

**MAKROFAJ HÜCRELERİNDE SERAMİDAZ İNHİBİTÖRLERİNİN  
ROLLERİ**

**Osman ALGI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji Bilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Filiz SUSUZ ALANYALI**

**Eskişehir**

**Eskişehir Teknik Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Ocak 2022**

## ÖZET

### MAKROFAJ HÜCRELERİNDE SERAMİDAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ROLLERİ

Osman ALGI

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2022

Danışman: Doç. Dr. Filiz SUSUZ ALANYALI

Kanser ülkemizde de ilk sıralarda yer alan dünya çapında kendisini gösteren ölümcül hastalıklardan birisidir. Bu hastalık bulunduğu bölgeyle kısıtlı kalmayıp çevresindeki dokuları da etkilemekle birlikte hücre döngüsü düzenlenmesindeki kontrol mekanizmalarını da negatif yönde etkilemektedir.

Bu çalışmada RAW 264.7 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda ceranib-2 uygulanarak 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucu MTT yöntemiyle sitotoksikite etkisi tespit edilmiştir. Bu inkübasyon süresi sonunda ceranib-2'nin uygulandığı en düşük konsantrasyondan itibaren mitokondriyal aktivitede dozla ilişkili olarak canlılık yüzdesinde belirgin azalmalar gözlenmiş, IC<sub>50</sub> konsantrasyonu belirlenmiştir. Hücrelerdeki apoptoz durumunu belirlemek için Anneksin V yöntemi ve hücrelerdeki morfolojik değişimleri gözlemek amacıyla konfokal mikroskopi yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemler sonucunda elde edilen veriler gözlemlenmiş, istatistiksel olarak analizi yapılmıştır. Ceranib-2'nin RAW 264.7 hücrelerinde uygulanan doz konsantrasyonuna ve süreye bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Makrofaj hücreleri, Seramidaz inhibitörleri, Kanser, RAW 264.7, Ceranib-2.

## ABSTRACT

### ROLES OF CERAMIDASE INHIBITORS IN MACROPHAGE CELLS

Osman ALGI

Department of Biology

Programme in Molecular Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, January 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Filiz SUSUZ ALANYALI

Cancer is one of the deadly diseases worldwide, which is one of the first in our country. This disease is not limited to the region where it is located, and affects the surrounding tissues, as well as negatively affecting the control mechanisms in cell cycle regulation.

In this study, different concentrations of ceranib-2 were applied to RAW 264.7 cells and the cytotoxicity effect was determined by MTT method after 24 and 48 hours of incubation. At the end of this incubation period, significant decreases were observed in mitochondrial activity, dose-related percentage of viability, starting from the lowest concentration at which ceranib-2 was applied and the IC50 concentration was determined. Annexin V method was used to determine the apoptosis status in cells and confocal microscopy method was used to observe morphological changes in cells. The data obtained as a result of these methods were observed and statistically analyzed. It has been determined that Ceranib-2 has cytotoxic and antiproliferative effects in RAW 264.7 cells depending on the dose concentration and time applied.

**Keywords:** Macrophage cells, Ceramidase inhibitors, Cancer, RAW 264.7, ceranib-2.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışma sürecimde, değerli bilgi birikimini benimle paylaşan, zengin bakış açısıyla beni aydınlatan, çalışmam sürecince bana karşı sabrını ve güler yüzünü esirgemeyen, her konuda yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Filiz SUSUZ ALANYALI'ya,

Tez çalışmamın laboratuvar ve deney aşamalarında her türlü soru ve sorunuma çözümler bulan, akademik bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU'ya ve Sayın Dr. Canan VEJSELOVA SEZER'e,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen Hüseyin İZGÖRDÜ'ye, Tez çalışmam boyunca destekleriyle yanımda olan Sosyolog Selin HİÇYILMAZ'a ve Kimyager Senem ÇAKIR'a,

Hayatım boyunca benden hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen ve her konuda yanımda duran değerli aileme,

Çalışmam boyunca yanımda olan tüm sevdiklerime,

Sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Osman ALGI

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Osman ALGI

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI .....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
DANIŞMAN ONAYI.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
GÖRSELLER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hücre Kültürü Tanımı .....	1
1.2. Adherent ve Süspanse Hücre Kültürü .....	1
1.3. Hücrelerin Morfolojik Özellikleri .....	2
1.4. Aseptik Teknikler ve Çalışma Ortamı .....	2
1.5. Hücre Kültür Çalışmalarında Besiyeri ve Fizyolojik Faktörler .....	3
1.6. Temel Teknikler .....	3
1.6.1. Hücre Çözme .....	4
1.6.2. Besiyeri Değişirme (Beslenme) .....	4
1.6.3. Pasajlama.....	5
1.6.4. Hücre Dondurma .....	5
1.7. Kanserin Tanımı .....	6
1.7.1. Kansere Sebep Olan Faktörler .....	7
1.7.1.1. Çevresel Faktörler.....	7
1.7.1.2. Genetik Faktörler.....	8

1.7.2.	Kanser Oluşumunun Moleküler Mekanizması.....	9
1.7.2.1.	<i>Protoonkogenler</i> .....	11
1.7.2.2.	<i>Tümör Süpresör Genler</i> .....	12
1.8.	Seramidler .....	14
1.8.1.	Sfingolipid metabolizması .....	15
1.8.2.	Seramidler ve kanserle ilişkisi .....	16
1.8.3.	Seramidaz inhibitörleri .....	16
1.9.	İmmün Sistem Tanımı .....	17
1.9.1.	Doğuştan Gelen Bağışıklık Sistemi: Makrofajlar .....	18
1.9.2.	Makrofaj Fagositozu.....	19
1.10.	Kullanılan RAW 264.7 Hücre Hattı .....	20
1.11.	Kanser ve Apoptozis .....	21
1.12.	Konfokal mikroskopi yöntemi .....	22
1.13.	Sitotoksosite Yöntemleri .....	23
1.13.1.	MTT Testi.....	24
2.	MATERYAL VE METOD .....	25
2.1.	Materyal.....	25
2.1.1.	Kullanılan hücre serileri .....	25
2.1.2.	Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler .....	25
2.2.	Metod .....	25
2.2.1.	Sterilizasyon .....	25
2.2.2.	RAW 264.7 hücrelerinin çoğaltılması .....	25
2.2.3.	Ceranib 2 maddesinin hazırlanması .....	26
2.2.4.	MTT kolorimetrik sitotoksosite testi .....	26
2.2.5.	Konfokal mikroskopi yöntemi .....	26
2.2.5.1.	<i>Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopi yöntemi ile tayini</i> .....	26
2.2.6.	Akış sitometri yöntemi.....	27
2.2.6.1.	<i>Akış sitometrisinde anneksin V analizi</i> .....	27
2.2.7.	İstatiksel analiz.....	27
3.	BULGULAR .....	27
3.1.	MTT Kolorimetrik Sitotoksosite Testi.....	27

3.1.1. Ceranib 2'nin RAW 264.7 hücreleri üzerindeki sitotoksiste bulguları .....	27
3.2. Konfokal Mikroskopi İnceleme Bulguları.....	29
3.2.1. RAW 264.7 kontrol hücreleri morfolojik değişikliklerinin konfokal mikroskobik inceleme bulguları .....	29
3.2.2. Ceranib 2'nin RAW 264.7 hücrelerinde sebep olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskobik inceleme bulguları.....	31
3.3. Anneksin V uygulamasının akış sitometrisindeki bulguları.....	35
3.3.1. RAW 264.7 hücrelerinin Anneksin V uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları.....	35
4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	37
KAYNAKÇA.....	41
ÖZGEÇMİŞ	

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1.</b> Fagositik reseptörler .....	19
---	----



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 1.1.</b> Bağışıklık sistemi ( <a href="http://www.alerjiklinigi.com/immun-sistem">http://www.alerjiklinigi.com/immun-sistem</a> ).....	17
<b>Şekil 1.2.</b> RAW 264.7 hücreleri .....	21
<b>Şekil 3.1.</b> RAW 264.7 hücrelerinin 24 saatlik Ceranib 2 muamelesinden sonra konsantasyona bağlı % canlılık grafiği. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak alınmıştır. IC50 değeri 33µM. (*: p<0,05) olarak hesaplanmıştır .....	28
<b>Şekil 3.2.</b> RAW 264.7 hücrelerinin 48saatlik Ceranib 2 muamelesinden sonra konsantasyona bağlı % canlılık grafiği. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak alınmıştır. IC50 değeri 35µM. (*: p<0,05) olarak hesaplanmıştır. ....	29
<b>Şekil 3.3.</b> RAW 264.7 kontrol hücrelerinin Annexin-V boyama bulguları .....	35
<b>Şekil 3.4.</b> Raw 264.7 hücrelerine Ceranib-2 IC <sub>50</sub> değeri 24 saat uygulanmış Annexin-V boyama bulguları .....	36

## GÖRSELLER DİZİNİ

### Sayfa

- Görsel 3.1.** Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak gerçekleştirilen ikili boyama yapılmış RAW 264.7 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü (40x). ..... 30
- Görsel 3.2.** Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak gerçekleştirilen ikili boyama yapılmış RAW 264.7 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü (40x). ..... 30
- Görsel 3.3.** Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak gerçekleştirilen ikili boyama yapılmış RAW 264.7 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü (40x). ..... 30
- Görsel 3.4.** Ceranib 2 nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x). ..... 31
- Görsel 3.5.** Ceranib 2 nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x). ..... 32
- Görsel 3.6.** Ceranib 2 nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x). ..... 32
- Görsel 3.7.** Ceranib 2 nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x). ..... 33
- Görsel 3.8.** Ceranib 2 nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x). ..... 33
- Görsel 3.9.** Ceranib 2 nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x). ..... 34
- Görsel 3.10.** Ceranib 2 nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x). ..... 34

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
O <sub>2</sub>	: Oksijen
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
FBS	: Fetal Bovin Serum
°C	: Santigrat Derece
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	: Bikarbonat
EtOH	: Etil alkol
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EG	: Etilen glikol
PVA	: Polivinil Alkol
PVP	: Polivinil Pirrolidon
PAH	: Polisklik Aromatik Hidrokarbonlar
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
CDK	: Siklin Bağımlı Kinazlar
AC	: Asit Seramidaz
ASAH	: Nötral Seramidaz
ACER	: Alkalın Seramidaz
LPS	: Lipopolisakkarit
ATCC	: American Type Culture Collection
TNF	: Tumor Necrosis Factor

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Hücre Kültürü Tanımı

Hücre kültürü, prokaryotik, ökaryotik veya bitki hücrelerini kontrollü bir şekilde çoğaltmaya yaramaktadır. İlk örnekleri 1885 yılında çalışılmaya başlanmıştır. 1885 yılından bu yana yeni teknikler geliştirmeye devam edilmiş, araştırmaların ön çalışmalarında veya temel çalışmalarında tercih edilmektedir. Tarihsel gelişimine bakıldığında Roux tarafından 1885 yılındaki ilk çalışma civciv embriyo hücrelerinin in-vitro koşullarda canlı kalmaları üzerinedir. İlerleyen süreçlerde Gey ve arkadaşları, 1952 yılında HeLa adını verdikleri hücre hattını serviks kanser hücrelerinden elde etmişlerdir [1].

Günümüz teknolojileri de kullanılarak hücre hattı olan HeLa ile birlikte birçok kanserli ve sağlıklı dokudan izole edilen hücre hattı bankaları oluşturulmuştur. Deneysel olarak in-vivo çalışmalara alt yapı niteliği taşıyan hücre kültürü hatları bilimsel çalışmalar için avantaj sağlamakta ve birçok hipotez için temel teknik oluşturmaktadır. Hücre kültürü temel hücre biyolojisi ve hücredeki ilaç etkileşimleri, ilaç toksisite testleri bitkisel ajanların ve çeşitli kimsayaların saptanması, kanser üzerine olabilecek etkilerin araştırılması gibi birçok alanda kullanılmaktadır [1].

Laboratuvarlarda cilt hücreleri, kas hücreleri, kanser hücreleri gibi birçok hücre türü in vitro koşullarda yetiştirilebilir. Bu kültür koşullarında üretilen ilk insan hücrelerinden biri 1951 Henrietta Lacks adlı bir kadından elde edilen rahim ağzı kanser dokusundan alınmış HeLa hücreleridir [2].

### 1.2. Adherent ve Süspanse Hücre Kültürü

Hücreler besiyerindeki gelişimlerine göre adherent ve süspanse olarak iki kültür türüne ayrılmaktadır [3].

Adherent hücreler genel olarak solid dokulardan elde edilir ve elde edilen adherent hücreler gelişim ortamlarında adhezyon melekülleri ile yüzeye tutunarak büyüme gösterirler. İstisna olarak kan ve kemik iliğinden elde edilen izole hücreler herhangi bir adezyon unsuruna gerek duymadan gelişim gösterirler. Herhangi bir adezyon melekülüne ihtiyaç duymayıp buldukları besin ortamlarında dağınık halde bulunan bu tip hücrelere süspanse(dağınık) hücreler denir. Bilimsel çalışmalarda kullanılan hücre karakterinin

bilinmesi beslenme, dondurma, pasajlama işlemlerini etkileyeceğinden oldukça önemlidir [4].

### **1.3. Hücrelerin Morfolojik Özellikleri**

“Hücreler 3 farklı şekilde morfolojik özellik gösterir; fibroblastik hücre, epiteliyal hücre ve lenfoblast benzeri hücre” [5].

- Fibroblastik hücreler; uzamış formda iki kutuplu veya çok kutuplu olup yüzeye tutunarak büyürler.

- Epiteliyal hücreler; çeşitli şekillere ve boyutlara sahip olup yüzeye tutunarak gelişirler.

- Lenfoblast hücreler; yuvarlak küre görünümünde dağınık(süspanse) halde büyürler. Laboratuvar şartları altında incelendiğinde üzüm tanelerini andıran bir görüntüye sahiptir. Kullanılan hücrelerin hangi morfolojileri gösterdiğine hâkim olmak laboratuvar şartlarında kontaminasyon türünü ve tehlikesini ön görmek için önemlidir. Eş zamanlı olarak yapılan çalışmalarda aynı inkübatör ile muamele sırasında farklı morfolojileri ihtiva eden hücreler çapraz kontaminasyona maruz kalarak birbirleri ile kontamine olabileceği tehlikeleri olmasına karşın aynı morfolojik özellik gösteren hücreler de çapraz kontaminasyona maruz kalabilir. Mikroskop altında farklı morfolojik özellik gösteren hücrelerin kontaminasyonu ayırt edilebiliyorken aynı morfolojik özellik gösteren hücreler görünüş olarak aynı olduklarından kontaminasyonları ayırt edilemez [6].

### **1.4. Aseptik Teknikler ve Çalışma Ortamı**

Laboratuvar ortamında yapılan hücre kültür çalışmalarında canlı veya bu dokulardan izole edilmiş hücreler ile çalışılması, toksik etki yaratabilecek çözeltilerin, mutajenik bileşimlerin ve bunun gibi teklikeli kimyasalların kullanılmasından dolayı aseptik çalışma ortamı mecburi kılınmaktadır [7]. Bu sebeple çalışırken hücrelerin kontamine olması haricinde kullanımı yapan kimse içinde birçok tehlike (kullanılan kimyasalların kişinin dokularına zarar vermesi, infeksiyöz aerosollerin solunumu, bistüri kesiği, enjektör batması gibi) ihtiva edebilmektedir [8].

Mikroorganizma kontaminasyonu laboratuvar ortamında yapılan hücre kültür çalışmalarında yaşanabilecek önemli sıkıntılardan biridir. Bu kontaminasyon çalışma yüzeyi, maya ve mantar sporları, bakteri, solüsyonlar, mikoplazma ve uygulamayı yapan kişi kaynaklı olabilir. Bu tarz kontaminasyonları en aza indirebilmek hatta tamamen yok edebilmek amaçlı aseptik yöntemler uygulanmalıdır. Aseptik yöntemler uygulanmadığı takdirde kontaminasyon durumu büyüyüp kontrol edilemeyecek hale gelebilir bu da tüm laboratuvarın enfekte olması demektir [8].

### **1.5. Hücre Kültür Çalışmalarında Besiyeri ve Fizyolojik Faktörler**

Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin güvenli ve elverişli bir ortamda gelişmelerini sağlayabilmek için optimum sıcaklık, O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> yoğunluğu ile pH faktörü kontrol altında tutulması gerekmektedir [9,10]. Karbonhidrat, vitamin, mineral ve aminoasit gibi besleyici mikro çevreyi bulduran besiyerleri, laboratuvar koşullarında hücrelerin metabolik faaliyetlerini gerçekleştirip, çoğalma ve gelişim gösterebildikleri ortamlardır. Uygun sıcaklık, uygun pH ve nemin sağlanması hücrelerin laboratuvar ortamında geliştirilebilmesi için oldukça önemlidir [10]. Hücreler her besiyeri için farklı besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden çalışılacak olan hücrenin besin ihtiyaçları belirlenip ona uygun bir besiyeri hazırlanmalıdır. [11].

Hücrelerin besin durumlarına göre besiyerine %10 oranında serum solüsyonu ilave edilmelidir. Serum içerik olarak enzimler, zengin matris proteinleri, gelişme faktörleri ile hücrelerin tutunma ve üremelerini sağlayan hormonlar içermektedir [12]. Yaygın olarak kullanılan serum; fetal sığır serumu (Fetal Bovin Serum, FBS) olmasına karşın yetişkin sığır, at, dana ve insan serumlarında bulunmaktadır [13].

### **1.6. Temel Teknikler**

Laboratuvar ortamında yapılan hücre kültür çalışmalarındaki süreç hücre çözme, beslenme, pasajlama ve hücre dondurma olarak ilerlemektedir [3]. Tüm bu çalışmalar steril bir oda içerisinde yapılmalı ve çalışma öncesi ile çalışma sonrasında laminar kabin kullanılmalıdır. Laminar kabin içine konulan her madde %70 lik etilalkol (EtOH) kullanılarak temizlenmelidir. Çalışma sonrasında UV verilerek laminar kabin ve odanın sterilizasyonu sağlanmalıdır [12].

### **1.6.1. Hücre Çözme**

Satın alınan veya daha önce stoklaması yapılan hücrelerin çalışmaya başlanmasındaki ilk etaptır. Stoklardan alınan hücreler çözme protokolü kullanılarak çözülürken 37 °C'de inkübasyona bırakılıp gelişimi beklenir. Stoklanıp dondurulmalarında -196 °C ile -800 °C dondurucu ve azot tankı benzeri yöntemler kullanılabilir. Saklama koşullarından alınan hücre cryo tüplerine aralıklı olarak alıştırma ısılarında (-800 °C, -400 °C, -200 °C) bekletilir ve çalışılacak hücreye göre serum ile antibiyotik uygun besiyerine eklenir. Optimize edilmiş olan besiyeri 37 °C ısıda olan su banyosunda 10-15 dk bekletilerek ısıtılması sağlanır. Cryo tüpünün kapak kısmı su olan alana değdirilmeden 90-120 saniye kadar içerisine sokularak çözünmesi sağlanır. Çözünmüş olan cryo tüp içerisinde dimetilsülfoksit ve sınırlı sayıda hücre bulunmaktadır. Dimetilsülfoksit (DMSO) bir kriyoprotektan türü olmakla toksik etkiside bulunmaktadır. Bu toksik etkiyi minimum seviyeye indirmek için falkon içerisine hücrenin besiyeri ilave edilir. Besiyeri ilave edilmiş falkon üzerine çözünen cryo tüp içeriği pipetajlanır. Falkonlar yaklaşık 1000-1800 rpm devirde hücre tipine göre 5-7 dakika süre ile santrifüjlenir. Santrifüj işlemi sonucunda oluşan pellet ve süpernatant kısmı ayrılır. Ayrılan kısımdaki hücreler sayılarak uygun boyutlardaki flaslara aktarımı sağlanarak besiyerinde büyümesi sağlanır ve bu seri işlemlerden sonra hücre ekimine geçilir.

### **1.6.2. Besiyeri Değişirme (Beslenme)**

Hücreler, 37 °C ısıda ve CO<sub>2</sub> bulunan inkübatörde istenilen büyüklüğe ve gerekli yoğunluğa ulaşmaya kadar inkübe edilir. İnkübasyon sayesinde hücreler metabolik aktivitelerini sağlayarak pasajlanacak duruma gelirler. Hücrenin pasajlanacak evreye gelmesindeki geçen süre hücre özelliklerine bağlı olarak 24-72 saat aralığında değişmektedir. Geçen süre ile birlikte besiyerinde pH değişimi başlar ve bu değişim inkübasyonda bulunan hücreler için olumsuz etki yaratır. Bu olumsuz etkiyi kontrol altına alabilmek için beslenme ortamı tazelenmelidir. Tazeleme işlemini sağlamak amaçlı besiyeri değiştirilirken erken davranmayıp hücrelerin tutunmuş olmasına dikkat edilmelidir. Aksi takdirde tutunmamış hücreler besiyeri değişimi ile buldukları besiyerinden uzaklaştırılabilirler. Değişim sırasında hücre kontrolünü sağlamak için mikroskop sürekli kullanılmalı ve hücre morfolojileri takip edilmelidir. Gerekli aralıklı yapılan besiyeri değişimleri hücrenin daha sağlıklı gelişimini sağlar ve tutunmamış olan hücrelerin elenip uzaklaştırılmasında katkıda bulunur.

### **1.6.3. Pasajlama**

Hücreler çoğunlukla 24 saat içerisinde hücre tipine bağlı olarak sayılarını iki katına çıkarırlar. Sağlıklı bir bölünme sonucunda hücreler buldukları kabın alanını doluracak şekilde tutunurlar. Elde edilen bu yoğunlukla birlikte daha fazla hücrenin bölünmesi için yer kalmadığından hücreler buldukları flasktan alınarak yeni bir büyüme ortamına alınmalıdır. Tutunan hücrelerin pasajlama işlemi için büyüme ortamının uzaklaştırılması ve hücrelerin solüsyon (Trypsin-EDTA) kullanılarak elemine edilmesi gerekmektedir. Pasajlama işleminde beslenme ortamına tutunan hücrelerin kaldırılması için en uygun protokol seçilerek yüksek canlılığın korunması gerekmektedir. Trypsin-EDTA solüsyonu kullanılarak kaldırılan hücreler serum bulunan besiyeriyle birlikte kabın içinden alınarak santrifüjlenir. Pellet ve süpernatant kısmı ayrılıp, sayılan hücreler istenilen miktarda yeni beslenme ortamlarına aktarılır.

Süspanse hücrelerde yapışma ve tutunma gibi bir özellik olmadığından solüsyon kullanılmaz ve serumlu besiyeriyle direkt santrifüjlenir. Santrifüj sonucunda oluşan pellet ve süpernatant ayrılır, istenilen miktarda hücreler sayılarak yeni beslenme ortamlarına aktarılır.

### **1.6.4. Hücre Dondurma**

Hücreler aynı çalışma içerisinde tekrar kullanılmak, kültür koleksiyonu oluşturmak gibi sebeplerden ötürü hücre içi aktiviteleri yavaşlatıp durdurularak dondurulmaktadır. Hücre içi metabolik aktivite  $-790\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de yavaşlar ve minimum düzeye inmesinde  $-1960\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'yi bulur. Soğutma hızının ve soğutma derecesinin ayarlanması hücrede oluşabilecek hasarı önlemek için önemlidir. Stoklama işleminde hücrelerin sağlıklı ve uzun süreli dayanabilmesi için  $-1960\text{ }^{\circ}\text{C}$  olan azot tankları tercih edilmelidir. Kademeli olarak yapılan stoklama ve dondurma işlemlerinde dezavantaj olarak hücre içi ve dışındaki sıvıların donma esnasında dengesiz kristalleşme durumu olabileceğinden dikkatli olunması gerekmektedir. Bu nedenle dondurma işlemi esnasında kristalleşme hızını yavaşlatıp ozmotik basıncın verebileceği hasardan korunmak için cryopektan olarak adlandırılan bağlayıcı ajanlar kullanılır. Hücrelerin membranlarından rahatlıkla geçebilen cryopektaanlara (permeating) örnek olarak gliserol, propilen glikol, DMSO, 1,2-propanediol, etilen glikol (EG), 2,3-bütanediol vb verilirken polivinil alkol (PVA), glikoz, trehaloz, polivinil pirrolidon (PVP), sükröz vb. polimerlerde hücrelerin membranlarından geçemeyenlere (non-permeating) örnek olarak verilebilir [12].

Gelişen teknoloji ile birlikte hücre kültürüne olan yaklaşımlar da değişmektedir. Günümüzde biyoteknoloji uygulamaları ile in-vivo ve in-vitro olarak hastalık teşhis ve tedavisi ile ilaç ve aşı üretimi de muhtemel yararlar arasındadır. Sağlıklı hücre hatları ile kanserli hücre hatları da çeşitlilik kazanmakla beraber bu hatlara ticari olarak erişmekte mümkündür [14]. Hastalıkların çalışma mekanizması ile patolojileri gibi önemli bulguların klinik ve cerrahi bilgiler ile birleştirilip yeni yaklaşımlar oluşturulabilmesi için hücre kültürü uygulamaları büyük önem taşımaktadır [15].

### **1.7. Kanser Tanımı**

Kanser, Latince “cancer” ya da “carcinoma” kelimelerinden türemiştir. Kanser günümüz hastalıklarından en korkulanları arasında yer alırken, hücrelerin gen kontrol mekanizmalarında ortaya çıkan çeşitli hatalar sonucunda hücre bölünmesi, hücre çoğalması ve hücre birikmesinin kontrol edilememesinden ortaya çıkar. Kanser hücreleri, bulunduğu organı ya da çevresindeki diğer organlara yayılım gösterip vücut hücrelerini ele geçirmesiyle bilinmektedir. Kanser hücrelerinin vücut hücrelerini etkilediği düşünülen yaklaşık 100’den fazla kanser türü bulunmaktadır [16].

Hücrenin bölünmesi, büyümesi ve sayıca artması, genler tarafınca kontrol edilen bir mekanizma sonucunda gerçekleşmektedir ve genler, kromozomlar üzerinde çok sıkı bir şekilde paketlenmiş olduğu için fiziksel veya kimyasal faktörler sonucunda ortaya çıkan işlevsel bozukluklar, direkt olarak hücrenin faaliyetleri olumsuz olarak etkilemektedir. Normal bir şekilde genin işlevsel olarak çalışabilmesi adına tekrar kazandırılması için DNA hasar mekanizmaları devreye girmektedir lakin bu mekanizmalar her daim ilgili gen üzerinden başarılı bir sonuç sağlayamaya bilmekte ve bu genin şifreyi taşıyarak sentezlenmesine olanak sağladığı proteinler eksik ve de hatalı olarak üretilmekte olup, gen kontrol mekanizma hatalarına bağlı bir hastalık olarak değerlendirilir [16].

Her sağlıklı bir hücrenin, canlı kaldığı süre boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır ve sağlıklı hücre bu sayede nerede ve ne kadar sayıya ulaşacağını bilincindedir. Buna karşın kanser hücreleri ise DNA tamir mekanizmasında oluşabilen hatalar sonucunda genlerin ilgili proteinleri hatalı şifrelemesi ya da ilgili proteinlerin gerekli sayıda olmaması ile hücrenin gereksinim duyduğu bölgede ve sayıda olma bilincini kaybetmektedir [16, 17].

Kanser hücrelerinin kendi üzerinde birikmesi ile oluşturduğu ve tümör olarak adlandırılan kitleler, bulunduğu hasarlı hücreleri terk ederek normal doku ya da organlara gidebilmektedir. Bu yüzden de gittikleri doku veya organlarda tahribatlara yol açabilmektedir. Kanser hücrelerinin üst üste birikerek oluşturduğu kitlelerden ayrılarak başka doku ya da organa taşınması kan veya lenf dolaşımı aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu kanserli hücreler, gittiği doku ya da organda da hücre kontrol mekanizmasını olumsuz bir şekilde etkileyip kitlesel büyümelerin gerçekleşmesine neden olabilmektedir [17].

### **1.7.1. Kansere Sebep Olan Faktörler**

Kansere neden olan genetik ve çevresel etkenler sonucunda hasta olan birey, psikolojik ve fiziksel olarak sıkıntılara maruz kaldığından ruhsal bunalım, bir takım bedensel zorluklar ve psikososyal sorunlar ile karşılaşabilmektedir. Kansere sebebiyet veren bu faktörlerin neden olduğu bu olumsuz sonuçlar neticesinde kanser hastaları, kendileri için gerekli olan tedavilere beklenen cevapları veremeyebilir [18].

#### **1.7.1.1. Çevresel Faktörler**

Çevresel faktörler nedeni ile kanserin ortaya çıkma olasılığı, genetik faktörler ile karşılaştırıldığında çok daha fazladır. Bireylerde kanser oluşumunu önleyen DNA tamir mekanizmaları hatalarının, genetik bir şekilde aktarılması ile alkol gibi kansere neden olan çevresel etmenlerin de etkisiyle kişiler, kansere yatkınlık kazanabilir.

Alkol, ilaç, kömür tozu, sigara, hardal gazı, naftalin, yanmış yağ içeren yiyecekler, yağ oranı dengesiz olan içecek ve yiyecekler, alfatoksin gibi küfler ve iyot eksikliği ile yapılan diyetler kansere neden olan çevresel faktörler içinde yer alır ve kimyasal faktörler olarak değerlendirilmektedir [19].

Kansere neden olan çevresel etkenlerden olan fiziksel etkenler, güneş ışığı, radyasyon, mekanik darbeler ve yüksek ısı olarak sınıflandırılmaktadır. Nükleer emisyonlar, ultra viole, X ve gama ışınları gibi iyonize radyasyon ışınları, biyolojik makromoleküllere direkt etki edebilecek bir enerji potansiyeline sahiptir ve bu durum da biyolojik makromoleküllerden elektron kopmasına neden olabilir ve bu makromoleküllerin yüklerini de değiştirebilir. Bundan dolayı DNA'da birçok baz kırılmaları veya DNA'nın organik bazı ve şekerinde birtakım değişimlere neden olmaktadır [20,21].

Kansere neden olan başlıca çevresel faktörler şunlardır;

Virüsler ve diğer mikroorganizmalar: Retrovirüsler, DNA ve RNA virüslerinin, kanser belirtilerinin oluşmasına neden olan olguların yaklaşık olarak %16'sını oluşturduğu bilinmektedir ve bu oran Afrika ülkelerinde, gelişmiş ülkelere göre neredeyse 2 kat kadar daha fazladır [22].

Hava kirliliği: Yakıt egzozları, tütün dumanı vb. organik moleküllerin yanması sonucunda atmosfere polisklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) verilmektedir ve PAH'lar havada asılı kalıp karbon moleküllerine yapışmaktadır. Bundan dolayı solunan hava ile de vücuda alınmaktadır. Yetişkin bireylerde yapılan çalışmalarda, havadan solunum ile alınan PAH moleküllerine temas etme süresinin uzunluğu hava kirliliğinin yoğun olarak bulunduğu şehirlerde yaşayan kişilerin, akciğer kanserine yakalanma oranını sigara içilme durumu kontrol edilse dahi %10 oranında arttırdığı yapılan deneysel araştırmalar sonucunda elde edilmiştir [22].

Sigara ve alkol: Kanser oluşumuna sebep olan çevresel faktörler arasında en kritik sayılabilecek rolü sigara ve alkol üstlenmektedir. Alkol ve sigara tüketiminin sıklığı ve süresinin uzunluğu ağız, yutak, yemek borusu, akciğer, mesane ve pankreas gibi bazı kanser türlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ek olarak, alkolle birlikte sigara kullanıyor olmak da kişinin, çeşitli kanser türlerine yakalanma riskini bir hayli arttırmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda oral kanserlere yakalanma riskinin sigara içmeyen kişilere oranla sigara içen kişilerde 5-9 kat arttığı, yalnızca alkol kullananlarda 3-9 kat arttığı ve sigara ile alkolün birlikte kullanılmasının alkol veya sigaranın tek başına kullanılmasına oranla yaklaşık 13 kat arttığı sonucuna ulaşılmıştır [23].

Kimyasal etmenler: Sağlık, boya sanayi gibi belirli meslek grubunda çalışan kişilerde asbest, kauçuk (vinil klorür), kurşun, benzen gibi maddeler ile temas etmeleri durumunda kanser hastalığına yakalanma risklerinin arttığı bilinmektedir. Kimyasal etmenler ve kanser ilişkisi hakkında yapılmış olan çalışmalarda, sigara içimi ile beraber asbeste maruz kalma durumu 25 kat oranında akciğer kanserine yakalanma riskini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır [24].

#### **1.7.1.2. Genetik Faktörler**

Genetik faktörler, büyüme özelliklerinde hata meydana gelmiş olan hücrelerin, kanser hücrelerine dönüşmesinde en etkili olan faktörler arasındadır. Bu genetik faktörler,

çevresel faktörler etkisinde kalarak da yüksek risk grubunda değerlendirilir. Kalıtsal olarak üst kuşaklardan aktarılan mutasyon, kişilerde kansere yatkınlık durumu oluşturabilmekte ve hazır olarak alınması gereken hormonlar, ilgili doku hücrelerinin çoğalmasını hızlandırarak sebep olduğu genetik değişiklikler ile birçok kanser türünün ortaya çıkmasında etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda sıklıkla gözlemlenen ailesel kanser türleri arasında kalın bağırsak, erken çocukluk dönemi göz tümörü olan retinoblastoma, ailesel meme ve yumurtalık kanseri genetik bozulmaların ve çevresel faktörlerin etkisi ile ortaya çıkan kanser çeşitleri arasında yer alır [25].

### **1.7.2. Kanser Oluşumunun Moleküler Mekanizması**

Serbest radikaller, bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron bulundurdukları için oldukça reaktif halde olmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS), biyolojik sistemler içerisinde oksijenden oluşan en önemli serbest radikaller olarak bilinmektedir. ROS'un kanser oluşumu mekanizmalarının farklı evreleri etkilediği ve bunun sonucunda ise kanser oluşumu üzerinde pek çok önemli role sahip olduğu bilinmektedir [26,27]. ROS oluşumu ve de bu oluşumun neden olduğu hasarı engelleyebilmek için kişinin vücudunda mevcut olan savunma mekanizmalarına antioksidan koruma sistemi (antioksidanlar) ismi verilmektedir. Bu sistem, hücresel oksidan sistem için gerekli olan dengeyi sağlamakla görevlidir. Hücresel oksidan sistemin aşırı yüklenmesi nedeni ile bu kritik denge bozulabilmektedir ve bu bozulma sonucunda reaktif oksijen türleri, hücre hasarı oluşturur [20].

Halliwell'e göre ROS sebepli DNA hasarı oluşumunun temelinde yatan iki sebepten ilki, direkt olarak hidroksil radikali tarafından meydana getirilen DNA zincir kırılımı, baz modifikasyonu ve deoksiriboz fragmentasyonudur. Mekanizmalardan ikincisi ise oksidatif stres sonucunda oluşan endonükleaz inaktivasyonu ile DNA fragmentasyonlarının ortaya çıkmasıdır [28]. Ek olarak, ROS ve ROS oluşumuna neden olan karsinogenler, büyüme inhibisyonu, büyüme desteği ve apoptotik sinyal yollarını etkileyerek tümör oluşuma ve gelişimine sebep olabilmektedir [29,30].

Oksidatif strese kaynaklı meydana gelen DNA hasarı onarılmadığı zaman, premutajenik özellik göstermektedir [20] ve hasarlı şekilde kopyalanmış bir DNA'nın mitoz bölünme ile devamı tümör hücresi ile son bulabilir. Ayrıca ROS, lipid ve protein peroksidasyonu plazma membranındaki hücresel aktiviteler üzerinde etki göstererek yapısal değişikliklere neden olabilir. ROS, büyüme faktörleri ve bunların reseptörlerini,

membrana bağılı olan protein kinazları dolayısıyla sinyal iletimini, kansere neden olan genlerin aktivasyonunu, kanseri baskılayacak olan genlerin ise inaktivasyonunu etkileme özelliğini barındırmaktadır. ROS kanser oluşumu ve onkogenler üzerinde oldukça önemli etkiler göstermektedir [27].

Tümörlerden meydana getirilen hücre kültürleri, normal dokulardan meydana getirilen hücre kültürleri ile karşılaştırıldığında farklı özelliklerde oldukları gözlenmiştir ve bu şekildeki hücre kültürlerine transforme olmuş hücre kültürü adı verilmektedir. Transforme olmuş bir hücre, çok daha sınırlı koşullarda büyüme göstermektedir ve de çoğunlukla sert bir zemine tutunmasına gerek olmamaktadır. Bundan dolayı genellikle şekilleri yuvarlak olup tutunmaları için sert bir zemine gereksinim duymadıklarından seruma duydukları ihtiyaçları azalmıştır. Ayrıca tutunduğu zeminde tek bir tabaka oluşturmak yerine fokus olarak isimlendirilen kitlesel bir yapı meydana getirmektedir [31].

Kanser oluşum mekanizması üzerinde etki sahibi olan kimi olaylar, normal hücreleri transforme olmuş hücrelere dönüştürerek tümör oluşumuna neden olan mekanizma zinciri için model oluşturmaktadır. Kanser oluşumunda genellikle çevresel faktörler tek başına olumsuz sonuçlar ortaya çıkarmamaktadır ve genetik etmenlerle beraber değerlendirildiğinde bu süreci hızlandırdığı gözlemlenmektedir. Bu yüzden birden fazla genetik değişiklik etkisi ile süreç hızlanmaktadır. Her ne kadar kanser oluşumunda tek bir genetik değişikliğe ek olarak birçok genetik değişiklik gerekli olsa da ilave bir genetik değişiklik önemli ve riski arttıran bir bileşen olarak değerlendirilmektedir. Hücrelerin transforme olma sıklığı karsinojen olarak isimlendirilen ajanlar tarafından arttırılmaktadır ve bu karsinojen ajanları tümör gelişiminde başlatıcı ve teşvik edici karsinojenler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Karsinojen ajanlarının iki gruba ayrılması ise kanserde farklı evrelerin olduğuna kanıt olarak gösterilmektedir. Karsinojen ajanları epigenetik değişikliklere ya da çok daha sık olarak direkt veyahut indirekt bir şekilde hücre gen yapısının değişmesine sebep olmaktadır [31]. Mutasyonlara uğramaları durumunda transformasyonun ortaya çıkmasına sebep olan onkogenler, virüslerin sahip oldukları ve hedef olarak seçtiği hücrelerde transformasyona yol açan genler olarak tanımlanmaktadır [31].

### **1.7.2.1. Protoonkogenler**

Protoonkogenler, hücrenin büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve apoptozis için alınan iletiler gibi sinyal iletim mekanizmasında görev alan, birden fazla proteinin sentezlenmesinde rol oynayan genler olarak bilinmektedir. Büyüme faktörleri ve bu büyüme faktörlerinin reseptörleri, ileti çeviricileri ve transkripsiyon faktörleri gibi normal hücre büyümesinde görev alan proteinlerin sentezlenmesinde protoonkogenler ve onkogenler sorumludur. Hücrede sinyal iletiminde görevli olan proteinleri şifreleyen protoonkogenlerin (N-myc, hst-1, abl, int-2, sis, erb-B1 ve erb-B2, fms, cyclin D, ret, myc, CDK4 vb.) mutasyon geçirmeleri halinde büyüme faktörlerinin çok sayıda üretimi, hücre membranı ile çekirdek arasındaki yolların kontrolsüz bir şekilde uyarılması, transkripsiyon faktörlerinin sentezinin artması, hücre bölünmesinin engellenememesi gibi durumlar meydana gelmektedir.

Hücre bölünmesinin kontrol mekanizmasında görev alan proteinler olarak işlev gösteren protoonkogenler, onkogen haline dönüştüğünde hücre büyümesinin kontrolünün yapıldığı mekanizmada hatalar oluşabilmekte ve bu hatalar neticesinde kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalmakta ve büyümektedir. Büyüme ve diferansiyasyona ait biyokimyasal yollarda bulunan enzimlerin işlevselliğini ve gen ifadesini olumsuz şekilde etkileyen mutasyonlar onkogenezin aktivasyonu ile sonuçlanabilmektedir. Protoonkogenlerin adlandırılması yapılırken proteinlerin önüne c [cellular (c-Fos, c-Myc)] ekleri, onkogenlerin önüne ise v [viral (v-Fos, v-Myc)] ekleri getirilmektedir [32, 33, 34].

Onkogenler, hücre transformasyon sürecini başlatma ve bu süreci ilerletme yeteneğine sahiptirler. Normal bir hücrenin hücre siklusunu bozabilen onkogenler, yeterli düzeyde proliferasyon olamamış olan hücreleri yok ederek apoptozise yol açabilmektedirler [35, 36, 37]. Son on yıldan daha fazla süre içerisinde yapılan deneysel çalışmalarda 30 ya da daha fazla sayıda potansiyel onkogen tanımlaması yapılmıştır (v-Sis, p53, v-kit, Mutant Gs, Ras, Bcl-2 ailesi, Raf, Rb geni vb.). Hücrel onkogen aktivasyonuna yol açan genetik olaylar genin yaygın veya uygun olmayan ifadesi ya da normal olmayan gen ürününün ifadesi şeklinde ortaya çıkabilmektedir [38, 39, 40].

Normal şartlarda transformasyona neden olmayan protoonkogenler, DNA'nın tekrar düzenlenmesi, translokasyonlar, eklentiler, delesyonlar, nokta mutasyonları ve gen

amplifikasyonları gibi genetik değişiklikler geçirerek aktive olurlar ve böylece onkogenlere dönüşebilirler [33, 38, 40].

Kromozomlar üzerinde bulunan birçok gen, mutasyonlara eğilimli halindedir. Büyüme­yi aktive eden protoonkogenler, büyüme­yi inhibe etmenin yanı sıra gerekli durumlarda büyüme­yi sınırlandırmaktan görevinde olan tümör süpresör genleri (pRb, p53, p21 proteinlerinin sentezinden sorumlu genler, CDK inhibitörleri) ve apoptozis denetle­mesinde görevli genler olmak üzere üç sınıfa ayrılan normal regülatör genler mutasyonun temel hedefleri arasında yer almaktadır [32, 34]. Ayrıca DNA tamir mekanizmasından sorumlu olan genler de hedef genler arasında yer almaktadır.

### **1.7.2.2. Tümör Süpresör Genler**

Tümör süpresör genler ve onkogenlerin aydınlatılması hücre büyümesinin regülasyonu ve kanser oluşum mekanizmalarının anlaşılabilirliğini kolaylaştırmıştır. İnsan neoplazmları, tümör süpresör genler ve protoonkogenlerin üzerinde epigenetik ve genetik değişikliklerin giderek ilerlemesi sonucu birikmesi ile oluşmaktadır [41].

Tümör süpresör genlerin aydınlatılması sadece tümör oluşumunu açıklığa kavuşturmakla kalmamaktadır ve mutant gen taşıyıcılarının hastalık öncesindeki takibinde de bir yol gösterici olmaktadır. Normal hücrelerde, hücre bölünmesini inhibe etmekle görevli olan proteinlerin kodlanması işlevine sahip olan tümör süpresör genlerin bir ya da birkaçında meydana gelen mutasyon sonucu tümör oluşumu ortaya çıkabilmektedir.

Tümör süpresör genler, her iki allelde normal işlevin kaybı, hücre bölünmesinin kontrol edilememesi ve tümörün büyümesine neden olmaktadır. Tümör süpresör genlerin mutasyonları her iki alleli de etkilemediği müddetçe hücre­sel düzeyde çekiniktir ve hücre­sel düzeyde işlev kaybına neden olabilmesi için bazen ikiden daha fazla mutasyon olayının gerçekleşmesi gerekli olmaktadır [42, 43, 44, 45].

Hücre­sel onkogenlerde meydana gelen tek alleldeki değişikliğin normal hücre­sel işlev değişikliğine neden olmasının aksine, tümör süpresör genlerinin tümör oluşumunun öncesinde her iki allelde de işlevselliğini kaybetmesi gerekmektedir. Süpresör gen üzerinde gerçekleşen birinci mutasyon ya zigotta var olabilir (germinal mutasyon) ya da alakalı dokudaki tek hücrede meydana gelebilir (somatik mutasyon). Hücre, bir allel üzerindeki mutasyonel faaliyet sonucunda işlev kaybı yaşayarak tümör gelişmesine

yatkınlaşmaktadır. Germinal mutasyon meydana geldikten sonra tüm hücreler bundan etkilenmekte ve tümörün ortaya çıkması ikinci allelin de işlevini kaybetmesinden sonra gerçekleşmektedir. Somatik mutasyon oluşumu tek bir hücrede meydana geldiği için ikinci allel işlev kaybı bakımından çok etkilenmemektedir fakat germinasyon mutasyonu sonrasında tüm hücreler somatik mutasyona uğradığından yani ilk mutasyonu taşıdıkları için yatkınlaştığından ikinci allelde işlev kaybı görülmesi daha olasıdır. Somatik mutasyonda tümör kalıtsal özelliğe sahip değilken germ hücre mutasyonu kalıtsal özellik göstermektedir ve etkilediği farklı hücrelerden birden fazla tümör meydana gelebilmektedir. Tümörlerin pek çoğu, tek bir tümör süpresör geninin her iki allelinin işlevsel kayıp yaşadığı zamanda ortaya çıkmaktadır. Bu durumu yaşayan hastaların yarısına yakın oranında tümör hücrelerinde heterozigot kaybı yaşanmaktadır [46].

Tümör süpresör genler, hücrelerin uygun koşullar altında hücre döngülerini tamamlayarak çoğalmasının artışına neden olarak işlevsel kayba sebep olan mutasyonları ile bilinmektedir. Bu genler ilk olarak kalıtsal olan kanserlerde tanımlanmıştır. Örneğin, retinoblastoma geninin iki kopyasının birden delesyona uğramasıyla ya da inaktive duruma getirilmesiyle retinoblastoma gelişmesi ortaya çıkmaktadır [31]. Bireylerde, p53 allelinin mutant Rb genini taşıması ve ailevi olarak bunu bir sonraki nesillere aktarması sonucu malign tümör gelişimine yatkınlık görülebilmektedir [19]. P53 geninde meydana gelen mutasyonlar insanlarda, farklı kötü huylu tümör hücrelerinin gelişiminde çok sık görülmekte olan genetik değişikliklerden biridir. Hücre döngüsünün ve transkripsiyon faktörlerinin en önemli elemanlarından biri olan p53 geni, 17. Kromozom bölgesinin kısa kolu üzerinde bulunur ve 530000 dalton (Da) atomik ve molekül kütlelerinde olan bir proteini kodlamaktadır. Mutasyona maruz kalması veya DNA'da tümör oluşumuna sebep olan virüslere ait onkogen proteini sebebiyle aktivitesini kaybetmesi durumunda normal hücre siklusu bozulur ve bu durum tümör oluşumuna zemin hazırlar [47, 48].

Hücresel siklusunda hasar meydana gelen hücrelerin büyümesinde p53 geni önemli bir role sahiptir. DNA hasarı meydana gelen bir hücrede p53 geninin protein ve aminoasit sentezinde kullanılması, hücre siklusunun kontrolünden sorumlu noktalardan biri olan G1 evresinde durdurulmasına sebep olmaktadır. Eğer hücrede hasara uğrayan DNA tamir edilebilmiş ise hücre siklusu normal şekilde devam edebilmektedir fakat DNA hasarı eğer tamir edilememişse hücre apoptozise uğramaktadır. P53 geninde mutasyon olan hücrelerde, hücre siklusu yeterli vaktin olmamasından dolayı G1

evresinde durmadan direkt olarak S evresine geçiş yapmakta ve bu evre sonucunda hücrede hata miktarı iki katına çıkmaktadır [31].

Tümör süpresör genlerden olan pRb, p53 ya da p21 proteinlerini şifreleyen genlerin iki kopyasında gerçekleşen mutasyon, hücre büyümesinde hasar meydana getirerek tümör oluşturmaktadır. Tümör süpresör genler çeşitli mekanizmalar yoluyla birçok farklı dokuda hücre büyümesini düzenlemektedir. Bu çeşitli mekanizmalar ise hücrenin çoğalma veya farklılaşma yönünde ilerlemesine olanak tanımaktadır ve bu olanağı sağlayan mekanizmalar; DNA eşlenmesinin başlaması, bazı genlerin uygun şart ve zaman içerisinde ifade edilmesinin regülasyonu, hücrelerin iletişimi, hücre içerisinde ya da hücreler arasında maddelerin iletimi gibi işlevlere ekolarak hücre içindeki reseptörlere dış sinyallerin transdüksiyonu olarak ele alınmaktadır [49].

### **1.8. Seramidler**

Kanser hücreleri poliferasyon hızının yüksek olmasından dolayı, yeni oluşan membran yapıtaşları olarak fazla miktarda lipitlere gereksinim duyarlar. Bu yüzden araştırmaların birçoğu kanser oluşumunda ve progresyonundaki lipitlerin rolü üzerinedir. Hücrelerin yapı bütünlüğünde ve hücre zarının bariyer fonksiyonunda sfingolipitler ve metabolitler rol oynar. Biyoaktif sfingolipit türlerinden sfingozin-1-fosfat ve seramidler hücrelerin bazı sinyal yolları üzerinde önemli fonksiyonları olan moleküller bütünüdür. Bu moleküller büyüme, farklılaşma, apoptoz ve otofaji gibi direkt karsinogenezde rol alan birçok hücresel aktiviteleri etkileyebilirler [50, 51]. Büyüme faktörü özelliği gösteren sfingozin-1-fosfat hücre proliferasyonu, inflamasyon tümör büyümesi ve metastazında da rol almaktadır. Seramidler ise büyümenin durması, yaşlanma ve apoptozu tetiklediği bu yüzden de tümörle negatif etkileşime girebileceği düşünülmektedir [51]. Sağlıklı bir organizmada sfingolipid metabolitleri; mitojenik etkileri ve apoptozun düzeni sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda kanser oluşumu ve ilerleyişi ile kemoterapi direncinde bozulmuş sfingolipidlerin yer aldığı görülmüştür [50, 51]. Seramid; 14-16 karbon uzunluğunda açıl zincirleri içeren N-açillenmiş bir sfingozin molekülüdür. Hücrede oluşumu de novo sentez yolu ile, sfingozin molekülü döngüsünden kurtarma yolu ile veya kompleks sfingolipidlerden hidroliz yolu ile olur. Burada oluşan herhangi aksamının kanser oluşumu ve tedavi direnci ile alakalı olabileceği yapılan araştırmalarla gözlenmiştir [52, 54]. Kanser tedavisinde kullanılan iyonize radyasyon, kemoterapi ve sitotoksik uyarı seramid düzeyini artırarak hücre ölümüne sebep olduğu, yapılan

araştırmalardaki bulgularla ortaya konulmuştur [50, 52]. Hücrede seramid üretiminin artırılması ya da yıkımının azaltılması kemoterapi ve radyoterapiye olumlu yanıt vereceği düşünölmektedir [53, 55].

Seramidi, sfingozin ve yağ asitine parçalayan lizozomal enzim grubu olan seramidazların insanda tanımlanmış 5 tipi bulunmaktadır [54]. Bu yüzdendir ki son yapılan kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu grup içerisinde bulunan asit seramidaz (AC); seramid metabolizmasında rol alan sistein amidazdır. Asit seramidaz düzeyi ve aktivitesinin bazı kanser türlerinde arttığı tespit edilmiş bu tür kanserlerde malignite düzeyi ile [56], ayrıca kemoterapi ve radyoterapi direnci ile bağlantısı gösterilmiştir [53, 55].

Seramidazların inaktive edilmesi son yıllarda yapılan çalışmalarında; hücredeki seramid düzeyinin korunması ve artırılması hedefine yöneliktir. Yapısal olarak seramid analogu olan bazı sentetik maddeler in vitro koşullarda asit seramidaz aktivitesini inhibe (seramidaz inhibitörleri) edebilmektedir. Bu maddeler, anti-kanser ilaç geliştirmelerinde kullanılmaktadır. Bunlar arasında; oleoylethanolamide (N-oleylethanolamine)10, (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1- propanol (D-e-MAAP) 11, ARN14974 ve bu araştırmada kullanılan ceranib 2 maddeleri bulunmaktadır.

### **1.8.1. Sfingolipid metabolizması**

Sfingolipidler; başlıca hücre membranında ve membranla bağlantılı organellerde (golgi, lizozom) bulunur. Sfingozin içeren bu lipit sınıfı; Sfingomyelinler ve glikosfingolipidler olarak ikiye ayrılırlar. Sfingomyelinler; sfingomyelinaz enzimi ile seramidler ve fosfokolin'e hidrolize olur. Hücrede; endoplazmik retikulumda sfingolipid yapıda olmayan prekürsör moleküllerden de novo sentezlenirler. Fosfolipidler ve kolesterol ile birlikte hücre membranının temel yapısal bileşenlerini oluştururlar, membranın bariyer fonksiyonu ve akışkanlığının sağlanmasında önemli rol oynarlar. Gaucher hastalığı, Farber hastalığı, Krabbe hastalığı ve bunlara benzeyen diğer lizozomal hastalıklara yol açan sfingolipid metabolizmasındaki enzim mutasyon bozuklukları, hücrede sfingolipidlerin fazla miktarda birikmesine sebep olurken, bazı enzim defektifleri de kanser oluşumuna sebep olmaktadır [58].

### 1.8.2. Seramidler ve kanserle ilişkisi

Seramid; tüm sfingolipidler için öncül olup 18 karbon içeren bir sfingozin uzun-zincir bazından (LCB) oluşur. Hücre büyümesi, farklılaşması, yaşlanması, inflamasyon, hücre içi sinyal iletimi ve tümör hücreleri dahil olmak üzere her hücredeki apoptozu tetikleyip hücre sel strese yanıt ve sağ kalım gibi önemli rolleri üstlenirler.

Seramidler de novo yolla (seramid sentaz) veya sfingomiyelinazlar aracılığı ile; sitokinler, ısı şoku, büyüme faktörleri, D vitamini, TNF- $\alpha$ , CD95 / Fas, kemoterapötik ajanlar, toksin, radyasyon, UV-ışın gibi stres ajanlarına cevap olarak oluşabilirler. Hücre içerisindeki seramid miktarındaki artış; doğrudan veya dolaylı olarak, MAP kinazlar, seramid aktive edici serin/treonin fosfatazlar, protein kinaz C, fosfolipazlar ve bazı transkripsiyon faktörlerini de içeren, apoptozisin başlatılması ve devamında rolü olan birtakım enzim ve sinyal yollarını aktive eder [59, 60]. Seramid aracılı hücre ölüm yolları hücre sel strese yanıt olarak oluşur ve hücre, doku tipine, seramidin hücre düzeyindeki konumlanmasına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir [58]. Genellikle insan tümör hücresi tipinde seramid düzeylerinin normalden düşük olup, malignitenin progresyonu ile de düzeyinin düşmeye devam etmesi ile birlikte; birçok tümör baskılayıcı sinyalin de seramid üretimini uyardığı ve böylelikle kanser hücrelerini apoptozu yönlendirdiği bilinmektedir. Hücre içi seramid miktarını denetleyen enzim yolları incelenerek antineoplastik tedaviye yeni yaklaşımlar getirmeye çalışılmaktadır [56].

### 1.8.3. Seramidaz inhibitörleri

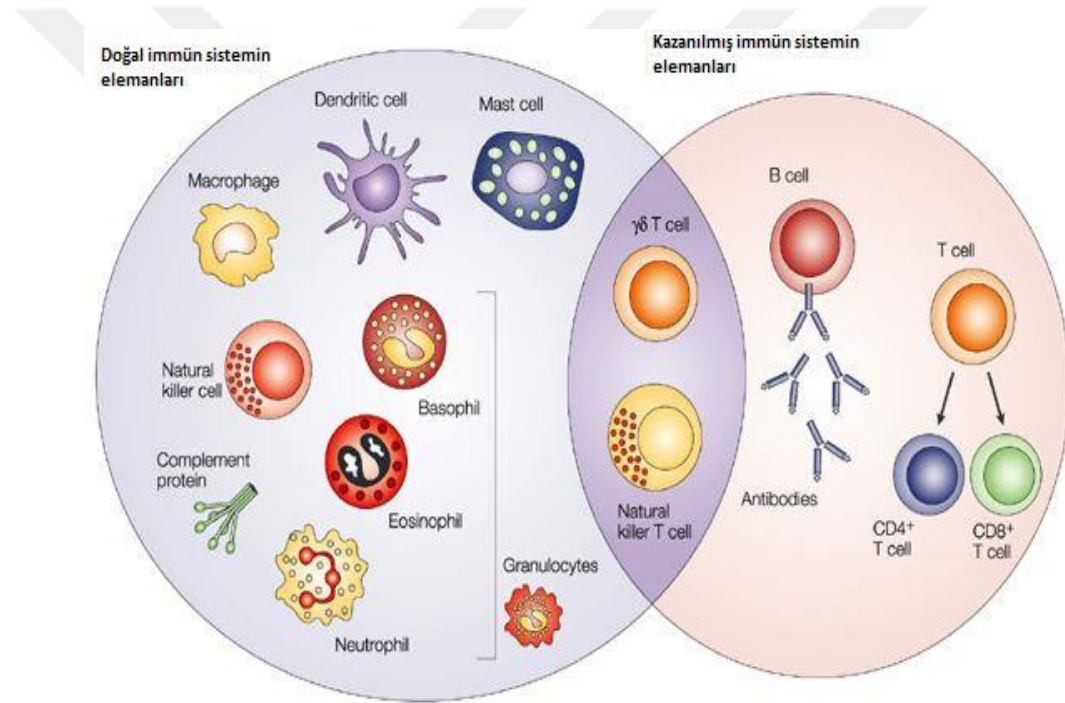
Seramidi sfingozin ve yağ asidine yıkan seramidazlar asit seramidaz (AC), Nötral seramidaz (ASAH) ve alkalın seramidaz (ACER) olmak üzere 3 grup altında toplanırlar. İnflamatuvar hastalıklar, tümörögenез ve nörodejenaratif hastalıkların sebebi seramidaz genlerindeki mutasyonlar sonucu oluşan enzim regülasyonlarındaki bozulmalardır [61]. Hastalıklarla en çok ilişkili olan AC; seramidi sfingozin ve yağ asidine yıkan bir sistein amidazdır [56]. Farber hastalığının belirteci eklem deformasyonları ve cilt altı nodüller olup asit seramidazın mutasyon sonucu eksilmesine bağlıdır [61]. Asit seramidazın artışı kanserli hücrelerin apoptoz ile tedavisini güçleştirmekte, azaldığında ise tümörün yinelenen kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılığının arttığı bilinmektedir [62].

AC'nin inhibisyonu, seramidlerin hücre sel seviyelerini arttırmakta, sfingozin ve S1P seviyelerini düşürmekte ve birçok hastalığa güncel tedavi stratejisi oluşturmaktadır.

Az sayıda asit seramidaz inhibitörü bilimsel çalışmalarda kullanılmakta ve ceranib 1 ve 2 gibi kemoterapinin etkisini güçlendirici maddeler de tedavi protokollerine girmiş bulunmaktadır [63].

### 1.9. İmmün Sistem Tanımı

Bağışıklık sistemi bir organizmada homeostazı sağlamak, hayatta kalmak ve tehlikeli patojenlere karşı savunmak ve korumak için gelişmiş bir organizasyondur. Bağışıklık sistemi bakteri ve virüsler gibi istilacılarla savaşır ama aynı zamanda değiştirilmiş kanserli hücreler de dahil olmak üzere endojen faktörlere uyarı oluşturur. Bağışıklık sistemi genel olarak iki bileşene ayrılabilir, doğuştan gelen ve uyarılabilir(kazanılmış) sistemler (Şekil 1.1) olarak bilinir [64].



Şekil 1.1. Bağışıklık sistemi (<http://www.alerjiklinigi.com/immun-sistem>)

Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, hızlı ilk savunma hattını temsil eder ve tüm çok hücreli organizmalarda bulunur. Patojen girişte bir bariyer işlevi gören solunum, ürogenital, epitel, gastrointestinal ve diğer mukozal sistemler tarafından engellenir. Ek olarak, salgılardaki antimikrobiyal faktörler de dahil olmak üzere β-defensinler bu bölgelerde enfeksiyonu engeller. Ancak, eğer bu sistemler aşılır patojenler içeri girerse doku makrojları yoluyla iltihab başlatılır. Sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanması sonucu nötrofiller dahil diğer hücrelerin alımı ve aktivasyonu engellenmeye çalışılır.

Bağışıklık tepkisi olarak dendritik hücreler antijeni alır ve adaptif hücrelerin hücreleriyle etkileşime girerek lenf düğümlerine göç eder [65].

Adaptif immün yanıt antijene özgüdür, Başlangıçta gelişmesi günler alır ve sadece omurgalılarda bulunur. T ve B hücreleri, antijenle etkileşime girer antijen sunan ve aktive olan hücreler (APC), çoğalır ve iltihaplanma bölgesine göç eder. B hücreleri hücre dışı patojenleri hedef alan antikolar üretir. T hücre popülasyonları, parçalanmış CD8+ sitotoksik T hücrelerini içerir. Bağışıklık tepkisi olarak; geniş bir salgı yapan enfekte hücreler ve CD4+ T yardımcı hücreler bir dizi sitokin ve diğer bileşenlerini aktive eder. Ancak doğuştan gelen sistemden farklı olarak, adaptif bağışıklık tarafından bir antijenle karşılaşıldığında, güçlü bir kalıcı bellek yanıtı oluşturulur. Doğuştan ve uyarılabilir olmasına rağmen sistemler sıklıkla ayrı ayrı tanımlanır, doğuştan gelen ve uyarılabilir tepkilerin bileşenleri örtüşür ve çoğu durumda her iki sistemde etkili bir bağışıklık tepkisi üretmek için birlikte çalışır [66].

### **1.9.1. Doğuştan Gelen Bağışıklık Sistemi: Makrofajlar**

Makrofajların bağışıklık sistemi içinde birçok farklı işlevi vardır. Makrofajların bağışıklık sistemi içinde birçok farklı işlevi vardır. Bu işlevler; patojenlerin ortadan kaldırılması, hasarlı dokuların onarımı, doku homeostazı, dokuların gelişimi, enflamatuvar yanıtların başlatılması ve adaptif immün yanıtın uyarılmasıdır. Bu güçlü bağışıklık, efektörlerin ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynar. Makrofaj salınımı dahil olmak üzere çok çeşitli enflamatuvar araçlar başlamanın merkezinde yer alan sitokinler ve kemokinler inflamatuvar sürecin yayılmasını engeller [67].

Doku makrofajları ilk yanıt verenlerden biridir. Patojenler epitel bariyerleri bir kez aştığında patojen tanıma reseptörleri (PRR) bir dizi kod ifade eder. Bu kod patojenleri ve tehlikeyi tespit etmek ve ardından immün cevabı başlatmak için kullanılır [68, 69]. Patojen tanıma reseptörleri, makrofajların enfekte olmamış/etkilenmemiş hücreleri tanımasını sağlar ve değişmeyen mikrobiyal ürünler olarak adlandırılan patojenle ilişkili moleküler modellerdir (PAMP). Patojen tanıma reseptörleri; TLR, nod benzeri reseptörler NLR ve RIG-I benzeri reseptörlerdir (RLP) [70].

İnflamatuvar yanıtı başlatan pro inflamatuvar sitokinlerin üretimi, PRR'lere ligand bağlanması ile sonuçlanır. Örneğin, TLR'ler, viral nükleik asitleri ve bakteriyi tanıyan hücre yüzeyi ve endozomal bölmelerdeki reseptörler lipopolisakkarit (LPS) ve lipoteikoik

asiti (LTA) tanıyan transmembrandır ayrıca endojen ligandlardır [71]. Makrofajlarda TLR'lerin aktivasyonu TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve inflamatuvar sitokinlerin IL-6, TNF- $\alpha$  üretimi ile sonuçlanır, endotel aktivasyonunu indükler ve bu da lökositlerin ve serum proteinlerinin alınmasını sağlar. Ek olarak, IL-1 $\beta$  ve IL-6, hepatositleri kollektinler gibi akut faz proteinlerini salgılamak için indükler. Bu akut faz proteinleri mikrobiyal opsonise ürünler ve ayrıca komplement sistemi etkinleştirir. Komplement sistemi patojenler ve diğer bağışıklık hücrelerinin alınması ve yönlendirilmesi patojenlerin membran saldırı kompleksleri yoluyla öldürülmesi gibi opsonizasyon sağlar [71].

### 1.9.2. Makrofaj Fagositozu

Makrofajlar nötrofiller ve olgunlaşmamış dendritikler de dahil en güçlü fagositik hücreler arasındadır. Fagositik süreç, fagositik reseptörlere bağlanma ve çok sayıda hücre içi sinyal yolları ligand tarafından başlatılır. Bu aktin hücre iskeleti ve içselleştirme hedefin fagozom olarak bilinen bir vakuole yeniden düzenlemesine yol açar. Fagozom lizozomdaki asitle birleşir ve hedef materyalin bozulmasına yol açar [72]. Bu parçalanma süreci, fagozomal membranlardaki NADPH oksidaz tarafından ve lizozim gibi proteolitik enzimler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerini içerir [73].

Fagositik reseptörler ikiye ayrılır (Tablo 1.1.). Opsonine bağımlı ve opsoninden bağımsız. Opsonine bağımlı reseptörler, antikora veya tamamlayıcıya dayanır. Fagositozu kolaylaştırmak için ligand kaplama, Fc reseptörlerini ve kompleman reseptörlerini içerir [74].

**Tablo 1.1.** *Fagositik reseptörler*

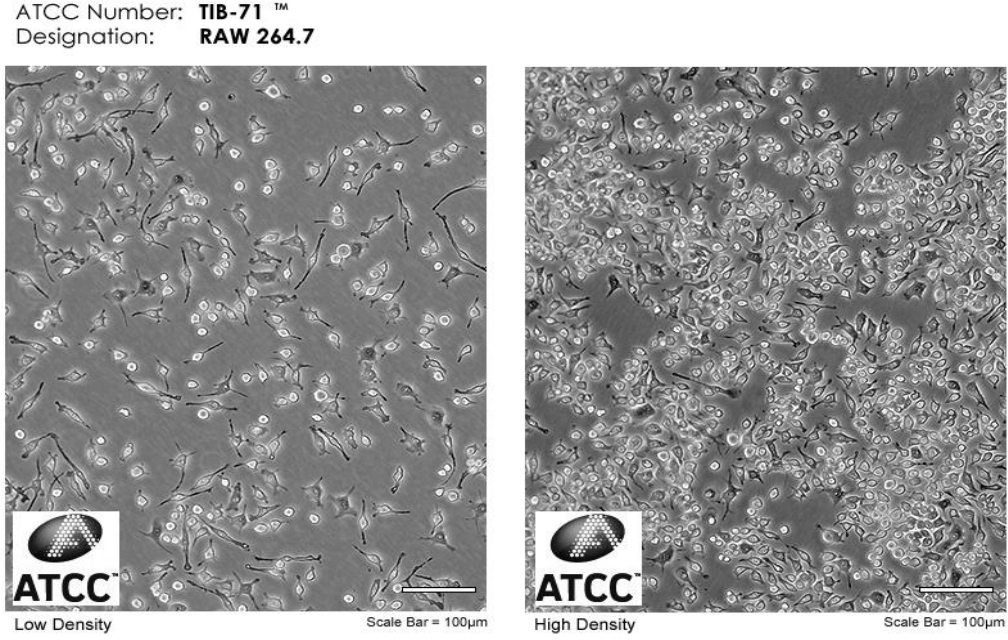
Fagositikreseptörler	Family	Örnekler
Opsonine bağımlı	Fc receptors (FcR)	Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII
	Complement receptors (CR)	CR1, CR3, CR4
	İntegrinler	$\alpha$ 5 $\beta$ 1
Opsoninden bağımsız	C tipi lektinler	Dectin-1, Mannose receptor
	Çöpçü reseptörler (SR)	SR-AI/II, MARCO, CD36

### 1.10. Kullanılan RAW 264.7 Hücre Hattı

RAW 264.7 hücreleri, ilk kez bilim adamı W.C. Raschkea tarafında BALB/c farelerinden türetilen, Abelson lösemi virüsünden uyarılmış tümör hücre dizisinden kaynaklanan monosit/makrofaj benzeri hücrelerdir. Pinositoz ve fagositoz yapabilme özelliği olan bu hücreler uygun bir makrofaj modeli olarak tanımlanmaktadır. Raschkea ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda; makrofajların özelliklerini ifade eden Abelson lösemi virüsü ile indüklenen murin tümörlerinden klonlanmış üç hücre çizgisi oluşturulmuştur. Ek olarak üç orijinal tümörden ikisi, biri Abelson virüsü hastalığına özgü ve diğeri timik lenfoma için tipik olan lenfosit hücre dizileri vermiştir. Makrofaj çizgilerinden ikisi, singeneik farelere yerleştirildiğinde tümörjeniktir. Makrofaj çizgilerinin tümü, nötr kırmızıyı pinositoz, zimosan ve lateks boncukları fagositoz yapmış, koyun eritrosit hedeflerinin antikora bağımlı öldürme ve fagositozuna aracılık etmiş ve yüksek seviyelerde lizozim salgılamışlardır. Bu özelliklerin hiçbiri lenfosit çizgileri tarafından sergilenmemiştir. Test edilen iki makrofaj hücre hattından hiçbiri, in vitro bağışıklık tepkilerinin indüklenmesi için gerekli olan yapışık hücre popülasyonunun yerini alamamıştır. Normal makrofajları aktive eden bir ajan, bakteriyel lipopolisakkarit, kültürde transforme edilmiş makrofajların büyümesini spesifik olarak inhibe eder. Enfeksiyöz Abelson lösemi virüsünün makrofaj çizgilerinden ikisi, RAW 309Cr ve WR 19M tarafından salgılanması, Abelson virüsünün makrofaj hücre tipini üretken bir şekilde enfekte edebildiğine dair kesin kanıt sağlamıştır. Diğer makrofaj hattı, RAW 264, saptanabilir virüs partikülleri salgılamada ve XC plak oluşumu tahlilinde negatiftir, ancak Moloney lösemi virüsü tarafından kurtarıldıktan sonra Abelson virüsü üretimi için pozitif hale gelmiştir [75].

RAW 264.7 (ATCC TIB-71), hem gevşek yapışık küboidal veya iğ şeklindeki hücrelere hem de yuvarlak canlı hücrelere sahip olacak bir monosit/makrofaj hücre hattıdır. Özellikle kültür yoğun olduğunda, hücrelerin gevşek bir şekilde bağlanması ve yığılması ve yuvarlak hale gelmesi normaldir. Yaşayan hücreler, özellikle kültür daha birleştikçe ayrılabilir ve yüzebilir. Bu bağlanmamış hücreler hala canlıdır ve nazik santrifüjleme ile tutulmalı ve ardından şişeye geri eklenmelidir. Farklı serum lotlarındaki küçük farklılıklar, bu hücrelerin az ya da çok bağlanmasına neden olabilir. RAW 264.7, yapışkan bir çizgi olarak belirlenir ve bir tek tabaka gibi işlenir, ancak kültür karışık yapışkan ve süspansiyon popülasyonlarına sahip olabilir. Hücrelerin kültürlenmesinin ilk aşamalarında, hücreler ince uzantılarla birleşir ve küboid benzeri görünür. Kültür daha

yoğun hale geldikçe, orijinal tek tabakaya eklenmiş başka bir yuvarlak hücre tabakası olabilir. Aşırı ağır kültürlerde hücreler ortama salınacaktır. Ağır kültürlerde genellikle hem bağlı hem de asılı hücreler (Şekil 1.2.) bulunur [76].



Şekil 1.2. RAW 264.7 hücreleri

### 1.11. Kanser ve Apoptozis

Vücutta bulunan her hücrenin belli bir hayatta kalma süresi vardır ve bu süre bitiminde ölümler, hayat ve ölüm arasındaki dengeyi sağlarlar. Hücresel ölüm biçimlerinden birisi olarak apoptozis; ilk defa 1972 yılında Avustralyalı patolog J.F.K Kerr tarafından tanımlanmıştır [77]. Apoptozis programlanmış olarak çalışmakta ve organizmadaki dengeyi sağlamaktadır. Diğer denge sağlayıcı unsuru ise hücre tahribatını önlemesidir. 2002 yılında John E. Sulston, Sydney Brenner ve Robert Horyitz yaptıkları çalışma ile Nobel ödülünü almış ve bu çalışmalarında *Caenorhabditis elegans* türündeki nematodu kullanarak apoptoz mekanizmasını anlamayı ve organ gelişimini genetik olarak düzenlemeyi hedeflemişlerdir. Bu nematod türünün tercih edilme sebebi ise birden fazla hücreye sahip olmalarının yanı sıra çok basit yapılarıdır. Bu canlıda apoptozis 3 gen tarafından; *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* kontrol edilir. *Ced-3* ve *ced-4* genlerinde oluşan bir mutasyon sonucu apoptoz faaliyetine geçmeyerek hayat döngülerinin son bulması gereken hücrelerin canlılığını koruduğu gözlemlenmiştir. *Ced-3* ve *ced-4* genlerine bu sebeple apoptozu indükleyici genler diğer bir deyişle ölüme karşı koruyan genler denilmektedir.

Sıklıkla, yapılan çalışmalarda tercih edilen ced genlerin insan genomunda homologları bulunmaktadır. Bu homologlar; ced-4'e karşılık Apaf-1, ced-3'e karşılık kaspazlar ve ced-9'a karşılık Bcl-2 dir. Bcl-2 geni insanlarda apoptozisten koruyucu bir gendir [78, 79].

Nekrozis ise bir diğer hücre ölüm şeklidir. Nekrosizde, hücrenin sıvı kaybederek küçülmesine sebep olan apoptozisten farklı olarak fizyolojik bir ölüm gerçekleşmeyip, hücre içerisine fazla miktarda sıvı girmesiyle şişmesine sebep olmaktadır. Apoptoz ve nekroz olaylarındaki diğer bir fark ise apoptozda hücre kromatinleri çekirdek zarı etrafında yoğunlaşırken nekrozda şişmeden kaynaklı membran yapısı bozulmakta ve hücre içi materyaller membran dışına atılmaktadır [80, 81, 82]. Apoptozu uğrayan hücre apoptotik cisimciklere parçalanmaktadır. Bu cisimciklerden hücre içi materyalleri ya da çekirdeği içerebilmektedir. Ancak nekroz olayına maruz kalan hücre lizise uğrarken, hücre içi materyallerin dış ortama salınmasıyla enflamasyon gerçekleşmektedir. Apoptoz olayında enflamasyon görülmemesinin sebebi ise makrofaj ve diğer çevre hücreler tarafından fagositozun gerçekleşmesidir [80, 82]. Özetle, morfolojik olarak apoptoz, hücre stimulusu, hücrenin küçülmesi, kromatinlerin toplanıp yoğunlaşması, 180-200 baz çiftli DNA parçaları ile apoptotik cisimciklerin oluşması ve retikuloendotelial hücreler ile fagositoz şeklinde ilerlemektedir [82].

Apoptoz mekanizması üzerine yapılan çalışmalar devam etmekte olup bu mekanizma tam olarak çözümlenememiştir. Ancak düzenlenmesinde kaspazların etkisinin büyük olduğu bilinmekle birlikte p53, Bcl-2, sitokrom-c ve kalsiyumun da işlevsel olarak bu düzenlenmede yerleri bulunmaktadır [82].

### **1.12. Konfokal mikroskopi yöntemi**

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan mikroskobik yöntemlerden birisi Konfokal mikroskopi yöntemidir. 1950 li yıllara temeli dayanan Konfokal mikroskobu floresan malzemelerle tespit çalışmalarında kullanılmıştır. Bu mikroskopta incelenen örnekler yüksek çözünürlükte görünmesinin yanı sıra üç boyutlu olarak da görüntülenmesine olanak sağlamaktadır. Bu avantajı bakımından konfokal mikroskobu hücredeki organelleri tespit edip, takibini yapmak için de kullanılmaktadır. Örneklerin görüntülenebilmesi için yüksek enerjili ışık verilmekte ve dipte bulunan hücrenin içerisine sızmasında zorluk çıkabilmektedir. Bu zorluk floresan malzemenin dışarı doğru

hareketini mecburi kılarak, doku ve hücrelerde zarar oluşmasıyla sonuçlanabilmektedir [83].

Hücre kültür araştırmalarında canlı ve canlı olmayan hücreler Hoescht boyar maddesi ile tespit edilebilmektedir. Bu boyar madde ile birlikte kullanılan Propidyum İyodür (PI) ölü hücreleri boyamaktadır. Çekirdekdeki kromatin yoğunlaşması, hücredeki büzüşme ve membrandaki tomurcuklanma konfokal mikroskop ile görüntülenebilmektedir. Konfokal mikroskopta kullanılan floresan benzeri boyar maddeler, DNA ya bağlanarak çekirdekte meydana gelen yapısal değişimleri gözlemlemeyi kolaylaştırmaktadır. Hücre canlılığına işaret olan belirteç hücre zarındaki bozulmalardır. Hücrenin apoptoz mekanizmasıyla mı yoksa nekroz mekanizmasıyla mı ölüm yoluna girdiği bu floresan boyalarla ayırt edilebilmektedir [84].

### **1.13. Sitotoksisite Yöntemleri**

Zehir; organizmada doz aşımı veya yanlış şekilde kullanımı ile çeşitli olumsuzluklara sebebiyet veren maddelerdir. Bu maddeler organizmaya alınması sonucu biyolojik veya kimyasal hasarlar oluşarak hücre ölüme gidebilmektedir. Canlı organizmalar üzerinde zehirli maddelerin etkisini inceleyen bilim dalına toksikoloji denilmektedir [85].

Hücre üzerinde zehir etkisinin analiz edilmesi amacıyla sitotoksisitesi belirlenmesi önem taşımaktadır. Uygun hücre kültüründe bu yöntemlerle zehir etkisi oluşturan maddelerin oranı tespit edilmektedir. Sitotoksisite testleri in vivo veya in vitro olarak yapılabilmektedir. Bu testlerle birlikte hücre hasar tespiti ve morfolojik değişimlerin gözlemlenebilir aynı zamanda hücre sel büyümenin ve metabolizmanın değişimlerinde tespit edilebilmektedir. Hücrede meydana gelen etkiden dolayı sitotoksisitesini belirlemek amaçlı çalışılan madde farklı derişimlerde her seferinde ise doz artımıyla verilerek in-vivo testler yapılmaktadır. Sitotoksisite testinin avantajı ucuz olması, denek hayvanlarına ihtiyaç duyulmaması, hızlı olması ve çok sayıda örneğin testini mümkün kılmasıdır. Dezavantajı ise kültür edilen hücrelerin konak hücrelerden farklı özellikler göstermesi ve her bir test çalışması için tek hücre kullanılmasının gerekmesidir [85]. Sıklıkla kullanılan sitotoksisite test yöntemleri ise; metabolik aktivite ölçümünü sağlayan MTT, XTT, MTS, WST-1 yöntemleri, alamar mavisi yöntemi, laktat dehidrojenaz (LDH) yöntemi, kristal viyole yöntemi, sülforhodamin B(SRB) yöntemi ve membran

geçirgenliğinin belirlenmesi için kullanılan; nötral kırmızısı ve tripan mavisi testleridir [86].

### **1.13.1. MTT Testi**

MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] testi metabolik aktivite ölçümünü sağlayan kolorimetrik bir testtir. Canlı hücrelerde mitokondriyal aktivitesinin belirlenmesinde ve sitotoksisteyi de ölçmekte kullanılmaktadır. Testin çalışma prensibi mitokondriyal aktivite sonucunda oluşan tetrazolyum tuzlarının renkli bir formazana dönüşerek oluşan renk değişiminin absorbans ölçümü yapılarak değerlendirilmesidir. Hücre yaşam döngüsünü sonlandırma yolundayken mitokondriyal aktivitesini de azaltır ve bu aktivite azalması ile tetrazolyum renkli bir formazana dönüşemez. Hücre tiplerine özgün olan bu formazan derişimi, hücre çokluğuyla orantılıdır ve bu orantı sayesinde hücrenin canlılık aktivitesi ölçülebilmektedir [87].

MTT suda çözülebilen bir tetrazolyum tuzudur. Kültür ortamında çözülemeyen bu tuz, fenol kırmızısı barındırmayan medium veya tuz çözeltileri ile hazırlanmak için karıştırıldığında sarımsı bir renk oluşturmaktadır. Kültür ortamında çözülemeyen MTT tetrazolyum tuzu, indirgeme ajanlarını çözebilmek için dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücülerle kullanılmaktadır ve inkübasyon süresi 240 dakikadır [87].

## **2. MATERYAL VE METOD**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Kullanılan hücre serileri**

Çalışmada RAW 264.7 (ATCC TIB-71) hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler ATCC protokolüne göre çoğaltılıp -196 °C’de sıvı azotta stoklanmıştır.

#### **2.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler**

Dimetil sülfoksit (DMSO), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), Fetal Bovine Serum (FBS), Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin), Tripsin-Etilendiaminotetraasetik asit (Tripsin/EDTA), Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma); Annexin V apoptosis detection kit (BD, Pharmingen, USA); cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 mL hacimlerinde), pastör pipetler, enjektörler (10, 20 ve 50 mL hacimlerinde), steril falkon tüpler (15 ve 50 mL) (TPP, İsviçre) kullanılmıştır.

### **2.2. Metod**

#### **2.2.1. Sterilizasyon**

Çalışmada kullanılan cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı halde sterilizatörde 2 saat boyunca 180 °C steril edilerek, bazı cam, Duran şişesi içinde bulunan sıvı solüsyonlar ve plastik malzemeler yine alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C, 1,5 atm/civa basınçta 20 dakika boyunca steril edilerek, bazı sıvı kimyasallar ise 0,2 mikron çapında tek kullanımlık steril filtrelerden geçirildikten sonra sterilize edilip kullanılmıştır.

#### **2.2.2. RAW 264.7 hücrelerinin çoğaltılması**

RAW 264.7 hücreleri tüp içerisinde stok halinde buldukları sıvı azot tankından çıkarılıp, eriyen hücreler %10 serum (Fetal Bovine Serum/FBS) içeren RPMI besiyerine ilave edilerek, 1200 rpm’da 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından oluşan süpernatant kısım dökülüp pellet üzerine taze besiyeri eklenerek süspansiyon edilen hücreler kültür flasklarına alınarak 37 °C’de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ve uygun nem şartlarını sağlayan inkübatör ortamında inkübe edilmiştir. İnkübe süresince hücre çoğalmaları, kültür flaskları Inverted mikroskop (Nikon Eclipse TS100, ABD) ile kontrol edilmiştir. 2

günlük inkübasyondan sonra flaskın yüzeyi tamamen hücrelerle kaplanmış, içerisindeki besiyeri pipet yardımıyla atılıp, PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Flask içersine 1X tripsin/EDTA solüsyonu ilave edilerek inkübatörde 5 dk boyunca hücrelerin flask tabanından kalkmasına izin verilmiştir. Tabandan kalkan hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenerek yeni flaslara bölünmüştür.

### **2.2.3. Ceranib 2 maddesinin hazırlanması**

Çalışmada ilaç olarak kullanılan Ceranib 2 maddesinden ana stok olarak DMSO'da 100 mM hazırlanmıştır. Ana stok üzerinden 400 µM'lık ara stok hazırlanmıştır. Ara stoktan plakaya en yüksek doz 100 µM olacak şekilde ilave edilmiştir.

### **2.2.4. MTT kolorimetrik sitotoksisite testi**

96 kuyulu plaka içine tüm kuyulara eşit miktarda besiyeri konulup üzerine Ceranib 2 maddesinden en yüksek doz 100 µM olacak şekilde (100-50-25-12.5-6.75-3.375 µM konsantrasyon aralığında) seri dilüsyon yapılmıştır. Her kuyuya 5000 hücre ekilip 24 ve 48 saatlik periyotlarda 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübasyona izin verilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde plakadaki her kuyuya 20 µL MTT (5mg/mL) boyası eklenip 4 saat boyunca tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde canlı hücrelerin oluşturduğu kristallenmeyi çözmek amacıyla her kuyuya 100 µL SDS eklenerek 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda plaka optik yoğunluğu (absorbans) spektrofotometrede 570 nanometre dalga boyunda okutulmuştur. Ceranib 2 ile muamele edilmeyen hücre grubu kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Her doz için ayrı ayrı canlılık değerleri kontrol grubuna göre hesaplanıp uygulanan maddenin RAW 264.7 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> konsantrasyonu zamana bağlı olarak bu canlılık değerleri kullanılarak GraphPad PRISM 6.0 programı ile hesaplanmıştır.

### **2.2.5. Konfokal mikroskopi yöntemi**

#### **2.2.5.1. Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopi yöntemi ile tayini**

RAW 264.7, hücre içi yapılarındaki değişiklikleri inceleyebilmek için 6 kuyulu plakalara, steril lameller üzerine her kuyuda 3x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde ekim yapılarak deney kuyuları Ceranib 2 maddesinin IC<sub>50</sub> konsantrasyonları ile 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Kontrol kuyuları hiçbir madde uygulanmadan inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkanmıştır. Ardından glutraldehit kullanılarak hücreler 15dk. fikse edilmiştir. Bu işlemleri takiben hücrelerin çekirdek morfolojilerini görüntüleyebilmek için akridin oranj, hücre

iskeletlerini görünür kılabilmek için de falloidin boyama uygulaması gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar konfokal mikroskop (Leica TCS-SP5 II, Germany) kullanılarak görüntülenmiştir.

## **2.2.6. Akış sitometri yöntemi**

### **2.2.6.1. Akış sitometrisinde anneksin V analizi**

Sağlıklı hücrelerde hücre membranının iç yüzeyinde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Hücre apoptoza giderken PS molekülleri membranın iç yüzeyinden dış yüzeyine doğru geçer; bu gerçekleşen yer değişimi hücrenin erken apoptoza gittiği durumlarda görülmektedir. Anneksin V proteinin PS'ye bağlanabilme özelliğinden dolayı floresan bir madde ile işaretlenerek apoptoza giden hücre görünür hale getirilebilmektedir. Anneksin V yöntemi için ilk olarak 6 kuyulu plakaya her bir kuyu için  $5 \times 10^5$  hücre ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan hücreler 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İlgili sürenin sonunda deney kuyularına Ceranib 2'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonları ile muamele yapılmıştır. Plaka tekrar 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından plaka içersindeki hücreler 2 kez PBS ile yıkanarak santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen hücrelerin 1 mL içersindeki sayısı hesaplanmıştır. Her bir akış sitometri tüpüne 100 µL hücre süspansiyonu eklenmiştir. Üzerlerine 100 µL Muse™ Annexin V solüsyonu ilave edilmiş, tüpler orta hızda 3 ila 5 saniye boyunca vortekslenerek tüp içeriklerinin iyice karıştırılması sağlanmıştır. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dakika boyunca örneklerin inkübasyonu yapılmıştır. Sonuçlar (Muse™ Cell Analyzer Merck, Millipore, Hayward, California, USA) cihazında analiz edilmiştir.

## **2.2.7. İstatiksel analiz**

GraphPad PRISM 6.0 programı kullanılarak sitotoksisite test sonuçları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Tüm testler  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir.

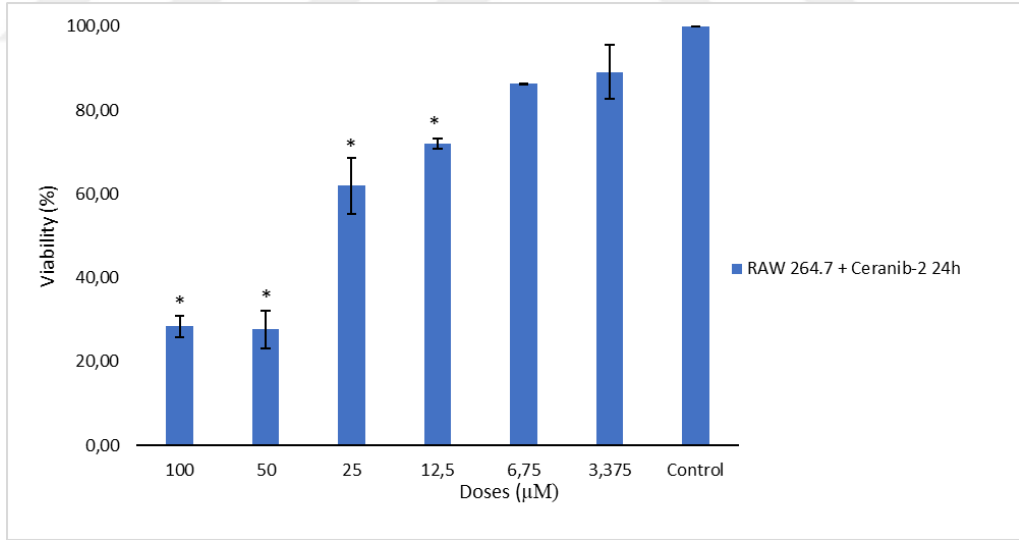
## **3. BULGULAR**

### **3.1. MTT Kolorimetrik Sitotoksisite Testi**

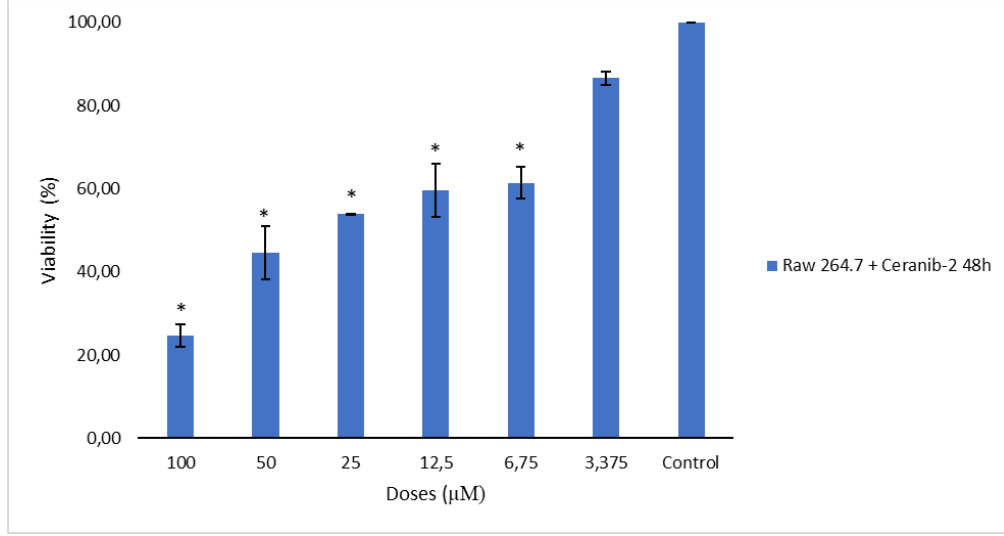
#### **3.1.1. Ceranib 2'nin RAW 264.7 hücreleri üzerindeki sitotoksisite bulguları**

Ceranib 2'nin, 100, 50, 25, 12.5, 6.75, 3.375 µM'lık konsantrasyonu RAW 264.7 hücreleri üzerine uygulandıktan sonra hücreler 24 ve 48 saat süresince inkübatörde bekletilmiş ve MTT yöntemiyle, uygulanan konsantrasyon miktarlarında gerçekleştirilen

sitotoksikite etkisi tespit edilmiştir. 24 ve 48 saatlik süre bitiminde uygulanan ilgili dozların tümünde RAW 264.7 hücrelerinde, mitokondriyal aktivitede dozla ilişkili olarak canlılık yüzdesinde belirgin azalma gözlemlenmiştir. Ceranib 2'nin uygulandığı en düşük konsantrasyondan itibaren canlı hücrelerin sayısında da azalma meydana gelmiştir. Şekil 3.1.'de verilen grafik hazırlanırken Microsoft Office Excel programı kullanılarak IC<sub>50</sub> konsantrasyonları belirlenmiş ve ardından GraphPad PRISM 6.0 programı kullanılarak uygulanan konsantrasyon aralığında yüzde canlılık oranının anlamlılık değeri analiz edilmiştir. Ceranib 2'nin RAW 264.7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi 24 saat için IC<sub>50</sub> konsantrasyonu 33 µM 48 saat için ise IC<sub>50</sub> konsantrasyonu 35 µM olarak hesaplanmıştır. Deneysel çalışmada makrofaj hattı olan RAW 264.7 'nin canlılık yüzdesinde uygulanan Ceranib 2'nin doz miktarı arttıkça belirgin bir azalma meydana geldiğinden, Ceranib 2'nin RAW 264.7 hücrelerinde uygulanan doz konsantrasyonuna ve süreye bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Aşağıda verilen Şekil 3.1., Ceranib 2'nin RAW 264.7 hücre hattı üzerinde 24 saatlik, Şekil 3.2. ise 48 saatlik uygulanması sonucu elde edilen canlılık konsantrasyonu ve anlamlılık değerini göstermektedir.



**Şekil 3.1.** RAW 264.7 hücrelerinin 24 saatlik Ceranib 2 muamelesinden sonra konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak alınmıştır. IC<sub>50</sub> değeri 33µM. (\*: p<0,05) olarak hesaplanmıştır



**Şekil 3.2.** RAW 264.7 hücrelerinin 48saatlik Ceranib 2 muamelesinden sonra konsantasyona bağlı % canlılık grafiği. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak alınmıştır. IC50 değeri 35µM. (\*:  $p < 0,05$ ) olarak hesaplanmıştır.

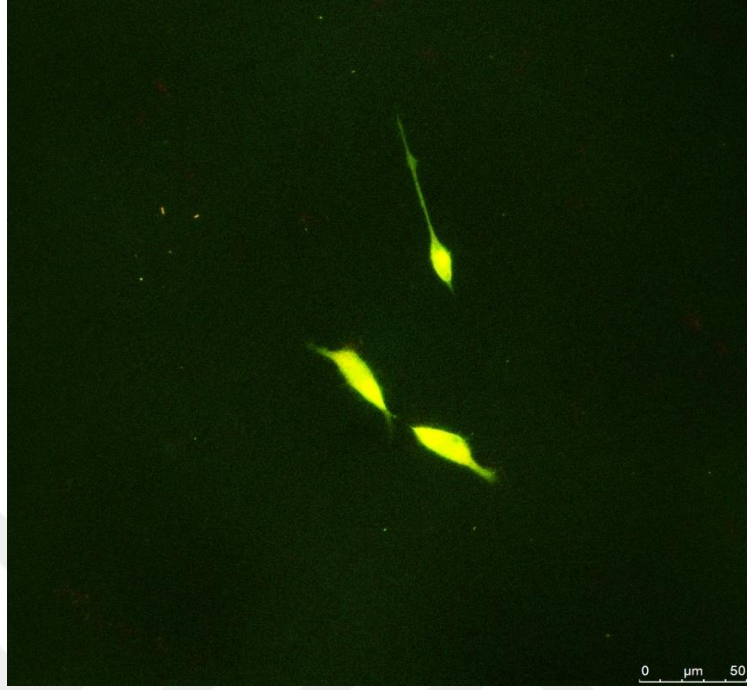
### 3.2. Konfokal Mikroskopi İnceleme Bulguları

#### 3.2.1. RAW 264.7 kontrol hücreleri morfolojik değişikliklerinin konfokal mikroskopik inceleme bulguları

RAW 264.7 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısı akridin oranj ve falloidin ile gerçekleştirilen ikili boyama sonrasında konfokal mikroskop görüntüsü Görsel 3.1.; 3.2. ve 3.3 ile gösterilmektedir.



**Görsel 3.1.** Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak gerçekleştirilen ikili boyama yapılmış RAW 264.7 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü (40x).



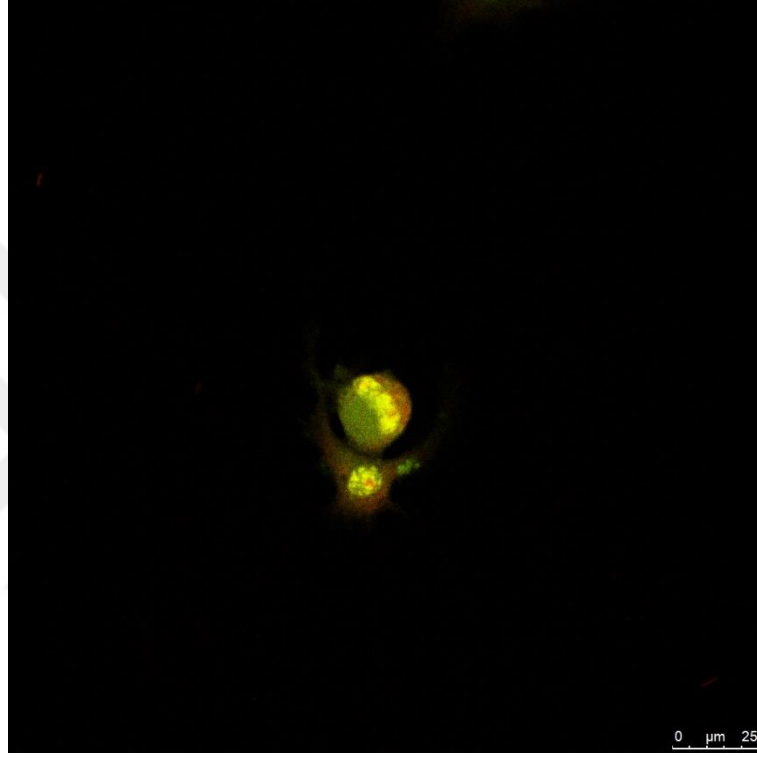
**Görsel 3.2.** Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak gerçekleştirilen ikili boyama yapılmış RAW 264.7 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü (40x).



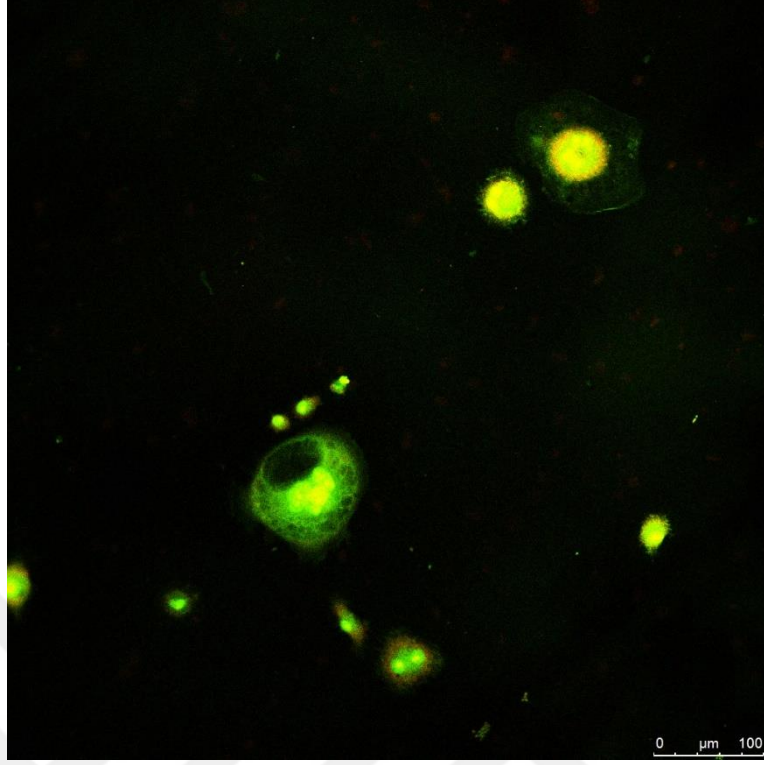
**Görsel 3.3.** Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak gerçekleştirilen ikili boyama yapılmış RAW 264.7 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsü (40x).

### 3.2.2. Ceranib 2'nin RAW 264.7 hücrelerinde sebep olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik inceleme bulguları

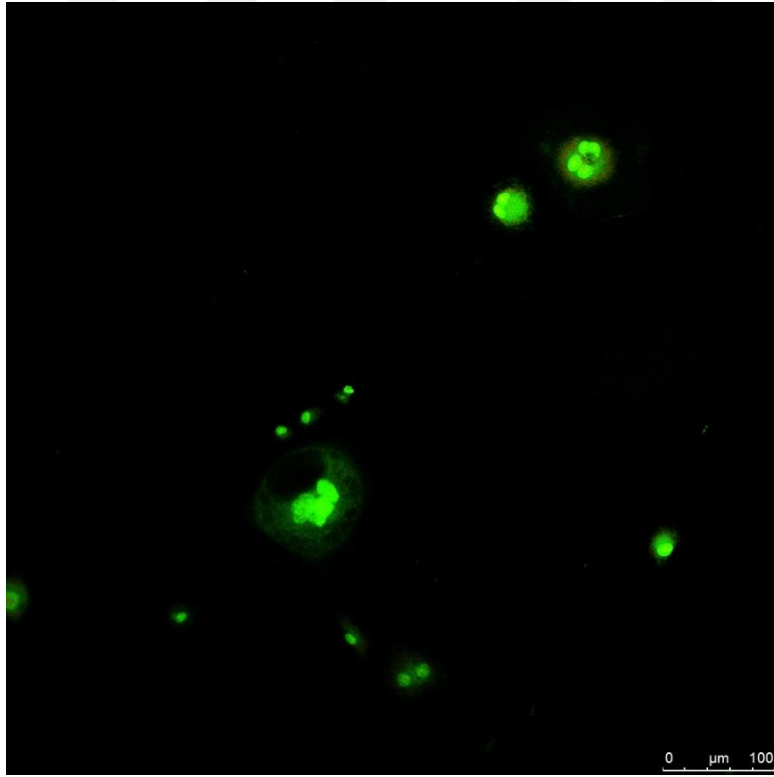
Ceranib 2'nin RAW 264.7 hücreleri morfolojik yapısında sebep olduğu değişiklikler falloidin ve akridin oranj ile gerçekleştirilen ikili boyama uygulaması sonucunda konfokal mikroskop ile incelenmiş, Görsel 3.4.; 3.5;3.6;3.7;3.8;3.9 ve 3.10 ile gösterilmiştir.



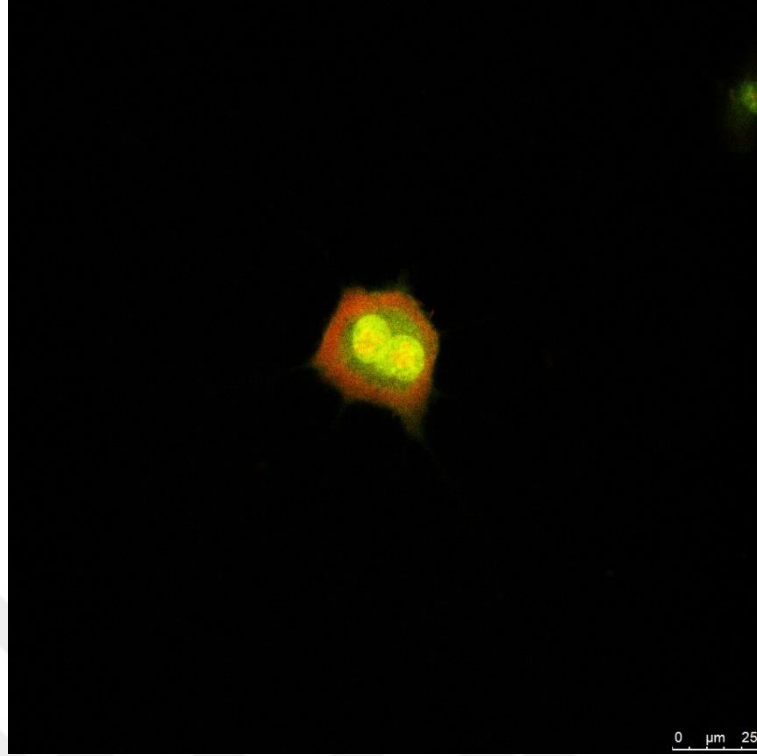
**Görsel 3.4.** Ceranib 2 nin  $IC_{50}$  konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x).



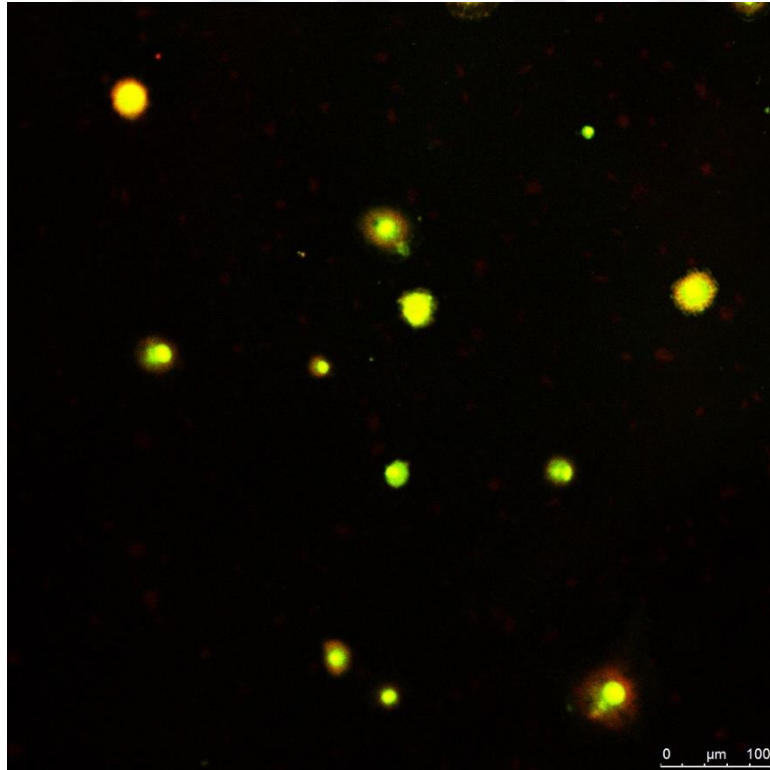
**Görsel 3.5.** Ceranib 2 nin  $IC_{50}$  konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x).



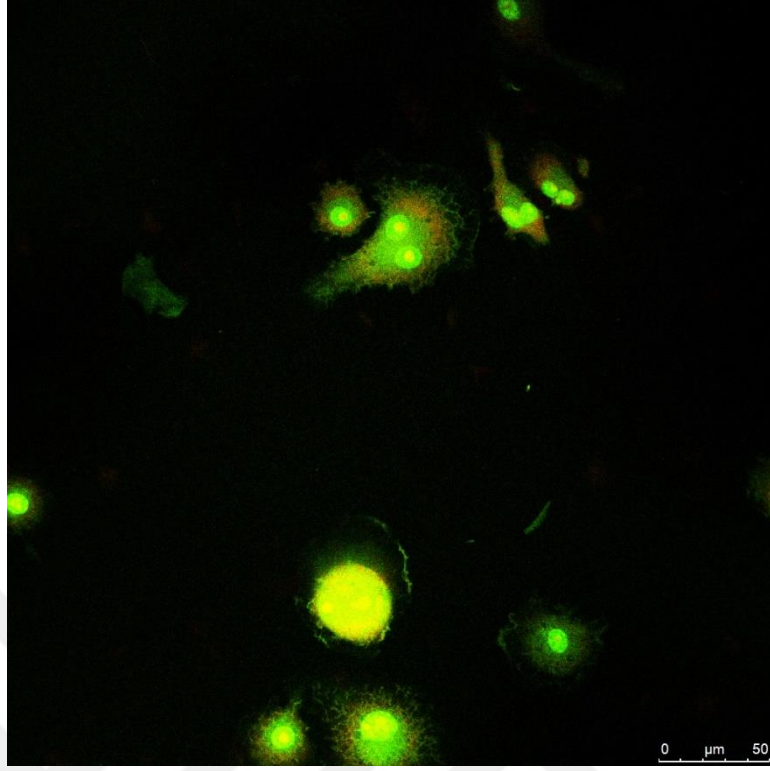
**Görsel 3.6.** Ceranib 2 nin  $IC_{50}$  konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x).



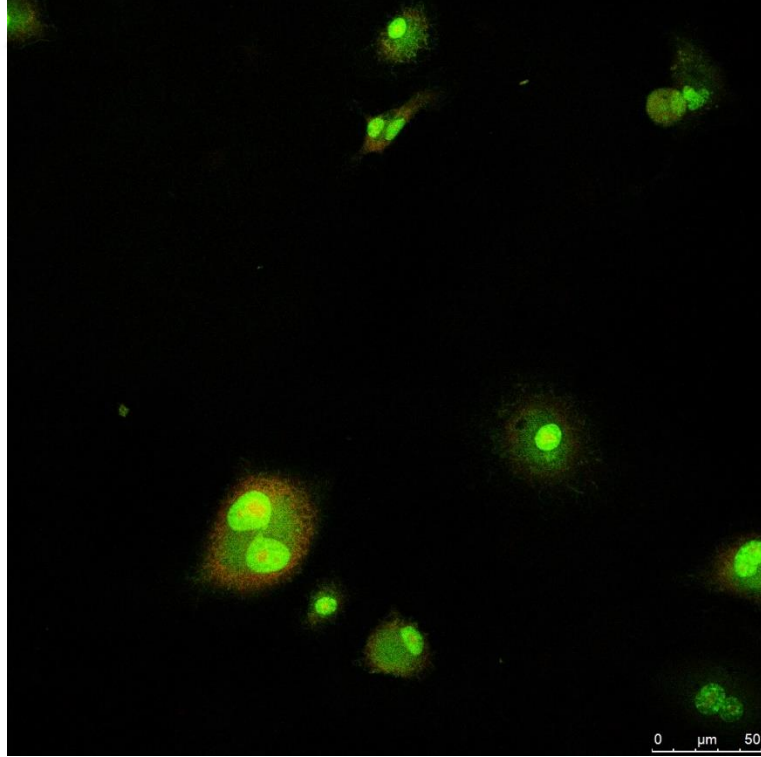
**Görsel 3.7.** Ceranib 2 nin  $IC_{50}$  konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x).



**Görsel 3.8.** Ceranib 2 nin  $IC_{50}$  konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x).



**Görsel 3.9.** *Ceranib 2 nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x).*

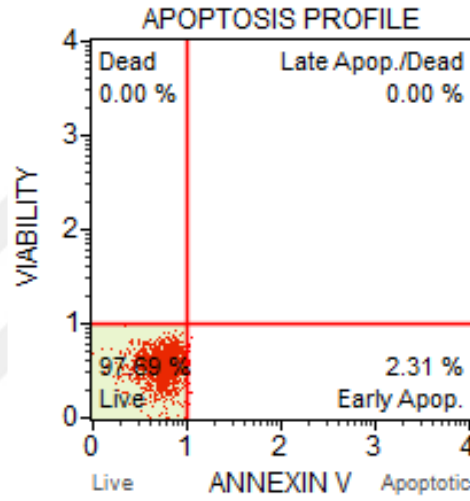


**Görsel 3.10.** *Ceranib 2 nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonuyla 24 saat muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak ikili boyaması yapılmış konfokal mikroskop görüntüsü (40x).*

### 3.3. Anneksin V uygulamasının akış sitometrisindeki bulguları

#### 3.3.1. RAW 264.7 hücrelerinin Anneksin V uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları

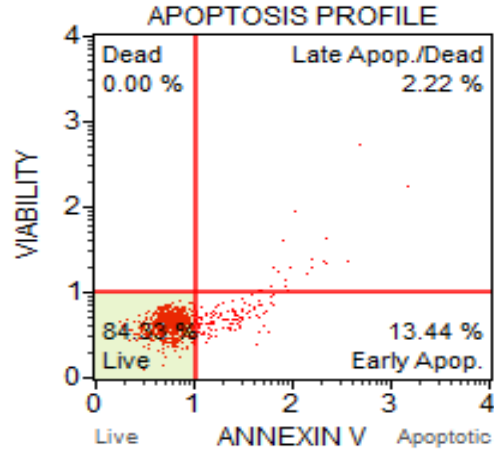
İlaçsız kontrol RAW 264.7 hücrelerinin apoptotik profili Anneksin V uygulaması ile akış sitometride incelenmiştir. Buna göre, RAW 264.7 hücrelerine ait ilaçsız grupta ölü hücreler %0,00, geç apoptotik/ölü hücreler %0,00; canlı hücreler %97,69 ve erken apoptotik hücreler %2,31 olarak bulunmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. RAW 264.7 kontrol hücrelerinin Anneksin-V boyama bulguları

#### 3.3.2. Ceranib ile muamele edilen RAW 264.7 hücrelerinin Anneksin V uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları

Ceranib in  $IC_{50}$  değerine 24 saat boyunca maruz bırakılan RAW 264.7 hücrelerinin apoptotik profili incelendiğinde; ölü hücreler %0,00 geç apoptotik/ölü hücreler %2,22 canlı hücreler %84,33 ve erken apoptotik hücreler %13,44 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Ceranib in  $IC_{50}$  konsantrasyonu RAW 264.7 hücrelerinin canlılığını %84,33'a düşürdüğü tespit edilmiştir. (Şekil 3.4)



**Şekil 3.4.** Raw 264.7 hücrelerine Ceranib-2  $IC_{50}$  değeri 24 saat uygulanmış Annexin-V boyama bulguları



#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, dünyada ülkemizde başta olmak üzere ciddi sonuçlar doğuran hastalıklarda sıralamaya giren hatta ölüme sebep olabilen, uzun süreli aktivite gösteren bir hastalıktır. Bu hastalık bulunduğu bölgeyle kısıtlı kalmayıp çevresindeki dokuları da etkilemekte ve hücre döngüsü düzenlenmesindeki kontrol mekanizmalarını negatif yönde etkilemektedir. Hemen her yaş grubunda görülebilen bu hastalığın erken evrelerinde teşhis edilmesi oldukça önemlidir. Erken evrelerde teşhis edilebilen durumlarda hücrelerde oluşan mutasyonların baskılanabileceği yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır [17]. Hücre büyüme ve bölünmesinde aktivite gösteren biyokimyasal mekanizmaların, gelişmekte olan teknoloji ve mevcut imkanlar doğrultusunda yapılan çalışmalarla kanser mekanizması arasındaki ilişki aydınlatılmaktadır. Ülkemizde dahil olduğu ve dünyada da ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yerini alan bu hastalık, araştırmacıları çevresel ve genetik faktörlerin kanseri tetikleyebileceğini gösteren çalışmalar yapmaya itmiş ve kanser oluşum ve gelişimini kontrol altına alıp incelemeye olanak sağlamıştır. Tam anlamıyla aydınlatılmamış olup popüler araştırmalar arasında, günümüzde uygulanan tedavi yöntemleri, yan etkileri, tedavi maliyetlerinin düşürülmesi ve tedaviye ulaşımın kolaylaştırılması merakla çalışılmaktadır [31].

Apoptoz organizmanın iç dengesini korumasında önemli bir etkidir. Apoptozis hasarlı hücrelerin herhangi bir enflamasyon durumu göstermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan pek çok fizyolojik reaksiyonları düzenlemektedir. Patofizyolojik reaksiyonlarda patojenlerin tedavisi, mutasyonların önüne geçilip durdurulması gibi önemli bir işlevi olan apoptozis bu yöntemle biyolojik olaylarda gereksinim duyulmayan etmenlerin hücrede iz bırakmaksızın uzaklaştırılmasını sağlamaktadır [88].

Ökaryotik hücre zarlarında yapısal rolleri bulunan sfingolipidler; sfingosin-1-fosfat, sfingomiyelin, sfingosin ve seramid gibi metabolitler de biyoaktif sinyal molekülleri olarak hücrede rol almaktadır. Apoptoziside indükleyici bu metabolitler hücrenin büyüme, farklılaşma ve yaşlanma aktivitelerinde de işlev göstermektedirler [89]. Ayrıca pek çok kanser türünde hücrenin ölümü, hücrenin hayatına devam etmesi ve hücrenin ilaca karşı direnci gibi biyolojik süreçlerde sfingolipidler önem kazanmaktadır [90]. Seramidin lipid sinyal molekülü olarak birçok hücre tipinde apoptozisi indüklediği görülmüştür. Seramidi hidrolitik aktiviteler sonucu sfingozin üreten seramidaz enzimleri,

radasyon ışınları ve çeşitli ilaçlara direnç kazanabilirler. Bu sebeple seramidaz inhibitörleri, günümüzde kanser karşıtı yeni ilaçlar olarak gelişime açtıkları [91].

Veyselova ve arkadaşları ceranib-2'nin diğer asit seramidazların antiproliferatif aktivitesine göre işlev göreceği ve sonuçta molekülün yeni bir antitümör ajan olarak sınıflandırmasında yer alabileceğini göstermişlerdir [92].

İzgördü ve arkadaşları seramidaz inhibitörlerinin meme kanserinde apoptozu indükleyerek tedavide kullanılabileceğini göstermişlerdir [93].

Aras çalışmasında kullandığı hücre hatlarını incelediğinde ceranib-2'nin kanseri baskıladığını ve kanser tedavisinde umut vaat edebilecek bir yaklaşım olduğunu belirtmektedir [94].

Danişman, nanoilaç olarak modifiye edilmiş seramidaz inhibitörleri için az miktarda ilaçla oldukça etkili bir sonucun ortaya çıkacağını böylelikle de kanser tedavisinde ilaçların zararlı yan etkilerinden koruyup daha etkili tedavi seçeneği sunacağını söylemektedir [95].

Erkasap ve Özyurt ceranib-2'nin apoptozu indüklediğini bu nedenle ceranib-2'nin anti-kanser bir rolü olabileceğini söylemektedir [96].

Özer ve arkadaşları ceranib-2'nin, çalışmalarında kullandıkları hücre hatları üzerinde büyüme önleyici ve apoptotik etkilerinin varlığını, akciğer kanser tedavisi için kombinasyon halinde kullanılabileceğini söylemektedir [97].

Vethakanraj ve arkadaşları asit seramidaz inhibitörü, ceranib-2'nin meme kanseri hücre hatlarına karşı güçlü bir terapötik ajan olduğunu raporlamıştır [98].

Bu çalışmamızda RAW 264.7 hücre hattı çoğaltılıp ceranib-2 ilacı hazırlanarak muamele edilmiştir. MTT kolorimetrik sitotoksikite testi, konfokal mikroskopi yöntemi ve Annexin V yöntemi kullanılarak değerlendirilmeler yapılmıştır.

RAW 264.7 (ATCC TIB-71), hem gevşek yapışık küboidal veya iğ şeklindeki hücrelere hem de yuvarlak canlı hücrelere sahip olacak bir monosit/makrofaj hücre hattıdır. Özellikle kültür yoğun olduğunda, hücrelerin gevşek bir şekilde bağlanması ve yığılması ve yuvarlak hale gelmesi normaldir. Yaşayan hücreler, özellikle kültür daha birleştikçe ayrılabilir ve yüzebilir. Farklı serum lotlarındaki küçük farklılıklar, bu

hücrelerin az ya da çok bağlanmasına neden olabilir. RAW 264.7, yapışkan bir çizgi olarak belirlenir ve bir tek tabaka gibi işlenir, ancak kültür karışık yapışkan ve süspansiyon popülasyonlarına sahip olabilir. Hücrelerin kültürlenmesinin ilk aşamalarında, hücreler ince uzantılarla birleşir ve küboid benzeri görünür. Kültür daha yoğun hale geldikçe, orijinal tek tabakaya eklenmiş başka bir yuvarlak hücre tabakası olabilir. Aşırı ağır kültürlerde hücreler ortama salınacaktır. Ağır kültürlerde genellikle hem bağlı hem de asılı hücreler bulunur [76].

MTT kolorimetrik sitotoksosite testinde, örnekler ceranib-2 ile muamele edilip 24 ve 48 saatlik periyotlarda inkübasyona bırakılmış ardından MTT boyası da eklenerek 4 saatlik tekrar inkübasyon süreci başlatılmıştır. Süre sonunda canlı hücrelerdeki kristallenmeyi çözmek için SDS eklenerek tekrar inkübe edilmiş ve her doz için ayrı ayrı canlılık değerleri ceranib-2 ile muamele edilmeyen kontrol grubuna göre hesaplanmıştır. Her maddenin RAW264.7 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> konsantrasyonu zamana bağlı olarak bu canlılık değerleri kullanılarak GraphPad PRISM 6.0 programı ile hesaplanmıştır.

Konfokal mikroskopi yönteminde, RAW 264.7 hücre hattında hücre içi yapılarındaki değişiklikleri inceleyebilmek için seri işlemler uygulanmış ve bu işlemleri takiben hücrelerin çekirdek morfolojilerini görüntüleyebilmek için akridin oranj, hücre iskeletlerini görünür kılabilmek için de falloidin boyama uygulanmıştır. Hücredeki morfolojik değişiklikleri gözlemlemek için konfokal mikroskop kullanılarak sonuçlar yorumlanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda kontrol grupları tek renk, eliptik ve tek lop halinde morfoloji gösterirken muamele sonrasında gruplar iki renk, küremsi, dağınık ve çok loplu olarak morfoloji göstermişlerdir.

Akış sitometri yönteminde Anneksin V proteini kullanılmıştır. Sağlıklı hücre membranının iç yüzeyinde bulunan fosfotidilserin hücrenin erken apoptoza gittiği durumlarda membranın iç yüzeyinden dış yüzeyine doğru hareket eder. Fosfotidilserine bağlanabilme özelliğinde olan anneksin V proteini, floresan özellikte bir boyar madde ile işaretlenerek apoptoza giden hücreler görünür hale getirilebilmektedir. Bir dizi işlemler yapılan hücreler karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübe edilip sonuçlar (Muse™ Cell Analyzer Merck, Millipore, Hayward, California, USA) cihazında analiz edilmiştir.

Çalışmamızda RAW 264.7 hücreleri üzerine 6 farklı konsantrasyonda ceranib-2 uygulanarak 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucu MTT yöntemiyle sitotoksosite etkisi tespit edilmiştir. Bu inkübasyon süresi sonunda ceranib-2'nin uygulandığı en düşük konsantrasyondan itibaren mitokondriyal aktivitede dozla ilişkili olarak canlılık yüzdesinde belirgin azalmalar gözlenmiştir. IC<sub>50</sub> konsantrasyonları belirlenmek amaçlı Microsoft Office Excel kullanılarak grafik hazırlanmış (Şekil 3.1., Şekil 3.2.) ve GraphPad PRISM 6.0 programı kullanılarak uygulanan konsantrasyon aralığında yüzde canlılık oranının anlamlılık değeri analiz edilmiştir.

Deneysel çalışmada makrofaj hattı olan RAW 264.7 'nin canlılık yüzdesinde uygulanan Ceranib 2'nin doz miktarı arttıkça belirgin bir azalma meydana geldiğinden, Ceranib 2'nin RAW 264.7 hücrelerinde uygulanan doz konsantrasyonuna ve süreye bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ilaçsız ve ceranib-2 ekli RAW264.7 hücrelerinin apoptotik profili anneksin V uygulaması ile akış sitometride incelenmiş ve sonuçlar kıyaslanmıştır. Her iki grupta ölü hücre gözlenmemiş, geç apoptotik/ölü hücreler ceranib-2 grubunda artış gösterirken canlı hücrelerde azalma görülmüştür (Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.). Erken apoptotik hücreler ise ceranib-2 ekli grupta artıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda ceranib IC<sub>50</sub> konsantrasyonu, RAW 264.7 hücrelerinin canlılığını düşürdüğü tespit edilmiştir.

Bu çalışma ile ceranib-2'nin RAW 264.7 makrofaj hücre hatları üzerinde apoptozu indüklediği, terapotik ajan olabileceği sonuçlarına ulaşılrken ceranib-2 üzerine daha ileri çalışmalara zemin hazırlamaktadır.

## KAYNAKÇA

- [1] De Ridder L, Mareel M. Morphology and 125I-concentration of embryonic chick thyroids cultured in an atmosphere of oxygen. *Cell Biol Int Rep.* 1978; 2:189-94
- [2] J. Hardin, G. Bertoni, L. Kleinsmith-Becker in *Hücre Dünyası-* 1785; s.15
- [3] Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol.* 2017;16(2):99–117
- [4] Stulberg, C. S., L. L. Coriell, A. J. Kniazeff, and J. E. Shannon. 1970. The animal cell culture collection. *In Vitro* 5: 1–16.
- [5] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (Eds.). Isolating cells and growing them in culture. In: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, 2002.
- [6] Markovic O, Markovic N. Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998;34(1):1-8.
- [7] Harrison RG. Observations on the living developing nerve fibers. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1907; 4:140-3.
- [8] Nardone RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell Biol Toxicol* 2007;23(6):367-72.
- [9] Koçaklı ZG, Akıllıoğlu K, Doğan A. Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü *Archives Medical Review Journal* 2015; 24(3):390-401.
- [10] Butler M, Christie A. Adaptation of mammalian cells to nonammonogenic media. *Cytotechnology.* 1994; 15:87-94.
- [11] Eisenblatter T, Psathaki K, Nitz T, Galla H, Wegener J. Cell culture media: selection and standardization. In: Lehr CM, ed. *Cell Culture Models of Biological Barriers In-Vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery.* London: Taylor & Francis; 2002:20–40.
- [12] Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion.* 2001;41(5):667-673.
- [13] Van der Valk J, Brunner D, De Smet K, et al. Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro.* 2010; 24:1053–1063.

- [14] Kim MJ, Chi BH, Yoo JJ, Ju YM, Whang YM, Chang IH. Structure establishment of three-dimensional (3D) cell culture printing model for bladder cancer. PLoS One. 2019;14(10): e0223689.
- [15] Zhang Y, Atala A. Urothelial cell culture. Methods Mol Biol. 2013; 1037:27-43.
- [16] Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5 (3), 154.
- [17] <http://bilheal.bilkent.edu.tr/aykonu/ay2005/april05/kanser.html> Erişim tarihi: 03.12.2021
- [18] Duyan, V. (2003). Hastaların Karşılaştığı Sorunlar ve Çözümleri Odağında Tıbbi Sosyal Hizmet. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 4, 39-44.
- [19] Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü. (2012). Kanser Biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 1(2), 7-18.
- [20] Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü. (2012). İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deokxyguanosine. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 5, 535-43.
- [21] Heynick, L.N. ve Johnston, S.A. ve Mason P.A. (2003). Radio Frequency Electromagnetic Fields: Cancer, Mutagenesis and Genotoxicity. Bioelectromagnetics. 6, 74-100.
- [22] Başaran, N. (tarihsiz). Çevresel Faktörler ve Kanser. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Anabilim Dalı. Şamkar, H., Yıldırım, A.G. ve Delibaş, Ö. (2016).
- [23] Determining the Risk Factors Causing Cancer with Logistic Regression Analysis. Alphanumeric Journal, 4(2),207.
- [24] Saltık, A. (2013). Kanser Epidemiyolojisi. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı.
- [25] Güran, Ş. (2005). Kanserden Korunma. Gülhane Tıp Dergisi, 47, 324-326.
- [26] Williams, G.M. (1992). DNA reactive and epigenetic carcinogens. Experimental and Toxicologic Pathology. 44, 457-64.

- [27] Yokuş, B., Akdağ, M.Z., Dasdag, S., Cakir D.U. ve Kizil, M. (2008). Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields Cause Oxidative DNA Damage in Rats. *International Journal of Radiation Biology*, 8 (10), 789-795.
- [28] Halliwell, B. ve Aruoma, O.I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species; Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS letters* 281, 9-19.
- [29] Deshpande, S.S. ve Irani, K. (2002). Oxidant signalling in carcinogenesis: a commentary. *Hum Exp Toxicol* 2, 63- 4.
- [30] Williams, G.M. ve Jeffrey, A. (2000). Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Reg. Pharmacol. Toxicol* 32, 283–92.
- [31] Pazarbaşı, A. ve Kasap, M. (2003). *Kanser Genetiği*. 12, 328.
- [32] Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, E.Y. (2002). *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık, 569-75.
- [33] Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. ve Valle, D. (2001). *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, 613-74.
- [34] Cotran, R., Kumar, V. ve Collins, T. (1998). *Robins Pathologic Basis of Disease*. In: *Cellular Pathology I: Cell Injury and Cell Death. Cellular Pathology, II: Adaptations, Intracellular Accumulations, and Cell Aging*. Philadelphia: WB Saunders Co. 238- 85.
- [35] Fearnhead, H.O. (2004). Getting back on track, or what to do when apoptosis is derailed: recoupling oncogenes to the apoptotic machinery. *Cancer Biol Ther.* 3(1), 21-8.
- [36] Yokuş, B. ve Mete, N. (2003). Oksidatif DNA hasarı. *Klinik Laboratuvar Araştırma Dergisi*. 7(2), 51-64.
- [37] Smith, M.R., Matthews, N.T., Jones, K.A. ve Kung, H.F. (1993). Biological actions of onkogenes. *Pharmacol Ther.* 2, 211-36.
- [38] Kopnin, B.P. (2000). Targets of onkogenes and tümör suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 1, 2-27.
- [39] Labazi, M. ve Phillips, A.C. (2003). Oncogenes as regulators of apoptosis. *Essays Biochem.* 39, 89-104.
- [40] Liu, D. ve Wang, L.H. (1994). Onkogenes, Protein Tyrosine Kinases, and Signal Transduction. *J Biomed Sci.* 2, 65-82.

- [41] Corn, P.G. ve El-Deiry, W.S. (2002). Derangement of growth and differentiation control in onkogenesis. *Bioessays* 1, 83-90.
- [42] Cooper, G.M. (1997). *The Cell, A Molecular Approach*, 521.
- [43] Ekmekçi, A. ve Erbaş, D. (1991). *Kanserin Moleküler Mekanizması*. 44. Ankara.
- [44] Pasternaki, J.J. (1999). *An introduction to Human Molecular Genetics*, 365.
- [45] Mange, E.J. ve Mange, A.P. (1999). *Basic Human Genetics. Second Ed*, 365.
- [46] Bates, S. ve Vousden, K.H. (1999). Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 28.
- [47] Weaver, R.F. ve Hedrick, PhW. (1997). *Genetics. Third Ed*, 482-502.
- [48] Oren, M. ve Rotter, V. (1999). Introduction: p53- the first twenty years. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 9.
- [49] Bos, J.L. ve van Kreijl, CF. (1992). In: Vainio, H., Magee, PN., McGregor DB., McMichael AJ. Eds. *Genes and Gene Products that Regulate Proliferation and Differentiation: Critical Targets in Carcinogenesis. Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. Lyon: International Agency for Research of Cancer, 57–65.
- [50] Lindsay, K., Ryland, T.E., Fox, X.L., Thomas, P., Mark, K. (2011). Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 11 (2), 138-149.
- [51] Furuya, H., Shimizu, Y., Kawamori, T. (2011). Sphingolipids in cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 30 (3-4), 567–76.
- [52] Taha, T.A., Mullen, T.D., Obeid, L.M. (2006). A house divided: ceramide, sphingosine and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758, 2027-2036.
- [53] Seelan, R.S., Qian, C., Yokomizo, A., Bostwick, D. G., Smith, D. I., Liu, W. (2000). Human acid ceramidase is overexpressed but not mutated in prostate cancer. *Genes, Chromosomes Cancer*, 29, 137–146.
- [54] Bach, A., Pizzirani, D., Realini, N., Vozella, V., Russo, D., Penna, I., Melzig, L., Scarpelli, R., Piomelli, D. (2015). Benzoxazolone Carboxamides as Potent Acid Ceramidase Inhibitors: Synthesis and Structure Activity

Relationship (SAR) Studies. *Journal of medicinal chemistry*, 58 (23), 9258–9272.

- [55] Thomas, H.B., Joseph C.C., Marrison S.T., James, S.N., and Xiang, L. (2013). Interdiction of Sphingolipid Metabolism to Improve Standard Cancer Therapies. *Advances in Cancer Research*, 117, 1–36.
- [56] Seelan, R.S., Qian, C., Yokomizo, A., Bostwick, D.G., Smith, D.I., and Liu, W. (2000). Human acid ceramidase is overexpressed but not mutated in prostate cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 29, 137-146.
- [57] Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science Therapy*, 1 (2), 1–4.
- [58] Ogretmen, B. (2018). Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 18 (1), 33–50.
- [59] Saddoughi, S.A., Ogretmen, B. (2013). Diverse functions of ceramide in cancer cell death and proliferation. *Advances in Cancer Research*, 117, 37–58.
- [60] Huang, C., Freter, C. (2015). Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 924-949.
- [61] Coant, N., Sakamoto, W., Mao, C., Hannun, Y.A. (2017). Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Advances Biological Regulation*, 63, 122–131.
- [62] Mahdy, A.E. (2009). Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation: AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Molecular Therapy*, 17, 430–438.
- [63] Diamantia, E., Bottegonia, G., Goldonia, L., Realinia, N., Pagliucaa, C., Bertozzia, F., Piomelli, D., Pizzirania, D. (2016). Pyrazole-Based Acid Ceramidase Inhibitors: Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationships. *Synthesis*, 48, 2739–2756.
- [64] Medzhitov R: Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826 (2007).
- [65] Iwasaki A, Medzhitov R: Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291–295 (2010)
- [66] Cooper MD, Alder MN: The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124, 815–822 (2006).

- [67] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397 (1997).
- [68] Janeway CA Jr, Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197–216 (2002).
- [69] Takeuchi O, Akira S: Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820 (2010).
- [70] Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373–384 (2010)
- [71] Kinchen JM, Ravichandran KS: Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 781–795 (2008).
- [72] Underhill DM, Ozinsky A: Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20, 825–852 (2002).
- [73] Underhill DM, Goodridge HS: Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* 12, 492–502 (2012).
- [74] Kanno S, Furuyama A, Hirano S: A murine scavenger receptor MARCO recognizes polystyrene nanoparticles. *Toxicol Sci* 97, 398–406 (2007).
- [75] W.C. Raschke, S. Baird, P. Ralph, I. Nakoinz Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell* Volume 15, Issue 1, September 1978, Pages 261-267.
- [76] <https://www.atcc.org/products/tib-71> Erişim tarihi: 03.12.2021
- [77] Kerr, J.F., Wylie, A.H. ve Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-257.
- [78] Hengartner, M.O., Ellis, R.E. ve Horvitz, H.R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature.*, 356, 494-499.
- [79] Andrew, G.R., Catherine, B. ve Christopher, S.P. (2001). Education and debate, What is apoptosis, and why is it important, *BMJ*, 322, 1536-1538.
- [80] Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-62.

- [81] Cooper, G.M. (1994). *Programmed cell death*. The cell. In: Cooper GM (ed), Washington: A.S.M., 14, 592-6.
- [82] Behnia, M., Robertson, K.A. ve Martin, W.J. (2000). Lung infections: Role of apoptosis in host defense and patogenesis of disease. *Chest*, 117, 1771-7.
- [83] Nguyen, V.T., Ndoye, A., Hall, L.L., Zia, S., Arredondo, J., Chernyavsky, A.I., Kist, D.A., Zelickson, B.D., Lawry M.A. ve Grando, S.A. (2001). Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *Journal of cell science*, 114(6), 1189-1204.
- [84] Gourdie, R.G. (1993). Cell biological applications of confocal microscopy. *Methods in Cell Biology*, 38.
- [85] Saygı, S. (2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(3), 291-298.
- [86] Ökçesiz, A. ve Bucurgat, Ündeğer, Ü. (2017). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 4(2), 1-14.
- [87] Terzioğlu, G., Keskin, A.Ü. ve Yanıkkaya, Demirel, G. (2013). Hücre Proliferasyon Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Turkish Journal of Immunology*, 1(3), 74-89.
- [88] Güleş, Ö. ve Eren, Ü. (2008). "Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler", Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Dergisi, 2, 73-78.
- [89] Bartke, N., Hannun, Y. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research*, 50, 91-96.
- [90] Kutlu, M., İzgördü, H., Çömlekçi, E., Sezer, C. (2019). Investigation of D-e-MAPP-derived cytotoxicity on human prostate cancer cells. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6,204-212.
- [91] Draper, J.M., Xia, Z., Smith, R.A., Zhuang, Y., Wang, W., Smith, C.D. (2011). Discovery and Evaluation of Inhibitors of Human Ceramidase. *Molecular Cancer Therapy*, 10 (11), 2052-2061.
- [92] Vejselova, D., Kutlu, H. M., Kuş, G., Kabadere, S., & Uyar, R. (2014). Cytotoxic and apoptotic effects of ceranib-2 offering potential for a new

antineoplastic agent in the treatment of cancer cells. Turkish Journal of Biology, 38(6), 916-921.

- [93] İzgördü, H., Sezer, C. V., Çömlekçi, E., & Kutlu, H. M. (2020). Characteristics of apoptosis induction in human breast cancer cells treated with a ceramidase inhibitor. Cytotechnology, 72(6), 907-919.
- [94] Aras, M. (2021). *Ceranib-2 ve miglustat inhibitörleriyle hücre içi seramid miktarının arttırılması durumunun meme kanseri üzerindeki etkisi* (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- [95] Danişman, F. (2020). Nanoilaç olarak modifiye edilmiş seramidaz inhibitörlerinin in vitro kanser hücrelerinde toksik etkilerinin ve mekanizmasının araştırılması.
- [96] Erkasap, N. İ. L. Ü. F. E. R., & Özyurt, R. (2020). Ceranib-2 HIF1- $\alpha$  gen ekspresyonunu inhibe eder ve HepG2 hücrelerinde apoptozu indükler. *Cukurova Medical Journal*, 45(4).
- [97] Yıldız-Ozer, M., Oztopcu-Vatan, P., & Kus, G. (2018). The investigation of ceranib-2 on apoptosis and drug interaction with carboplatin in human non small cell lung cancer cells in vitro. Cytotechnology, 70(1), 387-396.
- [98] Vethakanraj, H. S., Sesurajan, B. P., Padmanaban, V. P., Jayaprakasam, M., Murali, S., & Sekar, A. K. (2018). Anticancer effect of acid ceramidase inhibitor ceranib-2 in human breast cancer cell lines MCF-7, MDA MB-231 by the activation of SAPK/JNK, p38 MAPK apoptotic pathways, inhibition of the Akt pathway, downregulation of ER $\alpha$ . *Anti-cancer drugs*, 29(1), 50-60.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Osman ALGI

Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim Geçmişi:

- 2019-, Anadolu Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Endüstri İlişkileri ve İnsan Kaynakları Yönetimi, Yüksek Lisans Programı
- 2012-2017, Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Lisans)
- 2014-2016, Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi, Sosyal Hizmetler Bölümü (Önlisans)
- 2015-2016, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Pedagojik Formasyon Eğitim Programı

Ödüller:

- 2012, TÜBİTAK 2204- Araştırma Projeleri Yarışması, Sosyoloji Alanı, Ankara Bölge Birinciliği
- 2011, TÜBİTAK 2204- Araştırma Projeleri Yarışması, Sosyoloji Alanı, Türkiye Üçüncülüğü
- 2011, TÜBİTAK 2204- Araştırma Projeleri Yarışması, Sosyoloji Alanı, Ankara Bölge Birinciliği