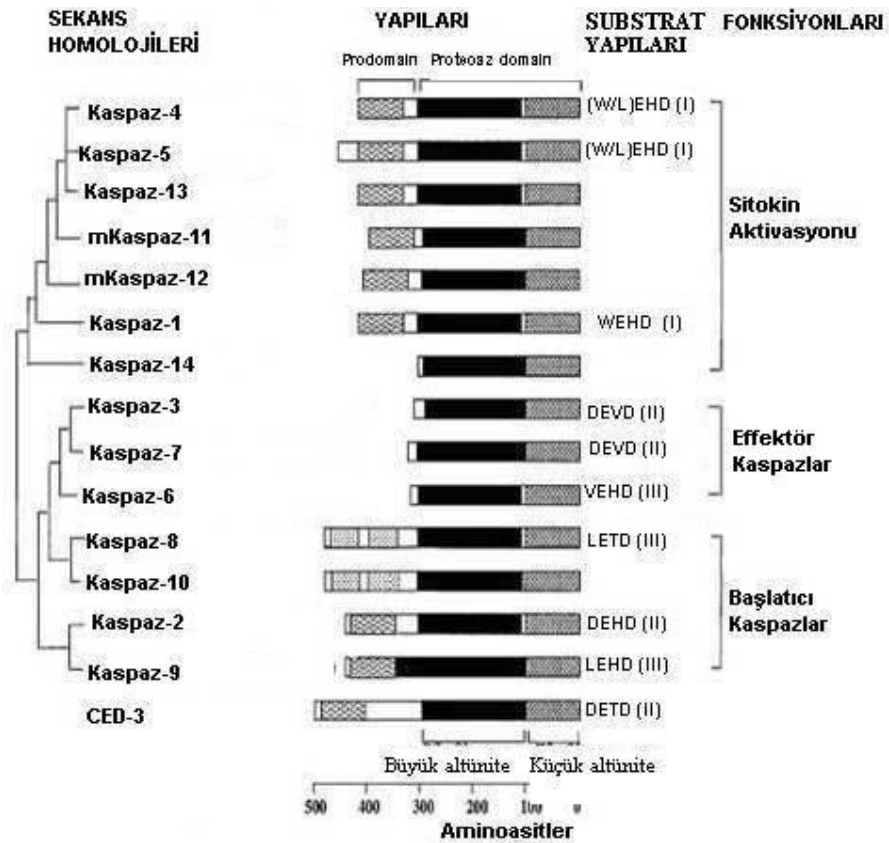
Kaspazlar (Caspase= Cysteine Aspartyl-specific Protease), sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler (41). Yapısal olarak bütün kaspazlar NH₂ terminal bölgesi ve farklı motiflerde aminoasit zinciri taşıyan 20 ve 10 kDa ağırlığında 2 proteaz sahası taşır. Bu proteaz alanındaki sekans benzerlikleri göz önüne alınarak kaspazlar 3 sınıfa ayrılmıştır (42).

1. **Başlatıcı Kaspazlar**, bu gruba 2., 8., 9. ve 10. kaspazlar dahildir ve bu kaspazlar pro-apoptotik sinyali alarak, sinyalin alt kısmında kalan diğer kaspaz üyelerinin aktive olmasını sağlarlar. Her biri 100 amino asitten oluşan başlatıcı kaspazlar, transmembran reseptörleri veya sitotoksik etkiye sahip maddeler ile etkileşerek aktif hale geçerler (43). Bu kaspazlar, adaptör ve düzenleyici proteinlerin farklı kombinasyonları ile etkileşime girerek apoptotik mekanizmanın hücre içerisinde

farklı yönlerde devam etmesine neden olurlar. Kaspaz 2'nin aktivasyonu için ölüm bölgesi içeren PIDD (ölüm bölgesi içeren p53 uyarıcı protein) ve adaptör protein olarak da RAIDD' (ölüm bölgesi içeren RIP-ile ilgili protein) nın gerekli olduğu yakın zamanlarda tespit edilmiştir (44).

2. *Effektör Kaspazlar*, bu gruba 3. , 6. ve 7. kaspazlar dahildir ve bu kaspazlar çeşitli hücre içi proteinleri enzimatik reaksiyonlarla parçalarlar ve apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (45).

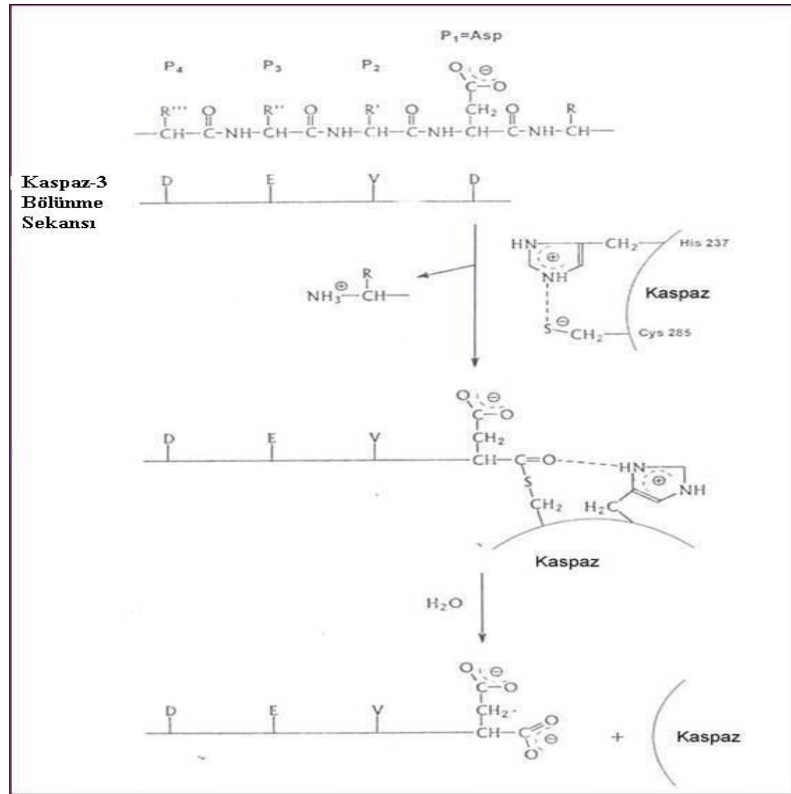
3. *Sitokinleri Aktive Eden Kaspazlar* ise, hücre sinyal iletiminde önemli role sahip sitokinlerin aktivasyonları için gereklidir. Bu gruba dahil olan Kaspaz 1, interlökin-1 β dönüştürücü enzim (ICE) olarak bilinmekte ve öncül interlökin-1 β 'nın aktif hale geçmesine neden olmaktadır (45,46) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kaspazların sınıflandırılması (47).

Aktif hale geçen kaspazlar hücre içindeki spesifik substrat molekülleri üzerine proteolitik etkiye sahiptirler ve substratlarındaki C-ucundaki aspartik asit kalıtı ve N-ucundaki en az 3 amino asit kalıtını tanıyarak, katalitik reaksiyonun gerçekleşmesini sağlarlar (43).

Katalitik reaksiyonun ilk basamağında kaspazların aktif merkezlerinde yer alan sistein amino asidinin nükleofilik tiol grubu, substratların aspartik asiti ile tiyoaçil kovalent bir bağ oluşturur. İkinci basamakta ise, histidin amino asitindeki imidazol halkasının yardımıyla amid bağının hidrolizi gerçekleşmektedir (43) (Şekil 2.5).



Sekil 2.5. Kaspaz ve substrat reaksiyonu (43).

Tablo 2.1. Kaspaz enzimlerinin substratları (47).

Hücre ölüm proteinleri	Bcl-2, Bcl-x ₁ , Bid, CrmA, IAP, p ₂₈ , Bap31, p35, Prokaspazlar
Hücre döngüsünde rol oynayan proteinler	Cdc27, Siklin A, MDM2, p21, p27, PITSLRE kinaz Retinoblastoma proteini, Wee1 fosfataz
Hücre iskeleti	Aktin, β -Katanin, Fodrin, Gas2, Lamin, Plokoglobulin, Gelsolin, Keratin 18 ve 19
Sitokin prekürsörleri	Pro-IL-1 β , Pro-IL-16, Pro-IL-18 (IGIF)
DNA metabolizması ile ilgili substratlar	DNA-bağımlı protein kinaz (DNA-PK), DNA replikasyon kompleksi C (DSEB/RFC140), ICAD, MCM3 DNA replikasyon faktörü, NuMA, PARP, Topoizomeraz I
Sinir hücreleri proteinleri	APP, Ataksin-3, Androjen reseptörü, Atropin-1, Huntingtin, Preselininler
RNA metabolizması ile ilgili proteinler	Ökaryotik başlatıcı faktör 2 α , Heteronükleer ribonükleer protein C1 ve C2, 70 kDa U1-snRNP
Sinyal proteinleri	Adenomatous polyposis coli protein (APC), PKB/AKT, Kalmilin bağımlı kinaz IV, c-Raf, D4-GDP dissociation inhibitör, Fyn tirozin kinaz, Fokal adezyon kinaz, MEKK1, MST/Ksr, PAK-2/hPAK65, Protein kinaz C , protein kinaz C-related kinaz 2, Protein Fosfotaz 2A, Ras GTPaz aktive edici protein
Transkripsiyon faktörleri	Heat shock faktör, GATA-1, I κ B- α , NF- κ B (p50,p65), NFR-2, Sp1, STAT1, Sterol-regulator element-bağlayıcı protein
Diğer substratlar	Calpastatin, Hsp90, Nedd4, Fosfolipaz A2, Rabaptin-5, Transglutaminaz

2.3.2.3.1. Kaspaz İnhibitörleri

Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan IAP (“inhibitors of apoptosis”)’ler, kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP’ler ayrıca hücre döngüsünü de etkileyerek apoptozisi durdurabilirler. Kaspazlardaki defektler otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilir (48). Hatta kaspaz-8’in nöroblastomada tümör supressörü olarak işlev gördüğü bulunmuştur (49).

IAP’ler prokaspazların aktivasyonunu önleyerek ve olgun kaspazların enzimatik aktivitesini inhibe ederek apoptozisi baskılayabilir. Birkaç farklı memeli IAP proteini (XIAP, c-IAP1, c-IAP2 ve survivin) tanımlanmıştır ve bunların hepsi hücre kültüründe anti-apoptotik aktivite göstermektedir (50,51).

IAP’ler, apoptoziste hem mitokondriyal (intrinsic) hem de ölüm reseptörü aracılı (extrinsic) yolları regüle eden antiapoptotik protein ailesidir. IAP’lerin antiapoptotik aktivitesi, bu protein ailesinin tüm üyelerinde bulunan, korunmuş baculovirus IAP tekrar domainine atfedilir. İnsan IAP’lerinin bazıları (XIAP, c-IAP1, c-IAP2) direkt olarak pro-kaspaz-9’a bağlanıp sitokrom-c’ye karşılık pro-kaspaz-9’un aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir (52). Ya da efektör kaspazlardan kaspaz-3 ve kaspaz-7’nin proteaz aktivitesini direkt olarak baskırlar (50). Onun için, IAP’ler, apoptozisin ölüm

reseptörü aracılı (extrinsic) ve mitokondriyal (intrinsic) yollarında iş gören downstream proteazlar gibi bazı kaspazların endojen (içsel) antagonistleri olarak görev yapar. Bazı IAP'lerin artmış gen anlatımı, istenmeyen klinik sonuçları olan kanserlerde bildirilmiştir (53).

2.3.2.3.1.1. Survivin (IAP: Inhibitors of Apoptosis grubu üyesi)

Survivin 17q25 kromozomal bölgede olup, bir apoptozis inhibitörüdür ve pek çok insan kanserinde artmış gen anlatımı (overekspresyon) olur. Survivin gen anlatımı (ekspresyonu) hücre döngüsü bağımlıdır. Çoğalan hücrelerde hücre döngüsünün G₂/M fazında yüksek seviyelerde ekspresyon olur ve hücre döngüsü durduktan sonra hızla gen anlatımı düşer. Mitozun başlangıcında survivin mitotik iğ ipliklerinin mikrotübülleri ile bağlanır. Survivin-mikrotübül interaksiyonlarının bozulması, survivinin antiapoptotik fonksiyonu kaybına neden olur ve mitoz sırasında hücre ölümünde gerekli bir mekanizma olan kaspaz-3 aktivitesinde bir artışa neden olur. Kanserde survivin artmış gen anlatımı (overekspresyonu) apoptotik bir kontrol noktası olabilir. Survivin tarafından yürütülen antiapoptotik yolun manipülasyonu kanser terapisi için yararlı olabilir (54,55).

Survivin, upstream ve terminal kaspazları inhibe ederek hücre ölümünü baskılayan protein ailesi IAP'lerin bir üyesidir (56,57,58,59,60,61,62). Bu proteinler çeşitli uyarılar (TNF- α , Fas, growth faktörün olmayışı gibi) ile indüklenerek apoptozisi baskılar (58,56,57,54). Survivin, hem hücre ölümü hem de hücre çoğalmasıyla ilişkilidir (63). Survivin olgun, terminal olarak farklılaşmış dokularda ekspresyon olmaz, fakat çoğu insan kanserinde ve kanser hücre hatlarında ekspresyon olur (58,63). Survivin ekspresyonunda bir bozulma hücre ölümü ve hücre döngüsü bozukluklarına neden olur (64,65,66). Çeşitli çalışmalarla Survivin ekspresyonunda artışın, AML'de ve bazı kanserlerde kötü prognoz ve tümör yinelenmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (67,68,69). Carter ve ekibinin gerçekleştirdiği iki çalışmada da Survivin artmış gen anlatımı AML hastalarının blastlarında tespit edilmiştir (70).

2.3.2.4. Sitokrom-c

Sitokrom-c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteinidir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması

apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom-c, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamış bir şekilde mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör (“AIF, apoptosis-inducing factor”) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom-c sitoplazmik protein olan Apaf-1 (“apoptotic protease activating factor-1”)’e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP’nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9’un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3’ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (“ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease”) inaktifleştirir, böylece ICAD’ünün bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (“CAD, caspase-activated deoxyribonuclease”) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (31,32).

2.3.2.5. p53

p53 gen ailesi hücre içinde oldukça önemli rollere sahiptir. Bunlardan birisi; hücre siklusunun durdurulması, bir diğeri ise hücre ölümünün aktive edilmesidir (71). p53, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı (“single or double-strand breaks”, nükleotid eksikliği) oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA’sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eger DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler. p53’ün apoptozisi indüklemesi bax’ın ekspresyonunu artırması böylece bcl-2/bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Fakat bax gen aktivasyonu için tek geçerli mekanizma, p53 aktivasyonu değildir (72). Bazı virüsler (insan papillom virüsü, Epstein-Barr virüsü, adenovirüs tip 12) ya p53’ü inaktive ederek ya da bax’a bağlanarak apoptozisi bloke ederler, böylece bu hücrelerin enfekte ettikleri hücreler doğal hücre ölüm mekanizmasından kurtulduklarından virüsle-indüklenen karsinogeneze bu yolla katkıda bulunurlar. p53 ayrıca bir transkripsiyon faktörü olan Mdm2 (murine double minute 2) tarafından da ya transkripsiyonu “down” regüle edilerek ya da kendisine bağlanılarak hem aktivitesi inhibe edilir hem de yıkımı hızlandırılır. Fakat, DNA’nın hasarlanması halinde p53’ün fosforilasyonu artar ve buna bağlı olarak da Mdm2’den ayrılır, böylece yarılanma ömrü uzadığı için de aktivitesi artar (73).

2.3.2.6. Granzimler

Granzimler, patojenle enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkin rol alırlar. Perforinler ve granzimler normal olarak sitotoksik lenfositlerin ve Natural Killer hücrelerin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar. Sitotoksik lenfositlerin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin membranında porlar meydana getirirler. Perforin porlar sitozolik kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Beraberinde salgılanan ve bir serin proteaz olan granzimin de bu porlar aracılığıyla hücreye girmesiyle hücre içinde prokaspaz-8'in aktivitesi, dolayısıyla kaspaz kaskadı başlatılır. Bu da enfekte hücreyi (veya kanser hücrelerini) apoptozise götürür (74).

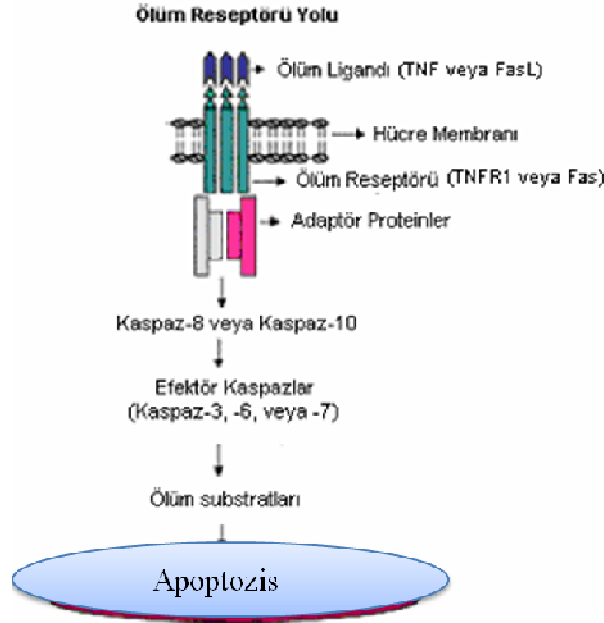
2.3.3. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozis, hücre dışı ve hücre içi seviyede oluşan çeşitli sinyaller yoluyla tetiklenebilir (33). Hücre içi düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligand (FasL) ve Tümör nekrozis faktör (TNF) isimli proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir. Bunun dışında apoptozis viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, onkogenler, kemoterapötikler, radyasyon gibi bazı faktörler ile de başlatılabilir. Ağır DNA hasarına yanıt olarak aktive olan p53 geni ve reaktif oksijen radikalleri (hem mitokondri, hem plazma membranı, hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak) apoptozisi tetikleyebilmektedir (31,32).

2.3.3.1. Kaspazlara-Bağımlı Gelişen Apoptozis Mekanizması

2.3.3.1.1. Ölüm Reseptörü Aracılı (Extrinsic) Apoptotik Yol:

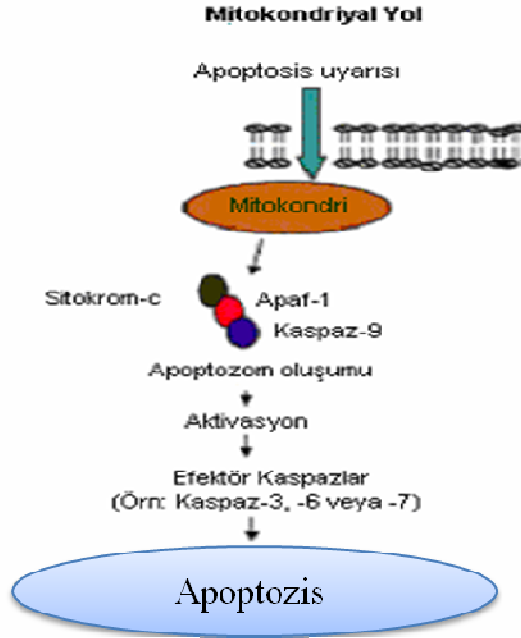
Bu yolda, hücre yüzeyindeki dış sinyaller yoluyla apoptozis tetiklenir. Bu yol ölüm reseptörlerinin (Fas veya TNFR1) hücre dışı uyarımına bağlıdır. Bu reseptörler aldıkları sinyali Kaspaz-8'e iletirler ve Kaspaz-3, Kaspaz-6, Kaspaz-7 gibi kaspazların aktivasyonuna neden olarak kaspaz kaskadını başlatırlar (79) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Ölüm reseptörü aracılı (extrinsic) apoptotik yol (77'den uyarlanmıştır).

2.3.3.1.2. Mitokondriyal (Intrinsic) Apoptotik Yol

Bu mekanizmada apoptotik sinyaller hücre içinde ortaya çıkar. Bu mekanizma mitokondriler aracılığıyla çalışır ve Bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilir. Bu yol, Bcl-2 ailesinin pro- ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki dengenin kaybolmasına neden olabilen hipoksik stres, büyüme faktörlerinin yokluğu veya radyasyon gibi faktörler tarafından aktive olur (78). Mitokondrinin dış membranı yüzeyinde Bcl-2 proteini eksprese olur. Bcl-2 Apaf-1 proteinine bağlanır. Hücrenin internal hasarı, Bcl-2'nin Apaf-1 ve sitokrom-c'nin mitokondriden salınımına neden olur. Sitokrom-c ve Apaf-1, prokaspaz-9'u aktive ederek kaspaz kaskadının aktifleştirilmesini sağlar ve apoptozis gerçekleşir (31,32) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Mitokondriyal (intrinsic) apoptotik yol (77'den uyarlanmıştır).

2.3.3.2. Kaspazlara Bağımlı Olmadan Gelişen Apoptozis Mekanizması

Apoptozise neden olabilen diğer yollar henüz tamamen karakterize edilememiştir. Kaspaz-bağımlı iki mekanizma dışında kaspazlara bağımlı olmadan gelişen yollar da olabilir. Mitokondri zarı hasar gördüğü zaman canlı hücrede mitokondri zarları arasında yerleşmiş olan Apoptosis inducing factor (AIF) sitokrom-c gibi aynı yolla mitokondriden salınır. AIF çekirdeğe girer ve kromatin kondensasyonu yoluyla hücresel apoptozisi indükler (79).

2.3.4. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa, günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu.

Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik yöntemlerle saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. 2000'li yılların başlarında apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etmiştir (45).

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır:

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

a. Işık mikroskobu

-Hematoksilen boyama

-Giemsa boyama

b. Floresan mikroskobu/ Lazerli konfokal mikroskop

-Propidyum iyodür (PI)

-Hoechst boyası

c. Elektron mikroskobu

d. Faz kontrast mikroskobu

2. İmmunohistokimyasal yöntemler

a. Anneksin V yöntemi

b. TUNEL yöntemi

c. M30 yöntemi

d. Kaspaz-3 yöntemi

3. Biyokimyasal yöntemler

a. Agaroz jel elektroforezi

-DNA fragmantasyonu

b. Western blotting

-Substrat kırılmaları

-Aktif kaspazın belirlenmesi

-Sitokrom c salıverilmesi

c. Akım sitometri

-DNA azalması

-Anneksin V

4. İmmunolojik yöntemler

a. ELISA

- DNA fragmantasyonu
 - M30 düzeyi
 - b. Fluorimetrik yöntem
 - Kaspaz aktivasyonu (hücre kültürü)
5. Moleküler biyoloji yöntemleri
- a. DNA Microarrays
 - Gen ekspresyon dereceleri (mRNA)
 - Hücre ölüm reseptörleri
 - Kaspazlar

2.4. HÜCRE FARKLILAŞMASI

Farklılaşma, hücrenin bir formdan, yapı ve işlevsel özelliklerini değiştirerek daha özel bir forma dönüşümüdür (80). Bu olay canlılığın başlangıcı ile başlar ve canlılığın yararına veya zararına olacak şekilde devam eder (81). Canlıların gelişim basamaklarında devamlı bir farklılaşma görülür ve bu işlemler farklılaşma genlerinin durumuna göre oluşurlar (82,83). Farklılaşma genleri en az iki tip gen seti tarafından kontrol edilirler. Farklılaşmayı baskılayan genler ve tümörü baskılayan genler ki bunlar birbirleriyle zıt fonksiyonludurlar. Örneğin, farklılaşmayı baskılayan genlerin aktif durumda olması ve tümörü baskılayan genlerin inaktif durumda olması, farklılaşma geninin ekspresyonunu azaltır ve tümör oluşumunu uyarır (83). Tümör hücreleri, farklılaşma genlerinde mutasyon yoksa, uygun ajanlarla terminal farklılaşmaya indüklenebilirler. Fakat bu genlerde bir mutasyon varsa terminal farklılaşmaya direnç kazanarak aşırı çoğalmaya giderler (82,83).

2.4.1. Hematopoetik Sistemin Farklılaşması

Hematopoez, kemik iliğinde bulunan öncül kök hücrenin çok basamaklı yollar ile fonksiyonel kan hücrelerine kadar farklılaşmasını sağlayan karmaşık bir işlemdir. Bu olay, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeyleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri, sitokinler, enzimler ve henüz aydınlatılmamış moleküller arasındaki ilişkileri düzenleyen kontrollü bir işlemdir (84).

Hematopoetik hücrelerin farklılaşmasında transkripsiyon faktörlerinin ve bunlarla ilintili olarak sinyal iletim yollarının önemi büyüktür. Çok karmaşık olarak görünseler de son derece düzenli çalışırlar. Bu yollarda bir sapma olması malignitelere neden olur. AML'de, WT1, AML1/ETO, C-myc, MLL/ELL, CBP/p300, C-myc önemli olan belli başlı transkripsiyon faktörleridir. WT1 geni, lösemik hücrelerde onkogen olarak rol oynamaktadır. Bir çok AML hastasının rölaps durumunda aşırı artmış görülür (81,84). AML1/ETO, kromozom 21q22 de yer alan AML1 geninin mutasyonları sonucu oluşan bir füzyon proteindir ve her iki akut lösemide de normal farklılaşmayı baskılamaktadır (85,86). Cmyc, AML'de ekspresyonu arttığında lösemi oluşumunda önemli rol oynamaktadır. SiklinA1 hücre döngüsünün düzenlenmesinde, hücre çoğalmasında ve farklılaşma basamaklarında etkilidir (85,86). MLL/ELL, kromozom 19p13.1 üzerindeki ELL geni ile kromozom 11q23 MLL geninin translokasyonu ile oluşan bir füzyon proteindir ve lösemik fenotipin oluşmasında rol oynamaktadır (85,86). CBP/p300, bir çok hücrenin farklılaşmasında ve sinyal iletim yollarında önemli rol oynamaktadır. Her ikisi de tümör baskılayıcı proteindir. Bu iki gendeki değişimler lösemik oluşumları tetiklemektedir (85,87). C-myc, aşırı eksprese olduğunda hücre çoğalmasıyla ve farklılaşmanın engellenmesi ile ilişkilidir. Onkojenik potansiyele sahiptir. Kromozomal translokasyon, retroviral insersiyon ya da gen amplifikasyonu ile aktive olmaktadır. Hücre çoğalması ve lösemi gelişiminde rol oynar (85,86). Kan hücrelerinin farklılaşmasında çok karmaşık yollar olsa da iki yolak çok önemlidir. Bunlar: Ras –MAPK ve Jak-Stat yollarıdır.

Ras-MAPK yolağı: Bu yolak, hematopoetik hücrelerde, yaşamsal, çoğalma ve farklılaşmada sitokin sinyallerinin iletiminde önemli bir işleve sahiptir. GTP bağlı Ras'ın aktif formu birçok alt sinyal yollarında hedef proteine bağlanır. Birçok reseptör, Ras efektörü olarak bilinir. PI3-Kinaz, P120 Ras-GAP, serin/treonin-kinaz ve Raf önemli reseptörlerdendir. Raf, GTP bağlı Ras'ın aktif formuna bağlanır ve sitoplazmadan hücre zarına gider. Sitokin reseptörlerinin varlığında Jak-2 ve src-kinaz ailesinin bir üyesi Raf'ın tirozin fosforilasyonunu sağlayarak MAPK'ları aktive eder. MAP-Kinaz ERK'leri aktive eder, ERK'ler çekirdeğe girer ve hedef genlerin aktivasyonunu sağlar (88,89).

Jak-Stat yolağı: Stat ve jak faktörleri bu yolağın önemli molekülleridir. Bazı sitokin reseptörleri tirozin kinazları aktive ederler. Tirozin kinaz aktivasyonu ile Jak

molekülleri sitokin reseptörleri ile birleşerek Stat moleküllerini fosforile ederler. Fosforile olan Statlar çoğunlukla dimer oluşturarak çekirdeğe yönelir ve özgül DNA bölgelerine bağlanarak farklılaşmayla ilgili genlerin aktivasyonunu sağlarlar (88,90,91).

2.4.2. Hücre Yüzey Belirleyicileri

Hücreler yüzeylerindeki glikoprotein yapıdaki reseptörler sayesinde birbirlerinden ayırt edilmektedirler. Monoklonal antikörlerin gelişmesiyle, hücre yüzey molekülleri antijen olarak tanımlanmakta ve farklı tipteki hücrelerin ayırımı yapılabilmektedir. Hücre yüzeyindeki bu antijenik yapılar CD (Cluster of Differentiation) farklılaşma kümeleri olarak adlandırılmaktadır. Sayıları günümüzde 250 ye ulaşan CD yüzey antijenlerinin, lösemi ve lenfoma immunfenotiplemesinde, hematolojik tümörlerin belirlenmesinde, otoimmün hastalıkların tanısında ve kemoterapötik gözlemlene aşamalarında kullanılmasında bir çok yararları bulunmaktadır (92,93).

2.5. AKIM SİTOMETRE

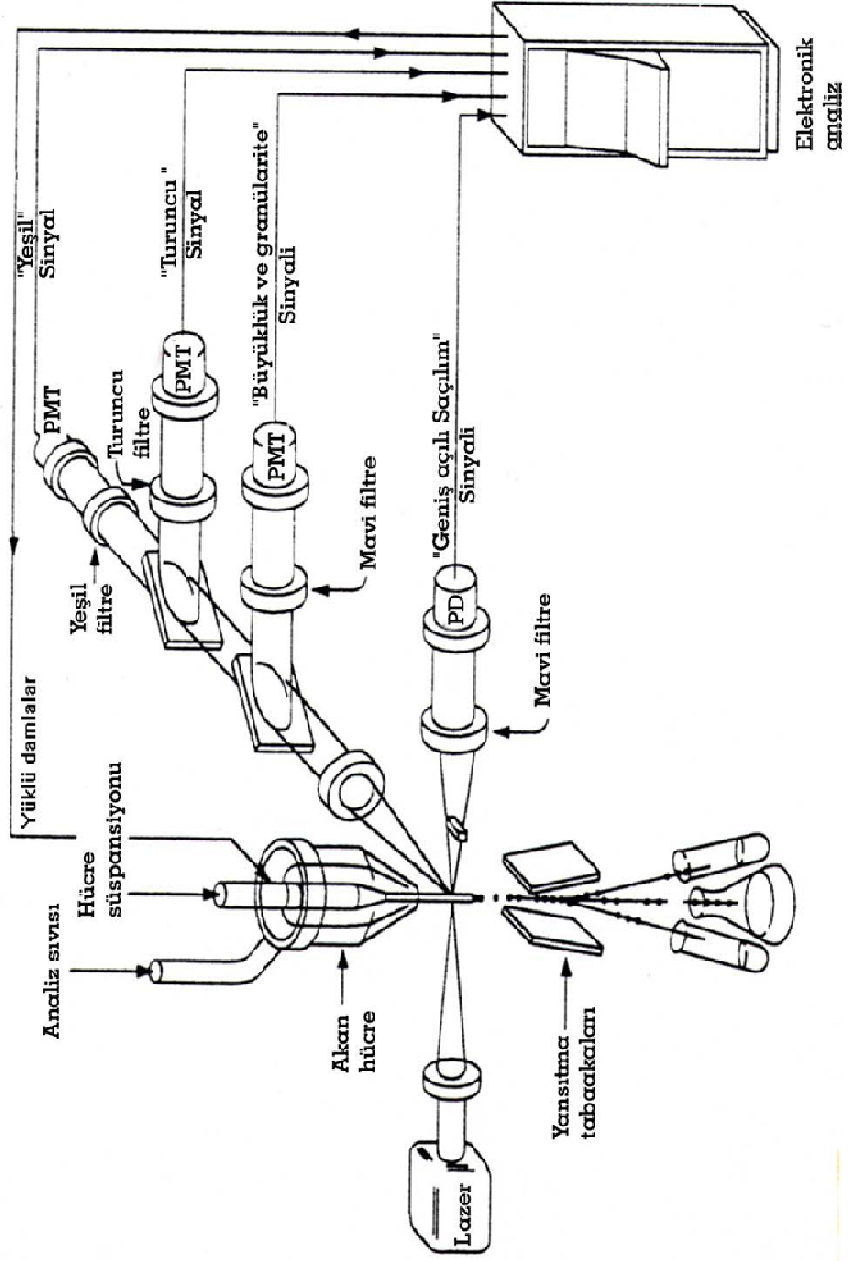
Akım sitometre, bir kanalda hareket eden çok sayıda hücrenin büyüklük, granül içeriğini ve aldığı flöresan yoğunluğunu çok hızlı bir şekilde nitel ve nicel olarak ölçen elektronik bir sistemdir (94). Hücreler akım sitometrede ölçüm öncesi flöresan işaretli moleküller ile boyanırlar ve “Fosfat Tampon Çözeltisi” (PBS) gibi bir sıvı içerisinde cihaza okutulur. Bu flöresan moleküller lazer ışını absorbe ederek uzun dalga boyunda ışın saçarlar. Saçılan ışınlar değişik ayna ve filtre sistemlerinin yardımıyla detektörlerle toplanır ve optik sinyaller alınır. Bu optik sinyaller elektronik sinyallere dönüştürülerek bilgisayara aktarılır ve değişik hücrelerin sayısal analizi yapılır (95).

Akım sitometre ile ilgili ilk bilgiler, 1934’de Kanada Montreal’den Andrew Moldavan tarafından geliştirilen ilkel bir cihaza dayanır(95). Los Alamos laboratuvarlarından Mack Fulwyler, 1949’da eritrositleri ayırarak ilk hücre ayırıcı (*sorter*) cihazını, geliştirdi (95). 1969’da Dittrich ve Göhde, hücrelerin flöresan yoğunluklarının histogramlarını geliştirdiler. 1975’de ise yaptıkları çalışmalardan dolayı Nobel alan Kohler ve Milstein’in akım sitometreden ayrı olarak monoklonal antikör teknolojilerini geliştirmeleri, hücrelere özel monoklonal antikörlerin akım sitometrede

kullanımını ve hızlı gelişimini sağladı. Günümüzde ise elektronik ve flöresan teknolojisindeki gelişmelerle, masa üstü akım sitometreler ve *Sorting* yapan iki ana tip akım sitometre cihazı geliştirildi (95,97).

Akım sitometre, akım sistemi, lazer ışık kaynakları, optik, elektronik ve bilgisayar sistemi olmak üzere dört bileşenden oluşur. Akım sistemi, örnek sıvının “*hidrodinamik odaklama*” ilkesine göre aktığı sistemdir. Bu sistem ile hücreler akım odası denilen ana kısma gelirler ve burada lazer ışını ile karşılaşılır. Lazerler tek renkli ışık kaynaklarıdır. Akım sitometrede en çok kullanılan lazer ışık kaynağı “*Argon ion lazer*” dir. Bunlar, 488 nm dalga boyunda ışın yayar ve birçok florokrom tarafından emilir. Optik filtreler, belirli dalga boyundaki ışınların geçmesini sağlarken, belirli dalga boyunun altındaki ya da üstündekilerin geçmesini engellerler. *Dichroic filtre* ve *Band-pass filtre* olmak üzere iki tip filtre vardır. *Dichroic filtreler*, kısa dalga boyundaki ışınları ayırıp, uygun *dedektöre* gönderirken, daha uzun dalga boyundakilerin geçmesine izin verirler. *Band-pass filtreler*, spesifik dalga boyundaki ışınların geçmesini sağlarlar. Elektronik sistemde, her hücreden saçılan ışınların sinyalleri elektronik voltaj atımlarına çevrilir ve her sinyalin yükseklik, alan, genişlik boyutları depo edilen dijital sinyallere dönüştürülür. Bilgisayar sisteminde, optik ve elektronik sistemce saçılan ışınlar ve flöresan, elektrik sinyallere çevrilir ve bu bilgi dijital bilgiye çevrilerek bilgisayarda analiz edilmek üzere depolanır (95,98).

Günümüzde, akım sitometre birçok tıp alanında rutin olarak kullanılmaktadır. Hematolojide, lösemi-lenfoma immünofenotiplemesinde, hematopoetik progenitor hücre analizinde, DNA-hücre döngüsü analizinde, hücre yüzey belirleyicisi analizinde, apoptozun ve nekrozun belirlenmesinde, proliferasyon belirleyici analizinde kullanılır (96,98).



Şekil 2.8. Akam Sütometre cihazının işleyiş şeması (9.5).

2.6. LİTYUM

Li^+ altmış yılı aşan bir süredir bilinen ve günümüzde de rutin olarak kullanılan manik depresyonun (bipolar bozukluk) akut ve uzun dönem tedavisinde etkili bir ilaçtır. Li^+ , 19. yüzyılda duygudurum düzenleyici olarak kullanılmaya başlandıysa da ilk olarak 1949 yılında John Cadde tarafından antimanik etkisi gösterilmiştir (101). Son yıllarda Li^+ 'un bipolar hastalığıdaki etkisinin yanında sahip olduğu sinir sistemi koruyucu etkisi de araştırılmaktadır. Özellikle yapılan biyokimyasal çalışmalarda sinyal yollarında görevli ve nöroprotektif etkisi olan önemli moleküllerin, Li^+ 'un hedefleri arasında olduğu gösterilmiştir (102).

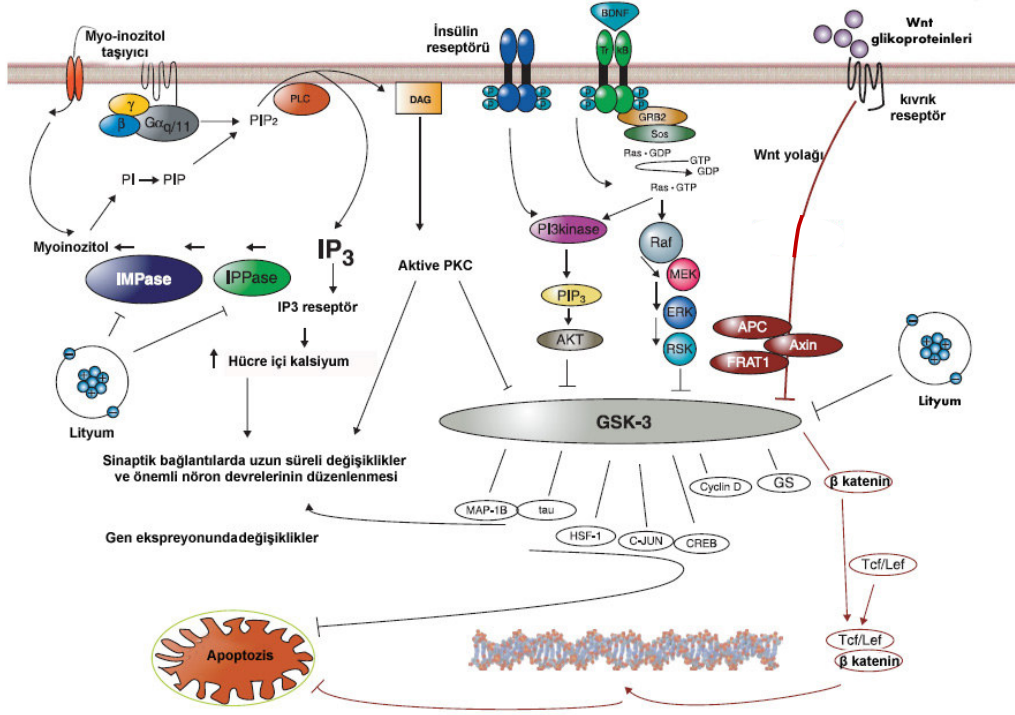
Li^+ 'un etki mekanizmaları;

1. İnozitol monofosfataz (IMPaz) inhibisyonu,
2. İnozitol polifosfat 1-fosfataz (IPPaz) inhibisyonu,
3. Bifosfat nükleotidaz (BPNaz) inhibisyonu,
4. Früktoz 1,6-bifosfataz (FBPaz) inhibisyonu,
5. Fosfoglukomutaz (FGM) inhibisyonu,
6. Glikojen Sentaz Kinaz-3 (GSK-3) inhibisyonu

olarak altı ana başlıkta toplanabilir (102,103).

Li^+ , Magnezyum (Mg^{2+}) ile benzer iyon yarıçapına sahiptir. Bazı inhibitör etkilerini, çok sayıda reaksiyonda kofaktör olarak görev yapan Mg^{2+} ile yarışarak ortaya koyar (104). Li^+ 'un bu sayılan etkilerinden daha çok ikisi üzerinde durulmaktadır. Li^+ 'un olası tedavi edici etkileri açısından birbirleriyle bağlantılı olan GSK-3 ve IMPaz'ın inhibisyonunun merkezi sinir sistemindeki etkileri üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır.

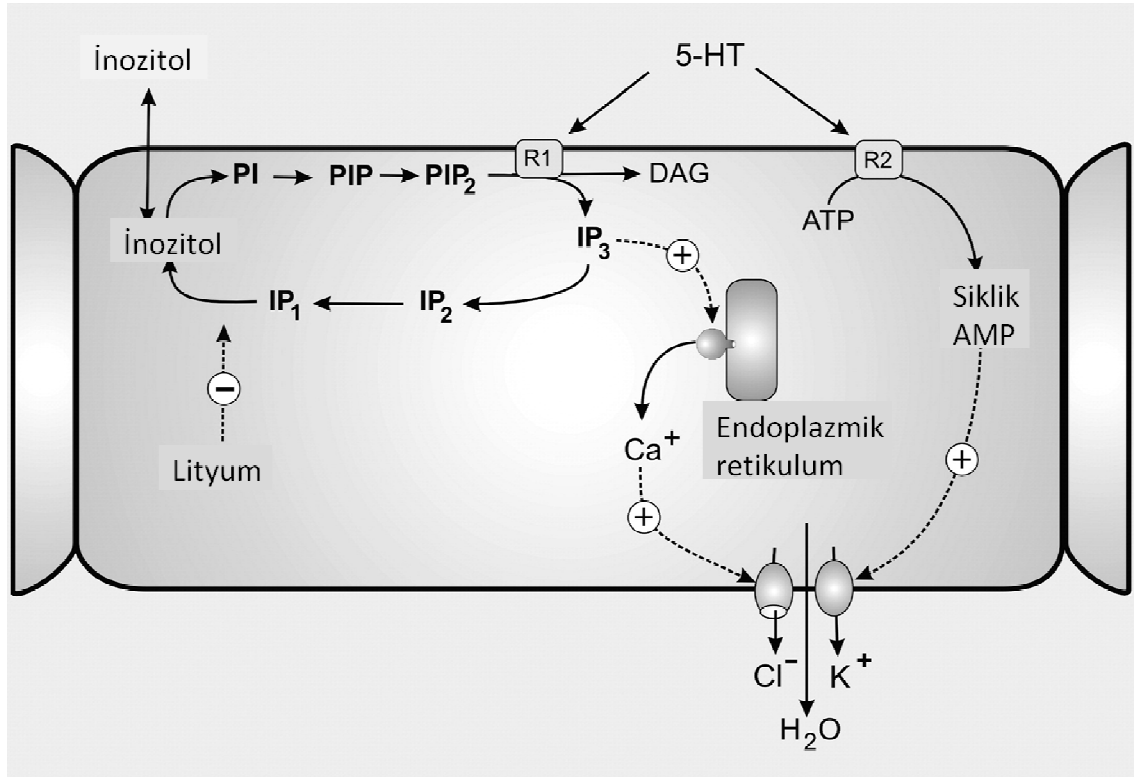
Li^+ ayrıca nöroprotektif etkiye sahiptir ve bu etkisini de GSK-3 β 'yı inhibe ederek sağladığı düşünülmektedir (103,105,106). Örneğin fare hipokampus hücrelerinde bulunan A β (beta amiloid protein) GSK-3 β düzeyini artırır ve apoptozu indükler. Bu durum GSK-3 tarafından yönetilen antisense oligonükleotidler tarafından engellenir (107). Ayrıca hippocampus hücrelerine A β peptid eklenmesi, sitozolik β -katenin düzeylerinde azalmaya neden olur. Bu durum da Wnt3a veya Li^+ tedavisiyle düzeltilebilir (108).



Şekil 2.9. Lityum'dan etkilenen hücre içi yolların birbirleriyle olan ilişkisi. GSK-β ve IMPaz Li⁺'un direkt hedefleridir. GSK-3; nörotrofik sinyal yolları, insulin-fosfoinozitol 3 kinaz (PI3K) yolağı, Wnt yolağı gibi birtakım hücre içi sinyal yollarında aracı olarak rol alır. Bu yolların aktivasyonu GSK-3'ü inhibe eder. Şeklin sol üst tarafında Li⁺'un Fosfoinozitol sinyal yolağı üzerine etkileri anlatılmaktadır. Bazı G proteinlerin aktivasyonu ve Fosfolipaz C (PLC); Fosfoinozitolid-4,5-bifosfat'ın (PIP₂) diaçilgliserole (DAG) ve inozitol 1,4,5 trifosfat'a (IP₃) hidrolizini uyarır. DAG protein kinaz C'yi (PKC) aktive eder. IP₃, hücre içerisinde kalsiyum kanalı olarak işlev gören IP₃ reseptörüne bağlanır. IP₃, İnozitol monofosfataz (IMPaz) ve İnozitol polifosfataz (IPPaz) ile PIP₂'ye geri dönüştürülür. Bu iki enzim de Li⁺ tarafından inhibe edilir. İnozitol Tükenme Hipotezi, Li⁺'un tedavi edici etkisini; serbest inozitol düzeylerini azaltarak ve böylece nöronlarda sinyal yollarının aktivasyonunu körelterek yaptığını savunur (102).

2.6.1. İMPaz ve İPPaz İnhibisyonu

İMPaz ve İPPaz, fosfoinozitol sinyal yolağının gerekli bir elemanı olan inozitolun geri dönüşümü ve baştan sentezinde görevli enzimlerdir. Lityum her iki enzimi de inhibe eder. Pekçok hücre dışı reseptör [serotonin (5-HT)₂, α adrenerjik, muskarinik (M) 1, 3, 5] G proteine (G_{q11}) bağlı şekilde çalışır. Bu protein de Fosfolipaz C (PLC) aktivasyonu üzerinden hücre membran fosfolipidi olan Fosfoinozitid 4-5 bifosfatın (PIP₂) hidrolizi ve bunun sonucunda da diaçilgliserol (DAG) ve İnozitol-1,4,5-trifosfat (IP₃) oluşumunu kontrol eder. Daha sonra da DAG ve IP₃ sayısız hücre içi olayın yönetilmesinde görev alırlar (Şekil 2.9-Şekil 2.10) (102).



Şekil 2.10. Hücre içerisinde uyarı-salgılama bağlantısı (34).

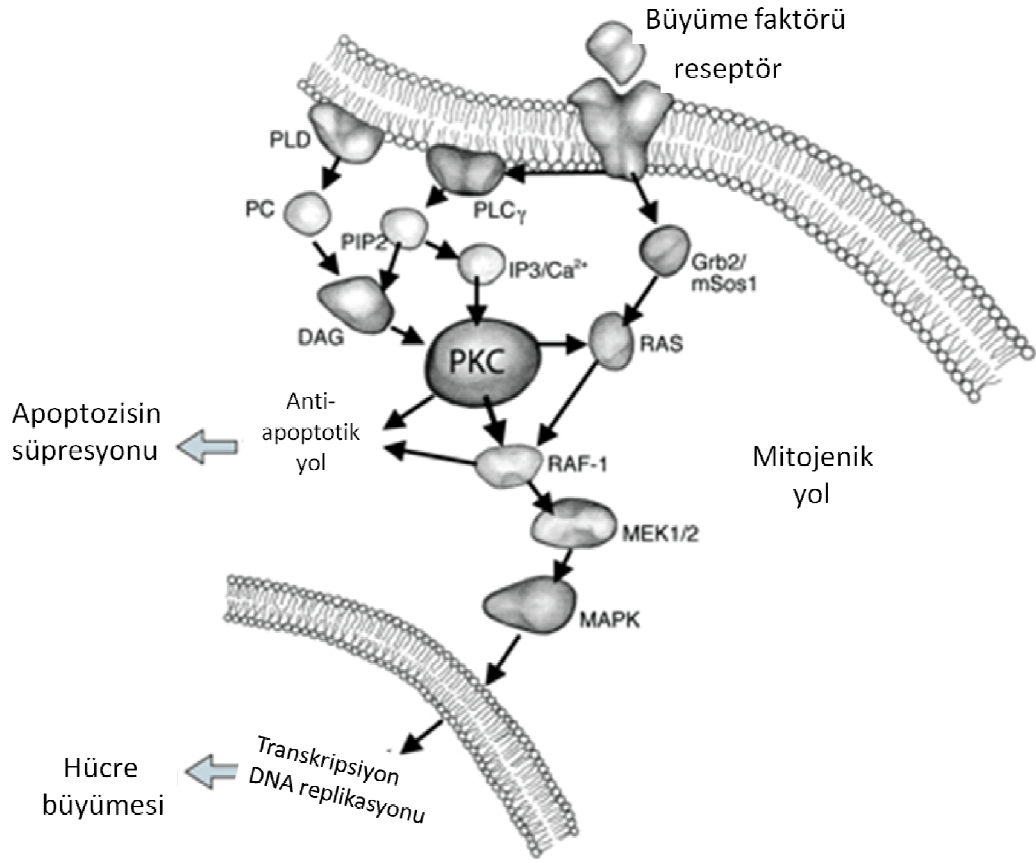
Hücre içerisinde endoplazmik retikulum üzerindeki IP₃ reseptörleri, IP₃ seviyesinin yükselmesine sitozole Ca²⁺ salınımı ile cevap verirler. Dolayısıyla IP₃, Ca²⁺ serbestleştirilmesine yarayan bir ikincil mesajcı olarak düşünülebilir. Bu IP₃/Ca²⁺

sinyalizasyon sistemi şekil 2.10'da görülen çok sayıda hücre içi mekanizmayı kontrol eder (109).

IP_3/Ca^{2+} sinyal yolağı pek çok hücrenin proliferasyonunda rol oynar. Özellikle beyin IP_3/Ca^{2+} sinyal yolağında görevli elemanlardan zengindir. Bu durum nöronal plastisite gibi çeşitli nöronal süreçlerde IP_3/Ca^{2+} yolağının neden etkili olduğunun göstergesidir (110).

Protein kinaz C (PKC), DAG molekülünün birincil hedefidir (102). PKC özellikle pre ve post sinaptik iletinin rol oynadığı beyinde çok miktarda bulunur. Merkezi sinir sistemi malign tümörlerinde PKC aktivitesinin artmış olduğu gösterilmiştir (111,112). PKC, bir serin treonin kinaz ailesidir ve hücre içi pek çok biyokimyasal reaksiyonun (hücre zarından glukoz geçişi, sekresyon, egzozitoz, düz kas kasılması, gen anlatımı, iyon geçirgenliğinin düzenlenmesi, hücre çoğalması, hücre dışı reseptörlerin duyarsızlaştırılması, vb...) kontrolünde önemli rolü vardır (111). Birden çok sinyal iletim yolunun kesişim noktasında olması sebebiyle sitoplazmadan çekirdeğe giden çok çeşitli sinyalin iletilmesinde hayati önem taşır.

PKC, büyüme faktörü reseptörü gibi elemanlarla geri dönüşümlü olarak aktive olur. Sinyal yollarını işleterek Raf-1 ve bcl-2 kaskadı gibi sistemleri uyarabilir (Şekil 2.11). Raf-1 kaskadı sitoplazmadaki sinyalleri çekirdeğe ileten ana sistemlerden biridir. Bu yüzden PKC'nin aşırı uyarılması hücre bölünmesi ve invazyonda rol oynayan genlerin zararlı şekilde aşırı anlatımlarına yol açabilir (111). PKC'nin 13 izoformu bulunmaktadır. Bunlar dört ana grupta toplanırlar. İnsan sinir hücresinde bulunan formu; PKC γ 'dır. Bu izoformun içerisinde bulunduğu gruptaki PKC'ler, DAG ve Ca^{2+} bağımlı aktive olurlar. Bu da Li^+ 'un PKC'yi nasıl etkilediğinin bir göstergesidir.



Şekil 2.11. Sinyal iletim yollarına PKC'nin katılımı (111).

PKC bir kez aktive olduktan sonra sinyal iletimine tekli veya çoklu MAP (Mitojenin aktifleştirdiği protein, "Mitogen-activated protein") kinazlar,[Raf-1/MEK ("Mitogen extracellular signal regulating kinase")/ERK ("Extracellular signal regulated kinase")] kaskadları üzerinden izin verir (111).

2.6.2. MAP Kinaz Sinyal İletim Yolu

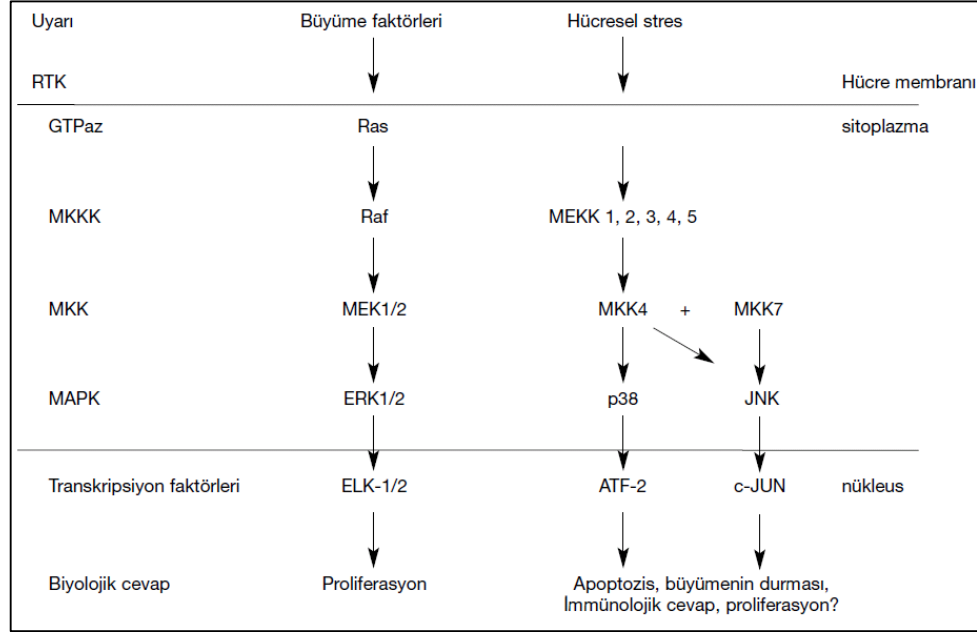
MAP kinazlar hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında önem taşımaktadır (Şekil 2.12). Bu tip sinyal iletimi kaskadları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, diferansiasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır. MAP kinazlar üç ana gruba ayrılır (113).

1. p38 MAP kinaz ailesi
2. “Extracellular signal regulated kinase (ERK)” ailesi
3. “c-Jun NH2- terminal kinase (JNK)” ailesi

MAP kinaz yolu, reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Kaskad sistemi, hem sinyalin amplifikasyonu hem de düzenleyici etkileşimler (sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiği) açısından önem taşır. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra, sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAP kinaz ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya çekirdekte transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (Şekil 2.12) (114,115).

2.6.3. Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal İletim Yolu ve Kanser

Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiyasyon faktörleri ve tümör uyarıcı maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Raf aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Ras, MEK ve ERK proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler. Ras ve Raf protoonkogendir. Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir. Aktive olan Ras proteinleri Raf kinazlara yüksek çekim ile bağlanırlar ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar (114,115,116) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. MAPK ailesi ve sinyal iletimi. ATF: “Activating transcription factor” (Aktive edici transkripsiyon faktörü), ERK: “Extracellular signal regulated kinase” (Hücre dışı sinyal tarafından düzenlenen kinaz), GTP: “Guanosine triphosphate” (guanozin trifosfat), JNK: “cJun N-terminal kinase” (c-Jun N-terminal kinaz), MAPK: “Mitogen-activated protein kinase” (Mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz), MEK: “Mitogen extracellular signal regulating kinase” (Mitojenik hücre dışı sinyali düzenleyen kinaz), MEKK: “MAPK/ERK kinase kinase” (MAPK/ERK kinaz kinaz), MKK: “MAPK kinase” (MAPK kinaz), MKKK: “MAPK kinase kinase” (MAPK kinaz kinaz), p38: “p38 kinase” (p38 kinaz), RTK: “Receptor tyrosine kinase” (Tirozin kinaz reseptörü) (115).

İnsan tümörlerinin % 30’unda Ras/Raf/MEK/ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur. Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant Ras proteinleri, aktif formda kalırlar; bu nedenle, hücrenin kontrolsüz uyanılmasından sorumlu tutulmaktadır. Ras aktivasyonu inhibitörleri klinik çalışmalarda denenmekte ve bu ajanların antitümöral etkilerinden tedavide yararlanabilme olasılığını güçlendirmektedir (117).

Normal koşullarda, EGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin fosfoinozid-3 kinaz (PI3K) yolunu uyarmalarında Ras’ın etkinliği minimal düzeydedir. Buna karşılık

onkojenik Ras, PI3K yolunun güçlü bir aktivatörüdür. Onkojenik Ras bu yolu aktive ederek apoptozisi baskılar. Dolayısıyla, bu hücrelerde apoptozisin baskılanması karsinogenez sürecinde kritik etkenlerden birini oluşturur. Ayrıca, onkojenik Ras uyarısı, transforme hücrelerde normal hücrelerden farklı genlerin ekspresyonunu da uyarabilir (115, 118).

Aktifleşmiş ERK; myc, myb, max, fos ve jun gibi hücre bölünmesi ve invazyonu için metabolik fonksiyonların yapılmasında görevli transkripsiyon faktörlerini uyarır.

IP₃'ün inozitole geri dönüşümde birkaç IPPaz enzimi görev alır. Bu dönüşüm, nöral doku gibi inozitolun serbestçe bulunmadığı hücre tiplerinde fosfoinozitol tarafından yönetilen sinyal iletimi için gereklidir. IPPaz enzimi, IP₃'ün inozitole çevrildiği basamakların sonuncusu ve de hız kısıtlayıcısını uyarır. Hücre içi inozitol seviyelerinin belirli bir seviyede tutulması açısından IPPaz ve IMPaz önemli enzimlerdir (102,103).

Li⁺'un IPPaz ve IPPaz üzerine doğrudan etkisi Li⁺'un "İnozitol Tükenme Hipotezi" ile açıklanan inozitolun azalmasına sebep olur (Şekil 2.9-Şekil 2.10). İnozitol Tükenme Hipotezi 'ne göre; Li⁺, duygudurum düzenleyici etkisini IPPaz'ı inhibe ederek ve inozitol konsantrasyonunu azaltarak gösterir. Bunun sonucunda da; nörotropin sinyal yolağı, tirozin kinaz reseptör yolakları ve de bazı G-proteine bağlı yolaklar için gerekli PIP₂ oluşumunun azalmasına sebep olur (102).

İnozitol'un, kan beyin bariyerinden zayıf oranda geçmesi nedeniyle, özellikle beyin Li⁺'a hassas olduğu düşünülmüştür (119).

2.6.4. GSK-3 İnhibisyonu

Li⁺'un diğer önemli bir etkisi, GSK-3β inhibisyonudur. 1996 yılında yapılan bir çalışmada, GSK-3β'nın, Li⁺ tarafından etkin ve seçici olarak inhibe edildiği ortaya çıkması üzerine duygudurum düzenleyicilerini araştıran bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. Eskiden sadece glikojen sentezi sırasında glikojen sentaz enzimini fosforile ettiği düşünülen GSK-3β, son zamanlarda çok sayıda substratı fosforile etmesinin bulunmasıyla pek çok hücre içi sinyal mekanizmasının da önemli bir düzenleyicisi olduğu düşünölmeye başlanmıştır (120). GSK-3β'nın fosforile ettikleri arasında; hücre iskelet proteinleri, metabolik ve hücre döngüsü proteinleri ve dikkate değer sayıda anahtar transkripsiyon faktörleri [β katenin, AP-1 ("activator protein-1"), siklik AMP-

response element binding protein (CREB), NF- κ B (“Nuclear Factor Kappa B”), Myc, Heat shock factor- 1, nuclear factor of activated T-cells gibi] bulunmaktadır (120).

Bir serin-treonin kinaz olan GSK-3, hücre içerisinde oldukça aktif durumda bulunur. Çok sayıda hücre içi sinyal yolağında, (Wnt, PI3 kinaz, Protein kinaz A, Protein kinaz C gibi) ara ürün olarak görev yapmaktadır. (Şekil 2.9) GSK-3 iki izoform halinde bulunmaktadır; GSK-3 α ve GSK-3 β . Her ikisi de Li⁺ tarafından, hem in-vivo hem de in-vitro olarak inhibe edilmektedir (121,122). Enzim kinetiği deneylerinde, Li⁺’un bu etkisini Mg²⁺ ile yarışarak gösterdiği ortaya konmuştur (104).

GSK-3’ün hedefleri arasında transkripsiyon faktörleri [β catenin, CREB], mikrotübüllere bağlı proteinler [Tau, mikrotübül-bağlantılı protein (MAP)-1B, kinesin hafif zinciri, hücre döngüsü medyatörleri (siklin D, insan ninein) ve metabolizma düzenleyicileri (glikojen sentaz, piruvat dehidrojenaz) sayılabilir (Şekil 2.9) (102.103).

Pek çok sinyal yolağının bir elemanı olarak, çok sayıda hücre hedeflere sahip olması nedeniyle, GSK-3 ;glikojen sentezi, gen transkripsiyonu, sinaptik plastisite ile ilgili olaylar, apoptoz, sirkadiyan ritm gibi geniş bir hücre içi işlem yelpazesinde rol alabilir (102).

Yapılan bazı çalışmalarda; GSK-3 mekanizmasının Alzheimer Hastalığı (123), Diabetes Mellitus (124), Bipolar Bozukluk (125) ve de son zamanlarda da kanserle (126) ilişkisi ortaya konmuştur. GSK-3 β inhibisyonunun, pankreas kanserinde sağkalım oranını artırdığı, (127) kolorektal kanserde ise apoptozu artırıcı (128) etkileri olduğu gösterilmiştir.

25 yıl gibi bir süre önce keşfedilmesine rağmen GSK-3 β , ancak son zamanlarda kanser tedavisinde bir umut olarak görülmektedir (126). Bu enzimin, bazı kanserlerde aktivitesi artmış olan Wnt, Hedgehog ve Notch gibi bazı yolları inhibe ettiği gösterilmiştir (129). Bu durum GSK-3 inhibitörlerinin, tümör hücreleri üzerinde sağkalımı arttıracak şekilde etki edeceğini düşündürülebilir.

Psikiyatrik bozukluklar için, GSK-3 β inhibitörü Li⁺’un uzun süreli kullanımı, kanser insidansını düşürmektedir. Uzun süreli Li⁺ kullanan psikiyatri hastalarında yapılan bir epidemiyolojik çalışmada, Li⁺ kullanan hastalarda kanser insidansının normal popülasyona göre anlamlı ölçüde az olduğu görülmüştür (130).

Li⁺’un hücre içerisindeki metabolizma, sinir hücreleri arası iletişim, hücre bölünmesi ve değişimi gibi farklı süreçlere etki ettiği bilinmektedir. Bu etkiler, hücre tipine ve doza bağlıdır. Örneğin Li⁺ meme kanserinde hücre çoğalmasını uyarırken

(131,132), melanoma (133) ve hepatosellüler karsinomada (134) tümör büyümesine engel olmaktadır. Li^+ nöronlarda hücre ölümüne karşı koruyucu etkisi (135) olmasına rağmen glioma hücrelerindeki hücresel streslere karşı koruyucu değildir (136). Bu durum Li^+ 'un neden Alzheimer Hastalığı'nda koruyucu olduğunu (123) fakat gliomada tümörü inhibe edici etkiye sahip olabileceğini (137) açıklayabilir.

Quiroz ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı bir deneme yazısında Li^+ 'un nöroprotektif etkisi belirtilmiştir (102). Ailesel duygudurum bozukluğu olan hastaların prefrontal korteks hacimleri incelendiğinde kontrol grubuna göre ortalama % 40'lık bir hacim azalması saptanmıştır (138). Belli bir süre Li^+ kullanımının prefrontal korteks hacmini anlamlı derecede arttırdığı ve de kontrol grubuyla aynı seviyeye çıkardığı gösterilmiştir (138). Bu çalışmadaki örnek sayısının yeterli miktarda olmadığı düşünülerek, daha geniş kapsamlı bir çalışma yapılmış ve de Manyetik Rezonans spektroskopisi (MRs) kullanılarak, özellikle gri maddedeki n-asetil aspartat [NAA, nöron canlılığının kabul edilen göstergesi (139)] seviyeleri ölçülmüştür (140). Bu çalışmada elde edilen bulgular uzun süreli Li^+ kullanımının beyinde nöron canlılığı ve fonksiyonunu arttırdığını göstermiştir.

GSK-3 β 'nin inhibisyonunun sinir hücresinin sağkalımını arttırdığı söylenmektedir (120). Burada sözü edilen hücreler, tümör hücreleri değil, Alvarez ve arkadaşlarının (135) belirttiği gibi normal sinir hücreleridir (120).

Li^+ 'un, diğer kanser tiplerine karşı etkileri de farklı güncel yazılarda araştırılmıştır. Lösemi için yapılan bir hayvan deneyinde; GSK-3 inhibisyonunun, Myeloid/Lenoid Lösemi (MLL) hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (126). Medüller tiroid kanserinde, $LiCl$ 'ün in vitro ve hayvan çalışmalarında kanser hücreleri üzerine apoptozu artırıcı etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (141,142). Prostat kanseri hücre kültüründe yapılan bir araştırma sonucuna göre, $LiCl$ 'ün kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı savunulmaktadır (143). Baş ve boyun yerleşimli skuamöz hücreli karsinom için yapılan bir çalışmada ise, $LiCl$ 'ün β katenin düzeylerini azaltarak kanser evresinin azaltılabileceği düşünülmüştür (144). Yine başka bir cilt kanseri üzerine yapılan çalışmada, insan ve fare melanoma hücre kültürlerinde, $LiCl$ 'ün cansız ortamda anlamlı derecede hücre büyümesini engellediği gösterilmiştir (133). Ölümcül bir kanser olan pankreas kanserinde yapılan çalışmalarda da, Li^+ 'un kanser hücrelerinin büyümesini engellediği ile ilgili sonuçlar açıklanmıştır (145,146).

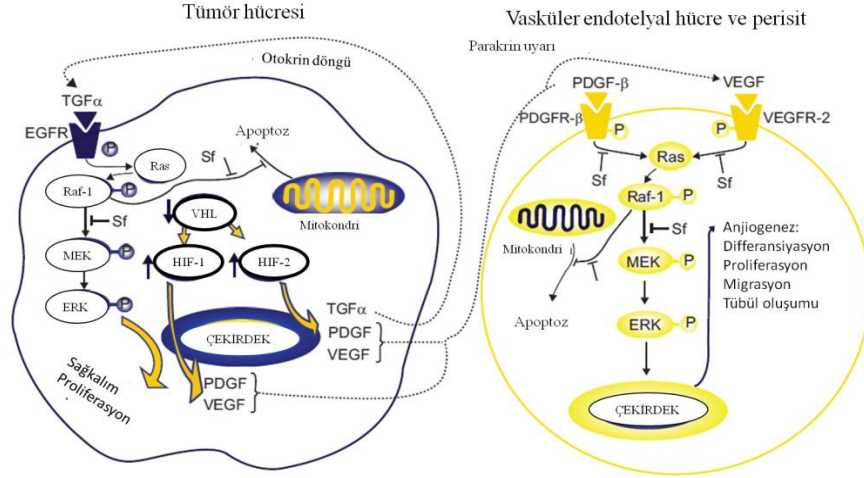
Bu tedavi edici etkileri yanında, LiCl'ün bilinen tümör hücresinin çoğalmasını artırıcı etkileri de vardır. Daha önce de belirtildiği gibi Li⁺ meme kanserinde tümör hücrelerini aktive edici etkiye sahiptir (131,132, 147). Daha çok çocuklarda görülen bir retinal tümör olan retinoblastomada da Li⁺'un tümör hücrelerinin çoğalmasını destekleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (148,149).

2.7. SORAFENİB

Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar) bir oral multikinase inhibitörüdür. Raf-1 ve B-Raf Serin-Treonin kinazları, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) reseptörleri 1, 2 ve 3'ün ve Trombosit Türevi Büyüme Faktörü (PDGF) reseptörünü, KIT, RET ve FLT-3 (FMS-like tirozin kinaz) aktivitesini inhibe eder (150).

Sorafenib, Raf/MEK/ERK yolağı ve VEGF sinyal yolağını hedefleyerek, tümör hücre proliferasyonunu ve tümör anjiyogenezini engeller. Ayrıca çok sayıda tümör modelinde apoptoz hızını arttırdığı (151) bunun yanında ileri evre hepatosellüler kanser ile metastatik renal hücreli kanserde sağkalım süresini arttırdığı gösterilmiştir (152,153).

Tümör gelişmesinde; hücre çoğalmasını, apoptozun baskılanması ile tümör yayılımı, metastazı gibi süreçler aktive olmuş tirozin kinaz reseptörünün tetiklediği sinyal yolları tarafından yönetilir. Bir protoonkogen olan Ras, tirozin kinaz reseptörlerinin uyarılmasına yardımcı olur. Bu nedenle önceden de belirtildiği gibi Ras sinyal yolağının aktivasyonu, insanda kanser gelişmesinde önemli bir mekanizmadır. Ras'ın Raf/MEK/ERK gibi sinerjistik etki gösteren çeşitli yolları idare ederek hücre dönüşümünde etkili olduğu bilinmektedir (150,154,155) (Şekil 2.11-Şekil 2.13). Raf kinazlar, GSK-3β gibi serin/treonin kinaz ailesindedir ve Ras moleküllerinin aktive olmasını sağlarlar (156). Raf kinaz ailesinin 3 üyesi bulunmaktadır; A-Raf, B-Raf, Raf-1. Tümör hücreleri aşırı miktarda VEGF ve PDGF-β gibi bazı büyüme faktörleri ve sitokinler salgılar. Bunların endotel hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanması, Raf/MEK/ERK yollarını aktive eder, bunun sonucunda da anjiyogenez ve lenfanjiyogenez görülür (157). Raf kinazlar, VEGF ve PDGF-β tümör gelişmesinin ve anjiyogenezin engellenmesinde potansiyel moleküler tedavi hedefleridir (158).



Şekil 2.13. Sorafenib'in etki mekanizması. Sorafenib ikili etki yaratarak tümörde ve tümör damarlarında Raf-1 dahil Raf kinazları ve vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü 2 ve 3 (VEGFR 2,3) Trombosit türevi büyüme faktör reseptörü (PDGFR) gibi tirozin kinaz reseptörlerini inhibe eder (Sf: Sorafenib) (158).

Sorafenib'in özellikle ileri evre karaciğer kanseri ve böbrek kanseri başta olmak üzere farklı kanserlerdeki etkisini araştırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. FDA (United States Food and Drug Administration, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve ilaç İdaresi) Aralık 2005'de Sorafenib'in böbrek ve karaciğer kanserinde kullanılması için kısa sürede onay vermiştir. Ayrıca tiroid kanserinde etkili olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır (159). Günümüzde de diğer bazı kanserler üzerine etkisini araştıran çalışmalar yapılmaktadır (159,160). Fakat literatürde Sorafenib'in HL-60 hücre soyu üzerine etkisini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR, ALETLER, KİMYASALLAR VE MALZEMELER

3.1.1. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN CİHAZLAR, ALETLER VE MALZEMELER

3.1.1.1. Cihazlar ve Aletler

1-Laminar akım hücre kültür kabini (Tezsan), 2-İnkübatör (Sanyo), 3-Ters (İnvert) Mikroskop (Leitz Wetzlar), 4-Çalkalayıcı su banyosu (Nüve ST402), 5-Soğutmalı santrifüj (Sigma 2-16K), 6-Derin dondurucu (-20° C) (Vestel F15), 7-Derin dondurucu (-80° C) 8-Buzdolabı (Bosch), 9-Manyetik karıştırıcı (IKA F20520162), 10-Dijital fotoğraf makinesi (Sony Cybershot), 11-Pipetleme aracı (Gilson F110755), 12-Mikropipet seti (Gilson), 13-Otoklav (Victor Recker), 14-Hassas terazi (Precise BJ 1000C), 15-Distile su cihazı (Millipore)

3.1.1.2. Kimyasallar

1-NaCl (Merck 106406), 2-Na₂HPO₄ (Merck 106586), 3-NaH₂PO₄ (Merck 106346), 4-Absolü etanol (Merck 100983), 5-HCl (Merck 113386), 6-Metanol (Merck 106008), 7-H₂O₂ (Merck 108597), 8-Phenol Red (Merck 107241), 9-Poly-l-Lysine Solution (Sigma P8920), 10-KH₂PO₄ (Merck 105108), 11-KCl (Merck 104934), 12-NaHCO₃ (Merck 3011729), 13-DMEM-F12 (Biological Industries 11-170-1M), 14-Fötal sığır serumu (Biological Industries 04-007-1A)

3.1.1.3. Malzemeler

1- Tek kullanımlık, 5 ml'lik steril plastik pipet (TPP 94005), 2- Tek kullanımlık, 10 ml'lik steril plastik pipet (TPP 94010), 3- 0.2 mikronluk steril enjektör filtre (TPP 99722), 4- 50 ml'lik steril falkon tüp (TPP 91050), 5- 6 kuyucuklu steril doku kültürü plağı (TPP 92006), 6-15 ml'lik steril santrifüj tüpü (TPP 91015), 7- 0.22 mikron'luk steril besiyeri süzme filtresi (Sartorius 0507 11107 0604053), 8-Yuvarlak lamel, 9- Tek kullanımlık, steril plastik Pasteur pipeti (LP Italiana135030), 10- Cam Pasteur pipeti (Isolab 108.03.02), 11- Tek kullanımlık, 25 cm²'lik steril plastik kültür kapları (TPP

90025), 12- Tek kullanımlık, 75 cm²'lik steril plastik kültür kapları (TPP 90075), 13- 15 mm çapında yuvarlak lamel (Deckglaser C911380), 14- Lamel (Isotherm), 15- pH kağıdı (Merck Neutralit 1.09564.0003), 16-Hemasitometre lameli (Merienfeld)

3.1.1.4. İlaçlar

1-Lityum Klorür (Sigma-Aldrich L4408), 2-Sorafenib (Bayer)

3.1.2. AKIM SİTOMETRİK (FLOW CYTOMETRİK) ANNEKSİN-V-FITC/PI BOYAMASINDA KULLANILAN CİHAZLAR, ALETLER VE KİTLER

3.1.2.1. Cihaz ve Aletler

1-Akım Sitometri (BD FACS Calibur)

3.1.2.2. Kitler

1- Anneksin-V-FITC (BD 556420), Propidyum iodid (BD 556463)

3.1.3. ELISA YÖNTEMİ İÇİN KULLANILAN CİHAZLAR, ALETLER, VE KİTLER

3.1.3.1. Cihaz ve Aletler

1- Şarjlı pipetör (Eppendorf), 2- Seri pipetör (Eppendorf), 3-12 kanallı otomatik pipet 300 µl (Eppendorf), 4- Mikroplaka okuyucu (Bio-Tek), 5- Mikroplaka yıkayıcısı (Bio-Tek) 6- Çalkalayıcı (Biosan) 7- Vorteks-Stuart Scientific 8- Mikrosantrifüj (Elektro-Mag)

3.1.3.2. Kitler

1- Kolorimetrik Kaspaz 3 Ölçüm Kiti (Sigma Aldrich CASP3C-1KT 047K4059)

2- GSK-3β (fosforile) EIA Kiti (Assay designs 900-123A)

3- Sinyal İletim Yolları Fosfo-ELISA Kiti (Sabiosciences FEM-003H)

3.1.4. GEÇİRİMLİ (TRANSMISSION) ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) YÖNTEMİNDE KULLANILAN CİHAZLAR, ALETLER, KİMYASALLAR VE MALZEMELER

3.1.4.1. Cihaz ve Aletler

1- Geçirimli elektron mikroskobu (Jeol Jem 1011), 2- Işık mikroskobu (Olympus CX21), 3- Mikrotom (Leica)

3.1.4.2. Kimyasallar

1-Absolu Etanol (Riedel-de Häen 32221), 2- Gluteraldehid (Sigma G7776), 3- Osmium Tetroksit O_5O_4 (Merck 124505), 4- Uranil Asetat Dihidrat $C_4H_6O_6U \cdot 2H_2O$ (Merck 108473), 5- 1,2 Propilen Oksit (Merck 112492), 6- Epoxy Embedding Medium (EPON-812) (Fluka 45345), 7- Dodeylsuccinic Anhidrit (DDSA) (Merck 112147), 8- MNA (Merck 112251), 9- 2,4,6-tris (dimethylaminomethyl) phenol (DMP) (Merck 112388), 10- $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (Merck 106345), 11- Na_2HPO_4 (Merck 106586), 12- Sodyum Kakodilat (Sigma C-0250), 13- NaOH (Merck 106482), 14- Trisodyum Sitrat Dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (Merck 106446), 15- Kurşun Nitrat (Merck 107397), 16- Tripan Mavisi (Sigma T8154), 17- PBS Tablet (Sigma P4417)

3.1.4.3. Malzemeler

1- 100 gözlü bakır veya nikel grid (Agar G2100 veya G2100), 2- Cam bıçak (Leica 84 00 31), 3- Bıçak havuzu (6.4 mm) (EMS 71008), 4- Jelatin kapsüller (Agar G29213), 5- Sanayi jileti

3.2.KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1. İnsan Akut Promyelositik Lösemi Hücre Kültürü

Çalışmamız in vitro koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, hücre kültürleri, hücre sayımları ve hücrenin morfolojik özelliklerinin incelenmesi İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki Hücre ve Doku

Kültürü Laboratuvarı'nda Işık ve Geçirimli (Transmission) Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılarak gerçekleştirildi.

Araştırmada Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu [American Type Culture Collection (ATCC)] Hücre Bankası'ndan alınan HL-60 insan Akut Promyelositik Lösemi hücre soyu (CLL-240) kullanıldı.

HL-60 hücreleri için besi ortamı, inaktive edilmiş %10 FCS, 0,2 mM glutamin, 100 µg/ml streptomisin, 100 IU/ml penisilin içeren DMEM-F12 medyumu (Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu, besleyici karışım F12 Ham Medyumu) dur.

Hücreler bu besi ortamını içeren 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda, iç ortamı %5 CO₂, %95 nem içeren ve 37 °C olan inkübatör içinde tutularak ve haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

3.2.2. GRUPLAR VE DOZ BELİRLEME DENEYLERİ

3.2.2.1. Doz Belirleme Deneyi

Hücrelerin toplanması aşamasında üst medyum ve flask yüzeyine tutunan hücreler pipet ile flasklardan toplanarak 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Hücreler 5 dk. 1500 rpm'de santrifüj edildi.

Hücrelerin üzerine medyum konularak süspansiyon haline getirildi ve hemasitometrede sayıldı.

Deneyde 6 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Kültür kaplarının her kuyucuğuna %100 canlı 500.000 HL-60 hücresi 5 ml DMEM-F12 medyumu içinde ekildi.

LiCl ve Sorafenib ilaçlarının her biri için 1; 10; 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde steril bidistile suda hazırlanmış taze çözeltileri 100'er µl'lik esit hacimlerde, 500.000 hücre içeren 6 kuyucuklu kültür kaplarına verildi. Her bir ilacın her bir dozu için 3'er kuyucuğa ekim yapıldı. Tüm gruplar 24, 48, ve 72. saatler için ekildi ve 37 °C 'de % 5 CO₂ hava karışımında rutubetli ortamda inkübe edildi.

24, 48 ve 72. saatler sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler ayrı ayrı toplanıp santrifüj edildi. Süpernatant kısımları atıldıktan sonra 1 ml medyum ile süspansiyon haline getirilip sayma hemasitometre ile sayıldı. Toplam hücre sayıları kaydedildi.

ID₅₀ (İnhibisyon dozu %50) değeri belirlendikten sonra iki ilacın beraber verileceği grup için yeni bir deney yapıldı. ID₅₀ değeri hem Lityum Klorür hem de Sorafenib için 100 µM olarak saptandı.

3.2.2.2. Deney Grupları

Tüm gruplardaki kültür kaplarına 100 µl besiyeri içerisinde 500.000 HL-60 İnsan Akut Promyelositik Lösemi hücresi konuldu.

Gruplar aşağıdaki şekildeydi:

Kontrol Grubu: Ek madde konulmadı.

Sorafenib Grubu: 100 µM Sorafenib konuldu.

LiCl Grubu: 100 µM LiCl konuldu.

LiCl + Sorafenib Grubu: 100 µM LiCl ve Sorafenib konuldu.

Her bir deney için deney gruplarına 24, 48 ve 72. saatler için üçer kuyucuğa ekim yapıldı.

3.2.3. TUTUNMA (PROLİFERASYON) DENEYİ VE CANLILIK (VİTALİTE) TAYİNİ

Deneyde 6 kuyucuklu kültür kaplarının her kuyucuğuna % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan 500.000 HL-60 hücresi 5'er ml DMEM besiyeri içine ekildi. Her 24 saat bitiminde hücreler santrifüj tekniğiyle toplanarak hemasitometreye alınıp sayıldılar. Canlı hücre sayısı % 0.1'lik tripan mavisini (vital boya) ile 1/1 oranında hazırlanan hücre süspansiyonu kullanılarak elde edilen preparatın ışık mikroskopunda sayılması ile saptandı.

3.2.4. AKIM SİTOMETRİK ANNEKSİN-V-FITC/PI BOYAMASI İLE İLAÇLARIN PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜNE ETKİLERİNİN SAPTANMASI

FITC Anneksin-V Boyama Protokolü:

FITC Anneksin V apoptoza maruz kalan aktif popülasyondaki hücrelerin yüzdesini kantitatif olarak belirlemek için kullanılır. Temel prensip apoptozisin erken evrelerinde membran asimetrisini kaybeden hücrelerin özelliğine dayanmaktadır.

Apoptotik hücrelerde membran fosfolipidi olan fosfatidilserin (PS) dış ortama maruz kaldıkça plazma membranının iç kısmından dış kısmına transloke olur. Anneksin V kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlayan bir proteindir; PS için yüksek affiniteye sahiptir. PS açığa çıkan apoptotik hücreleri belirlemek için kullanışlıdır.

PI (propidyum iyodür) standart bir akım sitometrinin canlılık probudur; canlı olmayan hücrelerden canlı olanları ayırmak için kullanılır. Ölü ya da hasarlı hücrelerin membranı PI geçirgen olup, sağlam membranlı canlı hücreler PI dışlar.

Apoptoza maruz kalan hücrelerde FITC Anneksin V için pozitif boyanma, PI için negatif boyanma olur. Hücre ölmüşse ya da apoptozun son dönemindeyse nekroza uğramışsa, hem FITC Anneksin V hem de PI pozitif boyanma olur. Apoptoza ölçülebilir düzeyde maruz kalmamışsa ve hücre canlıysa hem FITC Anneksin V hem de PI negatif boyanma olur.

Reaktifler:

1. FITC Anneksin V (BD Cat No: 556420)
2. Propidyum İyodür (BD Cat No: 556463) Nükleik asit boyasıdır.
3. Bağlama Tamponu (BD Cat No: 556454)
0.1 M HEPES (pH: 7.4)
1.4 M NaCl
25 mM CaCl₂

Boyanma:

- Her 24 saat sonunda hücreler toplanıp (her grup üçer kez çalışıldı) sayma kamarası ile sayılarak, soğuk PBS ile iki defa yıkandılar. Sonra 10 kez distile su

ile sulandırılan bağlama tamponu ile hücreler tekrar süspansiyon haline (1ml bağlama solüsyonu içinde 1×10^6 hücre) getirildiler.

- Bu süspansiyon formundan 100 µl başka tüpe aktarıldı. (100 µl'de 1×10^5 hücre)
- 5 µl FITC Anneksin V eklendi.
- 10 µl Propidyum İyodür eklendi.
- Hücreler nazikçe vortekslendi ve karanlıkta oda ısısında (25 °C) 15 dakika bekletildi.
- Her bir tüpe 400 µl bağlama tamponu eklendi. Anneksin-V ve PI ile verdiği floresans BD FACS Calibur adlı akım sitometri cihazı ile 1 saatin içinde ölçüldü.

Sonuçlar CellQuest ve WinMDI adlı analiz programı ile değerlendirilerek kontrol grubuna göre ilaçların ölü, canlı ve apoptotik hücre oranları üzerine etkileri saptandı.

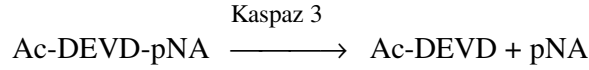
3.2.5. KASPAZ-3 DÜZEYİNİN KOLORİMETRİK ELISA İLE ÖLÇÜMÜ

(Ürün Kodu: CASP 3C-1KT 047K4059)

Ürünün Aydınlatılması:

Kaspazlar (sistein gerektiren aspartat proteaz) hücre ölümüne aracılık eden bir proteaz ailesidir ve apoptoz sürecinde önemlidir. CPP32, Yama ve apopain olarak da tanınmış olan kaspaz-3, kaspazların alt ünitelerinden olan CED-3'ün bir üyesi olup apoptozun kritik enzimlerinden biridir. Memelilere ait en çok çalışılan, etkili olan kaspaz-3'tür. 2, 6, 7 ve 9 nolu prokaspazlarla da çalışılabilmektedir. Bunlar ilgili substratlara yönleneceği bilinen çok sayıdaki kaspaza spesifik olarak bölünürler. Nüklear enzim poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), kaspazın aktive ettiği deoksiribonükleaz inhibitörü (ICAD), gelsolin ve fodrin gibi pek çok anahtar proteinler apoptoz regülasyonunda rol alırlar. Bu bölünme hücreyi ölüme götüren mekanizmanın bir parçasıdır. Buna ek olarak kaspaz-3 hücrede cep oluşturmanın yanı sıra, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu içeren nüklear aracılıklı apoptozda merkezi bir rol oynar. Kaspaz-3 aktivitesi doku, hücre tipi veya spesifik stimulus ölümüdür.

Kaspaz-3 kolorimetrik deneyi, kaspaz-3 tarafından peptid substrat asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid (Ac-DEVD-pNA)'in hidroliziyle p-nitroanilin (pNA) kısmının salınması esasına dayanmaktadır. p-nitroanilin (pNA) 405 nm ($\epsilon^{mM} = 10.5$) dalga boyunda yüksek bir absorbansa sahiptir. Substrattan salınan pNA konsantrasyonu 405 nm'deki absorbans değerinden ya da belli konsantrasyonlarda hazırlanmış pNA çözeltisinin kalibrasyon eğrisinden hesaplanır.



Deney iki şekilde yapılabilir: 1 ml hacimde spektrofotometrede absorbanlar okunarak değerlendirilir ya da 100 µl hacimde 96 kuyucuklu plaka ile ELISA okuyucu kullanılarak sonuca gidilir.

Hazırlanmış Ayıraçlar:

Hazırlanmış kit ayıraçları test başına 1 ml olmak kaydıyla 100 adet örnek çalışmak için ya da 96 kuyucuklu plakada 1000 adet örnek çalışmak için yeterlidir.

5×Lizis Tamponu: Ürün Kodu L 2912

5ml 250 mM HEPES, pH 7.4 25 mM, CHAPS, 25 mM DTT

10×Deney Tamponu: Ürün Kodu A 0219

20 ml 200 mM HEPES, pH: 7.4, 0.1 % CHAPS, 50 mM DTT, 20mM EDTA

Kaspaz-3: Ürün Kodu C 5974

5 µg liyofilize edilmiş tozdan 50 µl 17 megohm su ile yeniden yapılır; 50 mM HEPES, pH 7.4, 0.1 % CHAPS, 10 mM DTT, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA ve 10 % sükröz içeren 100 µg/ml kaspaz 3 çözeltisi oluşur.

Spesifik Aktivite: 1 mg protein başına > 1 Ünite

Ünite tanımı: 25 °C'de pH 7.4'te dakikada 1 µM substrat Ac-DEVD-pNA'yı yıkan enzim miktarıdır.

Ac-DEVD-pNA Substratı: Ürün Kodu A 2559 15 mg

Asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid

Ac-DEVD-CHO İnhibitör: Ürün Kodu A 0835 0.5 mg

Asetil-Asp-Glu-Val-Asp-al

p-Nitroanilin Standardı: Ürün Kodu N 2128 1 mg

Su (17 megohm): Ürün Kodu W 3888 125 ml

Kitte olmayan ancak gerekli olan ayıraç ve ekipmanlar:

- Apoptoza uğrayan hücreler: Örnek uygulamada Jurkat E6-1 hücreleri kullanılmıştır.
- Apoptoz indükleyici: Apoptoz spontan ya da indüklenerek gerçekleşebilir. Örnek uygulamada *staurosporin* kullanılmıştır. Ürün Kodu S4400
- Fosfat tamponu içeren % 0.9 NaCl (Phosphate buffered saline: *PBS*) Ürün Kodu D 8537
- DMSO: Ürün Kodu D 8418
- Sığır serum albumini (Bovine serum albumin: *BSA*) Ürün Kodu A 8022
- Kuartz küvetli spektrofotometre
- ELISA okuyucusu ve 96 kuyucuklu plaka için alt kaide
- Propilen test tüpleri ve mikrosantrifüj tüpleri

Saklama: Kit -20 °C’de saklandı.

Ayıraçların Hazırlanması:

Tüm basamaklarda sadece 17 megohm su kullanıldı. Hazırlanan çözeltiler -20°C saklandı.

1×Ölçüm Tamponu: 17 megohm su ile 10×Deney Tamponu 10 kez sulandırılarak hazırlandı.

Kaspaz-3 Substratı (Ac-DEVD-pNA): 15 mg’lık vial içeriği 1.2 ml’lik DMSO içinde çözüldü ve stok çözelti hazırlandı. DMSO içinde çözünmüş halde 20 mM konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmış oldu. Alternatif olarak 1 mg substrat 78.5 µl DMSO içinde çözülebilir. ELISA yöntemi ile ölçüm için 20 mM ‘lık stok çözelti 1×Ölçüm Tamponu ile 2 mM seyreltilti.

Kaspaz-3 İnhibitörü (Ac-DEVD-CHO): 0.5 mg’lık vial içeriği 500 µl DMSO içinde çözülerek stok çözelti hazırlandı. DMSO içinde çözünmüş 2 mM konsantrasyonda çözelti hazırlanmış oldu. ELISA yöntemi ile ölçüm için 2 mM stok çözelti 1×Ölçüm Tamponu ile 200 µM seyreltilti.

Kaspaz-3 Pozitif Kontrol: Kaspaz-3 içeren vial (5µg) 50 µl'lik 17 megohm su ile çözünerek 100 µg/ml konsantrasyonda yeni bir çözelti hazırlandı. Küçük porsiyonlar şeklinde bölünerek -70 °C'de saklandı. Kullanımdan hemen önce 5 µg/ml'lik bir porsiyon 20 kez sulandırıldı. (1×Ölçüm Tamponu içeren 1mg/ml BSA ya da 1×Lizis Tamponu içeren 1mg/ml BSA ile sulandırılır.)

1×Lizis Tamponu: 5×Lizis Tamponu 17 megohm su ile 5 kez sulandırıldı.

Not: Hücre lizatının kaspazlarını non spesifik proteolizden korumak için proteaz inhibitörleri (E-64, leupeptin gibi sistein proteaz inhibitörleri hariç) ilave edilebilir.

p-Nitroanilin Standardı (ELISA yönteminde bir kalibrasyon grafiği oluşturmak için): 0.72 ml DMSO'da vial çözüldü. Stok çözelti -20 °C'de saklandı. Esas konsantrasyonu tayin etmek için stok çözelti örneği 1×Ölçüm Tamponu ile 100 kez seyreltilir, kuartz küvet kullanılarak 405 nm'de absorbans tayin edilir. Molar absorptivite ($\epsilon^{mM} = 10.5$) kullanılarak stok çözeltinin gerçek konsantrasyonu hesaplanır.

Staurosporin: 1mg/ml DMSO içinde.

Uygulama

Kaspaz-3 aktivitesi belirlenmeden önce örnek uygulamada Jurkat hücrelerinde staurosporin ile apoptoz oluşturuldu ve hücreler lizise uğratıldı.

Bu metod için önerilen 3 kontrol:

- İnhibitörlü hücre lizat kontrol (nonspesifik hidrolize uğrayan substratın ölçümü için)
- Kaspaz-3 pozitif kontrol
- Kör (negatif kontrol)

Apoptotik Hücrelerden Hücre Lizatının Elde Edilmesi:

1. En az 10^7 hücre içeren Jurkat hücre süspansiyonuna staurosporin (final konsantrasyonu 1 µg/ml) ilave ederek apoptoz oluşturuldu. Sıfır zamanlı kontrol için ayrı bir staurosporinsiz hücre konsantrasyonu (non-induced cells) hazırlandı.
2. % 5 CO₂ olan ortamda 37 °C'de 2.5-3 saat inkübe edildi.
3. Apoptozlu ve apoptozsuz (kontrol) hücre süspansiyonları 4 °C'de 600×rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Nazikçe aspire ederek süpernatant uzaklaştırıldı.

5. Hücre süspansiyonları 1 kez 1 ml PBS ile yıkandı, hücreler santrifüj edilerek ve nazikçe aspire ederek süpernatant tamamıyla uzaklaştırıldı.
6. 100 µl konsantrasyonda 10^7 hücre olacak şekilde 1×lizis tamponu ile hücreler süspanse edildi.
7. Hücreler 15-20 dakika buzun üzerinde inkübe edildi.
8. Lizise uğrayan hücreler 4 °C’de 16000- 20000×rpm’de 10-15 dakika santrifüj edildi.
9. Süpernatantlar yeni bir tüplere aktarıldı.
10. Lizatlar derhal analiz edildi. (Analiz edilemeyecekse likit azotta dondurulur ve -70 °C’de saklanır.)

ELISA Metodu:

Çalışmaya başlamadan önce tüm ayraçlar, standart ve örnekler oda sıcaklığına getirildi. Her grup dört defa çalışıldı.

1. Uygulama şemasında belirtildiği gibi uygun kuyucuklara 5 µl hücre lizatı ve kaspaz-3 pozitif kontrol pipetlendi.
2. Uygulama şemasında gösterilen miktarlarda her bir kuyucuğa 1×Ölçüm tamponu eklendi.
3. Uygun kuyucuklara kaspaz-3 inhibitörü eklendi.
4. Her kuyucuğa 10 µl kaspaz-3 substrat eklenerek reaksiyon başlatıldı ve çalkalayarak nazikçe karıştırıldı. Kuyucuklarda hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterildi.
5. Plakanın üzeri kapatıldı ve 37 °C’de 90 dakika inkübe edildi. Eğer sinyal çok düşükse gece boyunca inkübasyona devam edilir.
6. Absorbanslar 405 nm’de okundu.
7. Sonuçların hesaplanmasında p-nitroanilin kalibrasyon eğrisi kullanıldı.

Tablo 3.1. Kaspaz-3 kolorimetrik ELISA yöntemi için uygulama.

	Hücre lizati	Kaspaz 3 5µg/ml	1×Ölçüm tamponu	Kaspaz 3 inhibitörü Ac-DEVD-CHO 200 µM	Kaspaz 3 substratı Ac-DEVD-pNA 2 mM
Kör	---	---	90 µl	---	10 µl
Uyarılmamış hücreler	5 µl	---	85 µl	---	10 µl
Uyarılmamış hücreler + inhibitör	5 µl	---	75 µl	10 µl	10 µl
Uyarılmış hücreler	5 µl	---	85 µl	---	10 µl
Uyarılmış hücreler + inhibitör	5 µl	---	75 µl	10 µl	10 µl
Kaspaz 3 pozitif kontrol	---	5 µl	85 µl	---	10 µl
Kaspaz 3 pozitif kontrol + inhibitör	---	5 µl	75 µl	10 µl	10 µl

p-Nitroanilin (pNA) Kalibrasyon Eğrisi:

1. p-Nitroanilin stok çözeltisi 1×Ölçüm tamponu ile seyreltilerek konsantrasyonları 10 ila 200 µM arasında olan p-Nitroanilin çözeltileri hazırlandı.
2. Kuyucuklara seyreltilmiş her bir çözeltiden 100µl eklendi.
3. Absorbanslar 405 nm’de okundu.
4. p-Nitroanilin çözeltilerinin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi oluştu. Kuyucuk başına p-Nitroanilin miktarının µmol olarak değerleri aşağıdaki tabloda izlenmektedir.

Tablo 3.2. 100 µl başına µmol cinsinden p-Nitroanilin çözeltisi miktarları.

µM p-Nitroanilin	100 µl başına µmol p-Nitroanilin
10	0.001
20	0.002
50	0.005
100	0.01
200	0.02

Hesaplama:

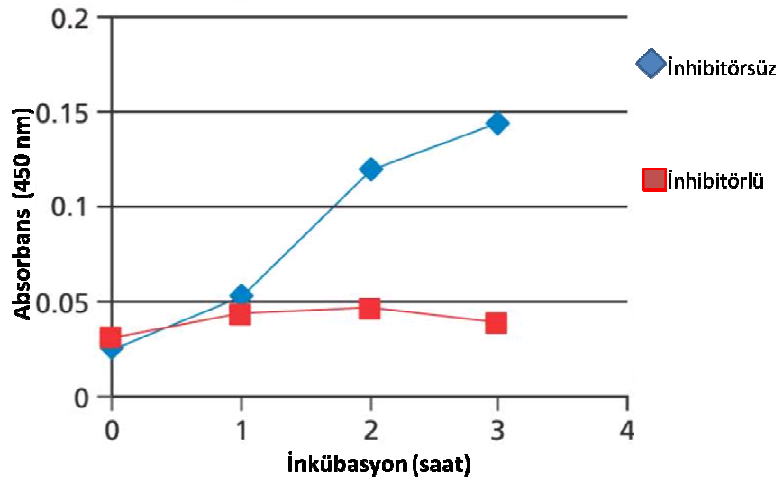
Kaspaz-3 aktivitesinin hücre lizatının 1 ml başına 1 dakikada salınan pNA'nın 1 μ mol'ünde ya da pozitif kontrol esas alınarak hesaplanma formülü:

$$\text{Aktivite, } \mu\text{mol pNA/dakika/ml} = \frac{\mu\text{mol pNA} \times d}{t \times v}$$

v: ml'deki örnek hacmi

d: dilüsyon faktörü (20)

t: dakikadaki reaksiyon zamanı



Şekil 3.1. Apoptotik Jurkat hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi.

3.2.6. GSK-3 β DÜZEYİNİN EIA İLE ÖLÇÜMÜ

GSK-3 β (Phospho-Ser9) EIA Kit Katalog No: #900-123A

Prensip:

1. GSK-3 β 'ya spesifik monoklonal GSK-3 β antikorları ile kaplanmış kuyucuklara örnekler ve standartlar pipetlenir. Plaka daha sonra inkübe edilir.
2. Bağlanma için gerekli inkübasyon süresinin ardından yıkama işlemi ile bağlanmayan moleküller uzaklaştırılır. Sarı renkli bir solüsyon olan GSK-3 β

poliklonal antikor eklenir. Eklenen bu antikorlar ikinci inkübasyon süresince, kuyucuklara sabitlenen antikorlar tarafından bağlanan GSK-3 β moleküllerine bağlanırlar.

3. Yıkama işlemi ile bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılır. Anti-tavşan IgG konjugatı olan HRP çözeltisi (horseradish peroxidase), GSK-3 β poliklonal antikor ile bağlı her bir kuyucuğa eklenir.
4. Yıkama ile HRP'nin fazlası uzaklaştırılır. TMB substrat çözeltisi eklenir. HRP'nin katalizlediği reaksiyonla mavi renk meydana gelir.
5. Sonlandırma çözeltisi eklenerek substratla olan reaksiyon durdurulur. Sonuçta oluşan sarı renk 450 nm'de okunur. Sinyalin miktarı örnekteki GSK-3 β düzeyi ile doğrudan orantılıdır.

Ayırıcılar:

1. Deneysel Tamponu (fosfataz inhibitörü)
2. GSK-3 β Standardı (100.000 pg/ml)
3. Monoklonal GSK-3 β antikor ile kaplı 96 kuyucuklu plaka
4. Poliklonal GSK-3 β Antikor (Sarı çözelti)
5. GSK-3 β Konjugat: Anti tavşan IgG-horseradish peroxidase (HRP)(mavi çözelti)
6. Yıkama Tamponu Konsantre Çözeltisi
7. TMP (tetrametilbenzidin) Substratı
8. Reaksiyon Sonlandırma Çözeltisi
9. RIPA Hücre Lizis Tamponu
10. PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma #P7626
11. PIC: Protease inhibitor cocktail, Sigma #P8340
12. Sodyum ortovanadat, Sigma #S6508
13. Sodyum pirofosfat, Sigma #S6422

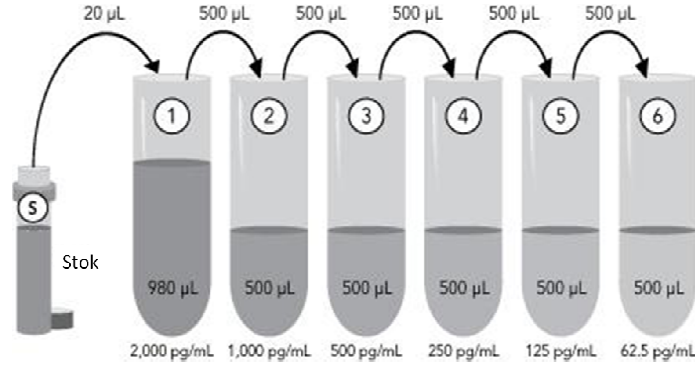
Ayrıraçların Hazırlanması:

1. Yıkama Tamponu: Yıkama tamponu konsantre çözeltisinden 50 ml alındı, 950 ml distile su ilave edilerek yıkama tamponu seyreltildi.
2. DeneY Tamponu: DeneYde kullanmadan hemen önce PMSF ve PIC tampona ilave edildi. PIC (proteaz inhibitör kokteyl) 0.5 µl/ml eklendi. PMSF final konsantrasyonu 1mM olacak şekilde eklendi.
3. Aktiflenmiş Sodyum Ortovanadat: 200mM konsantrasyonda hazırlandı. 1N HCl ve 1N NaOH ilave ederek pH 10'a ayarlandı. pH 10'da çözelti sarı renkte olmaktadır. Çözelti renksiz olana kadar kaynatıldı (yaklaşık 10 dakika). Oda ısısında soğumaya bırakıldı. pH'ın stabilize olup olmadığına bakıldı. pH stabilize olana kadar yukarıdaki basamaklar tekrarlandı. Çözelti bölünerek -20 °C'de saklandı.
4. RIPA Hücre Lizis Tamponu: Tampon oda ısısına getirildi. Kullanımdan hemen önce tampona proteaz inhibitörleri (PIC ve PMSF) ve fosfataz inhibitörleri (sodyum pirofosfat ve aktiflenmiş sodyum ortovanadat) eklendi. PIC 0.5 µl/ml eklendi. PMSF final konsantrasyonu 1mM olacak şekilde eklendi. Aktiflenmiş sodyum ortovanadat final konsantrasyonu 2 mM ve sodyum pirofosfat final konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde eklendi.

GSK-3β Standartlarının Hazırlanması:

Standart çözelti oda ısısına getirildi. Yedi adet ependorf tüp alındı. 1.tüpe 100.000 pg/ml'lik stok standarttan 20 µl eklendi. Aynı tüpe ölçüm tamponundan 980 µl eklendi, tüp iyice karıştırıldı. Böylece 1. tüpün standart konsantrasyonu 2000 pg/ml oldu. Ölçüm tamponundan 500 µl 2. tüpten 6. tüpe kadar kadar pipetlendi. 1. tüpte hazırlanan standart çözeltisinden 2. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı. Aynı işlem 7. tüpe kadar tekrarlanarak her seferinde konsantrasyonu yarıya inen standart

çözeltiler hazırlandı. 7. tüpe sadece analiz-ölçüm tamponu eklendiğinden bu kör tüp olarak kullanıldı. Her tüpte oluşan standart konsantrasyonları şekilde izlenmektedir.



Şekil 3.2. GSK-3β standartlarının hazırlanması.

Örneğin Hazırlanması:

Deneye başlamadan önce donmuş örnekler yavaşça 4 °C'ye getirildi ve santrifüjlendi. İnhibitörlerin katkısıyla modifiye edilmiş RİPA hücresi lizis tamponu hazırlanarak bütün örnekler lizise uğrattıldı. Deneyde interferansa neden olan RİPA hücre lizis tamponunun matriks eliminasyonu için örnekler 1:64 oranında deney tamponu ile seyreltildi.

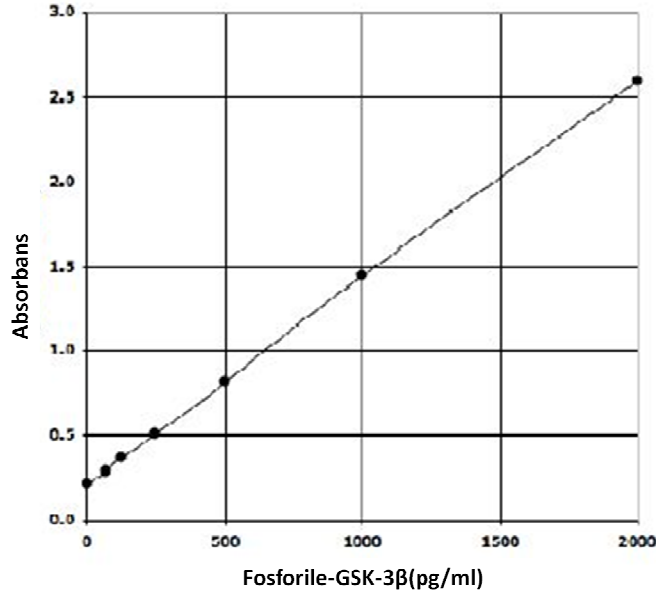
Yöntem Uygulanışı:

1. Kör kuyucuğa (S0) kuyucuğa 100 µl kör tüpten pipetlendi.
2. 6 adet standart için uygun kuyucuklara 100 µl pipetlendi.
3. Uygun kuyucuklara 100 µl örnek pipetlendi. Her grup üçer kez çalışıldı.
4. Plakanın üzeri kapatılarak oda ısısında 1 saat çalkalayarak inkübe edildi.
5. Kuyucuklardaki içerik boşaltıldı ve her bir kuyucuğa 400 µl seyreltilmiş yıkama tamponu eklenerek 4 kez yıkandı.
6. Kör kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara 100 µl sarı antikor pipetlendi.

7. Plaka kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
8. 400 µl seyreltilmiş yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.
9. Kör kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara 100 µl mavi antikor pipetlendi.
10. Plaka kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
11. 400 µl seyreltilmiş yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.
12. Her bir kuyucuğa 100 µl substrat çözeltisi pipetlendi.
13. Plaka kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi
14. Her bir kuyucuğa 100 µl reaksiyon sonlandırma çözeltisi pipetlendi.
15. 450 nm'de köre karşı plaka okunarak ölçüm yapıldı.

Hesaplama:

Standart konsantrasyonları yatay eksene, standartlara ait absorbanslar ise dikey eksene yerleştirilerek lineer grafi şeklinde standart eğrisi çizildi. Örneklerin konsantrasyonları standart eğriden pg/ml olarak hesaplandı.



Şekil 3.3. GSK-3β Standart Eğrisi.

3.2.7. SİNYAL İLETİM YOLU PROTEİNLERİNİN ELISA İLE DEĞERLENDİRMESİ (Sabiosciences Katalog No: FEM-003H)

Birden fazla protein düzeyini ölçmeyi sağlayan katı faz sandviç ELISA tekniği prensibine dayanmaktadır. Farklı sinyal yollarını temsil eden altı farklı proteinin total ve fosforillenmiş formlarının tespitini sağlamaktadır. Bu proteinler AKT, ERK, p38, c-jun, STAT3 ve I κ B α 'dır.

Ayıracılar

Saptama antikor \times 12

İkincil antikor (α -fare)

İkincil antikor (α -tavşan)

Örnek seyreltme tamponu

Fosfataz/proteaz inhibitör karışımı

Hücre ekstraksiyon tamponu

Yıkama tamponu

Geliştirme çözeltisi

Reaksiyon durdurma çözeltisi

Her analite spesifik antikorlarla kaplanmış 96 kuyucuklu plaka (12 adet 8 kuyucuklu şerit)

Ayıracıların Hazırlanması

Yıkama Tamponu: 50 ml'lik Yıkama Tampon Konsantresi distile su ile 10 kat sulandırılarak 500 ml'ye seyreltildi.

Saptama Antikoru: Her bir tüpe 665 μ l örnek seyreltme tamponu kondu ve çalkalandı.

Hücre Ekstraksiyon Tamponu: 25 ml'lik tampona kullanımının hemen öncesinde 250 μ l Fosfataz/Proteaz inhibitör karışımı eklendi.

Hücre Lizatının Hazırlanması

Hücreleri yapılarını bozmayacak şekilde toplamak için mikrolaka kuyularından besiyeri uzaklaştırıldı, 2 kez soğuk PBS ile yıkandı, PBS uzaklaştırıldı, 0.5 ml soğuk Hücre Ekstraksiyon Tamponu her mikrolaka kuyusuna eklendi ve karıştırıcı ile 3

dakika aralıklarla karıştırılarak buz üzerinde 10 dakika bekletildi. Hücreler plakadan kazındı ve uygun tüplere yerleştirildi. 4 °C’de, 10 dakika 14000 rpm’de santrifuj edildi. Lizatlar eppendorflara aktarıldı. Analiz için hazır hale gelen örnekler tekrarlayan donma-çözünme olmaması için -80 °C’de depolandı.

Yöntem Uygulanışı

Her grup üçer kez çalışıldı. Tüm ayıraçlar kullanım öncesi oda sıcaklığına getirildi. Kullanıldıktan sonra tekrar saklama koşullarına alındı. Şeritler şerit tutacağına yerleştirildiler.

1. Uygun kuyucuklara 50 µl hücre lizatı ve negatif kontrol olarak hücre lizatını seyreltmek için kullanan örnek seyreltme tamponu konuldu.

2. Bantla kapatılan 96’lık mikropolanın kuyucukları oda sıcaklığında 2 saat bekletildi.

3. Kuyucuklar boşaltıldı ve 350 µl yıkama tamponu ile kuyucuklar 3 kez yıkandı. Herhangi bir artık tampon kalmaması için şeritler üzerine yukarıdan aşağıya doğru süzgeç kağıdı kondu.

5. Seyreltilmiş saptama antikorlarından 50 µl kitte gösterilen şekilde plakasındaki uygun sıraya kondu. Kapak kapatıldıktan sonra tabaka yavaşça çalkalandı ve 1 saat kadar oda sıcaklığında bekletildi.

6. Kuyucuklar tekrar yukarıda anlatıldığı şekilde 4 kez yıkandı.

7. İkincil antikorlar (anti-tavşan IgG) hazırlanırken 344 µl anti-tavşan IgG’ye toplam hacim 5.5 ml olana kadar örnek seyreltme tamponu eklendi. İkincil antikor (anti-fare IgG) hazırlanırken 5.5 µl anti-fare IgG’ye toplam hacim 5.5 ml olana kadar örnek seyreltme tamponu eklendi.

8. Tüm kuyucuklara 50 µl ikincil antikor eklendi, 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.

9. Kuyucuklar tekrar toplam 4 kez olacak şekilde yıkandı.

10. Her kuyucuk içerisine 50 µl geliştirme solüsyonunundan eklendi. Plaka oda sıcaklığında ve karanlıkta en kuvvetli şekilde boyanıp koyu mavi oluncaya kadar 20 dakika süre ile bekletildi.

11. Her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve içindeki rengin maviden sarıya döndüğü zaman reaksiyonun durduğu kesinleşti.

12. Reaksiyon durdurulduktan hemen sonra 5 dakika içinde 450 nm'de absorbanslar okundu.

Hesaplama

Her bir antijenin düzeltilmiş absorbans değerlerini elde etmek için, absorbanslardan negatif kontrolün absorbansı çıkarılarak dilüsyon faktörü 5 ile çarpıldı.

3.2.8. İLAÇLARIN GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) İLE HÜCRE İNCE YAPISI (ULTRASTRÜKTÜRÜ) ÜZERİNE ETKİLERİNİN SAPTANMASI

Kontrol ve deney gruplarının tümünde hücreler 24. saatte toplandı. Santrifüj tüplerine alınan hücrelerin üzerindeki medyum çekilip atıldı ve PBS (*fosfat tamponu içeren % 0.9 NaCl*) ile yıkandıktan sonra üzerlerine %1.5 gluteraldehit konarak 30 dakika 4 °C de bekletilerek tespit edildi. PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra santrifüj edilip üst sıvısı çekildi ve OsO₄te 1 saat 4 °C'de bekletildi. Tekrar PBS'da 10 dakika yıkandıktan sonra %1 uranil asetatla 15 dakika tutuldu. PBS ardından %30 etanolde 10 dakika bekletildi. Hücrelerin bir arada durmalarını sağlamak amacıyla üzerlerine önceden süzölmüş taze yumurta akı kondu ve santrifüj edildi. Tüm yumurta akı çekildikten sonra %50 etanolde 10 dakika, %70 etanolde 10 dakika, 2 kez %100 etanolde 10 dakika, 2 kez saf propilenoksitte 10 dakika, 1/1 oranında hazırlanmış propilenoksit/epon karışımında 1 saat, 1/3 oranında hazırlanmış propilenoksit/epon karışımında 1 saat, saf eponda da 1 saat bekletildikten sonra doku gömme kapsüllerine gömüldü. 37 °C'lik etüvde 18 saat bekletildi. Etüvden çıkarılan bloklar trimlenerek bakır gridler üzerine ince kesitler alındı. Kurşun sitrat ve uranil asetatla kontrastlaması yapılarak Jeol 1011 transmisyon elektron mikroskopunda (TEM) incelendi.

3.3. İstatistik İnceleme

Sonuçların istatistik incelenmesi SPSS 13 paket program kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama±SEM (Standart Error Mean) olarak gösterildiler. Gruplar arasındaki farklılıklar, Student *t*-test analiz yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Olasılık değerleri $p < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildiler.

4. BULGULAR

4.1. SORAFENİB ve LiCl'ÜN HÜCRE SAYILARI ÜZERİNE ETKİLERİ

İlaç verilmeyen kontrol grubundaki hücreler, deneyin başlangıcından sonlandığı 72. saate kadar katlanarak beklenen şekilde çoğalmıştır (Grafik 4.1).

Sorafenib (100 µM) hücre sayısını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü ($p_{24} < 0.01$, $p_{48} < 0.01$, $p_{72} < 0.01$) (Tablo 4.1, Grafik 4.1).

LiCl (100 µM) hücre sayısını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.01$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.1, Grafik 4.1).

LiCl (100 µM) ile Sorafenib (100 µM) kombinasyonunun hücre sayısını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.1, Grafik 4.1).

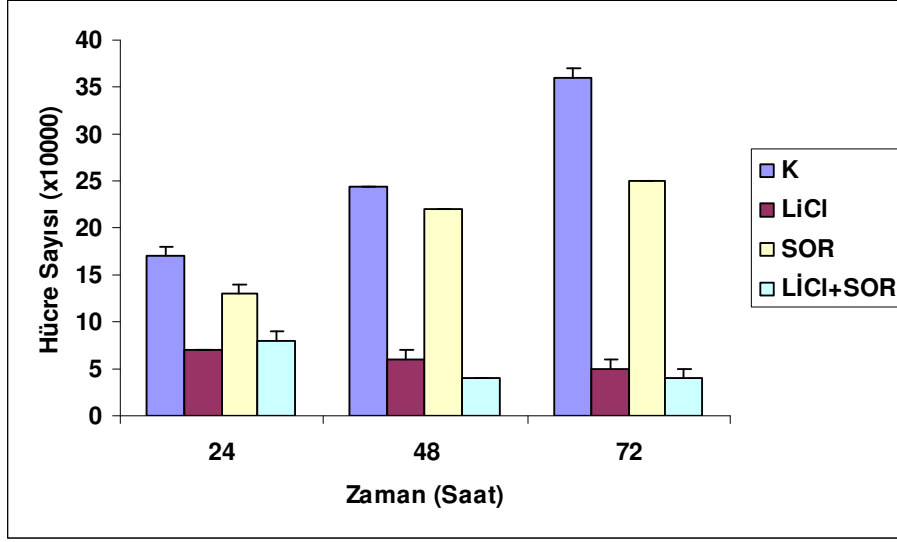
Bu sonuçlara göre ikili ilaç kullanımını hücre sayısını tek başına Sorafenib'e göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p_{24} < 0.01$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.1, Grafik 4.1).

İkili ilaç kullanımının hücre sayısına etkisi tek başına LiCl'e göre kıyaslandığında 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunamadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.1, Grafik 4.1).

Tablo 4.1'de Kontrol, Sorafenib ve LiCl için tek tek ve beraber alınan hücre sayım sonuçları SEM ile birlikte gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Her dört gruptaki 24., 48. ve 72. saat ortalama hücre sayıları ve SEM değerleri

	24. saat	48. saat	72. saat
Kontrol	17±1	24±0	36±1
Sorafenib	13±1	22±0	25±0
LiCl	7±0	6±1	5±1
Sorafenib+LiCl	8±1	4±0	4±1



Grafik 4.1. Tüm gruplardaki zamana bağlı hücre sayıları

4.2. SORAFENİB ve LiCl'ÜN PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ (APOPTOZ) ÜZERİNE ETKİSİ

İlaç verilmeyen kontrol grubunda 24. saatte apoptotik hücre oranı % 4, 48. saatte apoptotik hücre oranı % 7, 72. saatte apoptotik hücre oranı % 9 olarak bulundu (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

LiCl (100 μ M) programlı hücre ölümüne giden hücre oranını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

Sorafenib (100 μ M) programlı hücre ölümüne giden hücre oranını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

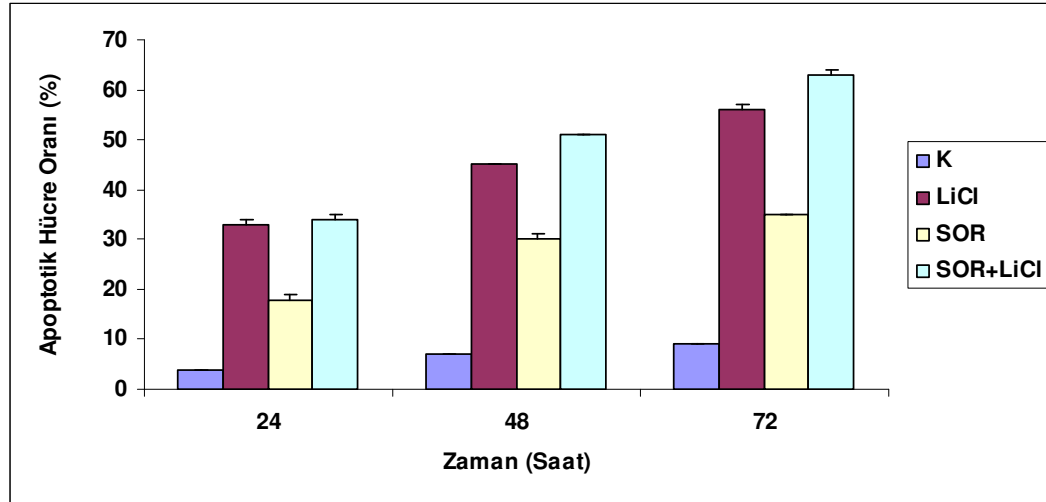
LiCl (100 μ M) ile Sorafenib (100 μ M) kombinasyonu programlı hücre ölümüne giden hücre oranını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

Bu birliktelik programlı hücre ölümüne giden hücre oranını sadece LiCl'e göre 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.01$), fakat 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmamıştır ($p_{24} > 0.05$) (Grafik 2, Tablo 2).

İkili ilaç programlı hücre ölümüne giden hücre oranını sadece Sorafenib'e göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

Tablo 4.2. Dört ayrı gruptaki apoptotik hücre oranlarının 24., 48. ve 72.saat yüzde dağılımı ve SEM değerleri

%	24. saat	48. saat	72. saat
Kontrol	4±0	7±0	9±0
Sorafenib	18±1	30±1	35±0
LiCl	33±1	45±0	56±1
Sorafenib+LiCl	34±1	51±0	63±1

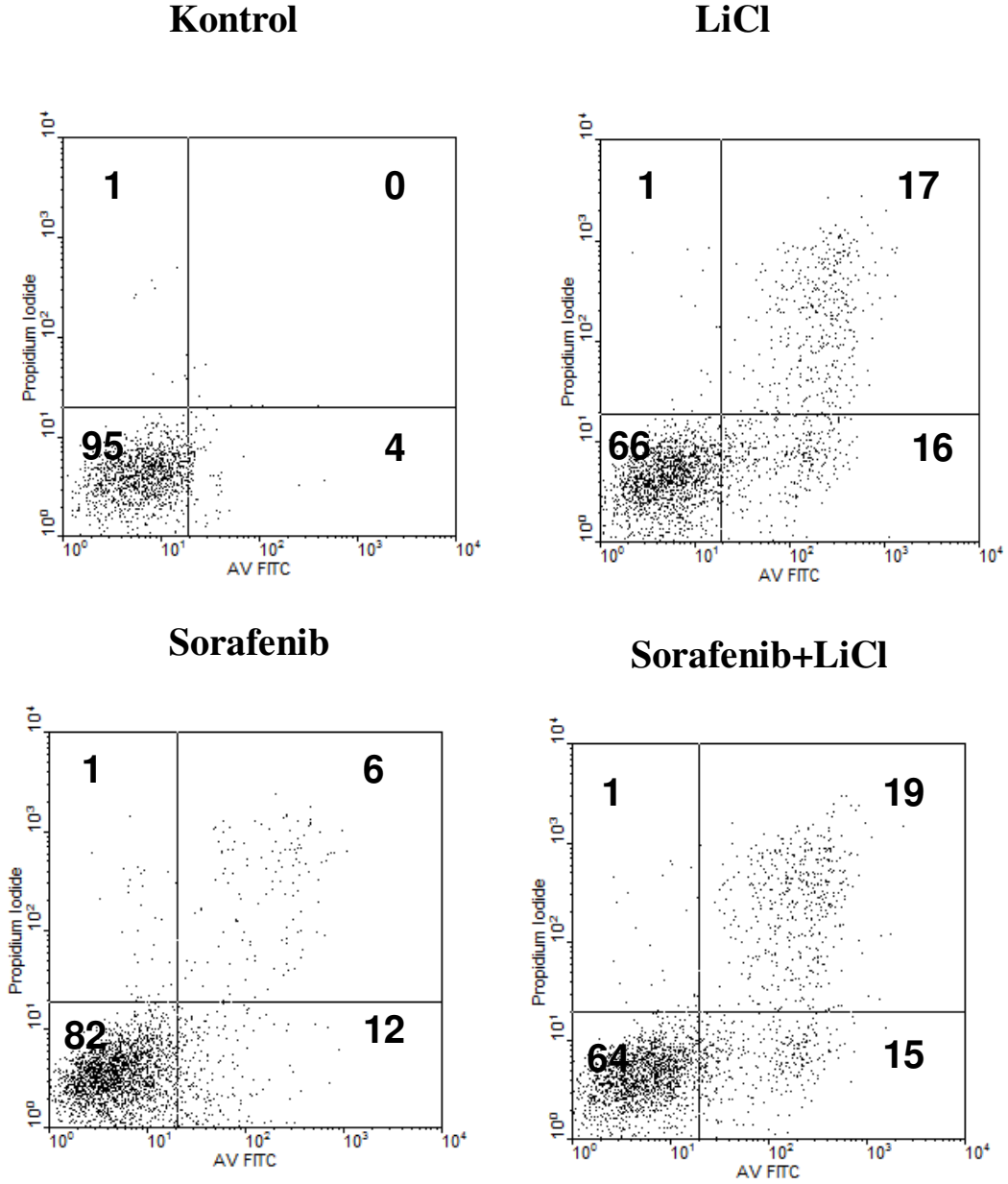


Grafik 4.2. Dört ayrı gruptaki apoptotik hücre oranlarının 24., 48. ve 72. saat dağılımı

İlaçların 72 saat boyunca apoptotik hücre oranına etkileri histogram olarak Şekil 4.1, 4.2, 4.3'de gösterilmiştir.

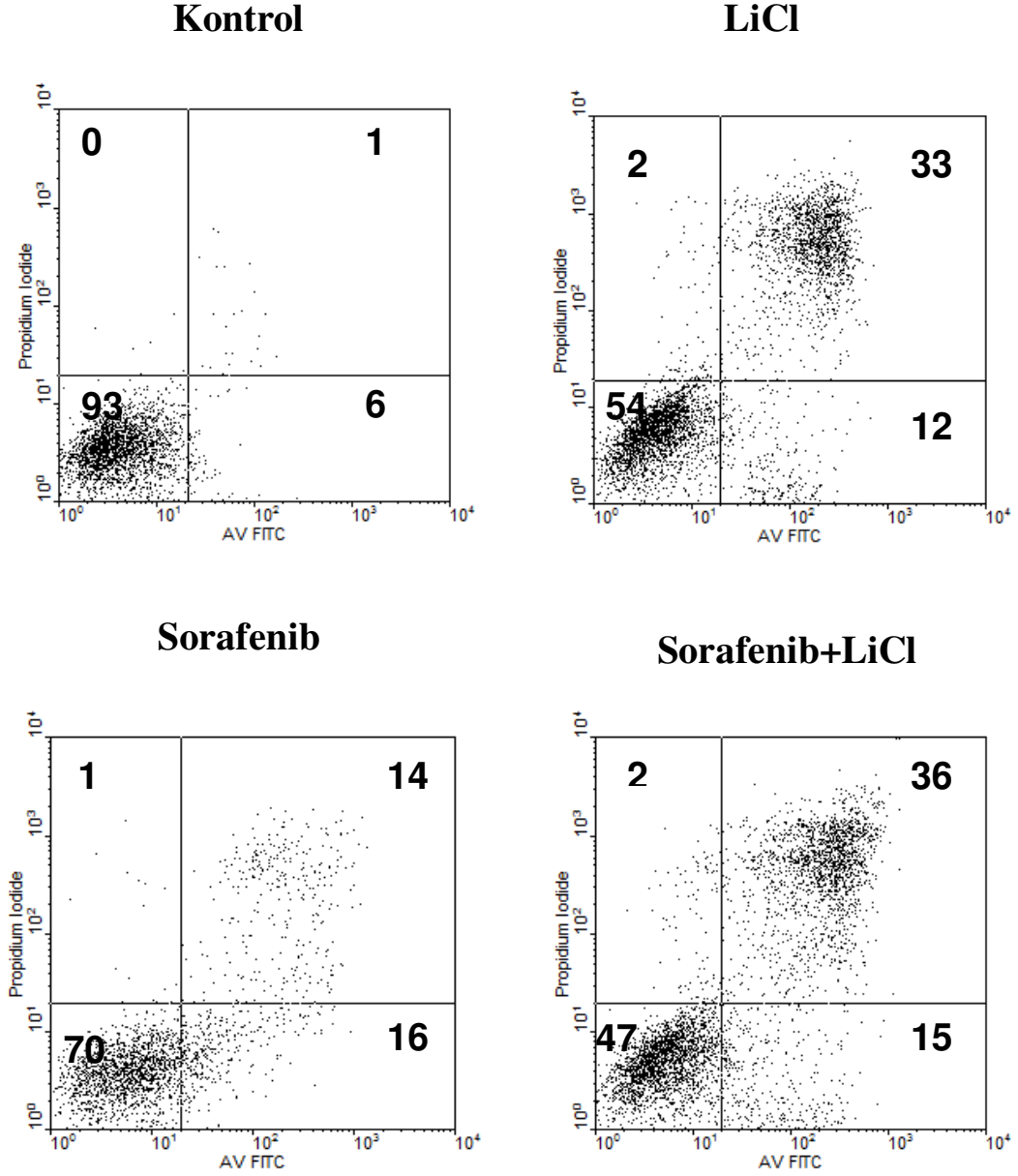
4.2.1. APOPTOZ HİSTOGRAMLARI

24. Saat Apoptoz Histogramları



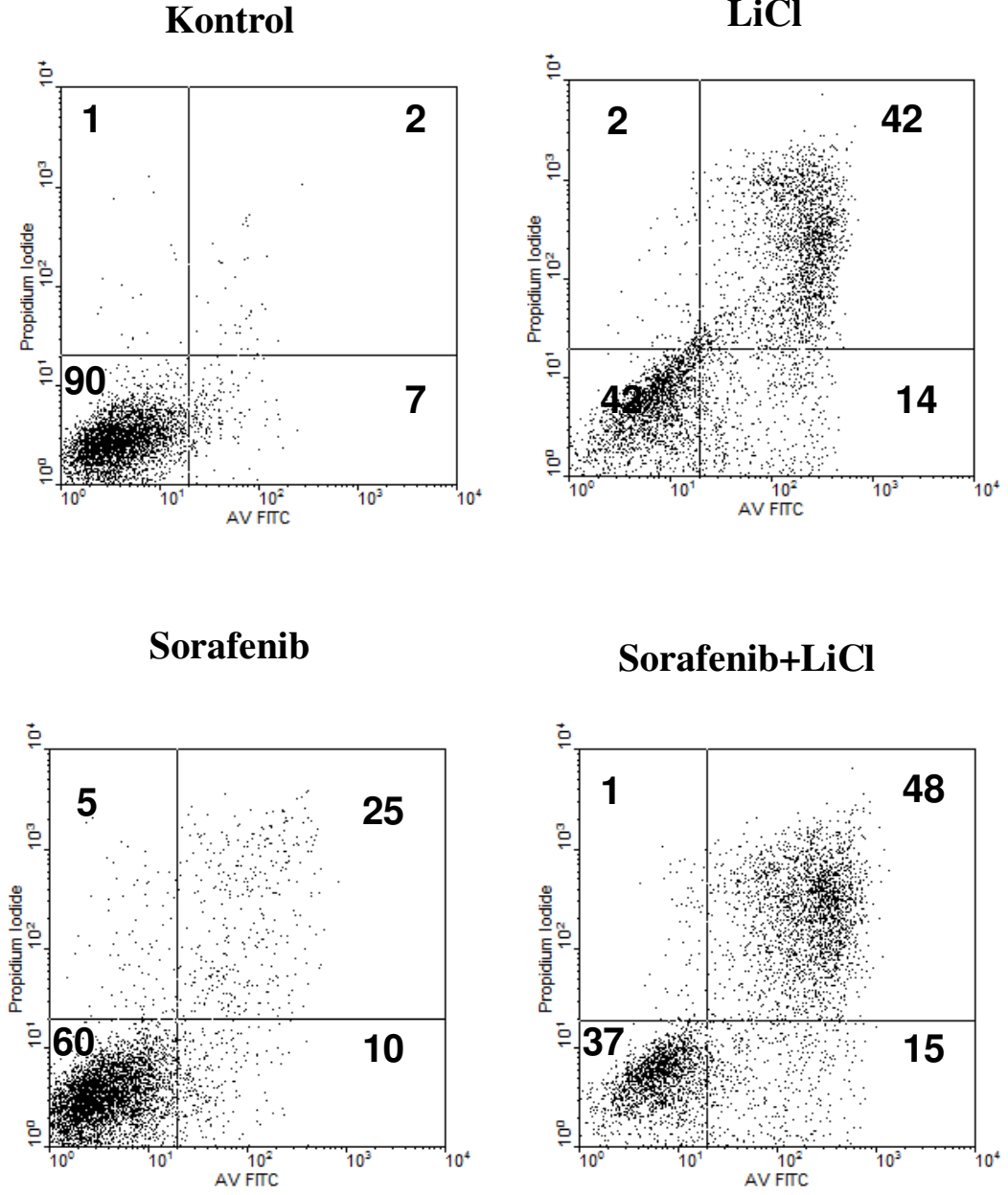
Şekil 4.1. 24.saat apoptotik hücre oranlarının histogram olarak gösterilmesi. Histogramın bölümleri canlı hücre oranını (sol alt), ölü hücre oranını (sol üst), erken apoptotik hücre oranını (sağ alt), geç apoptotik hücre oranını (sağ üst) göstermektedir.

48. Saat Apoptoz Histogramları



Şekil 4.2. 48.saat apoptotik hücre oranlarının histogram olarak gösterilmesi. Histogramın bölümleri canlı hücre oranını (sol alt), ölü hücre oranını (sol üst), erken apoptotik hücre oranını (sağ alt), geç apoptotik hücre oranını (sağ üst) göstermektedir.

72. Saat Apoptoz Histogramları



Şekil 4.3. 72.saat apoptotik hücre oranlarının histogram olarak gösterilmesi. Histogramın bölümleri canlı hücre oranını (sol alt), ölü hücre oranını (sol üst), erken apoptotik hücre oranını (sağ alt), geç apoptotik hücre oranını (sağ üst) göstermektedir.

4.3. KASPAZ-3 SEVİYELERİ

Sorafenib (100 µM) ile kaspaz-3 seviyelerini kontrole göre 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görüldü ($p_{24} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.3, Grafik 4.3).

LiCl (100 µM) ile kaspaz-3 seviyelerini kontrole göre 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görüldü ($p_{24} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.3, Grafik 4.3).

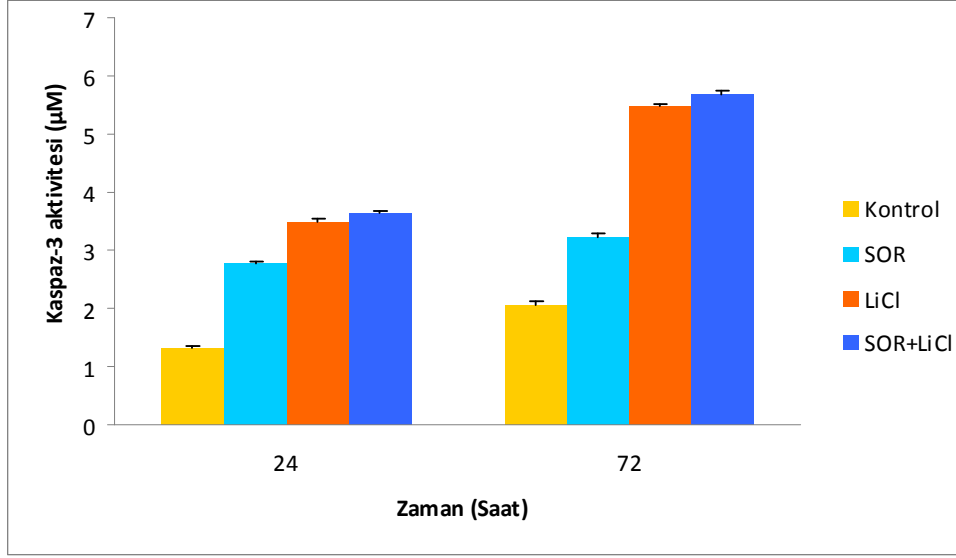
LiCl (100 µM) ile Sorafenib (100 µM) kombinasyonunun kaspaz-3 seviyelerini kontrole göre 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görüldü ($p_{24} < 0.01$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.3, Grafik 4.3).

Bu sonuçlara göre ikili ilaç kullanımı kaspaz-3 seviyesini tek başına Sorafenib'e göre 24. ve 72 saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.3, Grafik 4.3).

İkili ilaç kullanımının kaspaz-3 seviyesine etkisi tek başına LiCl'e göre kıyaslandığında 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı saptandı ($p_{24} < 0.01$, $p_{72} < 0.01$) (Tablo 4.3, Grafik 4.3).

Tablo 4.3. Her dört gruptaki kaspaz-3 seviyelerinin 24. ve 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri

µM	24. saat	72.saat
Kontrol	1.31±0.03	2.08±0.05
Sorafenib	2.77±0.05	3.21±0.07
LiCl	3.50±0.04	5.48±0.03
Sorafenib+LiCl	3.65±0.04	5.68±0.07



Grafik 4.3. Her dört gruptaki kaspaz-3 seviyelerinin 24. ve 72. saatteki dağılım grafiği

4.4. FOSFORİLE GSK-3 β SEVİYELERİ

Sorafenib (100 μ M) kontrol grubuna göre fosforile GSK-3 β seviyesini 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü ($p_{24} < 0.001$, $p_{72} < 0.01$) (Tablo 4.4, Grafik 4.4).

LiCl (100 μ M) kontrol grubuna göre fosforile GSK-3 β seviyesini 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görüldü ($p_{24} < 0.05$) 72.saatte ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p_{72} > 0.05$) (Tablo 4.4, Grafik 4.4).

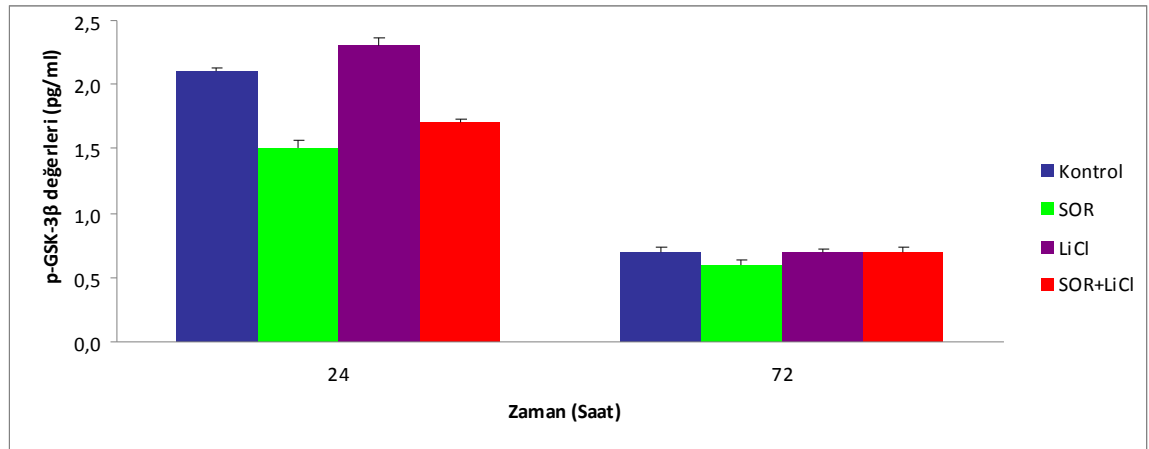
LiCl (100 μ M) ile Sorafenib (100 μ M) kombinasyonunun kontrol grubuna göre fosforile GSK-3 β seviyesini 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü ($p_{24} < 0.001$) 72.saatte ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p_{72} > 0.05$) (Tablo 4.4, Grafik 4.4).

İkili ilaç kullanımı fosforile GSK-3 β seviyesini tek başına Sorafenib'e göre 24. ve 72 saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.05$, $p_{72} < 0.01$) (Tablo 4.4, Grafik 4.4).

İkili ilaç kullanımının fosforile GSK-3 β seviyesine etkisi tek başına LiCl'e göre kıyaslandığında 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı saptandı ($p_{24} < 0.001$). 72 saatte ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p_{72} > 0.05$) (Tablo 4.4, Grafik 4.4).

Tablo 4.4. Her dört gruptaki fosforile GSK-3 β seviyelerinin 24. ve 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri

pg/ml	24. saat	72.saat
Kontrol	2.12 \pm 0.03	0.71 \pm 0.03
Sorafenib	1.50 \pm 0.06	0.58 \pm 0.03
LiCl	2.29 \pm 0.06	0.72 \pm 0.02
Sorafenib+LiCl	1.72 \pm 0.03	0.70 \pm 0.03



Grafik 4.4. Her dört gruptaki fosforile GSK-3 β seviyelerinin 24. ve 72. saatteki dağılım grafiği

4.5. SİNYAL İLETİM YOLUNDAKİ PROTEİN SEVİYELERİ

Dört gruptaki sinyal yolu proteinlerinden fosforile AKT (p-AKT), total AKT (t-AKT), fosforile p38 (p-p38), total p38 (t-p38), fosforile ERK (p-ERK), total ERK (t-ERK), fosforile IκBα (p-IκBα), total IκBα (t-IκBα), fosforile c-jun (p-c-jun), total c-jun (t-c-jun)'ın 72. saat düzeylerine bakıldı. Fosforile-stat-3 ve total-stat-3 saptanabilir düzeylerin altında bulunduğu için değerlendirme yapılamadı.

İlaçların **AKT** üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

Sorafenib (100 µM)'in kontrole göre p-AKT ($p < 0.01$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu, t-AKT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.1, Grafik 4.5.1).

LiCl (100 µM)'ün kontrole göre p-AKT ($p < 0.05$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu, t-AKT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.1, Grafik 4.5.1).

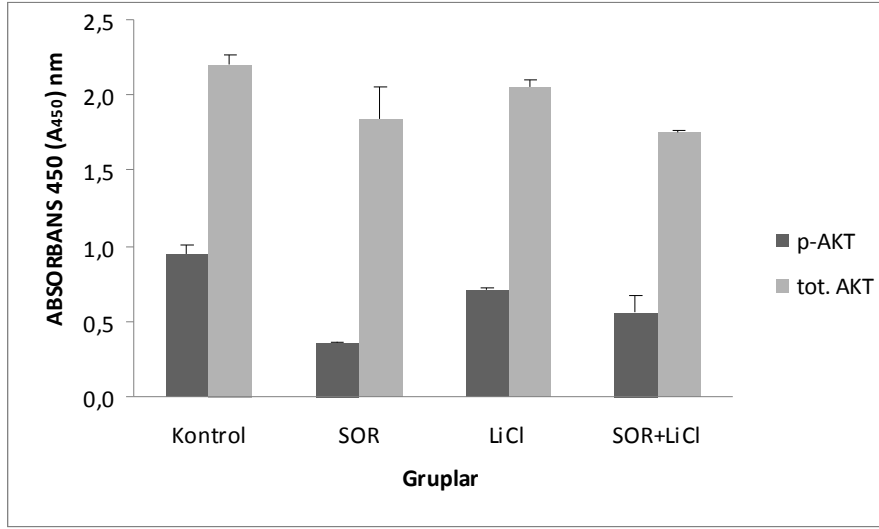
LiCl (100 µM) ile Sorafenib (100 µM) kombinasyonunun kontrole göre p-AKT ($p < 0.05$), t-AKT ($p < 0.01$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.1, Grafik 4.5.1).

İkili ilaç kullanımının LiCl'e göre p-AKT ($p < 0.01$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı, t-AKT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.1, Grafik 4.5.1).

İkili ilaç kullanımının Sorafenib'e göre p-AKT ve t-AKT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.1, Grafik 4.5.1).

Tablo 4.5.1. Her dört gruptaki p-AKT ve t-AKT seviyelerinin 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri

	p-AKT	t-AKT
Kontrol	0.89±0.06	2.20±0.05
Sorafenib	0.40±0.01	1.82±0.20
LiCl	0.71±0.005	2.13±0.05
Sorafenib+LiCl	0.61±0.10	1.80±0.01



Grafik 4.5.1. Her dört gruptaki p-AKT ve t-AKT seviyelerinin 72. saatteki dağılım grafiği

İlaçların **p38** üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

Sorafenib (100 µM)'in kontrole göre p-p38 ($p < 0.001$), t-p38 ($p < 0.001$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.2, Grafik 4.5.2).

LiCl (100 µM)'ün kontrole göre p-p38 seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği, t-p38 ($p < 0.01$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.2, Grafik 4.5.2).

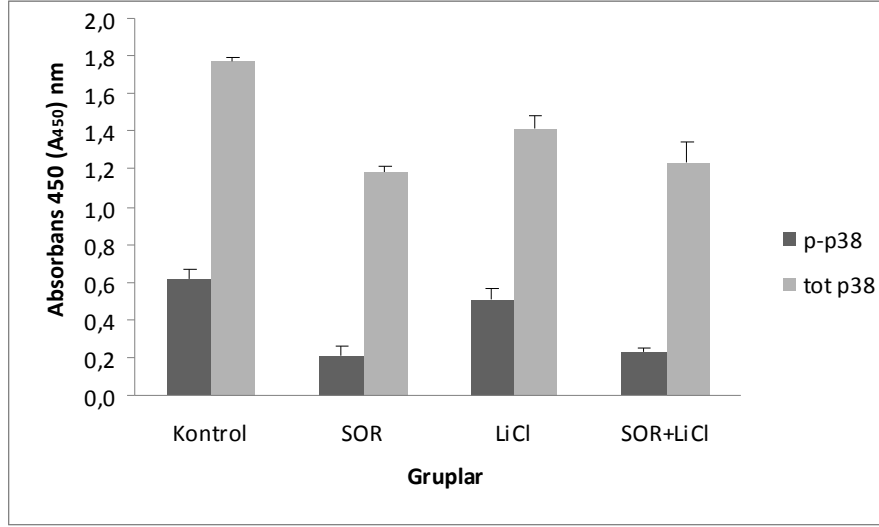
LiCl (100 µM) ile Sorafenib (100 µM) kombinasyonunun kontrole göre p-p38 ($p < 0.01$), t-p38 ($p < 0.05$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.2, Grafik 4.5.2).

İkili ilaç kullanımının LiCl'e göre p-p38 ($p < 0.05$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu, t-p38 seviyelerini ise azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.2, Grafik 4.5.2).

İkili ilaç kullanımının Sorafenib'e göre p-p38 ve t-p38 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.2, Grafik 4.5.2).

Tablo 4.5.2. Her dört gruptaki p-p38 ve t-p38 seviyelerinin 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri

	p-p38	t-p38
Kontrol	0.61±0.09	1.78±0.005
Sorafenib	0.20±0.005	1.19±0.005
LiCl	0.51±0.07	1.40±0.09
Sorafenib+LiCl	0.21±0.005	1.21±0.07



Grafik 4.5.2. Her dört gruptaki p-p38 ve t-p38 seviyelerinin 72. saatteki dağılım grafiği

İlaçların **ERK** üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

Sorafenib (100 µM)'in kontrole göre p-ERK seviyelerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. t-ERK seviyelerini ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği saptandı (Tablo 4.5.3, Grafik 4.5.3).

LiCl (100 µM)'ün kontrole göre p-ERK ve t-ERK seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği saptandı (Tablo 4.5.3, Grafik 4.5.3).

LiCl (100 µM) ile Sorafenib (100 µM) kombinasyonunun kontrole göre p-ERK seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği, t-ERK

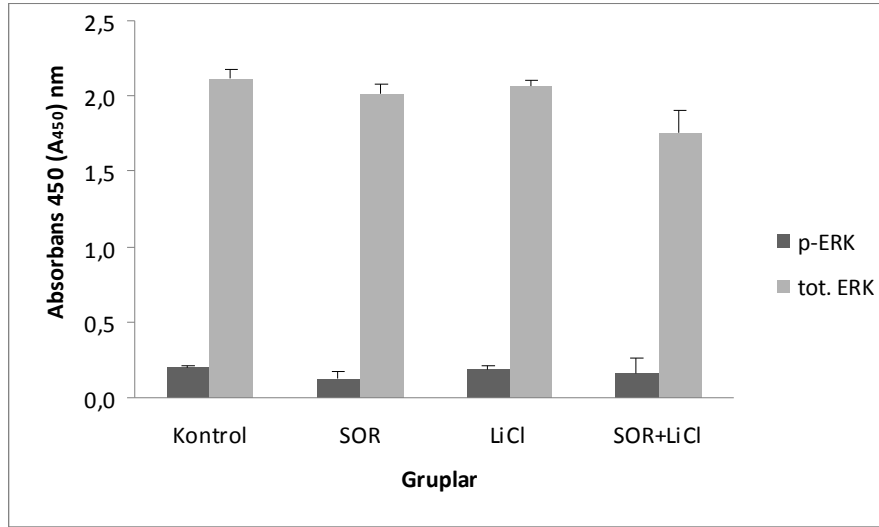
seviyelerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 4.5.3, Grafik 4.5.3).

İkili ilaç kullanımının LiCl'e göre p-ERK seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği, t-ERK seviyelerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 4.5.3, Grafik 4.5.3).

İkili ilaç kullanımının Sorafenib'e göre p-ERK seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği, t-ERK seviyelerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 4.5.3, Grafik 4.5.3).

Tablo 4.5.3. Her dört gruptaki p-ERK ve t-ERK seviyelerinin 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri

	p-ERK	t-ERK
Kontrol	0.20±0.005	2.10±0.07
Sorafenib	0.10±0.01	2.02±0.06
LiCl	0.20±0.005	2.09±0.005
Sorafenib+LiCl	0.20±0.06	1.83±0.12



Grafik 4.5.3. Her dört gruptaki p-ERK ve t-ERK seviyelerinin 72. saatteki dağılım grafiği

İlaçların **IκBα** üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

Sorafenib'in, LiCl'ün ve iki ilacın birlikte kombinasyonunun p-IκBα seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedığı saptandı (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

Sorafenib (100 μM)'in kontrole göre t-IκBα (p<0.001) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

LiCl (100 μM)'ün kontrole göre t-IκBα seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

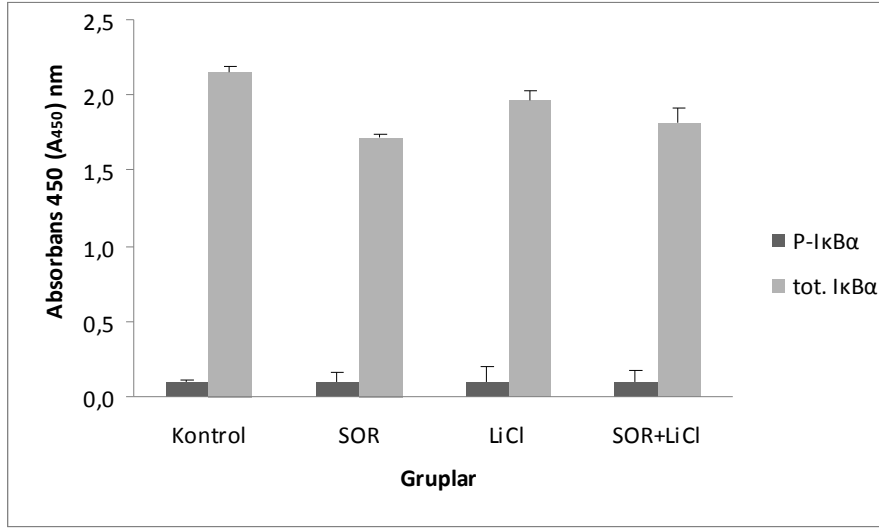
LiCl (100 μM) ile Sorafenib (100 μM) kombinasyonunun kontrole göre, t-IκBα (p<0.05) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

İkili ilaç kullanımının LiCl'e göre t-IκBα seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

İkili ilaç kullanımının Sorafenib'e göre t-IκBα seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

Tablo 4.5.4. Her dört gruptaki p-IκBα ve t-IκBα seviyelerinin 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri

	p-IκBα	t-IκBα
Kontrol	0.10±0.02	2.10±0.01
Sorafenib	0.10±0.06	1.70±0.02
LiCl	0.13±0.07	2.04±0.10
Sorafenib+LiCl	0.13±0.07	1.82±0.12



Grafik 4.5.4. Her dört gruptaki p-IκBα ve t-IκBα seviyelerinin 72. saatteki dağılım grafiği

İlaçların **c-Jun** üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

Sorafenib (100 μM)'in kontrole göre p-c-jun ($p < 0.01$) ve t-c-jun ($p < 0.05$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.5, Grafik 4.5.5).

LiCl (100 μM)'ün kontrole göre p-c-jun ($p < 0.01$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu, t-c-jun seviyelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.5, Grafik 4.5.5).

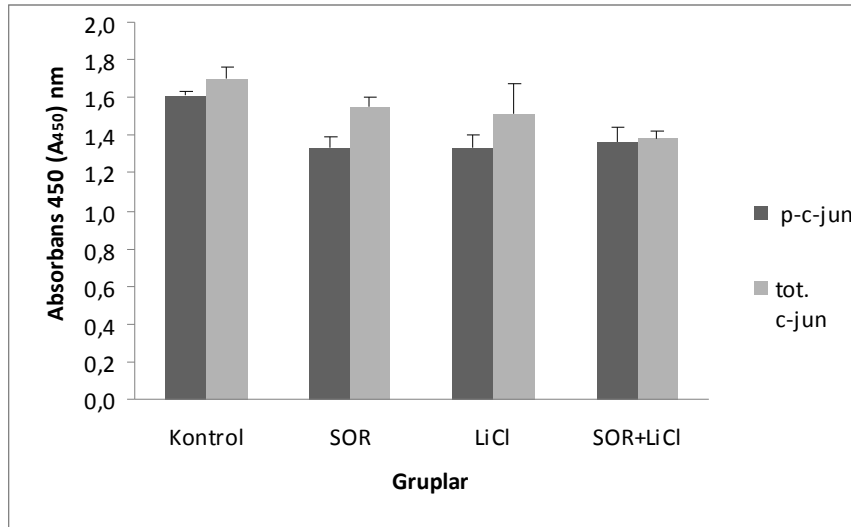
LiCl (100 μM) ile Sorafenib (100 μM) kombinasyonunun kontrole göre p-c-jun seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı, t-c-jun ($p < 0.01$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.5, Grafik 4.5.5).

İkili ilaç kullanımının Sorafenib'e göre p-c-jun seviyelerini arttırdığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve t-c-jun seviyelerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 4.5.5, Grafik 4.5.5).

İkili ilaç kullanımının LiCl'e göre p-c-jun seviyelerini arttırdığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve t-c-jun seviyelerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 4.5.5, Grafik 4.5.5).

Tablo 4.5.5. Her dört gruptaki p-c-jun ve t-c-jun seviyelerinin 72. saatteki ortalama ve standart sapma değerleri

	p-c-jun	t-c-jun
Kontrol	1.60±0.01	1.73±0.06
Sorafenib	1.27±0.08	1.51±0.06
LiCl	1.28±0.08	1.52±0.20
Sorafenib+LiCl	1.48±0.09	1.38±0.03



Grafik 4.5.5. Her dört gruptaki p-c-jun ve t-c-jun seviyelerinin 72. saatteki dağılım grafiği

Tablo 4.6. Hücre sayısı üzerine ilaçların 24., 48. ve 72. saatteki etkilerinin tüm verileri

	24. saat	48. saat	72. saat
Kontrol-1	17	24	38
Kontrol-2	18	24	34
Kontrol-3	16	25	36
Ortalama	17	24	36
SEM	1	0	1
Sorafenib-1	12	22	25
Sorafenib-2	14	22	25
Sorafenib-3	12	21	24
Ortalama	13	22	25
SEM	1	0	0
p kontrole göre	0.0084	0.0048	0.0066
LiCl-1	7	7	6
LiCl-2	7	4	4
LiCl-3	8	7	6
Ortalama	7	6	5
SEM	0	1	1
p kontrole göre	0.0005	0.0013	0.0001
(Sorafenib+LiCl)-1	9	4	4
(Sorafenib+LiCl)-2	7	4	5
(Sorafenib+LiCl)-3	8	5	3
Ortalama	8	4	4
SEM	1	0	1
p kontrole göre	0.0004	0.000002	0.0002
p Sorafenib'e göre	0.0065	0.000003	0.00005
p LiCl'e göre	0.3868	0.2322	0.2065

Tablo 4.7. Apoptozis üzerine ilaçların 24. saatteki etkilerinin her gruba ait üç kuyucuk ortalama verileri

24. saat	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Toplam Apoptozis	Ölü Hücre
Kontrol	95	4	0	4	1
Sorafenib	66	16	17	33	1
LiCl	82	12	6	18	1
Sorafenib+LiCl	64	15	19	34	1

Tablo 4.8. Apoptozis üzerine ilaçların 48. saatteki etkilerinin her gruba ait üç kuyucuk ortalama verileri

48. saat	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Toplam Apoptozis	Ölü Hücre
Kontrol	93	6	1	7	0
Sorafenib	70	16	14	30	1
LiCl	54	12	33	45	2
Sorafenib+LiCl	47	15	36	51	2

Tablo 4.9. Apoptozis üzerine ilaçların 72. saatteki etkilerinin her gruba ait üç kuyucuk ortalama verileri

48. saat	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Toplam Apoptozis	Ölü Hücre
Kontrol	90	7	2	9	1
Sorafenib	60	10	25	35	5
LiCl	42	14	42	56	2
Sorafenib+LiCl	37	15	48	63	1

Tablo 4.10. Toplam apoptozisin 24., 48. ve 72. saatteki tüm verileri

	24. saat	48. saat	72. saat
Kontrol-1	4	7	9
Kontrol-2	5	7	9
Kontrol-3	4	6	10
Ortalama	4	7	9
SEM	0	0	0
Sorafenib-1	19	30	35
Sorafenib-2	18	28	34
Sorafenib-3	17	32	35
Ortalama	18	30	35
SEM	1	1	0
p kontrole göre	0.0002	0.0012	0.0000007
LiCl-1	34	45	56
LiCl-2	32	45	54
LiCl-3	33	44	57
Ortalama	33	45	56
SEM	1	0	1
p kontrole göre	0.00002	0.0000001	0.00007
(Sorafenib+LiCl)-1	35	51	65
(Sorafenib+LiCl)-2	35	52	63
(Sorafenib+LiCl)-3	33	51	62
Ortalama	34	51	63
SEM	1	0	1
p kontrole göre	0.00004	0.00000007	0.00005
p Sorafenib'e göre	0.00006	0.0015	0.0002
p LiCl'e göre	0.2065	0.0001	0.0036

Tablo 4.11. Kaspaz 3 üzerine ilaçların 24. ve 72. saatteki etkilerinin tüm verileri

	24. saat	72. saat
Kontrol-1	1.34	2.08
Kontrol-2	1.27	2.12
Kontrol-3	1.28	2.11
Kontrol-4	1.33	2.01
Ortalama	1.31	2.08
SD	0.03	0.05
Sorafenib-1	2.77	3.22
Sorafenib-2	2.72	3.19
Sorafenib-3	2.84	3.30
Sorafenib-4	2.74	3.13
Ortalama	2.77	3.21
SD	0.05	0.07
p kontrole göre	0.00000005	0.00000004
LiCl-1	3.50	5.45
LiCl-2	3.54	5.51
LiCl-3	3.51	5.51
LiCl-4	3.44	5.45
Ortalama	3.50	5.48
SD	0.04	0.03
p kontrole göre	0.000001	0.000000003
(Sorafenib+LiCl)-1	3.70	5.62
(Sorafenib+LiCl)-2	3.64	5.62
(Sorafenib+LiCl)-3	3.61	5.74
(Sorafenib+LiCl)-4	3.64	5.73
Ortalama	3.65	5.68
SD	0.04	0.07
p kontrole göre	0.0017	0.00000007
p Sorafenib'e göre	0.0017	0.0055
p LiCl'e göre	0.00000004	0.000000004

Tablo 4.12. Fosforile GSK-3 β üzerine ilaçların 24. ve 72. saatteki etkilerinin tüm verileri

	24. saat	72. saat
Kontrol-1	2.16	0.71
Kontrol-2	2.11	0.70
Kontrol-3	2.08	0.72
Ortalama	2.12	0.71
SD	0.03	0.03
Sorafenib-1	1.56	0.62
Sorafenib-2	1.50	0.55
Sorafenib-3	1.43	0.57
Ortalama	1.50	0.58
SD	0.06	0.03
p kontrole göre	0.0004	0.0037
LiCl-1	2.29	0.74
LiCl-2	2.24	0.71
LiCl-3	2.35	0.71
Ortalama	2.29	0.72
SD	0.06	0.02
p kontrole göre	0.036	0.624
(Sorafenib+LiCl)-1	1.76	0.70
(Sorafenib+LiCl)-2	1.73	0.69
(Sorafenib+LiCl)-3	1.64	0.72
Ortalama	1.72	0.70
SD	0.03	0.03
p kontrole göre	0.00007	0.1398
p Sorafenib'e göre	0.0005	0.1563
p LiCl'e göre	0.0160	0.0093

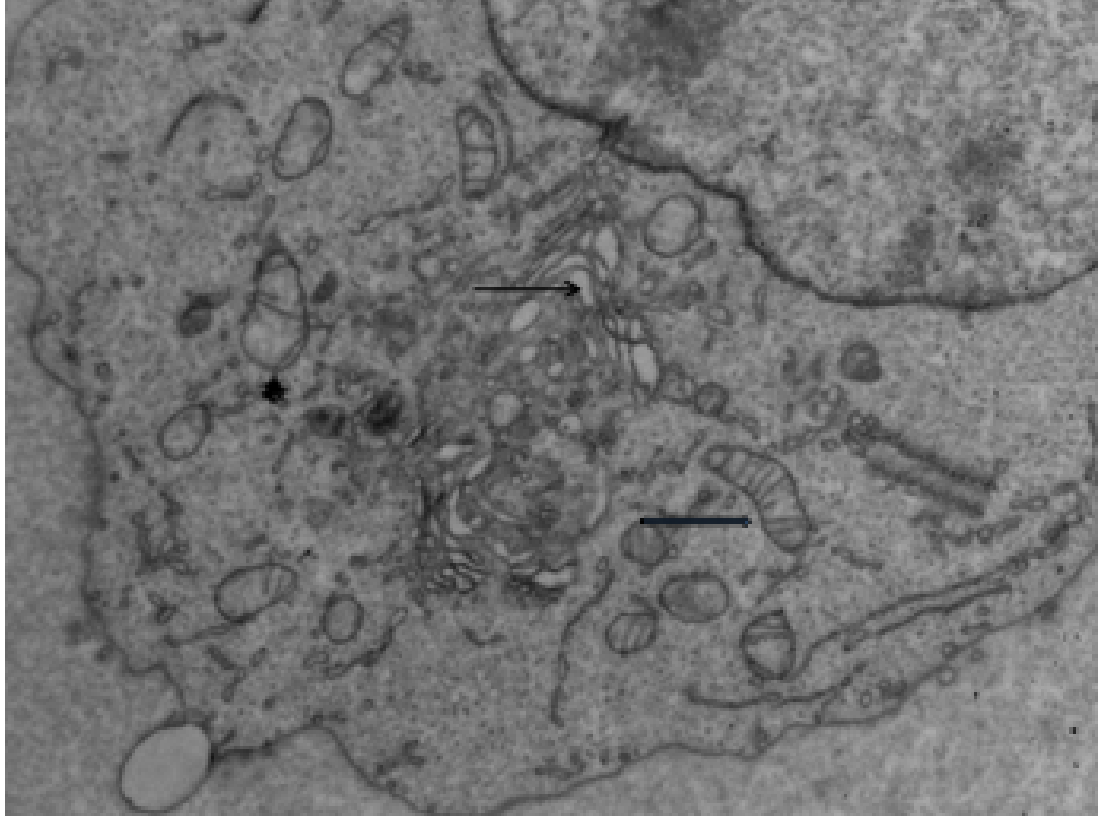
Tablo 4.13. Hücre iletim yolundaki proteinler üzerine ilaçların 72. saatteki etkilerinin tüm verileri

	p-AKT	t-AKT	p-p38	t-p38	p-ERK	t-ERK	p-IκBα	t-IκBα	p-c-jun	t-c-jun
Kontrol-1	0.84	2.23	0.61	1.78	0.20	2.14	0.08	2.09	1.61	1.68
Kontrol-2	0.94	2.14	0.52	1.77	0.20	2.14	0.10	2.11	1.60	1.72
Kontrol-3	0.90	2.24	0.70	1.78	0.19	2.02	0.12	2.12	0.59	1.80
Ortalama	0.89	2.20	0.61	1.78	0.20	2.10	0.10	2.10	1.60	1.73
SD	0.06	0.05	0.09	0.005	0.005	0.07	0.02	0.01	0.01	0.06
Sorafenib-1	0.41	1.84	0.20	1.19	0.09	2.0	0.14	1.68	1.29	1.48
Sorafenib-2	0.40	1.60	0.19	1.19	0.09	2.0	0.14	1.72	1.35	1.59
Sorafenib-3	0.39	2.01	0.20	1.18	0.11	2.1	0.04	1.71	1.19	1.47
Ortalama	1.40	1.82	0.20	1.19	0.10	2.02	0.10	1.70	1.27	1.51
SD	0.01	0.20	0.005	0.005	0.01	0.06	0.06	0.02	0.08	0.06
p kontrole göre	0.0032	0.0773	0.0007	0.0001	0.0609	0.4388	0.9354	0.0002	0.0085	0.0120
LiCl-1	0.71	2.11	0.53	1.39	0.20	2.09	0.15	2.14	1.28	1.52
LiCl-2	0.70	2.19	0.44	1.30	0.21	2.10	0.19	2.11	1.36	1.33
LiCl-3	0.71	2.09	0.57	1.48	0.20	2.09	0.06	1.89	1.20	1.71
Ortalama	0.71	2.13	0.51	1.40	0.20	2.09	0.13	2.04	1.28	1.52
SD	0.005	0.05	0.07	0.09	0.005	0.005	0.07	0.10	0.08	0.20
p kontrole göre	0.0321	0.1375	0.0916	0.0068	0.9963	0.5886	0.4215	0.0528	0.0089	0.1522
(Sorafenib+LiCl)-1	0.57	1.80	0.21	1.22	0.18	1.78	0.14	1.79	1.37	1.39
(Sorafenib+LiCl)-2	0.51	1.82	0.21	1.27	0.15	1.73	0.05	1.80	1.53	1.41
(Sorafenib+LiCl)-3	0.76	1.79	0.20	1.14	0.27	1.97	0.20	1.81	1.54	1.35
Ortalama	0.61	1.80	0.21	1.21	0.20	1.83	0.13	1.82	1.48	1.38
SD	0.10	0.01	0.005	0.07	0.06	0.12	0.07	0.12	0.09	0.03
p kontrole göre	0.0428	0.0065	0.004	0.0107	0.9050	0.0617	0.4674	0.0318	0.0896	0.0034
p Sorafenib'e göre	0.0586	0.7742	0.3680	0.7747	0.2314	0.0890	0.4859	0.1200	0.0732	0.0570
p LiCl'e göre	0.2701	0.0072	0.0105	0.1011	0.9072	0.0581	0.8980	0.1056	0.0736	0.3191

4.6. İLAÇLARIN GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU İLE HÜCRE İNCE YAPISI (ULTRASTRÜKTÜRÜ) ÜZERİNE ETKİLERİ

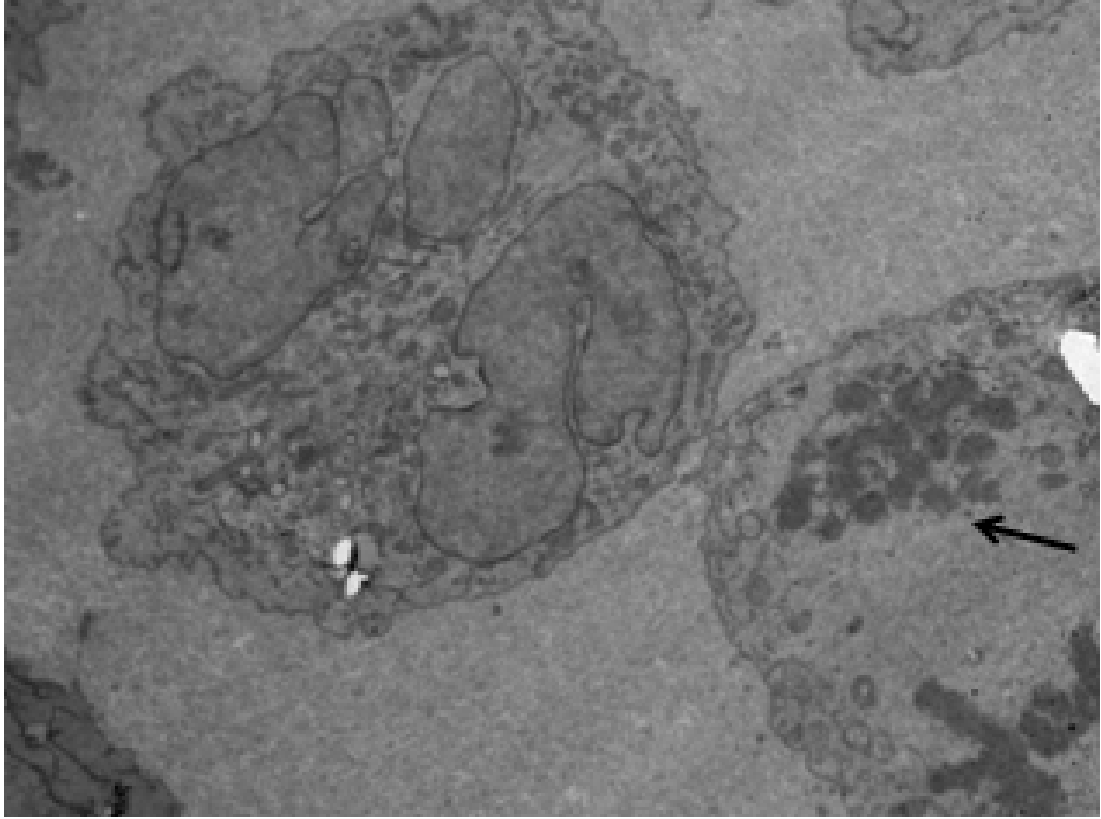
Kontrol Grubu

HL-60 hücre kültürü kontrol grubu hücrelerinden elde edilen elektron mikroskopik görüntüde sağlıklı mitokondri (tek ok) ve golgi aparatus yapısı ve diğer hücre organel yapıları izlendi. Hem çekirdek hemde hücre zarlarının devamlılık sergilediği izlendi.



Şekil 4.4. Kontrol grubu geçirimli elektron fotoğrafı (Büyütme $\times 12000$).

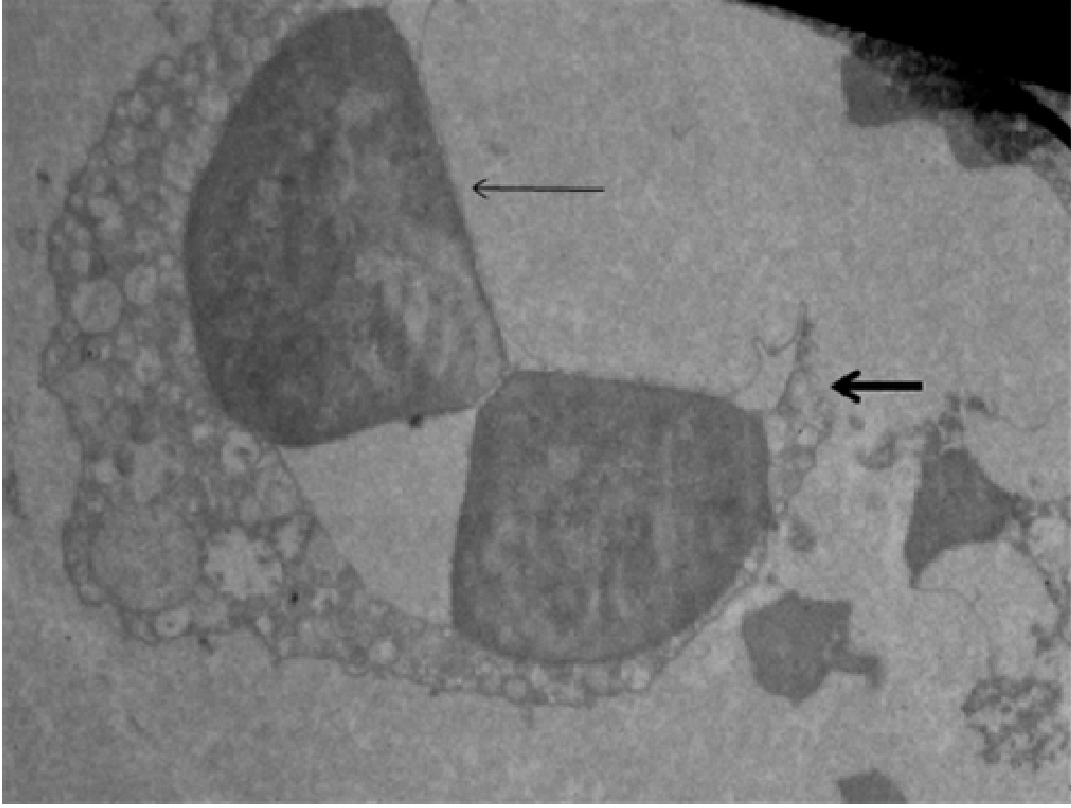
HL-60 hücre kültürü kontrol grubu hücrelerinden elde edilen elektron mikroskopik görüntüde, sağlıklı mitoz metafaz hücreleri (tek ok), diğer hücrede çok loblu hem çekirdek hem de hücre zarlarının devamlılık sergilediği gözlemlendi.



Şekil 4.5. Kontrol grubu geçirimli elektron fotoğrafı (Büyütme $\times 5000$).

Sorafenib Grubu

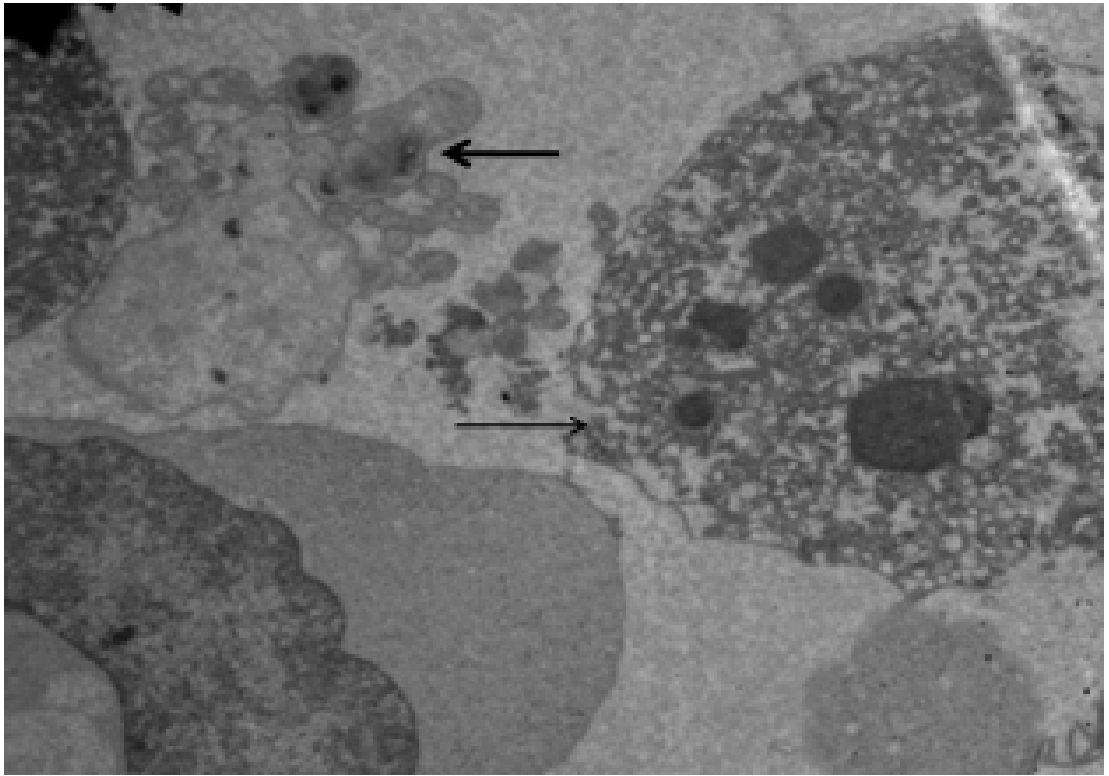
HL-60 hücre kültüründe Sorafenib uygulanmış hücrelerden elde edilen elektron mikroskopik görüntüde hücre zarının hasar gördüğü bütünlüğünü koruyamadığı (kalın ok) ve çekirdek materyalinin loblara ayrıldığı (ince ok) görüldü. Sitoplazmada ileri litik değişiklikler gözlenmektedir.



Şekil 4.6. Sorafenib grubu geçirimli elektron fotoğrafı (Büyütme $\times 5000$).

Lityum Klorür Grubu

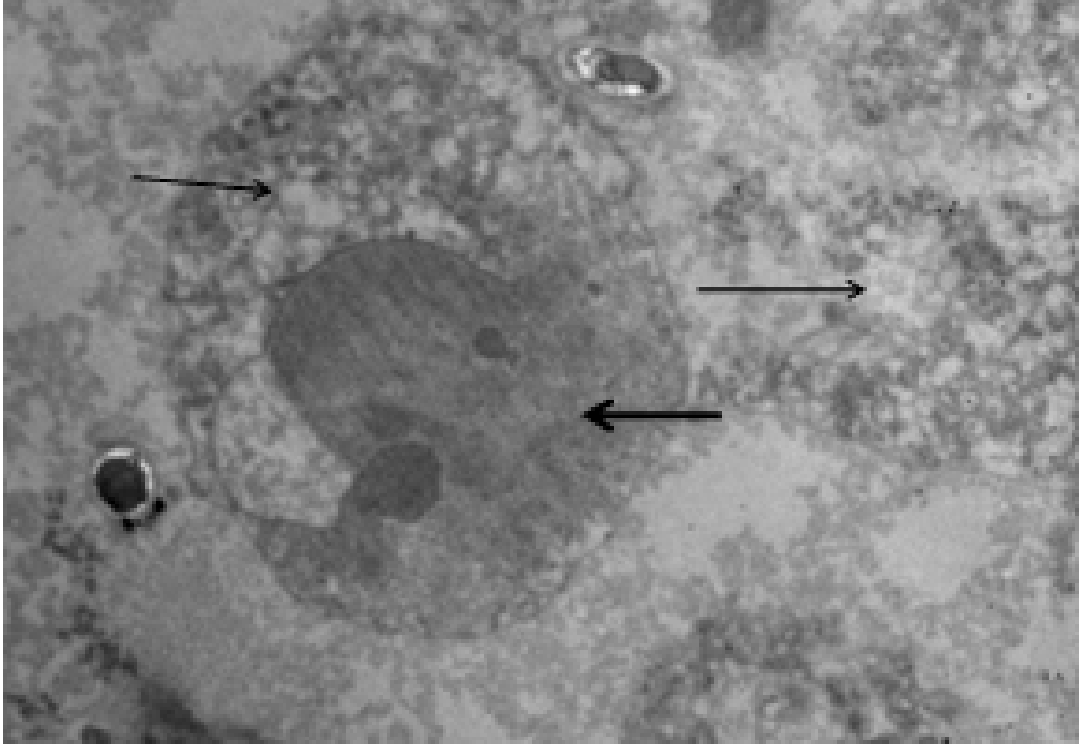
HL-60 hücre kültüründe LiCl uygulanmış hücrelerden elde edilen elektron mikroskopik resimde hücre zarının hasar gördüğü bütünlüğünü koruyamadığı (ince ok) ve bazı hücrelerin sitoplazmasının apoptotik morfoloji (kalın ok) yansıttığı görülmektedir. Ayrıca hücrelerin çoğunda ileri litik sitoplazmik değişiklikler gözlenmektedir.



Şekil 4.7. LiCl grubu geçirimli elektron fotoğrafı (Büyütme $\times 5000$).

Sorafenib ve Lityum Klorür Kombinasyon Grubu

HL-60 hücre kültüründe Sorafenib ve LiCl birlikte uygulanmış hücrelerden elde edilen elektron mikroskopik resimde hücrelerde ileri derecede litik sitoplazmik hasar (ince oklar) ve çekirdek membran hasarı (kalın ok) görülmektedir.



Şekil 4.8. Sorafenib ve LiCl kombinasyon grubu geçirimli elektron fotoğrafı (Büyütme $\times 6000$).

5. TARTIŞMA

Çalışmanın amacı HL-60 insan APL hücre kültüründe Sorafenib ile LiCl'ün etki mekanizmalarını araştırmaktır. Deneylede Sorafenib ve LiCl ilaçları tek tek ve birlikte, insan kökenli APL hücrelerinden oluşan kültürlerde 72 saat boyunca denenmiştir.

Günümüzde çeşitli kanser tipleri için keşfedilmeye çalışılan yeni kemoterapötikler ilk aşamada hücre kültürlerinde denenmekte, başarılı sonuçlar alındıktan sonra hayvan ve insan deneylelerine geçilmektedir. Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü koşullar altında yaşatılmasına dayanan bir laboratuvar işlemidir. Tarihsel olarak hücre kültürü alanındaki gelişmeler doku ve organlardan elde edilen hücrelerin yaşatılması ve çoğaltılması için geliştirilen metotlara dayanmaktadır. Bu teknikler özellikle 1950'li yıllarda virüslerin memeli hücrelerinde üretilmesi üzerine yapılan çalışmalar ile gelişme göstermiş ve son yıllarda deneysel kanser araştırmaları ve kök hücre konusunun bilimsel olarak öneminin ortaya konmasıyla değer kazanmıştır. Hayvan hücre kültürleriyle başlanan çalışmalar, insandan elde edilen kanser hücrelerinin de vücut dışında uygun şekilde çoğaltılmasıyla insan hücre kültürlerini mümkün hale getirdi. Hayvan hücre kültürleri ile yapılan çalışmalar birçok ilacın denenmesinde daha önce yaygın olarak kullanılsa da, hayvan hücreleri ile insan hücreleri arasındaki hastalık oluşum mekanizmalarında benzerliklerin bulunması yanında farkların da oldukça fazla olması nedeniyle kliniğe bağlı tedavi protokollerinde doğru ve güvenilir yanıtla ulaşmada sorunlar yarattığını göstermiştir. Bu nedenle hücre kültürleri ile yapılan çalışmalar son zamanlarda daha çok insandan köken alan hücre hatlarının çalışılması yönünde ağırlık kazanmıştır (161,162).

Bu sebeple günümüzde alternatif tedavi yollarının denendiği APL tedavisine katkı sağlamak amacıyla, çalışmada insan APL hücre soyu ile kültür ortamında çalışma yapılması planlandı.

İlaçların etkilerinin 72 saat süreyle denenmesinin sebebi, bir hücre devrinin ortalama 18-22 saat arasında olduğu düşünülürken sağlıklı bir değerlendirme için üç hücre devrinin geçmiş olması gerekliliği ve ilacın toksisite etkisinin gözlenmesi için iki hücre devrinin geçmesi gerektiğidir (163).

İlaç olarak LiCl'ün seçilmesindeki neden; aslında uzun süredir farklı tedavi amaçlarıyla yaygın şekilde kullanılan Li⁺'un literatürde 2004 yılında yayınlanan, HL-60 hücre soyu ile yapılan tek bir çalışmada hücre farklılaşmasını uyarabilme özelliği

üzerinde durulmasıdır. Bu çalışmada APL hastalarının rutin tedavisinde kullanılan ATRA ile LiCl kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiği belirtilmiştir. Ancak ATRA ile hücre farklılaşmasını uyarmak için kullanılan Li⁺ konsantrasyonunun manik depresif hastalık tedavisinde kullanılan dozu aştığı belirlenmiştir; yine de lösemilerin tedavisinde lityum ile daha yoğun tedavinin nispeten kısa sürede uygulamaya izin vereceği düşünülmüştür (164).

Sorafenib, son yıllarda ileri evre karaciğer ve böbrek kanserlerinde kullanılmaya başlanan ve olumlu sonuçlar alınmış bir maddedir (79, 80). Literatürde Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu üzerinden etkisini gösterdiğini belirten çalışmalar mevcut olup, GSK-3β üzerinden etkisini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Li⁺un ise GSK-3β üzerinden etkisini açıklayan pek çok çalışma yayınlanmıştır.

Her iki ilacın ortak kullanılmasının sinerjistik etki oluşturma ihtimali, çalışmada bu iki ilacın seçilmesine neden olmuştur. HL-60 hücre soyuna Sorafenib ve LiCl'un birlikte uygulanması ilk defa bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

İlaçların hücre sayıları üzerine etkilerini değerlendirecek olursak; ilaç verilmeyen kontrol grubundaki hücreler, deneyin başlangıcından sonlandığı 72. saate kadar katlanarak beklenen şekilde çoğalmıştır (Grafik 4.1).

Sorafenib'in (100 µM) hücre sayısını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü ($p_{24} < 0.01$, $p_{48} < 0.01$, $p_{72} < 0.01$) (Tablo 4.1, Grafik 4.1).

LiCl'ün (100 µM) hücre sayısını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.01$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.1, Grafik 4.1).

Sorafenib ile LiCl kombinasyonunun hücre sayısını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.1, Grafik 4.1).

Bu sonuçlara göre ikili ilaç kullanımı hücre sayısını tek başına Sorafenib'e göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p_{24} < 0.01$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.1, Grafik 4.1).

İkili ilaç kullanımının hücre sayısına etkisi tek başına LiCl'e göre kıyaslandığında 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunamadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.1, Grafik 4.1). Tablo 4.1'de Kontrol, Sorafenib ve LiCl için tek tek ve beraber alınan hücre sayım sonuçları (SEM ile birlikte) gösterilmektedir.

Doz belirleme deneyleri sonucunda belirlenen ID₅₀ değerleri olan 100µM konsantrasyonda iki ilacın ayrı ayrı verilmesinin hücre kültüründe tümör hücrelerinin sayılarını 24., 48. ve 72. saatlerde anlamlı derecede azalttığı, fakat iki ilacın birlikte verilmesi durumunda bu etkinin kontrol ve Sorafenib grubuna göre daha da fazla olduğu saptandı. LiCl grubuna göre kıyaslandığında 48. ve 72. saatlerde bu etkinin biraz daha fazla olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (24. saatte LiCl'ün tek başına kombinasyon grubundan biraz daha fazla azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı saptandı).

Schult ve arkadaşlarının lösemi hücre soyuna Sorafenib uyguladığı çalışmasında hücre sayısında azalma tespit etmişlerdir (165). Başka bir çalışmada farklı hücre soyuna Sorafenib uygulandığında yine hücre sayısında azalma tespit edilmiştir (166).

Lityumun HL-60 hücrelerinde karsinogenezi engelleyen etkisi literatürde tek olan Rice ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyumlu bulunmuştur (164).

İlaçların akım sitometri yöntemiyle programlı hücre ölümü (apoptozis) üzerine etkileri değerlendirildiğinde; ilaç verilmeyen kontrol grubunda 24. saatte apoptotik hücre oranı % 4, 48. saatte apoptotik hücre oranı % 7, 72. saatte apoptotik hücre oranı % 9 olarak bulundu (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

Sorafenib (100 µM) programlı hücre ölümüne giden hücre oranını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

LiCl (100 µM) programlı hücre ölümüne giden hücre oranını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

Sorafenib ile LiCl kombinasyonu programlı hücre ölümüne giden hücre oranını kontrole göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

Bu birliktelik programlı hücre ölümüne giden hücre oranını sadece LiCl'e göre 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.01$), fakat 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmamıştır ($p_{24} > 0.05$) (Tablo 4.2, Grafik 4.2). İkili ilaç programlı hücre ölümüne giden hücre oranını sadece Sorafenib'e göre 24., 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.001$, $p_{48} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

Apoptoz sonuçlarında da benzer şekilde iki ilacın tek tek uygulamasında kontrole göre 24., 48. ve 72. saatte apoptoz oranlarında yüksek derecede artış saptandı. Bu durumun ilaçların beraber verilmesi durumunda daha da arttığı gözlemlendi. Apoptoz oranlarındaki farklılık histogramlarda açık şekilde ortaya konuldu (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).

Hücre sayıları ile apoptoz oranları karşılaştırıldığında ise ilaçların apoptozu arttırmak üzerine olan etkilerinin toplam hücre sayısını azaltma üzerine olan etkilerinden daha kuvvetli olduğu görüldü (Tablo 4.2, Grafik 4.2- Tablo 4.1, Grafik 4.1). İki ilaç ayrı ayrı değerlendirildiğinde genel ortalama da LiCl'ün tümör hücre sayısını azaltma ve apoptozu artırma etkisinin daha fazla olduğu görüldü (Tablo 4.2, Grafik 4.2- Tablo 4.1, Grafik 4.1).

Literatürdeki çalışmalarda lösemik hücre soyları (165,167) ve farklı hücre soylarında (168,169,170) Sorafenib'in uyardığı apoptozun kanıtı olarak, akım sitometri yöntemi ile Anneksin V pozitif hücrelerin (apoptotik hücreler) gösterilmesi bakımından çalışmamız uyum göstermiştir. LiCl'ün farklı hücre soyunda (171) uyardığı apoptozun kanıtı olarak, akım sitometri yöntemi ile Anneksin V pozitif hücrelerin (apoptotik hücreler) gösterilmesi bakımından da çalışmamız uyum göstermiştir.

Apoptoz, nekroz, otofaji ve mitotik katastrof olmak üzere hücrede dört çeşit ölüm mekanizması bulunmaktadır. Kaspaz-3 seviyesinin artışı ile apoptozun diğer hücre ölümlerinden ayrıldığı gösterilmiştir (172,173,174). Kaspaz-3'ün aktif hale gelmesi ile apoptoz oluşumu arasında doğru orantı olduğu saptanmıştır (172). Bu nedenle çalışmamızda *ilaçların kaspaz-3 aktivitesine etkilerini* ELİSA yöntemi ile araştırdık.

Sorafenib (100 µM)'in kaspaz-3 seviyelerini kontrole göre 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görüldü ($p_{24} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.3, Grafik 4.3).

LiCl (100 µM)'ün kaspaz-3 seviyelerini kontrole göre 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görüldü ($p_{24} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.3, Grafik 4.3).

Sorafenib ile LiCl kombinasyonunun kaspaz-3 seviyelerini kontrole göre 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görüldü ($p_{24} < 0.01$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.3, Grafik 4.3).

Bu sonuçlara göre ikili ilaç kullanımı kaspaz-3 seviyesini tek başına Sorafenib'e göre 24. ve 72 saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.001$, $p_{72} < 0.001$) (Tablo 4.3, Grafik 4.3).

İkili ilaç kullanımının kaspaz-3 seviyesine etkisi tek başına LiCl'e göre kıyaslandığında 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı saptandı ($p_{24} < 0.01$, $p_{72} < 0.01$) (Tablo 4.3, Grafik 4.3).

İlaçlar tek başına kıyaslandığında LiCl, kaspaz-3 aktivitesini Sorafenib'e göre daha fazla arttırmıştır (Tablo 4.3, Grafik 4.3). Bu sonuç LiCl'un apoptozu Sorafenib'e göre daha fazla artırması sonucu ile uyumlu bulunmuştur. Açıkça görülmektedirki her iki ilaç kaspaz-3 aktivasyonu ile hücreyi apoptoza götürmektedir.

Ki ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınlanan bir çalışmada, HL-60 hücrelerine kaspaz-3 inhibitörü eklendiğinde ilaca bağlı apoptozun engellendiği gösterilerek kaspaza bağlı yol üzerinden apoptozun gerçekleştiği teyit edilmiştir (175). Sorafenib uygulanan lösemik hücre soyları ile yapılan çalışmalarda kaspaz-3 aktivasyonunda gözlenen artış ile bizim çalışmamız uyum sağlamıştır (165,167). Ayrıca farklı hücre soylarına Sorafenib uygulandığında apoptozise bağlı kaspaz-3 aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (168,169,170). LiCl'ün farklı hücre soyuna uygulandığı bir çalışmada yine kaspaz-3 aktivasyon artışı ile apoptotik cevap kanıtlanmıştır (171).

Geçirimli elektron mikroskopi sonuçlarını değerlendirecek olursak; kontrol grubunda görülen hücre zarı ve çekirdek yapılarının korunmasına rağmen ilaç verilen gruplarda hücre bütünlüğünün bozulduğu saptandı. Bu durum Sorafenib'e oranla LiCl grubunda daha belirgin şekilde görüldü. Akım sitometri yöntemiyle tespit edilen apoptoz oranındaki artış, bu sayede mikroskobik olarak da teyit edildi.

LiCl grubunda hücre zarının hasar gördüğü bütünlüğünü koruyamadığı, bazı hücrelerin sitoplazmasının apoptotik morfoloji yansıttığı ve hücrelerin çoğunda ileri litik sitoplazmik değişiklikler olduğunun gözlenmesi apoptoz histogramlarıyla paralel sonuçlar elde edildiğinin göstergesidir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).

Sorafenib grubunda hücre zarının hasar gördüğü bütünlüğünü koruyamadığı, çekirdek materyalinin loblara ayrıldığı ve sitoplazmada ileri litik değişikliklerin olduğu gözlemlendi. Kombinasyon grubunda hücrelerde ileri derecede litik sitoplazmik hasar ve çekirdek membran hasarı gözlemlendi. Yine bu sonuçlar da Tablo 4.1, Grafik 4.1, Tablo 4.2, Grafik 4.2'de görülen hücre sayımı ve apoptoz sonuçlarını desteklemektedir.

İlaçların fosforile GSK-3β üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

Sorafenib (100 μM)'in kontrol grubuna göre fosforile GSK-3β seviyesini 24. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü ($p_{24} < 0.001$, $p_{72} < 0.01$) (Tablo 4.4, Grafik 4.4).

LiCl (100 μM)'ün kontrol grubuna göre fosforile GSK-3β seviyesini 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı görüldü ($p_{24} < 0.05$) 72.saatte ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p_{72} > 0.05$) (Tablo 4.4, Grafik 4.4).

Sorafenib ve LiCl birlikteliği kontrol grubuna göre fosforile GSK-3β seviyesini 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü ($p_{24} < 0.001$) 72.saatte ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p_{72} > 0.05$) (Tablo 4.4, Grafik 4.4).

İkili ilaç kullanımı fosforile GSK-3β seviyesini tek başına Sorafenib'e göre 24. ve 72 saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p_{24} < 0.05$, $p_{72} < 0.01$) (Tablo 4.4, Grafik 4.4).

İkili ilaç kullanımının fosforile GSK-3β seviyesine etkisi tek başına LiCl'e göre kıyaslandığında 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı saptandı ($p_{24} < 0.001$). 72 saatte ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p_{72} > 0.05$) (Tablo 4.4, Grafik 4.4).

Literatürde Sorafenib'in fosforile GSK-3β üzerine inhibe edici etkisi daha önce gösterilmiştir (176). Çalışmada, ELISA yöntemiyle bakılan fosforile GSK-3β değerlerinde Sorafenib'in LiCl'e oranla daha belirgin derecede düşüşe sebep olduğu görüldü. Panka ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada GSK-3β inhibitörlerinin kullanılmasının melanom hücre kültürlerinde Sorafenib'in etkisini arttırdığı saptanmıştır (177). Aslında GSK-3β yapı olarak fosforillendiğinde inaktif forma geçmektedir. LiCl verilen grupta kontrole kıyasla fosforile GSK-3β seviyesinin artması, LiCl'ün bu yol üzerinden etki ettiğini bu çalışmada da teyit etmiştir. Ayrıca GSK-3β serbest Mg^{2+} 'un ATP ile şelasyonuna çok hassastır ve ATP konsantrasyonu arttıkça ilerleyici tarzda inhibe olmaktadır. Bu durum in vitro deneylerde bakılan Lityum etkisinin, Mg^{2+} ve ATP seviyelerinin daha fazla olduğu in vivo durumda daha da artacağına göstergesidir (104).

İlaçların sinyal iletim yolu proteinlerinden AKT üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

Sorafenib'in kontrole göre p-AKT ($p < 0.01$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu belirlendi (Tablo 4.5.1, Grafik 4.5.1).

LiCl'ün kontrole göre p-AKT ($p < 0.05$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu belirlendi (Tablo 4.5.1, Grafik 4.5.1).

Sorafenib ve LiCl kombinasyonunun kontrole göre p-AKT ($p < 0.05$), t-AKT ($p < 0.01$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu belirlendi (Tablo 4.5.1, Grafik 4.5.1).

İkili ilaç kullanımının LiCl'e göre p-AKT ($p < 0.01$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu belirlendi (Tablo 4.5.1, Grafik 4.5.1).

İkili ilaç kullanımının Sorafenib'e göre p-AKT ve t-AKT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi (Tablo 4.5.1, Grafik 4.5.1).

Hücre sağkalımından sorumlu olan AKT'nin Sorafenib ile uyarılan apoptoz sürecinde değerlendirildiği çalışmalarda aktif formu olan fosforile AKT (p-AKT) nin azaldığı saptanmıştır (165,166).

Justin ve arkadaşları 2010 yılında yayınlanan çalışmasında Sorafenib'in potansiyel inhibitör aktivitesi GSK-3 β 'nin inaktivasyonu üzerinden incelenmiştir. Sorafenib'in p-AKT'yi kısmen azalttığı, bu azalan p-AKT'nin ise GSK-3 β inaktivasyonunu artırdığı tespit edilmiştir. AKT inhibitörü ilave edildiğinde p- GSK-3 β 'nin azaldığı saptanarak GSK-3 β 'nin PI3K/AKT yolunun bir kinazı olduğu teyit edilmiştir (178). Bizim çalışmamızın bu ilişkiyi gösterecek parametrelerin eklenerek denenmesinde fayda vardır. Hu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada AML hücre soyunda Sorafenib'in uyardığı apoptoz ile p-AKT düzeyinde değişiklik saptanmamıştır (179). Lin ve arkadaşları LiCl ve diğer GSK-3 β farmakolojik inhibitörlerini kullanarak GSK-3 β 'yi inhibe etmişler, bunun sonucunda p-AKT düzeyinde artış ve apoptozda azalma saptamışlardır (180). Samanta ve arkadaşlarının çalışmasında ise önce inhibitör bir ajanla AKT fosforilasyonu ve NF κ B aktivasyonu inhibe edilmiş, bunların etkisiyle GSK-3 β aktivasyonu ve p-GSK-3 β düzeyinde azalma tespit edilmiştir (181).

İlaçların sinyal iletim yolu proteinlerinden p38 üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

Sorafenib'in kontrole göre p-p38 ($p < 0.001$), t-p38 ($p < 0.001$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.2, Grafik 4.5.2).

LiCl'ün kontrole göre p-p38 seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmediği, t-p38 ($p < 0.01$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.2, Grafik 4.5.2).

Sorafenib ve LiCl kombinasyonunun kontrole göre p-p38 ($p < 0.01$), t-p38 ($p < 0.05$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.2, Grafik 4.5.2).

İkili ilaç kullanımının LiCl'e göre p-p38 ($p < 0.05$) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu, t-p38 seviyelerini ise azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.2, Grafik 4.5.2).

İkili ilaç kullanımının Sorafenib'e göre p-p38 ve t-p38 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.2, Grafik 4.5.2).

Justin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada p38 MAPK aktivasyonu değerlendirilmiş, Sorafenib'in p-38 seviyesini azalttığı saptanmıştır (178).

İlaçların sinyal iletim yolu proteinlerinden ERK üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

Sorafenib'in kontrole göre p-ERK seviyelerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. t-ERK seviyelerini ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmediği saptandı (Tablo 4.5.3, Grafik 4.5.3).

LiCl'ün kontrole göre p-ERK ve t-ERK seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmediği saptandı (Tablo 4.5.3, Grafik 4.5.3).

Sorafenib ve LiCl kombinasyonunun kontrole göre p-ERK seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmediği, t-ERK seviyelerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 4.5.3, Grafik 4.5.3).

İkili ilaç kullanımının LiCl'e göre p-ERK seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmediği, t-ERK seviyelerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 4.5.3, Grafik 4.5.3).

İkili ilaç kullanımının Sorafenib'e göre p-ERK seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmediği, t-ERK seviyelerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 4.5.3, Grafik 4.5.3).

Sorafenib ile uyarılan apoptoz sürecinde ERK düzeyinin değerlendirildiği çalışmalarda aktif formu olan fosforile ERK (p-ERK) in azaldığı saptanmıştır (165,166,168). Justin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Sorafenib'in ERK aktivitesi üzerine anlamlı etkisi saptanmamıştır (178).

NF- κ B, inhibitör kappa B (I κ B) ile sitoplazmada inaktif olarak bulunur; I κ B α p65 subünitine yüksek affinite ile bağlıdır. Hücrenin fizyolojik ve patolojik stresi (mikrobiyal, oksidatif, viral enfeksiyon ve proinflamatuvar sitokinler) ile bir dizi sinyalin neticesinde I κ B kinazın (IKK) aktivasyonu ile sonuçlanır. IKK iki katalitik subünitten oluşmuş bir komplekstir. IKK α , IKK β ve düzenleyici subünit IKK γ (182). Aktive olan IKK, I κ B proteinini fosforiller. Fosforilasyona bağlı ubikütinasyondan sonra I κ B α proteolizise uğrar. Böylece serbest kalan NF- κ B çekirdeğe doğru yer değiştirir ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır. NF- κ B kontrolündeki genler tümör progresyonu ve metastazı ile ilişkilidir (183).

İlaçların sinyal iletim yolu proteinlerinden I κ B α üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

Sorafenib'in, LiCl'ün ve iki ilacın birlikte kombinasyonunun p-I κ B α seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği görüldü (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

Sorafenib'in kontrole göre t-I κ B α (p<0.001) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu görüldü (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

LiCl'ün kontrole göre t-I κ B α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

Sorafenib ve LiCl kombinasyonunun kontrole göre, t-I κ B α (p<0.05) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu görüldü (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

İkili ilaç kullanımının LiCl'e göre t-I κ B α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

İkili ilaç kullanımının Sorafenib'e göre t-I κ B α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü (Tablo 4.5.4, Grafik 4.5.4).

Wu ve arkadaşları 2009 yılında yayınlanan çalışmalarında kanser hücrelerinin NF- κ B yolununun bileşenleri olan NF- κ Bp65 ve IKK β 'da artış, I κ B α 'da ise azalma tespit edilmiştir. Böylece kanser hücrelerinde NF- κ B'nin aktive olduğunu, NF- κ B inhibisyonunun Sorafenib'in hücre ölümüne olan etkisini artırdığını gösterilmiştir. Bu

çalışma Sorafenib, apoptoz ve IκBα arasındaki ilişkiyi göstermesi bakımından literatürdeki tek çalışmadır (170). Sorafenib ile NF-κB arasındaki ilişkiyi gösteren başka bir çalışmada Sorafenib'in bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB üzerine inhibitör etkileri tespit edilmiştir (184).

LiCl, apoptoz ve IκBα arasındaki ilişkiyi gösteren 2002 yılında yayınlanmış literatürde tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaya göre GSK-3β NF-κB'nin p65 subunitini COOH terminalinden fosforilleyerek transaktivasyonunda rol oynadığı, NF-κB'nin hücreleri apoptoza karşı koruduğu, LiCl ile GSK-3β farmakolojik olarak inhibe edildiğinde (IκBα yıkımında artış) IκBα düzeyinde azalma olduğu ancak kontrole göre anlamlı olmadığı saptandı. GSK-3β'nin etkisinin NF-κB'den bağımsız olduğu düşünülmüştür (185).

Min ve arkadaşlarının 2009'da yayınlanan bir çalışmasında LiCl ile GSK-3β inhibisyonunun NF-κB aktivasyonunu azalttığı, bunun da kaspaz 8 aracılıklı apoptozu hızlandırdığı saptanmıştır (186). Yapılan başka bir çalışmada ise GSK-3β'nin fiziksel olarak MEKK1 ile etkileşimde olup aktive ettiği, bunun sonucunda JNK, MAPK ve NF-κB yollarının uyarılmasına yol açtığı tespit edilmiştir (187).

Kotliarova ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada GSK-3β aktivitesinin inhibisyonunun hücre içindeki NF-κB aktivitesini azalttığı saptanmıştır (137).

Samanta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada NF-κB aktivasyon inhibisyonunun GSK-3β aktivasyonuna neden olduğu ve p- GSK-3β düzeyinin azaldığı bulunmuştur (181).

Bilim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada GSK-3β'nin farmakolojik inhibisyonu ile NF-κB'nin hedef genleri olan Bcl-2 ve XIAP (anti-apoptotik genler) ekspresyonunun azaldığını, ardından apoptozisin arttığını tespit etmişlerdir (188).

İlaçların sinyal iletim yolu proteinlerinden c-jun üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

Sorafenib'in kontrole göre p-c-jun (p< 0.01) ve t-c-jun (p<0.05) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.5, Grafik 4.5.5).

LiCl'ün kontrole göre p-c-jun (p< 0.01) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu, t-c-jun seviyelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı (Tablo 4.5.5, Grafik 4.5.5).

Sorafenib ve LiCl kombinasyonunun kontrole göre p-c-jun seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı, t-c-jun ($p < 0.01$) seviyelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaya neden olduğu saptandı (Tablo 4.5.5, Grafik 4.5.5).

İkili ilaç kullanımının LiCl'e göre p-c-jun düzeylerini arttırdığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve t-c-jun düzeylerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 4.5.5, Grafik 4.5.5).

İkili ilaç kullanımının Sorafenib'e göre p-c-jun düzeylerini arttırdığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve t-c-jun düzeylerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Tablo 4.5.5, Grafik 4.5.5).

İlaçların sinyal iletim yolu proteinlerinden STAT3 üzerine etkilerini değerlendirecek olursak;

fosforile-STAT3 ve total-STAT3 saptanabilir düzeylerin altında bulunduğu için değerlendirme yapılamadı. Ancak yapılan çalışmalar Sorafenib'in p-STAT3 seviyesini azalttığını göstermektedir (166,189).

Bu çalışmada incelenen tüm sinyal iletim yolu parametreleri içinde p-p38 ve p-Akt seviyelerindeki azalmanın daha fazla olması bu yolağın Sorafenib ve LiCl için önemini göstermektedir. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu üzerinden etki ettiği bilinen Sorafenib'in p-ERK düzeyini azaltma etkisi mevcut literatürlerde belirtilmiş olup (165,166,168) bizim çalışmamız uyum göstermemiştir. Bulgularımız iki ilacın birlikte uygulanması durumunda apoptozisin anlamlı ölçüde arttığını göstermektedir. Buradan ilaçların sinerjistik etki oluşturduğunu söyleyebiliriz.

PKC ve GSK-3 β 'yı inhibe ederek etki gösteren LiCl ile Ras/Raf/MEK/ERK kaskadını inhibe eden Sorafenib'in etkileri birbiri içine geçmiş mekanizmaları ilgilendirmektedir. Birbiri içine geçmiş mekanizmaları aydınlatma açısından bu proteinlerin inhibitörlerinin eklenerek çalışmanın tekrarlanmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Sorafenib ve LiCl standart APL tedavisinin tamamlayıcı tedavi seçenekleri olarak düşünülebilir. Li⁺'un APL hücreleri üzerinde yaptığı diferensiyasyon etkisi, ATRA gibi rutin olarak kullanılan kemoterapötik ilaçların etkisini artırarak daha etkili sonuçlar alınmasına sebep olduğu mevcut literatürde belirtilmiştir (164). Ayrıca APL tanısı alan hastada oluşabilecek psikiyatrik bozukluklara da eş zamanlı etki etmesi Li⁺'un bu hastalarda kullanımını daha da destekleyecektir.

Bu çalışmanın sonucunda, HL-60 insan APL hücre kültüründe Sorafenib ve Li⁺un istatistiksel olarak anlamlı düzeyde tümör hücre sayılarını azalttığı ve apoptoz oranını arttırdığı saptanmıştır. Bu iki ilacın rutin APL tedavisine girmesi için elbette ki daha fazla araştırmaya gereksinim vardır.

6. ÖZET

İn Vitro Ortamda Üretilen HL-60 Hücre Soyu Üzerine Sorafenib ve Lityum Klorürün Biyokimyasal Etkilerinin İncelenmesi

Akut lösemiler olgun hücrelerin azalması ve lökosit prekürsörlerinin (lösemik blastlar) birikimi ile karakterizedir. Bu çalışmada HL-60 insan Akut Promyelositik Lösemi (APL) hücre kültüründe Sorafenib ve Lityum Klorür (LiCl)'ün etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Deneylede Sorafenib ve LiCl ilaçları tek tek ve birlikte, insan kökenli HL-60 APL hücrelerinden oluşan kültürde 72 saat boyunca denenmiştir. Tümör hücre sayıları sayım kamarasıyla, apoptoz oranları akım sitometri yöntemiyle değerlendirilmiştir. Hücre kültüründe hücrelerde meydana gelen değişiklikler geçirimli elektron mikroskobu ile araştırılmıştır. İlaçların etkileri hangi yoldan oluşturduklarını saptamak için ELISA yöntemi ile kaspaz-3 aktivitesi, fosforile GSK-3 β , fosforile AKT, total AKT, fosforile p38, total p38, fosforile ERK, total ERK, fosforile I κ B α , total I κ B α , fosforile c-jun, total c-jun, fosforile STAT3 ve total STAT3 seviyelerine bakıldı. Sorafenib ve LiCl'ün tek tek ve birlikte verilmesi durumunda HL-60 insan hücre kültüründe kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede hücre sayısını azalttığı ve apoptoz oranını artırdığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: HL-60, Sorafenib, Lityum Klorür, Apoptozis, Lösemi

7. SUMMARY

HL-60 Cell Line Generated In Vitro Environment on Analysis of the Biochemical Effects of Sorafenib and Lithium Chloride

Acute leukemia is characterized with decreasing mature cells and aggregation of leucocyte precursors. In this study we aimed to investigate the effects of Sorafenib and Lithium Chloride (LiCl) on HL-60 human Acute Promyelocytic Leukemia (APL) cell line. The HL-60 APL cell cultures are subjected to Sorafenib and LiCl separately and in combination for 72 hours during experiments. Tumor cells are counted under Cell Count Hemocytometer and the apoptotic ratios are investigated with flow cytometry method. The changes in the cells in cell cultures are evaluated by transmission electron microscopy. To determine the possible mechanism of action of the drugs, the caspase 3 activities, phosphorylated GSK-3 β , phosphorylated AKT, total AKT, phosphorylated p38, total p38, phosphorylated ERK, total ERK, phosphorylated I κ B α , total I κ B α , phosphorylated c-jun, total c-jun, phosphorylated STAT3 ve total STAT3 levels are investigated with ELISA method. Separately and in combination Sorafenib and LiCl decreased the number of cells and increased the apoptotic ratio in HL-60 APL cell line in a statistically significant manner when compared with the control group.

Key Words: HL-60, Sorafenib, Lithium Chloride, Apoptosis, Leukemia

8. KAYNAKLAR

1. Robbins. Patoloji. Çevirmen: Prof. Dr. Uğur Çevikbaş, 7. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi. 2003.
2. Rini Bl. Sorafenib Expert Opin Pharmacother 2006; 7: 453-461
3. Alexopoulos GS, Streim J, Carpenter D, Docherty JP. Expert Consensus Panel for Using Antipsychotic Drugs in Older Patients. J Clin Psychiatry. 2004; 65: 100-104.
4. Rao AS, Kremenevskaja N, Resch J, Brabant G. Lithium stimulates proliferation in cultured thyrocytes by activating Wnt/beta-catenin signalling. Eur J Endocrinol 2005; 153: 929-38.
5. Bilir, A., Solakoğlu, S. ve Ahışalı, B. Uygulamalı Flow Sitometri-PCR ve Hücre Kültürü Kursu. İstanbul. 2004.
6. Öktem G, Vatansever, S, Ayla S, Uysal A, Aktaş A, Karabulut B. Effect of apoptosis and response of extracellular matrix proteins after chemotherapy application on human breast cancer cell spheroids. Oncology Reports 2006; 15: 335-340.
7. Santini MT, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. Pathobiology 1999; 67(3): 148-157.
8. Lee WC, Testa JR. Techniques for identifying cancer genes, "Basic Science of Cancer" (Ed. G.D. Kruh ve K.D. Tew). Current Medicine.Inc. Philadelphia. 2000: 1.
9. Harnden DG, McGee JO'D. Neoplasia "Oxford Textbook of Pathology" Volume 1 (Ed. J.O'D. McGee PG Isaacson ve NA Wright). Oxford University Press, Oxford-New York-Tokyo. 1992; 1: 571-577.
10. Ekmekçi A, Erbaş D, Kanser ve Onkogenler "Kanserin Moleküler Mekanizması Onkogenler ve Büyüme Faktörleri". 72 Teksir Dizgi Fotokopi Ofset Tesisleri, Ankara. 1991: 44-46.
11. Lee HSJ, Wright J, 21/06/2005. Cancer History (online). http://www.rare_cancer.org/history-of-cancer.html. (01/09/2005)

12. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH, Acute Leukaemias “Essential Haematology” (A.V. Hoffbrand, J.E. Pettit ve P.A.H. Moss). Blackwell ScienceLtd, Massachusetts-Oxford-Carlton. 2001: 162-179.
13. Mehta A, Hoffbrand V. Haematological Malignancy: basic mechanisms “Haematology at a Glance” (A. Mehta ve V. Hoffbrand). Blackwell Science Ltd, Oxford. 2000: 54-55.
14. Bennett C, Hsu K, Look AT. Myeloid leukemia, myelodisplasia and myeloproliferative disease in children. “Nathan and Oski’s Haematology of Infancy and Childhood (Ed.: D.G.Nathan, S.H.Orkin, D.Ginsburg, A.T.Look). W.B.Saunders, Philadelphia, USA. 2003:1167.
15. Kuşkonmaz, B, Çetin M. Akut Myeloblastik Lösemi. Katkı Pediatri Dergisi, Lösemiler 2004; 26(3):386-404.
16. Goldman, JM. Myeloproliferative Disorders, Oxford Textbook of Pathology. Vol.2b. 1992: 1717-1723.
17. Ward, AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat patway in normal and perturbed hematopoiesis. Blood 2000; 95(01): 19-26.
18. Bennet JM, Catovsky D., Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Granick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukemias: FAB cooperative group. Br. J. Haematol 1976; 33(4): 451-458.
19. Mecucci C, Rosati R, La Starza R. Genetic Profile of Acute Myeloid Leukemia. Rev Clin Exp Hematol 2002; 6(1): 3-25.
20. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of Myeloid Leukemias. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet 2002; 3: 179-198.
21. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T. Tandem-duplicated FLT3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL3 dependent cell lines. Oncogene 2000; 19: 624-631.
22. Kiyoi H, Naoe T. Flt3 in human hematologic malignancies. Leuk. Lymphoma 2002; 43(8): 1541-1547.
23. Naoe T, Kiyoi H. Normal and oncogenic Flt3. Cell Mol. Life Sci. 2004; 61(23): 2932-2938.

24. Minami Y, Yamamoto K, Kiyoi H, Ueda R, Saito H, Naoe T. Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated Flt3: insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood* 2003; 102(8): 2969-2975.
25. Beghini A, Peterlonga P, Ripamonti CB, Cairoli R, Mecucci C, Morra E, Larizza L. C-kit mutations in core binding factor leukemias. *Blood* 95: 726-727, 2000.
26. Helbling D, Mueller B U, Timchenko NA, Hagemeyer A, Jotterand M., Meyer-Monard S, Lister A, Rowley JD, Huegli B, Fey MF, Pabst T. The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EV11 suppresses CEBP-A in acute myeloid leukemia by activation of calreticulin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2004; 101: 13312-13317.
27. Michaud J, Wu F, Osato M, Cottles G.M, Yanagida M, Asou N, Shigeseda K, Ito Y, Benson KF, Raskind WH, Rossier C, Antonarakis SE, Israels S, McNicol A, Weiss H, Horwitz M, Scott HS. In-vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood* 2002; 99(4): 1364-1372.
28. Ito Y. Oncogenic potential of the RUNX gene family. *Oncogene* 2004; 23(24): 4198-4208.
29. Raumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C. New mechanisms of AML1 gene alterations in hematological malignancies. *Leukemia* 2003; 17(1): 9-16.
30. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
31. Cooper GM. Chapter 14: The Cell Cycle. In: *The Cell. A Molecular Approach*. Washington: ASM Pres 1997: 561-592.
32. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Cell Cycle and Programmed Cell Death. In: *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science, Taylor and Francis Group. 2002: 983-1025
33. Thompson, C.B., (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.

34. Jahn L, Bar H. Cell Cycle regulation and Apoptotic Cell Death. In: Apoptosis in Cardiac Biology 1st ed. Eds: H. Schunkert, GAJ Riegger. U.S.A. Kluwer Academic Publishers. 2000: 101-108.
35. http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f03/f03_lectures/Cell.f03/Cell.html
36. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456.
37. Holtz J, Darmer D. Death receptors and their ligands. In: Apoptosis in Cardiac Biology 1st ed. Eds: H. Schunkert, GAJ Riegger. U.S.A. Kluwer Academic Publishers. 2000: 5-28
38. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Lung infections: Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. 2000: 1771-1777
39. [http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B\(2\).ppt#21](http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B(2).ppt#21)
40. Schlottmann K, Schölmerich J. Bcl-2 family member and mitochondria. In: Apoptosis in Cardiac Biology 1st ed. Eds: H. Schunkert, GAJ Riegger. U.S.A. Kluwer Academic Publishers 2000: 71-90.
41. Salvensen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91. 1997: 443-446.
42. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
43. Krauss G. Biochemistry of signal transduction and regulation. WILEY-VCH Darms. 2001: 456-467.
44. Tinel A, Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated inactivation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 2004; 304: 843-846.
45. <http://4 Apoptozis Ders notlari, www20.uludag.edu.tr/~eulukaya> (2003).
46. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins JA. Novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992; 356: 768-774.

47. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and Mol. Biol. Rev.* 2000; 64: 821–846.
48. Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11(3): 191-201.
49. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000; 6: 529-535.
50. Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC. Endogenous inhibitors of caspases. Review. *J Clin Immunol* 1999; 19: 388-98.
51. Miller LK, (1999). An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. Review. *Trends Cell Biol* 1999; 9: 323-328.
52. Holcik M, Korneluk RG. XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 550-556.
53. Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, Altieri DC. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 635-640.
54. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-584.
55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=603352> (Survivin)
56. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus IAP gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 1996; 15: 2685-2694.
57. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; 379: 349-353.
58. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921.

59. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen G.S, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997; 16: 6914-6925.
60. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen G.S, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388: 300-304.
61. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen G.S, Reed G.S. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*. 1998; 17: 2215-2223.
62. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58: 5315-5320.
63. Altieri DC, Marchisio PC, Marchisio C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* 1999; 79: 1327-1333.
64. Fraser AG, James C, Evan G.I, Hengartner MO. *Caenorhabditis elegans* inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol* 1999; 9: 292-301
65. Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC, Altieri DC. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 461-466.
66. Li F, Flanary PL, Altieri DC, Dohlman HG. Cell division regulation by BIR1, a member of the inhibitor of apoptosis family in yeast. *J Biol Chem* 2000; 275: 6707-6711.
67. Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Antiapoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998; 351: 882-883.
68. Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Altieri DC, Dombret H, (2000). Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 111: 196-203.
69. Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46: 645-650.

70. Carter BZ, Milella M, Altieri DC, Andreeff M. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 2784-2790.
71. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-332.
72. Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Schwartzkroin PA, Morrison RS. Bax involvement in p53-mediated cell death. *J Neurosci* 1998; 18: 1363-1373.
73. Hunot S, Flavell RA. Apoptosis. Death of a monopoly? *Science* 2001; 292: 865-6.
74. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Review. *Science* 1998; 281: 1309-12.
75. Gruss HJ, Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. Review. *Blood* 1995; 85: 3378-404.
76. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanism. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 331-367.
77. [http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B\(2\).ppt#15](http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B(2).ppt#15)
78. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-32.
79. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-446.
80. Kamps PM. Differentiation and Cancer: Basic Research, *Encyclopedia of Cancer* (Ed Joseph R. Bertino), Elsevier Science USA. 2002: 49-63.
81. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Differentiated cells and the maintenance of tissues, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc. New York ve London. 1994: 139-1194.

82. Martin GS. Normal Cells and Cancer Cells, Scientific American Molecular Oncology (Ed. Bishop, J.M. ve Weinberg, R.A.), Scientific American Inc. New York. 1996: 13-40.
83. Prasad K, Hovland AR, Nahreini P, Cole WC, Hovland P, Kumar B, Prasad KC. Differentiation Genes: Are they primary targets for human carcinogenesis? *Exp. Biol. Med* 2001; 226(9): 805-813.
84. Smithgall TE. Signal Transduction Patways regulating hematopoietic differentiation. *Pharmacological Reviews* 1998; 50(1): 1-19.
85. Ward AC, Loeb DM, Soede-Bobok AA, Touw IP, Friedman AD. Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. *Leukemia* 2000; 14: 973-990.
86. Crans HN, Sakamoto KM. Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 313-331.
87. Giles RH, Peters DJ, Breuning MH. Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genetics* 1998; 14(5): 178-183.
88. Benjamin Lewin. Signal Transduction, Genes VIII'de, Pearson Education Inc. N.J. 2004: 811-842.
89. MAP Kinase modules in signaling, *Encyclopedia of Cancer* (Joseph R. Bertino) Elsevier Science USA. 2002: 119-129.
90. Nguyen MH, Ho JM, Beattie BK, Barber DL. TEL/JAK2 mediates constitutive activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B signaling pathway. *J. Biol. Chem* 2001; 276(35): 32704-32713.
91. Ward A, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 2000; 95(1): 19-26.
92. Aktaş E. Lökosit yüzey molekülleri, *Flow Sitometre. İst Üniv. DETAE.* 2004: 31-42.
93. Alice Longabardi Givan. *Diseases and Diagnosis: The Clinical Lab. Flow Cytometry.* Wiley-Liss, Inc., N.Y. 1992: 135-149.
94. Kipps TJ. *Flow Cytometry, Williams Hematology* (Ed. Beutler E, Lichtman MA, Collier BS). McGraw-Hill Inc USA. 1995: 56-63.

95. Alice Longabardi Givan. Flow Cytometry First Principles. Wiley-Liss Inc. N.Y., 1992: 1-41.
96. Stewart CC, Goolsby C, Shackney SE. Emerging technology and developments in flow cytometry. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 2002; 16(2): 477-495.
97. Stewart CC, Stewart SJ. Multiparameter data acquisition and analysis of leukocytes by flow cytometry. *Methods Cell Biol* 2001; 64: 289-312.
98. Pruitt SC, Mielnicki LM, Stewart C. Analysis of fluorescent protein expressing cells by flow cytometry. *Methods Mol. Biol* 2004; 263: 239-258.
99. Uçar F. Hücre Kültüründe Temel İlkeler, Hematolojide Uygulamalı Hücre Kültür Teknikleri (editör Ovalı E.) 2003: 7-16.
100. Fleck RA. Use of HL 60 cell line to measure opsoniv capacity of pneumococcal antibodies. *Clin. Diag. Lab. Immuno* 2005; 12(1): 19-27.
101. Mitchell Pb. On the 50th anniversary of John Cade's discovery of the anti-manic effect of lithium. *Aust. N. Z. J. Psichiary* 1999; 33: 623-628.
102. Quiroz JA, Gould TD, Manji HK. Molecular effects of lithium. *Mol Interv* 2004; 4(5): 259-272.
103. Gould TD, Quiroz JA, Singh J, Zarate CA, Manji HK. Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. *Mol Psychiatry* 2004; 9(8): 734-55.
104. Ryves WJ, Harwood A. Lithium inhibits GSK-3 β by competition for Magnesium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 280: 720- 725.
105. Chen RW, Chuang DM. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem* 1999; 274(10): 6039-42.
106. Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, Rausch OL, Murphy GJ, Carter P5, Roxbee Cox L, Mills D, Brown MJ, Haigh D, Ward RW, Smith DG, Murray KJ, Reith AD, Holder JC. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* 2000; 7(10): 793-803.

107. Takashima A, Noguchi K, Michel G, Mereken M, Hoshi M, Ishiguro K, Imahori K. Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett* 1996; 12 203(1): 33-6.
108. De Ferrari GV, Chacon MA, Barria MI, Garrido JL, Godoy JA, Olivares G, Reyes AF, Alvarez A, Bronfman M, Inestrosa NC. Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by beta-amyloid fibrils. *Mol Psychiatry* 2003; 8(2): 195-208.
109. Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signalling mechanisms, *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793(6): 933-40.
110. Berridge MJ. Neuronal calcium signaling, *Neuron* Jul 1998; 21(1): 13-26.
111. da Rocha AB, Mans DR, Regner A, Schwartzmann G. Targeting protein kinase C: New therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas? *Oncologist* 2002; 7(1): 17-33.
112. Baltuch GH, Yong VW. Signal transduction for proliferation of glioma cells in vitro occurs predominantly through a protein kinase C-mediated pathway. *Brain Res* 1996; 710: 143-149.
113. Plataniotis LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 2003; 101: 4667-4679.
114. Kolch W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions, *Biochem J* 2000; 351: 289-305.
115. Doğan L, Güç D. Sinyal İletim Mekanizmaları ve Kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 34-42.
116. Lee JT, McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia, *Leukemia* 2002; 16: 486-507.
117. Karp JE, Lancet JE, Kaukmann SH, End DW, Wright JJ, Bol K, Horak I, Tidwell ML, Liesveld J, Kottke TJ, Ange D, Buddharaju L, Gojo I, Highsmith WE, Belly RT, Hohi RJ, Rybak ME, Thibault A, Rosenblatt J. Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: A phase I clinical-laboratory correlative trial. *Blood* 2001; 97: 3361-3369.

118. Blalock WL, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Moye PW, Lee JT, Franklin RA, Mirza A, McMahon M, White MK, McCubrey JA. Requirement for the PI3K/Akt pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: Identification of an Achilles heel in leukemia. *Leukemia* 2003; 17: 1058-67.
119. Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 1989; 3,59(3): 411-9.
120. Jope RS, Bijur GN. Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3beta and cell survival. *Mol Psychiatry* 2002; 1: 35-45.
121. Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 16: 8455-8459.
122. Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 1996; 6(12): 1664-1668.
123. Ryder J, Su Y, Liu F, Li B, Zhou Y, Ni B. Divergent roles of GSK3 and CDK5 in APP processing. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312(4): 922-929.
124. Cline GW, Johnson K, Regittinig W, Perret P, Tozzo E, Xiao L, Damico C, Shulman GI. Effects of a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor on insulin-stimulated glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Diabetes* Oct 2002; 51(10): 2903-2910.
125. Gould TD, Manji HK. The Wnt signaling pathway in bipolar disorder. *Neuroscientist* 2002; 8(5): 497-511.
126. Wang Z, Smith KS, Murphy M, Piloto O, Somerville TC, Cleary ML. Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukemia maintenance and targeted therapy. *Nature* 2008; 455: 1205-1209.
127. Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD. Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65(6): 2076-2081.
128. Tan 3, Zhuang L, Leong HS, Iyer NG, Liu ET, Yu Q. Pharmacologic modulation of glycogen synthase kinase-3beta promotes p53-dependent apoptosis through a direct

Bax-mediated mitochondrial pathway in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65(19): 9012-9020.

129. Foltz DR, Santiago MC, Berechid BE, Nye JS. Glycogen synthase kinase3beta modulates notch signaling and stability. *Curr Biol* 2002; 12(12): 1006-1011.

130. Cohen Y, Chetrit A, Cohen Y, Sirota P, Modan B. Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. *Med Oncol* 1998; 15(1): 32-36.

131. Ptashne K, Stockdale FE, Conlon S. Initiation of DNA synthesis in mammary epithelium and mammary tumors by lithium ions. *J Cell Physiol* 1980; 103(1): 41-46.

132. Wang Y, Lam JB, Lam KS, Liu 3, Lam MC, Hoo RL, Wu D, Cooper GJ, Xu A. Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDA-MB-231 cells in nude mice. *Cancer Res* 2006; 66(23): 11462-11470.

133. Nordenberg J, Panet C, Wasserman L, Malik Z, Fuchs A, Stenzel KH, Novogrodsky A. The anti-proliferative effect of lithium chloride on melanoma cells and its reversion by myo-inositol. *Br J Cancer* 1987; 5(1): 41-46.

134. Erdal E, Ozturk N, Cagatay T, Eksioglu-Demiralp E, Ozturk M. Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 2005; 115(6): 903-910.

135. Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J. (1999): Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 1999; 453(3): 260-264.

136. Lai JS, Zhao C, Warsh JJ, Li PP. Cytoprotection by lithium and valproate varies between cell types and cellular stresses. *Eur J Pharmacol* 2006; 539: 18-26.

137. Kotliarova S, Pastorino S, Kovell LC, Kotliarov Y, Song H, Zhang W, Bailey R, Marie D, Zenklusen JC, Lee J, Fine HA. Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. *Cancer Res* 2008; 1568(16): 6643-6651.

138. Drevets WC, Price JL, Simpson JR Jr, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* Apr 1997; 86(6627): 824-827.

139. Tsai G, Coyle JT. N-acetylaspartate in neuropsychiatric disorders. *Prog Neurobiol* 1995; 46(5): 531-540.
140. Moore GJ, Bebhuk JM, Hasanat K, Chen G, Seraji-Bozorgzad N, Wilds IB, Faulk MW, Koch S, Glitz DA, Jolkovsky L, Manji HK. Lithium increases N-acetylaspartate in the human brain: in vivo evidence in support of bcl-2's neurotrophic effects? *Biol Psychiatry* 2000; 48(1): 1-8.
141. Adler JT, Hottinger DG, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Inhibition of Growth in Medullary Thyroid Cancer Cells with Histone Deacetylase Inhibitors and Lithium Chloride. *J Surg Res* 2010; 159(2): 640-644.
142. Kunnimalaiyaan M, Vaccaro AM, Ndiaye MA, Chen H. Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta, a downstream target of the raf-1 pathway, is associated with growth suppression in medullary thyroid cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(3): 1151-1158.
143. Sun A, Shanmugam I, Song J, Terranova PF, Thrasher JB, Li B. Lithium suppresses cell proliferation by interrupting E2F-DNA interaction and subsequently reducing S-phase gene expression in prostate cancer. *Prostate* 2007; 67(9): 976-988.
144. Goto M, Mitra RS, Liu M, Lee J, Henson BS, Carey T, Bradford C, Prince M, Wang CY, Fearon ER, D'Silva NJ. Rapi stabilizes beta-catenin and enhances beta-catenin-dependent transcription and invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2010; 16(1): 65-76.
145. Ravichandran D, Cooper A, Johnson CD. Growth inhibitory effect of lithium gammalinolenate on pancreatic cancer cell lines: the influence of albumin and iron. *Eur J Cancer* 1998; 34(1): 188-192.
146. Deming D, Geiger P, Chen H, Kunnimalaiyaan M, Holen K.(2009): ZM336372 Induces Apoptosis Associated with Phosphorylation of GSK-3beta in Pancreatic Adenocarcinoma Cell Lines. *J Surg Res* 2009; 161(1): 38-32.
147. Dong J, Peng J, Zhang H, Mondesire WH, Jian W, Milis GB, Hung MC, MericBemstam F. Role of glycogen synthase kinase 3beta in rapamycin-mediated cell cycle regulation and chemosensitivity. *Cancer Res* 2005; 65(5): 1961-1972.

148. Tell S, Yi H, Jockovich ME, Murray TG, Hackam AS. The Wnt signaling pathway has tumor suppressor properties in retinoblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349(1): 261-269.
149. Silva AK, Yi H, Hayes SH, Seigel GM, Hackam AS. Lithium chloride regulates the proliferation of stem-like cells in retinoblastoma cell lines: a potential role for the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Vis* 2010; 16: 36-45.
150. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak 5, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor 1, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 7099-7109.
151. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *CancerRes* 2006; 66: 11851-11858.
152. Ratain MJ, Eisen T, Stadler WM, Flaherty KT, Kaye SB, Rosner GL, Gore M, Desai AA, Patnaik A, Xiong HQ, Rowinsky E, Abbruzzese IL, Xia C, Simantov R, Schwartz B, O'Dwyer PJ. Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24 (16): 2505-12.
153. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman 5, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM; TARGET Study Group. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356(2): 125-134.
154. Hackel P0, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opm Cell Biol* 1999; (2): 184-189.
155. Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 82: 241-250.

156. Liovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359(4): 378-390.
157. Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, Cheresch DA. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 2002; 296(5577): 2404-2407.
158. Furuse J. Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma *Biologics* 2008; 2(4): 779-788.
159. Hong DS, Sebt SM, Newman RA, Blaskovich MA, Ye L, Gagel RF, Moulder S, Wheler JJ, Naing A, Tannir NM, Ng CS, Sherman SI, El Naggar AK, Khan R, Trent J, Wright JJ, Kurzrock R. Phase I trial of a combination of the multikinase inhibitor sorafenib and the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2009; 15(22): 7061-7068.
160. Hasskarl J. Sorafenib. *Recent Results Cancer Res* 2010; 184: 61-70.
161. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* 2002; (4): 315-319.
162. Harvey AM. Johns Hopkins-the birthplace of tissue culture: the story of Ross G. Harrison, Warren Y. Lewis, and George O. Gey. *Johns Hopkins Med J Suppl* 1976; 114-123.
163. Bernard S, Cajavec Bernard B, Levi F, Herzel H. Tumor growth rate determines the timing of optimal chronomodulated treatment schedules. *PLoS Comput Biol* 2010; 6(3): e1000712.
164. Rice AM, Li J, Sartorelli AC. Combination of all-*trans* retinoic acid and lithium chloride surmounts a retinoid differentiation block induced by expression of Scl and Rbtl2 transcription factors in myeloid leukemia cells. *Leukemia Research* 2004; 28: 399-403.
165. Schult C, Dahlhaus M, Ruck S, Sawitzky M, Amoroso F, Lange S, Etro D, Glass A, Fuellen G, Boldt S, Wolkenhauer O, Neri LM, Freund M, Junghans C. The

multikinase inhibitor Sorafenib displays significant antiproliferative effects and induces apoptosis via caspase 3, 7 and PARP in B- and T-lymphoblastic cells. *BMC Cancer* 2010; 10: 560.

166. Chai H, Luo AZ, Weerasinghe P, Brown RE. Sorafenib downregulates ERK/Akt and STAT3 survival pathways and induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3(4): 408-415.

167. Yu C, Friday BB, Lai J, Yang L, Sarkaria J, Kay NE, Carter CA, Roberts LR, Kaufmann SH, Adjei A. Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2378-2387.

168. Meier F, Busch S, Lasithiotakis K, Kulms D, Garbe C, Maczey E, Herlyn M, Schittek B. Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment. *British Journal of Dermatology* 2007; 156: 1204-1213.

169. Choudhury SR, Karmakar S, Banik NL, Ray SK. Synergistic efficacy of sorafenib and genistein in growth inhibition by down regulating angiogenic and survival factors and increasing apoptosis through upregulation of p53 and p21 in malignant neuroblastoma cells having N-Myc amplification or non-amplification. *Invest New Drugs* 2010; 28: 812–824.

170. Wu J, Sheng H, Saxena R, Skill NJ, Bhat-Nakshatri P, Yu M, Nakshatri H, Maluccio MA. NF- κ B inhibition in human hepatocellular carcinoma and its potential as adjunct to sorafenib based therapy. *Cancer Letters* 2009; 278: 145-155.

171. Liao X, Zhang L, Thrasher JB, Du J, Li B. Glycogen synthase kinase-3B suppression eliminates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1215-1222.

172. Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta* 2002; 326: 27-45.

173. Bursch W, Karwan A, Mayer M. Cell death and autophagy: cytokines, drugs and nutritional factors. *Toxicology* 2008; 254: 147-157. 174. Shen JK, Du HP, Yang M. Casticin induces leukemic cell death through apoptosis and mitotic catastrophe. *Annals of Hematology* 2009; 88: 743-752.

175. Ki YS, Park EY, Lee H, Oh MS, Cho Y, Kwan YK, Monn JH, Lee K. Donepezil, a Potent Acetylcholinesterase Inhibitor, Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2010; 33(6): 1054—1059
176. Vogl UM, Berger W, Micksche M, Pirker C, Lamrn W, Pichelmeyer O, Zielinski CC, Schmidinger M. Synergistic effect of Sorafenib and Sunitinib with Enzastaurin, a selective protein kinase C inhibitor in renal cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 2009; 277(2): 218-226.
177. Panka DJ, Cho DC, Atkins MB, Mier JW. GSK-3beta inhibition enhances sorafenib-induced apoptosis in melanoma cell lines. *J Biol Chem* 2008; 283(2): 726-732.
178. Edwards JP, Emens LA. The multikinase inhibitor Sorafenib reverses the suppression of IL-12 and enhancement of IL-10 PG E₂ in murine macrophages. *International Immunopharmacology* 2010; 10: 1220-1228.
179. Hu S, Niu H, Minkin P et al. Comparison of antitumor effects of multitargeted tyrosine kinase inhibitors in acute myelogenous leukemia. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1110-1120.
180. Lin C, Wang J, Huang Y, Kuo Y, Surendran K, Wang F. Wnt/ β -Catenin Signaling Modulates Survival of High Glucose–Stressed Mesangial Cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2812–2820.
181. Samanta AK, Lin H, Sun T. Januse Kinase 2: A Critical Target in Chronic Myelogenous Leukemia. *Cancer Res* 2006; 66: 6468-6472.
182. Schomer-Miller B, Higashimoto T, Lee YK, Zandi E. Regulation of IKK complex by IKKgamma-dependent phosphorylation of the T-loop and C terminus of IKKbeta. *J. Biol. Chem* 2006; 281: 15268-15276.
183. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
184. Echeverria V, Burgess S, Gamble-George J, Zeitlin R, Lin X, Cao C, Arendash GW. Sorafenib inhibits nuclear factor kappa B, decreases inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression, and restores working memory in APP^{swe} mice, *Neuroscience* 2009; 162(4): 1220-1231.
185. Schwabe RF, Brenner DA. Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF- α -induced

NF- κ B activation and apoptosis in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: 204-211.

186. Min H, Koh SS, Cho I, Srisuttee R. Inhibition of GSK-3 β enhances reovirus-induced apoptosis in colon cancer cells. *International Journal of Oncology* 2009; 35: 617-624.

187. Kim JW, Lee JE, Kim MJ, Cho EG, Cho SG and Choi EJ. Glycogen synthase kinase 3 beta is a natural activator of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase 1 (MEKK1). *J Biol Chem* 2003; 278: 13995-14001.

188. Bilim V, Ougolkov A, Yuuki K, Kawazoe H, Muto A, Billadeau D, Motoyama T, Tomita Y. Glycogen synthase kinase-3: new therapeutic target in renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 2009; 101: 2005-2014.

189. Zhao W, Zhanga T, Qu B, Wu X, Xu X, Meng F. Sorafenib induces apoptosis in HL60 cells by inhibiting Src kinase-mediated STAT3 phosphorylation. *Anti-Cancer Drugs* 2011; 22: 79-88.