



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**PARAQUAT İLE OLUŞTURULMUŞ OKSİDATİF
STRESİN HEPG2 HÜCRELERİNDE APOPTOZİS
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Görkem KISMALI

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tevhide SEL**

2009- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Doktora Programı

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14.07.2009



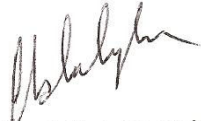
Prof.Dr. Arif ALTINTAŞ
Ankara Üniversitesi
(Jüri Başkanı)



Prof.Dr. Tevhide SEL
Ankara Üniversitesi
(Danışmanı)



Prof.Dr. Mithat BOZDAYI
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. Seyfullah HALİLOĞLU
Selçuk Üniversitesi



Prof.Dr. Hamdi UYSAL
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x

1.GİRİŞ

1.1.	Oksidatif Stres	1
1.2.	Paraquat	6
1.3.	Apoptozis	7
1.3.1.	Apoptoziste Hücre Ölümünün Aşamaları	14
1.3.1.1.	Apoptozisin Başlatılması	14
1.3.1.1.1.	Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyal Yolları	14
1.3.1.1.2.	Sitotoksik T lenfosit Aracılı Apoptozis	22
1.3.1.2.	Apoptoziste Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu	24
1.3.1.2.1.	Kaspaz İnhibisyonu	29
1.3.1.3.	Apoptoziste Hücrelerde Oluşan Diğer Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler	32
1.3.1.4.	Fagositoz	33
1.3.2.	Kanser ve Apoptoziz	35
1.3.3.	Oksidatif Stres ve Kanser	36

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.	Gereç	40
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal maddeler	40
2.1.2.	Kullanılan Sarf Malzemeler	42
2.1.3.	Kullanılan Kitler	43
2.1.4.	Kullanılan Cihazlar	44

2.2.	Yöntem	46
2.2.1.	HepG2 Hücre Kültürünün Hazırlanması	46
2.2.2.	MTT Hücre Canlılık Testi	46
2.2.3.	Hücrelerin Sayımı	47
2.2.4.	Kaspaz 3 Kolorimetrik Analizi	55
2.2.4.1.	Kaspaz 3 Testinin Prensibi ve Uygulama Yöntemi	55
2.2.5.	Kaspaz 9 Kolorimetrik Analizi	56
2.2.5.1.	Kaspaz 9 Testinin Prensibi ve Uygulama Yöntemi	57
2.2.6.	DNA Laddering Testi	58
2.2.6.1.	DNA İzolasyonu	59
2.2.6.2.	Agaroz Jel Elektroforez ve EtBr ile Boyama	60
2.2.7.	Sitokrom C Tayin Yöntemi	61
2.2.7.1.	Sitokrom C Testinin Prensibi ve Uygulama Yöntemi	62
2.2.8.	Malondialdehid Tayin Yöntemi	65
2.2.8.1.	Malondialdehid Testinin Prensibi ve Uygulama Yöntemi	65
2.2.9.	İstatistiksel Yöntem	66

3.BULGULAR

3.1.	Kaspaz 3 Sonuçları	67
3.2.	Kaspaz 9 Sonuçları	69
3.3.	Sitokrom C Sonuçları	71
3.4.	DNA Laddering Sonuçları	73
3.5.	MDA Sonuçları	75

4.TARTIŞMA

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

ÖZET

SUMMARY

KAYNAKLAR

ÖZGEÇMİŞ

ÖNSÖZ

Malign hastalıklar kontrolsüz aşırı hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının olduğu hastalıklar olarak tanımlanır. Ancak aşırı çoğalmanın yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da kanser gelişiminde rol oynadığı görülmüştür. Fizyolojik ömrünü tamamladığı halde çeşitli nedenlerle apoptozise gidemeyen hücreler kanser hücrelerine dönüşme potansiyeline sahiptir.

Apoptozis pek çok farklı yolla uyarılabilir. Bu yollar, hücre membranındaki ölüm reseptörlerinin uyarılması, büyüme faktörü eksikliği, toksinler, oksidatif stres, antikanser ajanlar, radyasyon ve hücre dışından fazla miktarda Ca^{++} iyonlarının girişi ya da endoplazmik retikulumdan Ca^{++} 'un sitoplazmaya salınması olarak sıralanabilir.

Akut oksidatif stres ile apoptozisin uyarımının sağlanması günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların etki mekanizmalarından biridir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan pek çok ilaç ROS üretimi ile kanserli hücreleri öldürmektedir. Bu nedenlerden dolayı oksidatif stres günümüzde biyomedikal alanda pekçok çalışmanın konusu olmaktadır.

Paraquat ve diquat hücrelerde süperoksid radikali ve hidrojen peroksit oluşumuna yol açarak oksidatif stres oluşturmaktadır.

Apoptoziste en önemli biyokimyasal olaylardan biri endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile DNA'nın kırılmasıdır. Bu enzim Ca^{++} ve Mg bağımlı olduğundan aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekmektedir. Enzim, DNA'yı 180-200 baz çiftlik parçalara ayırarak kırılmalar oluşturur ve jel elektroforezinde merdiven paterninin oluşmasına yol açar.

Apoptozis süresince mitokondri dış membranında geçirgenlik artışı meydana gelir. Bunun sonucunda da mitokondri iç ve dış membranı arasında bulunan sitokrom c ve diğer proteinler sitozole çıkarlar.

Apoptoziste görev alan kaspazlar ise kendi aralarında başlatıcı (kaspaz 2, 8, 9, 10, 12) ve efektör (kaspaz 3, 6, 7, 14) olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örn.; aktin, nükleer membran proteini lamin A, DNA rejenerasyonunda rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar.

Bu çalışma kapsamında, oksidatif stres kaynağı olduğu pek çok çalışmada kanıtlanmış ve kanserojen olmadığı WHO tarafından bildirilen bir molekül olan paraquatın hepatosellüler karsinom hücrelerinden HepG2 hücre hattında invitro koşullarda apoptozis üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Apoptozis belirtici olarak kaspaz 3, kaspaz 9, sitokrom c ve DNA laddering testleri kullanılmıştır.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekan Yardımcısı, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Hilal Karagül hocama, her konuda bana destek olan Biyokimya Anabilim Dalının öğretim üyelerine, katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen tez izlemem komitesi üyeleri Prof.Dr.Mithat Bozdayı ve Prof.Dr.Hamdi Uysal'a, danışmanım Prof.Dr.Tevhide Sel'e, tez çalışmam için gerekli materyali sağlamamda yardımcı olan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Cemalettin Aybay'a, doktora eğitimim süresince desteklerini her zaman hissettiğim Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlileri, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma, hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu aşamasında da desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AICD	Aktivasyonun indüklediği hücrel ölüm
AIDS	Edinilmiş immün yetmezlik sendromu
Apaf 1	Apoptozis proteaz aktive edici faktör 1
ATP	Adenozin üç fosfat
BIR	Bakuloviral apoptozis inhibitör protein
CCHL	Sitokrim c hem liyaz
crmA	Cytokine response modifier protein A
cm ²	Santimetrekare
CTL	Sitotoksik T lenfosit
CO ₂	Karbondioksit
DcR1	Tuzak reseptör 1
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DISC	Death-inducing signaling complex
DTT	Dithiothreitol
EBV	Ebstein-Barr virus
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
FADD	Fas adapter protein with a death domain
FasL	Fas ligand
FBS	Fetal sığır serumu
FLIP	Flice-inhibitory protein
GPxs	Glutasyon peroksidaz
HPV	İnsan papilloma virusu
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IAPs	Apoptozis inhibitörleri
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ICAD	DNA fragmentasyon faktör-45
ICAM	Intrasellüler adezyon molekülü
IC ₅₀	The half of maximal inhibitory concentration
ICE	Interleukin çevirici enzim
kDa	Kilodalton
Leu	Lösin
MDA	Malondialdehid
ml	Mililitre
MTT	Dimethyliazol
N	Normal
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NK	Natural killer
nm	Nanometre
OLS	Otoimmün lenfoproliferatif sendrom
PARP	poliADP-riboz fosfat
PBS	Phosphate buffered saline
pNA	p-nitro alanin
rhTRAIL	Rekombinant insan TRAIL

RCO	Reaktif karbonil bileşikleri
rhTRAIL	Rekombinant insan TRAIL
ROM	Reaktif oksijen metabolitleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SD	Standart sapma
SLE	Sistemik lupus eritematozus
SOD	Süperoksit dismutaz
sFasL	Soluble Fas ligand
sTNF	Soluble tümör nekroz faktör
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCAA	Trikoloroasetik asit
TCR	T hücre reseptörü
TNF	Tümör nekroz faktör
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TRAIL	Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
TUNEL	Terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP nick end labeling
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WFI	Water for injection
X	Ortalama
μ l	Mikro litre
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
μ M	Mikromolar
8-OHDG	8-hidroksi deoksi guanozin

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidantlar lehinde bozulması oksidatif strese neden olur	2
Şekil 1.2.	Paraquatın kimyasal yapısı	6
Şekil 1.3.	Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri	12
Şekil 1.4.	TNF ve Fas reseptör yolu	19
Şekil 1.5.	TRAIL reseptör ile sinyal iletimi	20
Şekil 1.6.	Apoptozis uyarımında intrinsik ve ekstrinsik yollar	24
Şekil 1.7.	Pro-kaspazların temel yapısı ve kaspaz aktivasyonu	25
Şekil 1.8.	Kaspaz 9 aktivasyonu ve apoptozom oluşumu	28
Şekil 1.9.	Kaspaz inhibisyonu	30
Şekil 1.10.	Kaspaz kaskadı	31
Şekil 1.11.	Ekstrinsik ve intrinsik sinyaller sonucu aktive olan apoptotik yollar	32
Şekil 2.1.	MTT'nin formazana biyokimyasal olarak dönüşümü	47
Şekil 2.2.	Neubauer lamı ile hücre sayımı	48
Şekil 2.3.	MTT hücre canlılık testi ile hücre kaplama yoğunluğunun belirlenmesi	50
Şekil 2.4.	HepG2 hücre hattında paraquat'ın IC ₅₀ değerinin belirlenmesi	53
Şekil 3.1.	İnkubasyon süresine bağlı olarak Kaspaz 3 düzeyindeki değişim	68
Şekil 3.2.	İnkubasyon süresine bağlı olarak Kaspaz 9 düzeyindeki değişim	70
Şekil 3.3.	İnkubasyon süresine bağlı olarak sitokrom c düzeyindeki değişim	72
Şekil 3.4.	DNA Laddering sonucu (6.saat)	73
Şekil 3.5.	DNA Laddering sonucu (12. saat)	74
Şekil 3.6.	DNA Laddering sonucu (24. saat)	74
Şekil 3.7.	MDA düzeyinin paraquat dozuna bağlı değişimi	75

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Programlı hücre ölümü sırasında yıkılmanan bazı polipeptidler ve kullanılan enzimler	27
Çizelge 1.2.	Nekroz ile apoptozis arasındaki farklar	34
Çizelge 2.1.	MTT hücre canlılık testi ile hücre kaplama yoğunluğunun belirlenmesi	51
Çizelge 2.2.	HepG2 hücre hattında paraquat'ın IC ₅₀ değerinin belirlenmesi	54
Çizelge 2.3.	MDA tayini için çalışma şeması	66
Çizelge 3.1.	Kaspaz 3 düzeyindeki zamana bağlı değişim sonuçları	67
Çizelge 3.2.	Kaspaz 9 düzeyindeki zamana bağlı değişim sonuçları	69
Çizelge 3.3.	Sitokrom c düzeyindeki zamana bağlı değişim sonuçları	71
Çizelge 3.4.	MDA düzeyinin paraquat dozuna bağlı değişimi	75

1.GİRİŞ

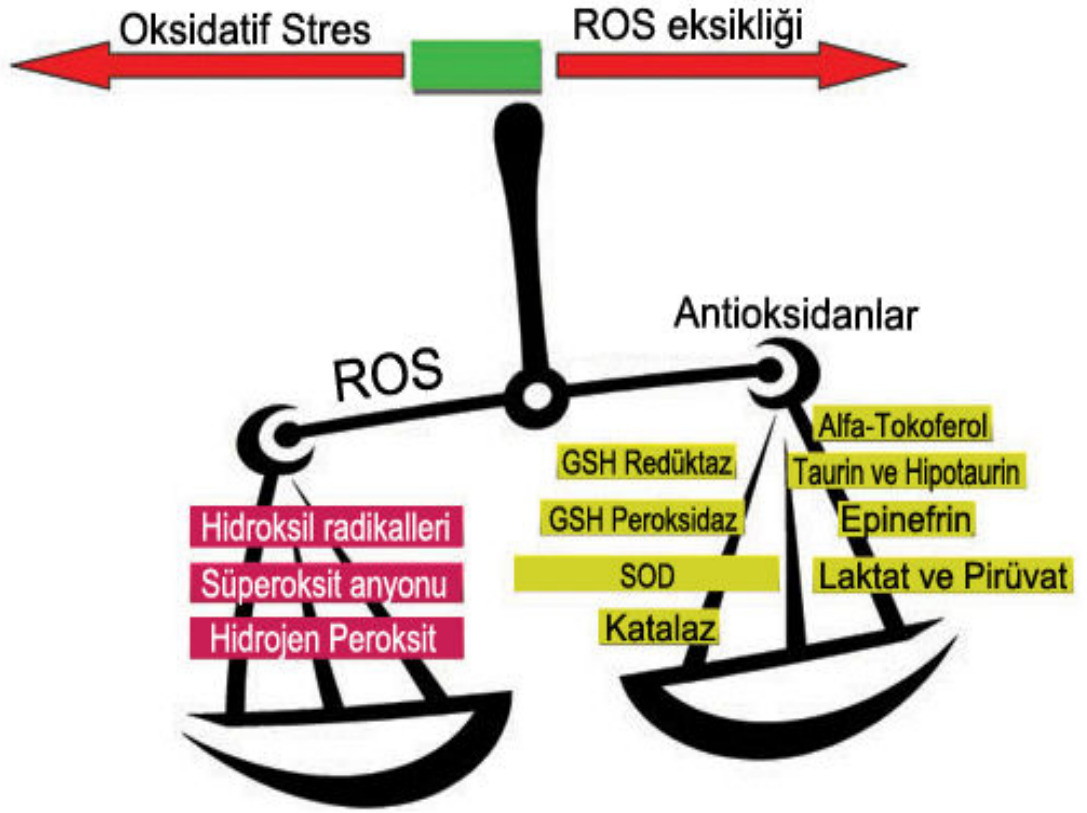
1.1.Oksidatif Stres

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen metabolitleri (ROM ya da ROS) meydana gelmektedir. Başta mitokondrial elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve yıkımlanma reaksiyonlarında ROM oluşmakta prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir (Burçak ve Andican, 2004).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Eksojen kaynaklı etmenler arasında paraquat (gramoxon), alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunmaktadır (Mercan, 2004).

Endojen kaynaklar ise mitokondrial elektron transport zinciri, endoplazmik retikulum, redoks döngüsü, araşidonik asit metabolizması fagositik hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Bütün oksijenli solunum yapan organizmalar serbest oksijen radikallerine karşı antioksidan enzim sistemi ağı geliştirmişlerdir. Bu antioksidan enzim ağı, hem ROM'lerine karşı hem de bunların yaptığı hasarı onarmaya yöneliktir. Bu enzimlerden en önemlileri; glutasyon peroksidaz (GPxs), süperoksit dismutaz (SODs) ve katalazdır (Faris ve ark.,2005). Enzimatik olmayan antioksidanlar ise; alfa-tokoferol, B-karotin, askorbik asit, melatonin, ürik asit sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, hemoglobin, ferritin, albumin, bilirubin ve glutatyondur.



Şekil 1.1. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidantlar lehinde bozulması oksidatif strese neden olur (Garrido ve ark, 2004).

ROM, direkt olarak proteinler üzerine etki ederek okside aminoasitlerin oluşumuna yol açtıkları gibi, indirekt yolla karbonhidrat ve lipidlerin otooksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif karbonil bileşiklerinin (RCO) etkisi ile de ileri glükasyon son ürünlerine (AGE) ve ileri lipoksidasyon son ürünlerine (ALE) dönüşürler (Miyata ve ark., 2002). ROM, tirozin aminoasidini direkt olarak okside ederek

ditirozin yapısını oluşturarak protein yapıda agregasyona ve fragmantasyona yol açar (Köken ve ark., 2004). Örneğin, oksidatif stresin hücre içi yapısal proteinler üzerine yıkımlayıcı etkisi sonucu kardiyomiyositlerde apoptozis görülür. Bunun sonucunda da aritmi ve endotelial fonksiyon bozuklukları görülür (Grieve ve Shah, 2003).

Çoklu doymamış yağ asitleri gibi kolay oksitlenebilen hücre bileşenlerini etkileyerek lipid peroksidasyon zincirini başlatmaları serbest radikallerin etkileşimlerine önemli bir örnektir. Lipid peroksidasyonu, membran fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece zar lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır (Niki, 1987).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan en toksik ürünler aldehidlerdir. Plazma malondialdehid (MDA) derişimi, enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksid ayrışımının bir sonucu ve göstergesidir. İki'den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda veya eikozanoid sentezinde serbestleşen siklik endoperoksitler MDA'nın asıl kaynağını oluştururlar. MDA proteinlerin amino asit gruplarına, fosfolipidlere ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterebilir. MDA difüze olabilen bir bileşik olduğundan DNA'nın azotlu bazı ile reaksiyona girebilir (Akkuş, 1995).

Lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde farklı kimyasal ve fiziksel yöntemlerin kullanılabilmesine rağmen bir poliansatüre yağ asiti oksidasyonun son basamakları sırasında endoperoksitlerin yıkılımı ile oluşan malondialdehidin (MDA) ölçümüne dayanan yöntemler tercih edilmektedir. MDA'nın tiyobarbitürik asitle pembe renkli bir ürün oluşturduğu reaksiyon hızlı, ucuz ve hassas olması nedeniyle en çok kullanılan yöntemdir (Valanzuella , 1991).

Hücre çoğalması ve lipid peroksidasyonu arasında negatif bir ilgileşim olduğuna inanılır. Örneğin, spermatozoonlar gibi hızlı çoğalan hücrelerde düşük oranda lipid peroksidasyonu görülür. Buna karşılık nöron gibi yavaş çoğalabilen (çoğu zaman çoğalamayan) hücrelerde ise yüksek oranda lipid peroksidasyonu görülmektedir (Undurti N., 2002).

Stabil bir molekül olan DNA da lipidler, karbonhidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür. DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeydeki hasar sağlıklı bireylerde de saptanabilmektedir. ROM oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır (Burçak ve Andican, 2004).

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları, şeker hasarları meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta anti-DNA antikorları oluşabilmektedir (Burçak ve Andican, 2004).

DNA'da oksidatif hasarın oluşumu iki hipotezle açıklanmıştır. "Fenton Kimyası" hipotezinde $\text{OH}^\bullet$ radikalleri DNA'ya saldırarak hasar oluşturur. O_2^- gibi H_2O_2 de doğrudan DNA'da hasar yapamaz. $\text{OH}^\bullet$ radikalinin DNA üzerinde etkili olabilmesi için DNA da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek olan $\text{OH}^\bullet$ radikalinin hücre içine difüze olarak nükleusa geçme olasılığı azdır. Olası mekanizma membranı kolayca geçebilen H_2O_2 'in nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyona girerek (Haber Weiss ve Fenton reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmasıdır. Doku kültürü ortamının Fe^{3+} ve Cu^{2+} iyon konsantrasyonunun arttırılması ile oksidatif DNA baz hasarının arttığı ve H_2O_2 'e

maruz bırakılan hücrelerde bakır ve/veya demir şelatörlerinin kullanımının DNA'daki oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir (Burçak ve Andican, 2004).

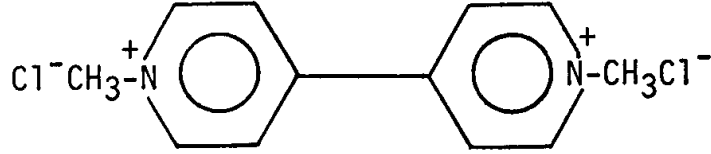
Ayrıca serbest radikallerin, nükleotid bazlarını oksitleyerek de DNA yapısında değişikliklere neden oldukları bilinmektedir. Oksitlenen bazlar, onarım mekanizması sonucu DNA yapısından kopararak idrarla atılırlar. İdrarla atılan ve bu tür oksitlenmiş baz olan 8-hidroksi deoksi guanozin (8-OHDG) miktarının ölçülmesi ile DNA hasarı hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (Frenkel, 1989).

Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi, lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını kıran antioksidan maddeler aracılığı ile gerçekleşir. Zincir reaksiyonlarının sona erdirilmesini sağlayan maddeler peroksil ve alkoksil radikalleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonu reaksiyonlarının ilerlemesini önler. Glutasyon peroksidaz, katalaz, metallerle şelat yapan proteinler gibi antioksidanlar, zincir reaksiyonların başlamasını engellerken, zincir kırıcı antioksidanlar olarak bilinen ürik asit, vitamin E ve vitamin C gibi maddeler radikalleri ortadan kaldırarak zincir reaksiyonlarının ilerlemesine engel olur (Niki, 1991).

Tokoferoller (Vitamin E) yağda çözünen ve hücre membranında bulunan en önemli zincir kırıcı antioksidanlardan biridir. Antioksidan etkisi en fazla olan formu ise α -tokoferoldür ve peroksil radikalini parçalamak için gereklidir (Noriko ve ark., 2007). Askorbik asit suda çözünen bir maddedir ve diğer suda çözünen antioksidanlar gibi plazmada bulunan radikallere karşı ilk koruyucu sistem olarak hareket eder. Membranda bulunan lipofilik karakterdeki radikallerle mücadele edemez (Halliwell ve Borish, 1989).

1.2. Paraquat

Paraquat 61 yıldır tüm dünyada kullanılan, herbisidler içerisinde en toksik olan ve çoğu ülkede kullanımı kısıtlı olmayan bir maddedir. İlk olarak 1882 yılında sentezlenmiş ve 1955 yılında herbisidal etkisi keşfedilmiştir. Şu anda Türkiye dahil olmak üzere 120 ülkede kullanılmaktadır. Son zamanlarda çevreye verdiği zararlardan dolayı 13 ülkede kullanımı yasaklanmıştır. Son olarak Malezya 2002 yılında bu maddenin kullanımını yasaklamıştır. Genellikle “Gramoxone” olarak bilinir. Sinonim adlarından bazıları ise; metyhl viologen dichlorid, 1,1'-dimethyl-4,4'-Bipyridinium dichloride, Crisquat, Dexuron, Ortho paraquat Cl, Dichloride salt of paraquat, Methyl viologen hidrat'tır. Kimyasal formülü; $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$ 'dir. Kimyasal olarak bipyridil grubunda yer alır (Anonim, 2006).



Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'nın 1984 yılında yayınladığı rapora göre paraquat karsinogenik değildir (Anonim, 2006).

Bipiridil herbisidlerin oksidatif stres oluşturma mekanizması basittir. Paraquat, NADPH'ya bağımlı indirgenme/yükseltgenme tepkimesine maruz kalmakta ve her seferinde elektronları doğurarak süperoksidi şekillendirmektedir. Akciğer dokusunda SOD bulunmaz. Bu nedenle paraquat önderliğinde şekillenen süperoksit guruplarına akciğer dokusu aşırı derecede duyarlılık gösterir. Aminotriazol gibi katalazın etkinliğini engelleyen maddeler, paraquat duyarlılığını arttırır ve hızla ölüme yol açar (Mercan, 2004). Ayrıca paraquat, yüksek miktarda reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana getirdiğinden beyin hasarına yol açar. Dopaminerjik nöronlar, reaktif oksijen metabolitlerine çok duyarlıdır (Mollace ve ark., 2003).

Paraquatın yukarıdaki mekanizma dışında sitotoksik etkisi bulunmamaktadır (Cuthbert ve ark.,1997).

1.3. Apoptozis

Apoptosis, eski Yunanca apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür (Öniz, 2004). Apoptosis ile ilgili ilk bilgiler Kerr tarafından 1971'de Journal of Pathology'de yayımlanan *Shrinkage Necrosis* başlıklı makalede yer almıştır (Kerr, 1972). Endonükleazların yol açtığı DNA kırıklarının jel elektroforezinde gösterilmesi ile apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir (Richard ve ark., 1983).

Yaşayan her hücre yaşam ve ölüm için programlanmıştır (Kerr, 1972). Ökaryotik organizmalardaki hücreler doğarlar, belli bir süre yaşarlar ve sonra ölürlər. Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Örneğin bağırsak hücreleri 3 - 5 günlük bir yaşam süresi sonunda ölürlərken epidermis hücreleri 20 - 25 gün sonunda ölürlər. Bahsedilen bu hücre ölümleri apoptosisle gerçekleşir. Zamanı gelince ölen bu hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde (programmed cell death) ölürlər. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (physiological cell death) olarak adlandırılır. Ayrıca bir şekilde DNA'sı hasarlanmış (virüs etkisi, çevresel nedenler v.b.) hücreler organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürürler (cell suicide). İşte tüm bu kavramlar apoptozisle eş anlamlı olarak kullanılabilen ve literatürde yer alan ifadelerdir (Ho ve Hawkinns, 2005). Apoptozis, istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması olarak ta tanımlanabilir, nekrozun aksine apoptozis fizyolojik bir ölümdür ve embriyolojik gelişim sırasında, doku yenilenmesinde, immun sistem rejenerasyonunda ve tümör gerilemesinde etkilidir (Osthoff ve ark., 1998).

Apoptozisin oluşmasının iki nedeni vardır:

1. Apoptozis gelişim için gereklidir; örneğin menstrasyon başlangıcında endometriumun atılması, kastrasyon sonucu prostat atrofisi, beyinde nöronlar arası haberleşme için fazlalık hücrelerin ortadan kaldırılması apoptozisle olur.

2. Apoptozis organizmayı tehdit eden yabancı etkenleri bulunduran hücrelerin yok edilmesi için gereklidir; örneğin virusla enfekte hücreler, otoimmun hastalıklara yolaçan immun sistem hücreleri, DNA'sı hasar görmüş hücreler ve kanser hücreleri apoptozisle ortadan kaldırılır (Yehhielly ve Deiss, 2000).

Çok hücreli canlıların normal gelişimleri, seçilmiş bazı hücrelerin apoptozisle ölmesine bağlıdır. İnsan embriyosunda el parmakları arasında bulunan perdeleri, buradaki hücrelerin apoptozisle ölmeleri sonucu kaybolmaktadır. Ayrıca örneğin timus involüsyonu da apoptozis sonucu gerçekleşir (Öniz, 2004). Her dakika milyonlarca hücre apoptozisle vücuttan uzaklaştırılmakta ve bunların yerine yenileri yapılmaktadır (Thompson, 1995).

Yapım (mitozis) ve yıkım (apoptosis) arasında bir denge vardır. Apoptozis hızının bozulduğu diğer bir değişle yavaşladığı ya da hızlandığı durumlarda çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaya başlar. Viral bir enfeksiyon sırasında, viruslar enfekte ettikleri hücreleri kendi yapısal proteinlerini sentezlemeye zorlarlar ve hücrenin kendi yaşamı ve çoğalması için gerekli proteinlerinin yapımını da durdururlar ya da yavaşlatırlar. Bu yüzden virusla enfekte olmuş hücrede apoptozis indüklenir ve hücre ölür. Fakat bazı viruslar örneğin Epstein-Barr Virusu (EBV) veya insan papilloma Virusu (HPV), enfekte ettikleri hücrenin apoptozise gitmesini baskılayan yollar geliştirmişlerdir. EBV, apoptozis sinyallerini kontrol eden düzenleyicilerden biri olan Bcl-2'ye benzer moleküller üreterek ve ayrıca enfekte ettiği hücrenin kendi Bcl-2 üretimini indükleyen moleküller üreterek apoptozisi durdurmaktadır. Alzheimer, Parkinson, Hutchinson, Amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarda, AIDS ve otoimmün hastalıklarda nedeni henüz bilinmeyen bir şekilde apoptozisin rol aldığı düşünülmektedir (Thompson, 1995; Henchcliffe ve Beal, 2008).

Apoptozisin önemli bir işlevi de bağışıklık sisteminin düzgün çalışmasının sağlanmasıdır. Gerek bağışıklık sisteminin gelişimi sırasında gerekse normal fonksiyonu sırasında ve yaşlanmış hücrelerin vücuttan uzaklaştırılması sürecinde apoptozis oldukça önemli rol alır. Örneğin; genç bir insanda timositlerin ancak % 2 kadarı olgunlaşma sürecine girer, geriye kalan % 98'i apoptozis yoluya ortamdan uzaklaştırılır. Bu işlem bağışıklık sisteminin sağlıklı gelişimi için gereklidir. Diğer taraftan normal bağışıklık yanıtından sonra oluşan aktivasyon ve proliferasyon sonrasında bu hücrelerin ortamdan çekilmesi de apoptozis yoluyla gerçekleşir ve bu olay aktivasyonun indüklediği hücrel ölüm (AICD) olarak adlandırılır. Bu işlem

sayesinde aktive olup proinflamatuvar sitokin üreten hücreler ortadan çekilirler. Eğer bu gerçekleşmezse sürekli aktif immun hücreler otoimmun hastalıkların oluşmasına yol açabilirler (Behcet, 1937).

Apoptozis pekçok farklı yolla uyarılabilir. Bu yollar, hücre membranındaki ölüm reseptörlerinin uyarılması, büyüme faktörü eksikliği, toksinler, oksidatif stres, antikanser ajanlar, radyasyon ve hücre dışından fazla miktarda Ca^{++} iyonlarının girişi ya da endoplazmik retikulumdan Ca^{++} 'un sitoplazmaya salınması olarak sıralanabilir (Mattson ve Chan, 2003).

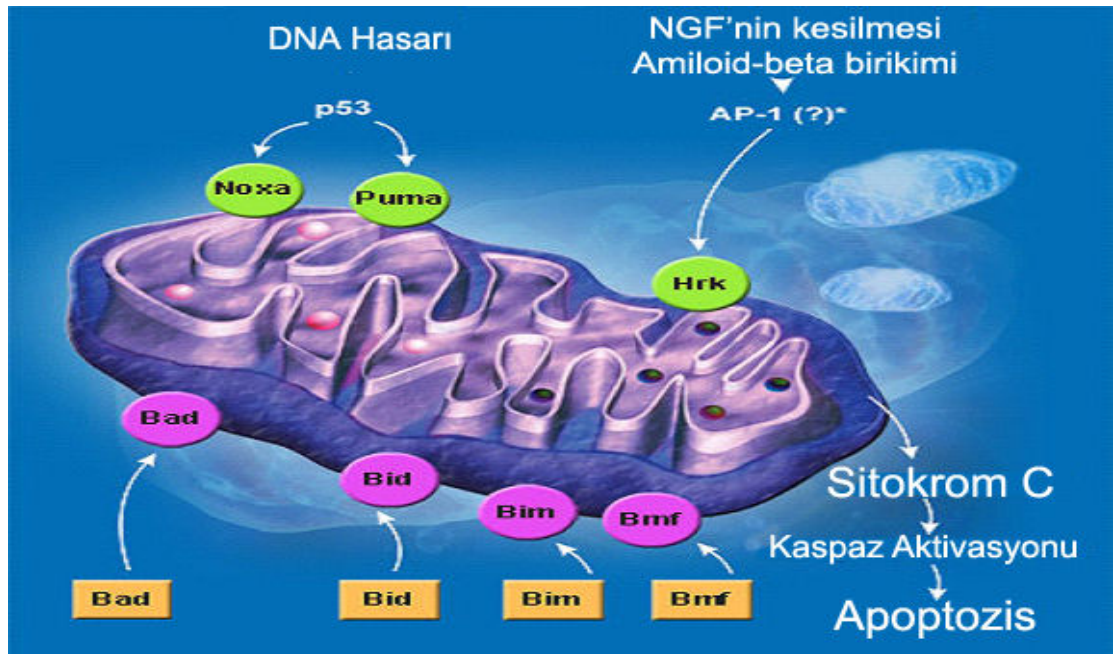
Hücrelerde apoptozise yol açan tek bir mekanizma olmamakla birlikte pek çok hücre tipinde apoptozisin erken dönemlerinde sitoplazmada iyonize kalsiyumun arttığı gözlenmiştir (Staunton ve ark., 1998). Hücre içi Ca^{++} derişimi, kalsiyum kanalları ve kalsiyum bağlayıcı proteinler ile ayarlanarak endoplazmik retikulumda (ER) depolanır. Ca^{++} , endoplazmik retikulum lümeninde serbest veya luminal proteinlere bağlı olarak bulunur. Ca^{++} , sitozolden sarkoplazmik/endoplazmik Ca^{++} -ATPaz, ATP aracılı Ca^{++} pompası konsantrasyon gradientine karşı ER lümenine Ca^{++} taşır. Sitozolik Ca^{++} derişimindeki artış kalpain'in, (Ca^{++} bağımlı sistein proteazı) aktive olmasına neden olur. Kalpainler, kalsiyum ile aktive edilmiş nötral enzimlerdir (Hanna ve ark., 2008). Bu enzimler normal Ca^{++} seviyesinde inaktif durumdadırlar fakat iskemi gibi Ca^{++} yüksek seviyede olduğu durumlarda aktive olurlar ve yapısal proteinleri yıkımlamak üzere harekete geçerler (Nakagawa ve Yuan, 2000). Apoptozis üzerine yapılan çalışmalar ilk yıllarda nükleus ve nükleusta meydana gelen değişiklikler üzerinde yoğunlaşırken son yıllarda mitokondri ve endoplazmik retikulumdan salınan Ca^{++} 'un önemi anlaşılmış, nükleustaki değişikliklerin hücrenin ölüm kararı verildikten çok sonra meydana geldiği ortaya konulmuştur (Mattson ve Chan, 2003).

Apoptozis süresince mitokondri morfolojik olarak sağlamdır. Nekrozun aksine apoptozis enerji gerektiren bir süreçtir ve mitokondrilerin sağlamlığını koruması gerekmektedir. Sadece mitokondri dış membranında geçirgenlik artışı meydana gelir. Bunun sonucunda da mitokondri iç ve dış membranı arasında bulunan sitokrom c ve diğer proteinler sitozole çıkarlar (Green, 2006). Sitokrom c, suda çözünen, hem grubu içeren bir proteindir. Ökaryotik hücrelerde iç mitokondri membranında fosfolipid kardiopilin'e bağlı olarak bulunur. Fizyolojik şartlar altında kardiopilin, sitokrom c'yi mitokondri membranına bağlar. Bu bağlanma bölgesi elektron transport zincirinin kompleks 3 ve kompleks 4 arasındadır. Kardiopilin, özel bir yapıya sahip anyonik fosfolipiddir. Bu fosfolipid yapı mitokondri membranının sağlamlığını ve akışkanlığını sağlar. Sitokrom c ve kardiopilin birbirlerine elektrostatik olarak bağlanır. Sitokrom c'nin apoptozis sırasında sitozole çıkabilmesi için bu elektrostatik bağın kopması gerekmektedir. Bu bağ ROS tarafından koparılabilir. Kısacası, sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınması iki aşamada gerçekleşir; birinci aşama mitokondri iç membranından ayrılma, ikinci aşama mitokondri dış membranında açılan porlardan dışarı çıkmadır (Farris ve ark., 2005).

Apoptozis için gerekli ve çok önemli olan sitokrom c'nin sitozole çıkması Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir. Bcl-2 ailesinde bulunan proteinler, 26 kDa büyüklüğünde, mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek çevresindeki membranlarda yerleşmiş proteinlerdir. İlk kez *C. elegans* üzerinde yapılmış genetik çalışmalarda Ced-9 adı verilen bir molekülün programlanmış hücre ölümünü engellediği bulunmuş ve Ced-9'un memelilerdeki karşılığı Bcl-2 olarak adlandırılmıştır (Thompson, 1995). Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının pro-apoptotik olduğu yani apoptozisi aktive ettiği (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), bir kısmının ise anti-apoptotik olduğu yani apoptozisi inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_L) geniş bir ailedir. Bcl-2 ailesinde pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salıverilmesini baskırlar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks) bağlıdır. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak "intrinsik" sitokrom c'nin salıverilmesini baskılama özelliğine sahiptir. Pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki

ortadan kalkar ve sitokrom c'nin mitokondriden saliverilmesi gerçekleşir. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler (Petros ve ark., 2004; Marsden ve ark., 2002). Örneğin, pekçok kanser türünde pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasında dengesizlik oluşur. Dengenin anti-apoptotik proteinler yönüne kayması kanserleşen hücrenin kontrollü olarak kendini öldürememesine neden olur. Sonuçta bazı kanser türlerinde, bu dengeyi sağlayacak yeni ilaçların geliştirilmesi tedavi seçeneği olarak görülmektedir (Fesik, 2000).

Bid, Bak ve Bax gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri normal şartlarda hücrelerde sessiz halde bulunurlar. Bu proapoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom c'nin sitoplazmaya geçmesini sağlarlar. Bid'in kırılmasına, dolayısıyla aktifleşmesine, yol açan etken kaspaz-8'in aktivasyonudur. Aktif kaspaz-8, Bid'i kırar; böylece, 15 kDa'luk bir karboksi terminal parça oluşur. Bid ayrıca diğer hücre yüzey ölüm reseptörleri olan TNF ve TRAIL aracılığıyla da aktifleşir. Bid karboksi terminal parçası Bak aracılı sitokrom c saliverilmesini de aktifleştirir (Petros ve ark., 2004).



Şekil 1.3. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri (Anonim,2005).

Apoptoziste en önemli biyokimyasal olaylardan biri de endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile DNA'nın kırılmasıdır. Bu enzim Ca^{++} ve Mg bağımlı olduğundan aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekmektedir. Enzim, DNA'yı 180-200 baz çiftlik parçalara ayırarak kırılmalar oluşturur ve jel elektroforezinde merdiven paterninin oluşmasına yol açar (Kültürsay ve ark., 2002). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılabılırken, apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve bu kırıkların onarımı hücre tarafından yapılamaz (Öktem ve ark., 2001). Nükleusta kromatin yoğunlaşır ve sonrasında DNA parçalanır. Bu DNA parçaları hücre zarı ile kaplıdır (apoptotik cisimcikler) ve bu apoptotik cisimler ortamdan fagositozla uzaklaştırılır. Yangı, ancak apoptozisin çok yoğun olduğu durumlarda, ortamda yeteri kadar makrofaj yoksa meydana gelir. Nekrozda ise pek çok endonükleaz aktive olduğundan DNA düzensiz parçalanarak merdiven paterni oluşmaz (Kültürsay ve Kayıkçıoğlu, 2002).

Apoptoziste, transglutaminaz aktivitesi artarak apoptozise giden hücrenin zarı değişikliğe uğrar ve dirençli hale gelir (Melino, 1994). Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipidtransferaz enzimi ile membranın dışına doğru göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (Öktem ve ark., 2001). Bununla birlikte hücre içi çapraz bağların sayısı artar ve hücre içeriği ekstrasellüler ortama çıkmaz (Melino, 1994).

1.3.1. Apoptoziste Hücre Ölümünün Aşamaları

1.3.1.1. Apoptozisin Başlatılması

Bir hücreye apoptozisin başlaması için öncelikle genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir hücre içi veya hücre dışı sinyal gelmelidir. DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} seviyesindeki artış, hücre içi pH sında düşme, metabolik ve/veya hücre siklusu bozuklukları gibi hücre içinden gelen sinyaller de hücreyi apoptozise götüren merkezi ölüm sinyallerini oluşturabilir (Turgut ve ark., 2006).

1.3.1.1.1. Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller

Çevresel Yaşam Sinyallerinin ve Büyüme Faktörlerinin Yetersizliği

Hücrelerin yaşamlarını devam ettirebilmeleri için çevre hücrelerden ve ekstrasellüler matriksten gelen yaşam sinyallerine, büyüme faktörlerine ihtiyaçları vardır (Hirose ve ark., 1997).

Büyüme faktörleri hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanıp sinyal iletimi olaylarını başlatarak hücre bölünmesini pozitif veya negatif yönde etkiler. Bir hücrenin yüzeyinde bulunan reseptörler bu hücrenin hangi faktörlere cevap vereceğini belirler. Böylece pozitif veya negatif uyaranlar, hücre yüzeyindeki reseptörlerin düzenlenmesinde meydana gelen dengesizlikler, hücre siklusu regülasyonunun kaybına yol açar (Güneş, 1999).

Hücre dışından gelen yaşam sinyalleri düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptozise giderler (Hirose ve ark.,1997).

Ölüm Reseptörleri Aktivasyonu

Sitokinler, hücrel düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak immün sistem hücreleri tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Hücrenin yaşamı, uygun büyüme faktörlerinin salınımı ile belirlenir. Buna rağmen bazı sitokinler bu destek faktörlerinin fazla tetiklenmesine neden olup direk olarak hücre ölümüne neden olabilir. Belli bir sitokin çeşitli hücreler tarafından farklı dokulardan salgılanır, fakat aynı biyolojik aktiviteyi gösterir. Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokal olabilir. Bazıları hormon gibi davranıp belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücrel sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki kendilerine spesifik hücre reseptörlerine bağlanırlar (Kinloch ve ark., 1999).

Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler (Hirose ve ark.,1997). Sitokinler protein yapısında olup hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanarak etki gösterirler. Yapısal özelliklerine göre; sitokin bağımlı büyüme faktörü, TNF ve helikal sitokinler olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar (Kinloch ve ark., 1999).

Önemli bir apoptotik faktör olan Fas Ligand (FasL), TNF alt grubunun bir üyesidir (Nagata ve Golstein, 1995). TNF ailesinde; limfotoksin, CD 30 ligand, 4-1BB ligand, CD 40 ligand, CD 20 ligand, OX-40 ligand ve TRAIL (TNF ilişkili apoptozisi indükleyen ligand) bulunmaktadır (Nagata ve Golstein, 1995; Nagata, 1997).

Apoptoziste rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup “Tümör Nekrozis Faktör Reseptör (TNFR)” ailesidir (Sanders ve ark.,1997). Bu ailedeki çok sayıda reseptör farklılaşma, hayatta kalma ve hücre ölümü gibi çok önemli fonksiyonlara sahiptir. Bu reseptörler yapısal olarak birbirlerine benzerlik gösterirler, fakat fonksiyonları birbirlerinden farklıdır (Klaus ve ark., 1998).

TNFR ailesi içinde apoptozis oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1'dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan parçaları, “adaptör proteinlere” bağlanırlar. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apoptozis için başlatıcı olan kaspazlara (örn.: prokaspaz 8) bağlanırlar (Sanders ve ark., 1997).

Membrana bağlı TNF ve FasL'in metalloproteinaz enzimleri ile proteoliz sonucunda membrandan ayrılan serbest hale geçen formları mevcuttur. Bu serbest formlarına, solubl TNF (sTNF) ve solubl FasL (sFasL) adı verilmektedir (Knox ve ark., 2003). sTNF ve sFasL'da apoptozisi aktive etmektedir fakat membrana bağlı TNF ve FasL'in, spesifik reseptörlerini aktive etmekte solubl formlarından daha etkili oldukları saptanmıştır (Grell ve ark., 1995).

Fas-Fas Ligand (CD95-CD95L) Aracılı Apoptozis

Bu tip apoptozis hücre yüzey reseptörü Fas aracılığı ile oluşur. Fas Ligand'ın (FasL) reseptörü olan Fas, APO-1 veya CD 95 adıyla da bilinen tip-1 membran proteinidir (Itoh ve ark., 1991; Oehm ve ark., 1992). Fas ve onun ligandı olan FasL ile apoptozisin arasındaki ilişkiler hakkındaki bilgiler otoimmün hastalığa sahip fonksiyonel Fas reseptörleri bulunmayan transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalarla 1992 yılında Watanabe R. ve ark. tarafından aydınlatılmıştır (Schulze-Osthoff ve ark., 1998). Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, FADD'la (Fas adapter protein with a death domain) birleşerek death-inducing signaling complex (DISC) ölüm başlatan sinyal kompleksini oluşturur. Bu da prokaspaz 8'in aktifleşmesini sağlar (Pole ve ark., 2002). Serum FasL düzeyindeki artış özellikle kalp hastalıklarında son zamanlarda kullanılmaya başlanan önemli bir biyolojik belirteçtir. Kalp hastalıklarının yanısıra

pekçok hastalıkta ve embriyonik gelişim sırasında serum FasL düzeyinde artış gözlenir (Braunwald, 2008).

Fas ve FasL'daki mutasyonlar otoimmunitenin oluşumunda sorumlu bulunmuştur. Otoimmuniteye yatkın özel bir transgenik fare türünde FasL karboksi terminal ucunda oluşan bir nokta mutasyonu sonucu Fas trimerizasyonunda önemli olan FasL trimerizasyonu oluşmaz, dolayısıyla normal apoptozis süreci işlemez. Fas genindeki mutasyon sonucunda otoimmun lenfoproliferatif sendrom (OLS) olarak adlandırılan ve bir kısım sistemik lupus eritematozus (SLE) benzeri tablo ile seyreden bir durum gelişir (Lehner ve Barners, 1979).

Hematopoetik tümörlerde ve melanoma'da Fas ve TNF reseptör sisteminin oldukça önemli rol oynadığı görülmüştür. Solid tümörlerde bu sistemin rolü tam olarak açıklanamamıştır fakat akciğer karsinomunda hücre yüzeyinde Fas tanımlanabilmiştir (Bronchud ve ark., 2000).

Sitotoksik T lenfositlerin tümör hücrelerini öldürmesi asıl olarak Fas aktivasyonu ile gerçekleşir fakat bunun dışında farklı mekanizmalardan da söz edilmektedir. Ayrıca Fas yolunun aktifleşmesini engelleyen dolayısıyla da tümör hücrelerin apoptozis yoluyla ortadan kaldırılmasını engelleyen faktörler de tanımlanmıştır. Örneğin, malign melanom tümör hücrelerinde FLIP (Flice-inhibitory protein, CASH, MRIT) proteini Fas aracılı apoptozisi inhibe eder (Irmiler ve ark., 1997). Ayrıca, Kaposi's sarcoma onkogenic virus associated human herpes virus-8 (HHV-8) FLIP antiapoptotik inhibitör protein viral homoloğu olan v-FLIPS'i sentezler ve bu da prokaspaz-8'in aktifleşmesi için gerekli olan FADD-ölüm reseptör kompleksine bağlanarak parokaspaz-8'in aktivasyonunu engeller ve dolayısıyla da apoptozisin inhibisyonuna neden olur (Kaufman ve Gregory, 2000).

Bazı tümör hücrelerinin, Fas-FasL ilişkili apoptozise dirençli olduğu ve bu yolla immün sistemden kaçarak çoğalmaya devam ettiği bulunmuştur. Tümör hücre membranında FasL artar, tam ters bir şekilde sitotoksik T lenfositler (CTL) ve NK hücre membran yüzeylerindeki Fas ile bağlanır ve sitotoksik hücrelerde apoptozisi tetikleyerek ölmelerine neden olur (Griffith ve Ferguson, 1995).

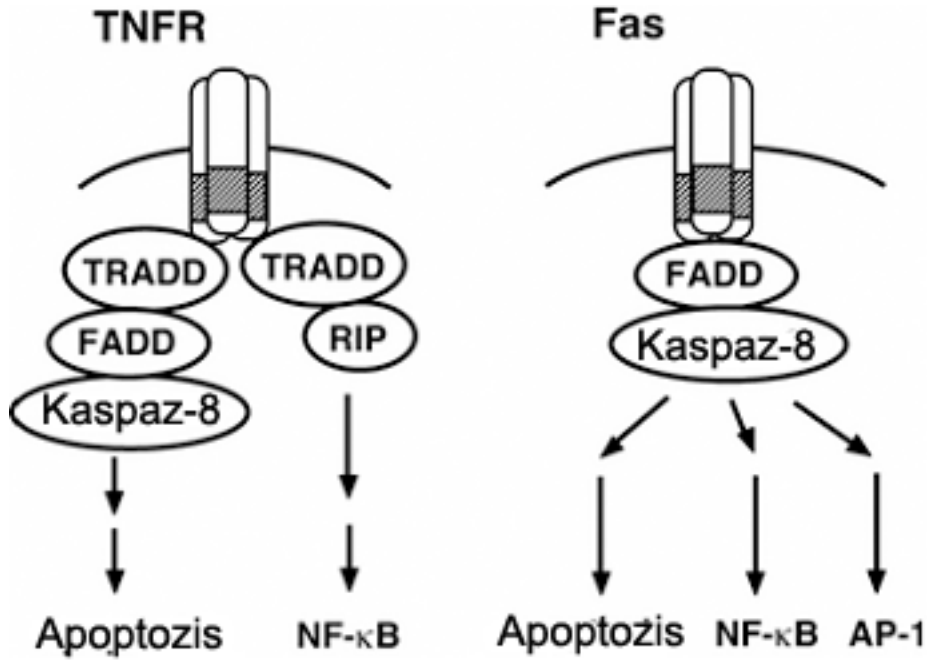
TNF Aracılı Apoptozis

Bir sitokin olan TNF'nin, TNF reseptörleri ile birleşmesi (örn. TNFR-1) sonucunda reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TRADD'la birleşerek (TNFR adapter protein with a death domain) etki gösterir. Adaptör protein daha sonra prokaspaz 8'i aktifleştirerek apoptozise neden olur (Hirose ve ark., 1997).

TNFR-1, pek çok dokuda bu sinyalin aktivasyonundan ve iletiminden sorumlu iken TNFR-2, timositlerde TNF bağımlı sinyalden sorumludur (Nagata, 1997).

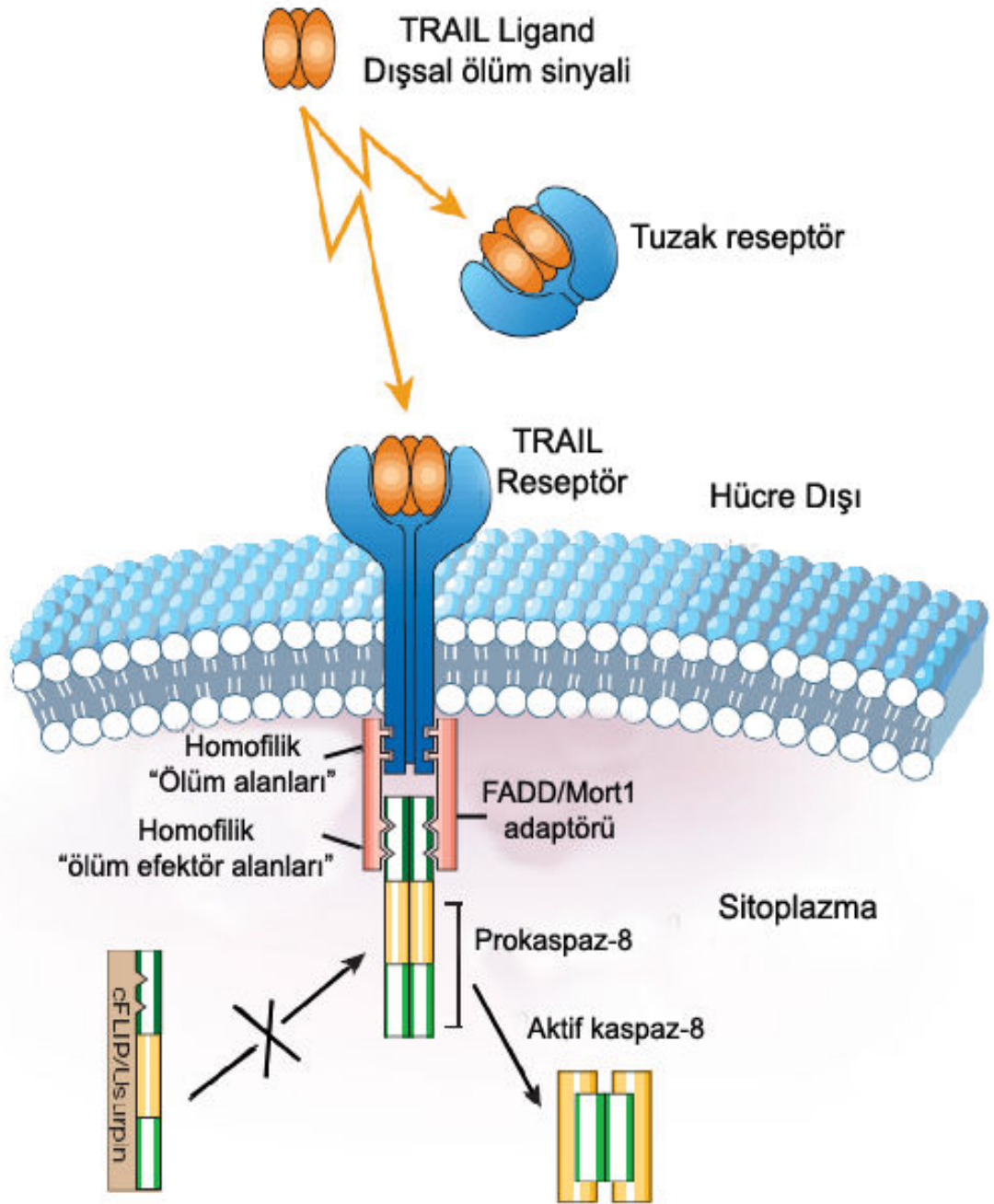
TNFR-1 ve Fas'ın sitoplazmik parçasında bulunan yaklaşık 80 aminoasitli homolog bölgeler, ölüm sinyalinin iletimini sağladıklarından (death domain) ölüm bölgeleri olarak adlandırılırlar. Bu bölgeler, FADD (Fas ile ilişkili ölüm bölgesi) veya MORT1 ve TRADD (TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgesi) olarak adlandırılır. TRADD, TNFR-1 ve TNFR-2 reseptörlerinin, FADD ise Fas reseptörünün ölüm bölgesidir (Nagata, 1997).

Kaspaz 8 aktivasyonu sonrası kaspaz kaskadı harekete geçer. TNF reseptör ailesinin diğer üyeleri de FADD ile ilişkidir ve uyarılmaları kaskadı başlatır (Bronchud ve ark., 2000) .



Şekil 1.4. TNF ve Fas reseptör yolu (Anonim, 2005)

TRAIL-R1 (DR4, APO-2) ve TRAIL-R2 (DR5) yeni bulunmuş yücre yüzey reseptörleridir. Bu reseptörlere TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) sitokini bağlanır. Her iki TRAIL reseptörü yapı ve fonksiyon olarak birbirine benzer. Bu reseptörler CD95 gibi apoptozis başlatıcı reseptörler olarak görev almaktadır (Osthoﬀ ve ark., 1998). TNF ligandından farklı olarak TRAIL sadece tümör hücreleri üzerine etkilidir, normal hücrelerde apoptozisi uyarıcı etkisi çok azdır yada hiç yoktur. TRAIL-R3 (DR1) ve TRAIL-R4 (DR2) bu reseptör ailesinin diğer üyeleridir, bu reseptörlerin uyarılması kaspaz zincir reaksiyonlarını aktifleştirmez tam tersine NF-κB aktivasyonu sağlayarak apoptozisi baskılar (Cherradi ve ark., 2003).



Şekil 1.5. TRAIL reseptör ile sinyal iletimi (Anonim, 2005).

Rekombinant human (rh) TRAIL, günümüzde potansiyel bir antikanser ajan olarak görülmektedir. rhTRAIL, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörlerini uyararak tümör hücrelerinde apoptozisi uyarmaktadır. Günümüzde TRAIL reseptörlerinin hangi doku ve organlarda yoğun olarak bulunduğu kesinlik kazanmamasına rağmen,

insan karaciğer, safra kanal epiteli, kalp kası hücreleri, kolon epiteli bu reseptörler bakımından zengin görünmektedir (Spierings ve ark., 2004). TRAIL reseptörler ile ilgili fareler ve insan hücre kültüründe yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler TRAIL tabanlı ilaç geliştirilmesinin erken dönem lenfomalarda ve geç dönem karsinomlarda etkili olabileceğini göstermektedir (McCarthy, 2008).

Hücre Yüzey Ölüm Reseptörlerinin Aktivasyonunun Kontrolü

Günümüzde hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonunu negatif yönde kontrol eden üç mekanizma tanımlanmıştır. Bu mekanizmalardan ilki, DISC aktivasyonun önlenmesidir. Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile başlayan apoptozisin engellenmesinde görevli pekçok endojen inhibitör tanımlanmıştır. Bu inhibitörlerden en önemlisi viral proteinler ailesinden olan FADD-like ICE (vFLIPs)'dir ve DISC oluşumunu engelleyerek apoptozisin başlamasını engeller. İkinci mekanizma TRAIL için tuzak reseptörlerin ekspresyonudur. Bu tuzak reseptörler TRAIL reseptörlere büyük benzerlik gösterir. Fakat bu reseptörlerin hücre içi uzantıları yoktur. Günümüzde çeşitli tipte tuzak reseptörlerin varlığı tanımlanmıştır. Bunlardan tuzak reseptör 1 ve 2 (DcR1-2) TRAIL ligantı için spesifikite gösterirken tuzak reseptör 3 (DcR3) Fas ligandına bağlanır ve bu ligandın reseptöre bağlanmasını engeller. Üçüncü mekanizma ise doğrudan başlatıcı kaspazların proteolitik aktivitesini engellemektir. Örneğin, viral protein crmA, prokaspaz-8 'in güçlü bir inhibitörüdür (Budihardjo ve ark., 1999).

1.3.1.1.2. Sitotoksik T lenfosit (CTL) Aracılı Apoptozis

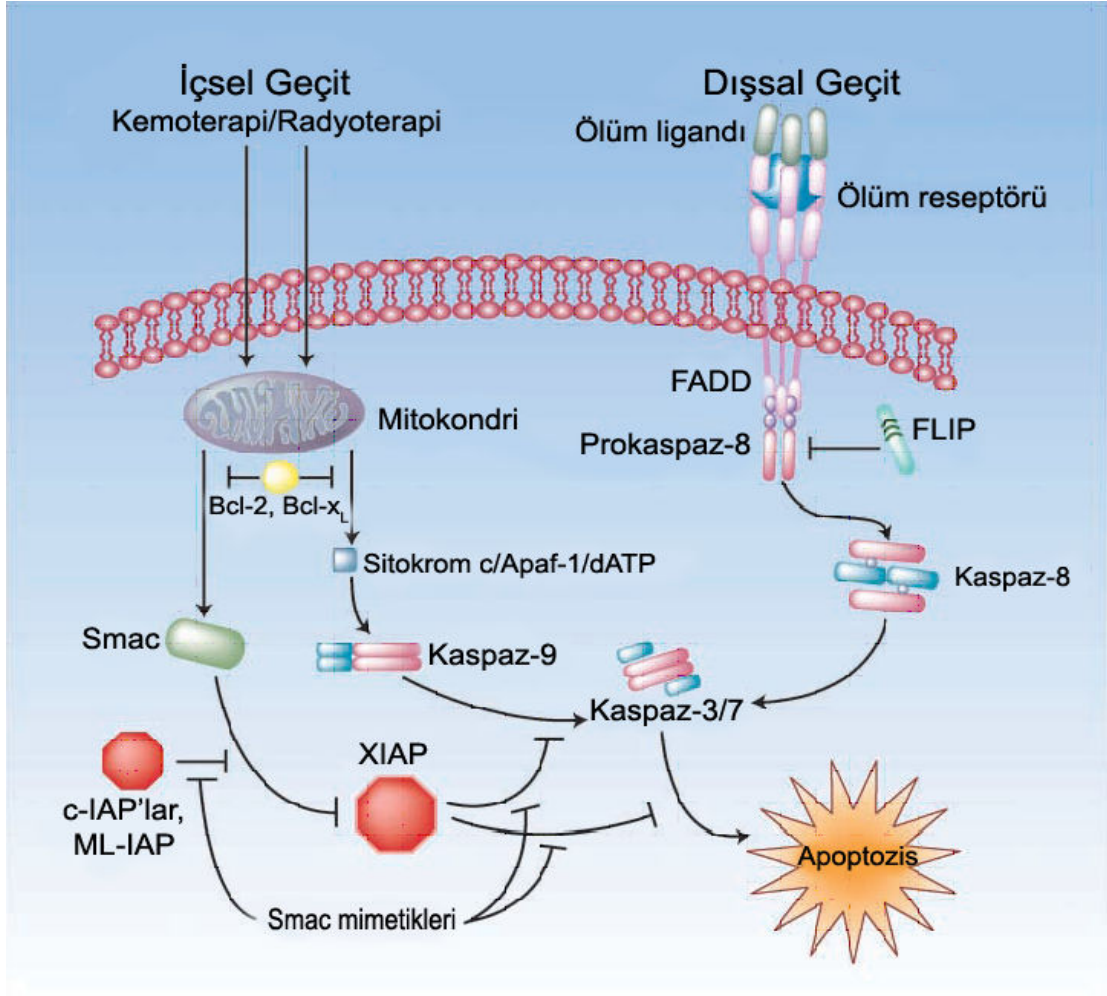
Bütün viruslar ve bazı bakteriler hücre içinde yaşarlar ve bu nedenle endojen antijen olarak nitelendirilirler. Bu tip enfekte hücreler sitotoksik T lenfositler tarafından etkisiz hale getirilirler. Sitotoksik T hücreleri ayrıca, yabancı organ transplantlarında ve kanser hücrelerine karşı aynı etkiyi gösterirler. Sitotoksik T lenfositleri sitoplazmalarında iki tip granül taşırlar. Tip 1 granüller elektron yoğun, Tip 2 veziküler yapıdadır. Tip 1 granüllerde perforinler ve granzimler olmak üzere iki grup molekül bulunur. Sitotoksik T lenfositleri hedef hücreleri bu moleküller aracılı ile yani perforin yolu denilen mekanizmayla öldürürler. Bu hücreler ayrıca otoreaktif timositleri Fas (CD95) yolu denilen mekanizma ile apoptozise uğratırlar (Diker, 1998).

Sitotoksik T lenfositleri CD8 yüzey molekülü taşıırken CD4 bulundurmazlar, bu nedenle “CD4-CD8+” olarak kodlanırlar. Antijenle temas etmeden önce naif CD8+ T hücreleri olarak bulunurlar. CD8+ T hücrelerinin sitotoksik T lenfositler haline dönüşebilmesi için iki önemli uyarımı alması gerekir. Bunlardan birincisinde; anormal hücreler veya dendritik hücreler tarafından MHC sınıf 1 ile sunulan endojen antijenler, CD8+ T hücrelerindeki TCR (T cell receptor)’lere bağlanır. Sitotoksik T lenfositlerin aktivasyonunu sağlayan en önemli ikinci faktör interlökin 2 (IL-2) dir. Uyarılan sitotoksik T lenfositler hedef hücreye önce nonspesifik adhezyon molekülleri ile bağlanırlar. Bu bağlantıyı sitotoksik T lenfositli lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) ve hedef hücredeki intrasellüler adezyon molekülü (ICAM) gerçekleştirir. Spesifik bağlanma ise TCR ve CD8 molekülü ile hedef hücre üzerindeki MHC-peptid kompleksine bağlanması ile gerçekleşir. Bağlanmanın tamamlanması ve aktivasyonun tam olarak gerçekleşmesinden sonra hedef hücrede apoptozis üç yolla gerçekleştirilir; perforin yolu, Fas (CD95) yolu ve Tümör nekroz faktör-beta (TNF-beta) yolu. Perforin, sitotoksik T lenfositler içerisinde granüllerde bulunan salgılanmaya hazır serin protezlardır. Hedef hücre membranının lipid tabakasında polimerleşerek silindir şeklinde porlar açarlar. Granzimler, perforinlerin açtıkları porlardan hücre içine girerler ve hızla hücre içi

Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırıp endonükleazları aktive edip apoptozisi başlatırlar. Fas (CD95) yolunda ise aktive olmuş sitotoksik T lenfosit membranında bulunan FasL (CD95L), hedef hücre membranındaki Fas'a bağlanıp apoptozisi başlatır. TNF-beta, sitotoksik T lenfositler tarafından salgılanan ve FasL'ye benzer şekilde etki eden bir sitokindir, antijenik uyarıyı takiben salgılanır (Diker, 1998).

T ve B lenfositlerlerdeki sitokin yetersizliğinde hücreler apoptozisle ortadan kaldırılabilir. Hücrel immun red ve graft versus host reaksiyonlarında sitotoksik T lenfositleri aracılığıyla apoptozis oluşmaktadır. Pankreas, parotis ve böbrek gibi organlarda kanal tıkanıklıklarına bağlı gelişen atrofilerde, viral hepatit gibi çeşitli viral hastalıklarda, hücrelerdeki hasarlanma durumlarında (ısı, radyasyon, antikanser ajanlar, hipoksi vb.) ve yaşlılıkta apoptozis izlenmektedir (Turgut ve ark., 2006).

Hemen hemen tüm hücrelerde iyonize radyasyon, sitokinler, reaktif oksijen türleri, redoks potansiyelinde değişimlerin olması, büyüme faktörlerinin ya da trofik faktörlerin ortadan kalkması ve mekanik stres apoptozisi uyatabilmektedir. Antioksidan enzimlerin azalması, apoptozisin uyarılmasından sorumlu hücrel reaktif oksijen radikallerinin artışına neden olabilmektedir (Kültürsay ve ark., 2002).

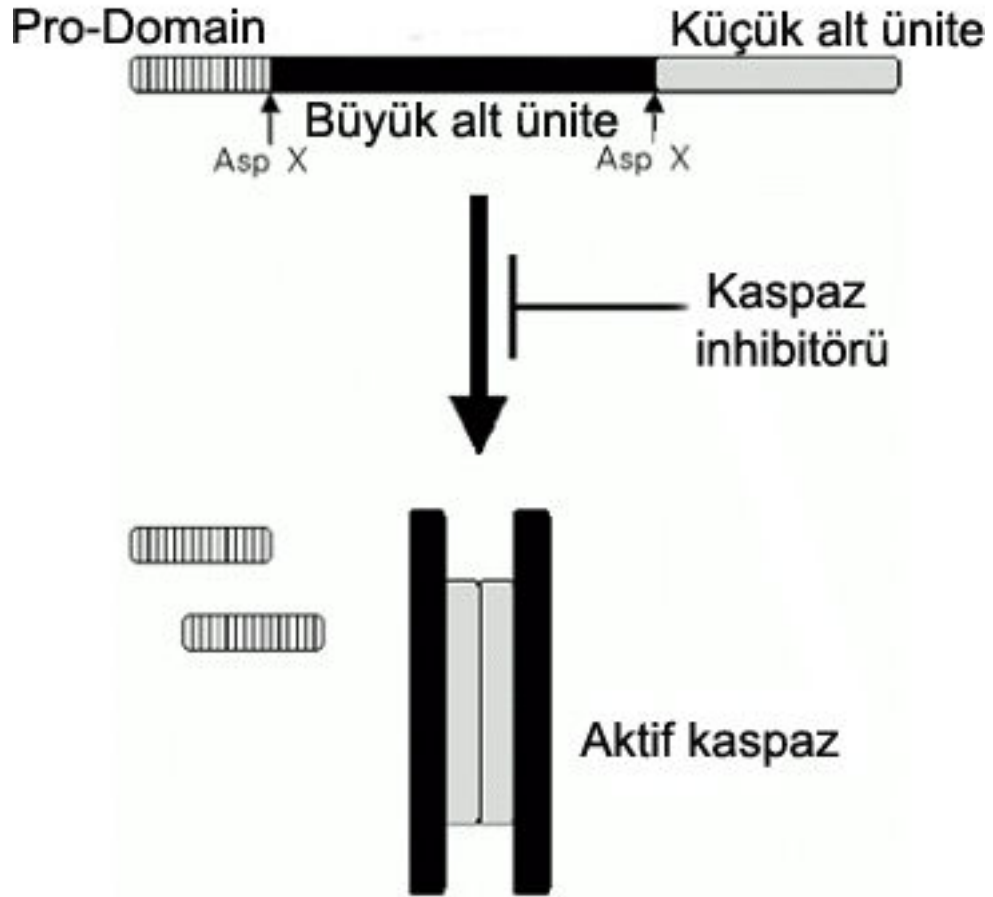


Şekil 1.6. Apoptozis uyarımında intrinsik ve ekstrinsik yollar (Vucic ve Fairbrother, 2007).

1.3.1.2. Apoptoziste Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu

İç ve dış sinyallerle hücre içindeki bir grup proteaz aktive olur ki bunlara kaspaz (caspase=cysteine-containing aspartate specific protease) adı verilmektedir. İlk kaspaz tanımı 1992 yılında yapılmıştır ve interleukin-1 β converting enzyme (ICE) olarak adlandırılmıştır, günümüzde bu ilk tanımlanan moleküle kaspaz-1 adı verilmektedir. Kaspazların ilk bulunan fonksiyonu inflamasyondaki görevleridir. Daha sonra *C.elegans* üzerinde yapılan çalışmalar sonucu kaspazların hücre ölümünde yönetici moleküller olduğu ortaya konulmuştur. Kaspazlar sistein proteazlarıdır ve inaktif zimojen formda sentezlenirler. N-terminal prodomain'i

20 kDa'luk büyük altünite ve yaklaşık 10 kDa'luk küçük altünite takip eder. Prokaspazların çoğunda küçük ve büyük altüniteleri birbirine bağlayan kısa bir bağlayıcı sekans bulunur (Kumar, 2007).



Şekil 1.7. Pro-kaspazların temel yapısı ve kaspaz aktivasyonu (Anonim, 2005).

Zimojen şeklinde bulunan kaspazların aktivasyonu iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlar otokatalitik süreç ve aktif kaspazlar tarafından gerçekleştirilen proteolizistir (Thornberry ve Lazebnik, 1998). Kaspaz prekürsörlerinin olgun ve aktif kaspaz haline dönüşebilmesi için en az iki bölünmeye ihtiyacı vardır. Birinci reaksiyonda prodomain büyük altüniteden ayrılır bu ayrılmayı büyük ve küçük altünitelerin birbirinden ayrılması izler. Bu ünitelerin birbirinden kopması hep Asp-X bağlarının kopması ile gerçekleşir (Earnshaw ve ark., 1999).

Günümüze kadar 14 adet kaspaz tanımlanmıştır ve çoğu apoptoziste rol almaktadır. Kaspazlar omurgalı hayvanlardan nematodlara kadar pekçok farklı türde tanımlanmıştır ve tüm kaspazlar yapısal olarak birbirine büyük benzerlik gösterir. Buna rağmen her kaspazın kendine spesifik substratı bulunmaktadır (Hengartner, 2000). Hücrelerdeki pek çok proteaz alt düzey organizasyonda görevlidir ve substrat spesifitesi çok yüksek değildir. Buna karşın kaspazlar olağanüstü seçici enzimlerdir. Apoptozis sırasında özellikle hücre iskeletini oluşturan proteinlere, nükleus içerisindeki proteinlere ve hücre sinyal iletiminden sorumlu proteinlere saldırarak onları yıkımlarlar (Earnshaw ve ark.,1999; Li ve Juan, 2008). Bu yıkımlama büyük ölçüde tetra peptid tanıma alanı yoluyla olmaktadır, burada C-uçta yer alan aspartat atığı üzerinden kesme gerçekleşir. Kaspazlar tipik olarak tatra peptitleri bu bölgede tanınırlar, bölgeler C den N ya doğru numaralandırılır (P4-P3-P2-P1). P1 bölgesinde kesin olarak aspartata gereksinim duyarlar. Ayrıca P4 pozisyonu da substrat spesifikliğı için gereklidir. P4 pozisyonunda; Grup 1 de yer alan insan kaspaz 1, 4, 5 enzimleri çok fazla hidrofobik ve aromatik aminoasit atıklarını yapısında içerirler, bu aminoasitler Tyr, Trp veya Leu dir. Grup 2 yi oluşturan kaspazlar 2, 3, 7 P4 pozisyonunda Asp ve P3 pozisyonunda Glu artıklarını tercih ederken, grup III enzimleri 6, 8, 9, 10 P4 pozisyonunda artıkları olan Ile, Leu veya Val'i tercih ederler (Meller ve ark., 2002).

Çizelge 1.1. Programlı hücre ölümü sırasında yıkılan bazı polipeptidler ve kullanılan enzimler (Earnshaw ve ark., 1999).

Polipeptid (substrat)	Sorumlu Kaspaz	Etki
B-Catenin	Kaspaz 3	α -Catenin bağlanmasında azalma ve hücreler arası bağlantıların zayıflaması
Lamin A	Kaspaz 6	Nükleer lamina parçalanması
Lamin B ₁	Kaspaz 6 ve 3	Nükleer lamina parçalanması
PARP	Kaspaz 3,7,9	poliADP-riboz sentezinde azalma
Topoizomerez 1	Kaspaz 3	Bilinmiyor
PKC δ	Kaspaz 3	Aktif kinaz yapısına azalma
Pro-interlökin 1- β	Kaspaz 1	İnflamasyonda anahtar rol alır
Pro-interlökin 16	Kaspaz 3	T lenfosit kemotaksisi
Bcl-2	Bilinmiyor	Proapoptotik fragmentlerin oluşturulması
Bcl-X _L	Kaspaz 1,3	Proapoptotik fragmentlerin oluşturulması
FLIP _L	Kaspaz 3,8,10	Bilinmiyor
Bid	Kaspaz 8	Proapoptotik fragmentlerin oluşturulması
ICAD	Kaspaz 3	Aktif CAD nükleazın serbestleşmesi

Kaspazların sınıflandırılması çeşitli yöntemler vardır. Sınıflandırma genellikle kimyasal yapıya, fonsiyonuna yada spesifik olduğu substrata göre yapılır. Fonsiyonlarına göre yapılan sınıflandırmada temel olarak inflamasyonda görev alanlar ve apoptoziste görev alanlar olarak iki grup oluşturulmuştur. Apoptoziste görev alan kaspazlar ise kendi aralarında başlatıcı (kaspaz 2, 8, 9, 10, 12) ve efektör (kaspaz 3, 6, 7, 14) olarak alt gruba ayrılmıştır (Ho ve Hawkinns, 2005).

Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örn.; aktin,nükleer membran proteini

lamin A, DNA rejenerasyonunda rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Hücre içi sinyallere bağlı başlayan kaspaz kaskadı, sitokrom c'nin mitokondri membranından sitozole saliverilmesi ile başlar ve bu olayla kaspaz 9 aktifleşir (Lavrik ve ark., 2005). Hücre dışından gelen etkiler de kaspaz kaskadını başlatabilir Hücre membranında bulunan TNF ve Fas reseptörlerinin uyarılması kaspaz 8'i aktive eder ve kaspaz yolunu başlatır (Tait, 2008).



Şekil 1.8. Kaspaz 9 aktivasyonu ve apoptozom oluşumu (Anonim, 2005) .

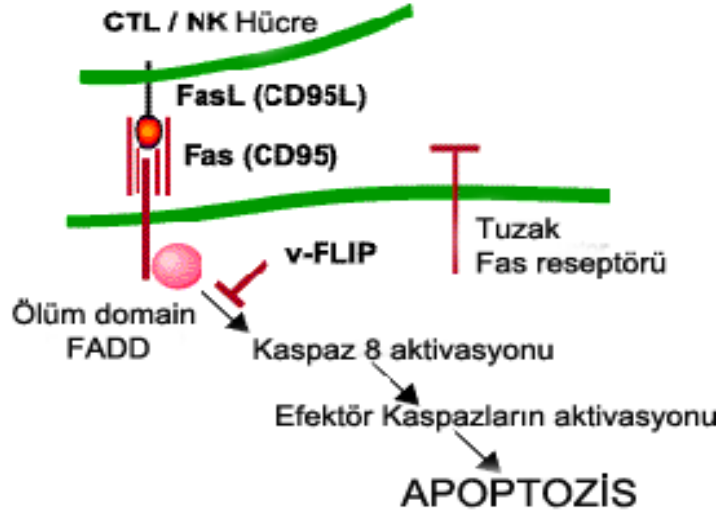
Kaspazlar apoptozis dışında hücrenin çoğalmasında, farklılaşmasında ve hayatta kalmasında da görevlidir. Örneğin, kaspaz-1 sitokin maturasyonunda ve NF- κ B aktivasyonunda, kaspaz-8 T lenfositlerin çoğalmasında ve monositlerin makrofajlara farklılaşmasında, kaspaz-11 proinflamatuvar sitokinlerin

maturasyonunda, kaspaz-14 keratinositlerin son aşama farklılaşmasında görevlidirler. Birçok çalışma göstermiştir ki özellikle kaspaz-8 immun sistem hücrelerinin farklılaşmasında çok önemli role sahiptir. Kaspaz-8 aktivasyonunun gerçekleşmediği, gen mutasyonuna sahip hastalarda T lenfositlerde, B lenfositlerde ve NK hücrelerinde çoğalmada bozukluklar tesbit edilmiştir (Lamkanfil ve ark., 2007) .

1.3.1.2.1. Kaspaz İnhibisyonu

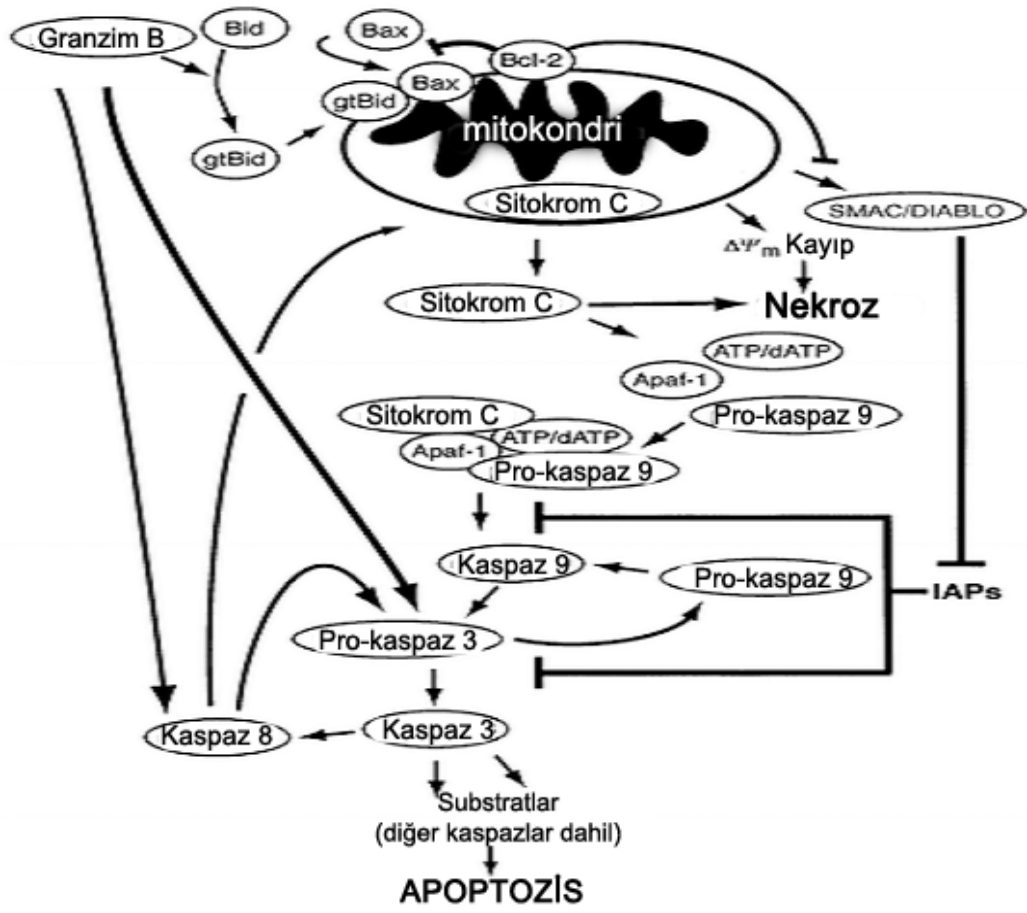
Kaspaz aktivitesi bazı diğer hücre içi proteinler tarafından inhibe edilebilir. Bu inhibisyon mekanizmalarından biri IAPs (inhibitors of apoptosis) aracılıdır. IAPs benzeri proteinler ökaryotik hücrelerin hepsinde sentezlenirler. Bu proteinlerin ortak özelliği 1 ya da 3 bakoluviral apoptozis inhibitör protein (BIR) tekrarı içermeleri ve C-terminal uçlarında RING-finger motifi bulundurmalarıdır (Ho ve Hawkinns, 2005). IAP ailesi içerisinde insan hücrelerinde tanımlanan proteinler NAIP, cIAP1/HIAP-2/hMIHB, cIAP2/HIAP-1, XIAP/hILP olarak isimlendirilmiştir (Quinn ve ark. 1998). IAPs etkisi başlatıcı ve efektör kaspazlar farklılıklar gösterir (Ho ve Hawkinns, 2005). Kaspaz 3 ve Kaspaz 7'nin bir apoptozis inhibitör protein olan XIAP tarafından inhibe edilmesi için BIR1 ve BIR2 arasına bağlanması gerekirken kaspaz 9 inhibisyonunda BIR3 bölgesine bağlanır. Kaspaz 9 aktivasyonunun düzenlenmesinde mitokondrial proteinler olan Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi'da rol alır (Sun ve ark., 1999). Smac/DIABLO apoptozis sırasında mitokondriden salınır ve apoptozisin devamlılığı için önemlidir. Bazı tümör hücrelerinde IAPs moleküllerinin sentezi normalden fazladır ve Smac/DIABLO'ya bağlanarak etkinliğini durdurur. Bunun sonucunda da hücre kendini öldüremez ve kanserleşme hızla devam eder. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Smac/DIABLO yapısını taklit eden moleküllerin üretilmesi ve kanser tedavisinde kullanılması önem kazanmıştır (Petersen ,2007; Srinivasula ve ark., 2001).

Kaspaz 8 aktivitesi FADD-like ICE (FLICE)-inhibitory proreinler (FLIPs) tarafından kontrol edilir. Pekçok virus FLIPs proteinlerini sentezleme yeteneğindir. Böylece hücre içerisine girdiğinde hücrenin organizmayı korumak amacıyla apoptozise gitmesini engeller (Thome ve ark., 1997).

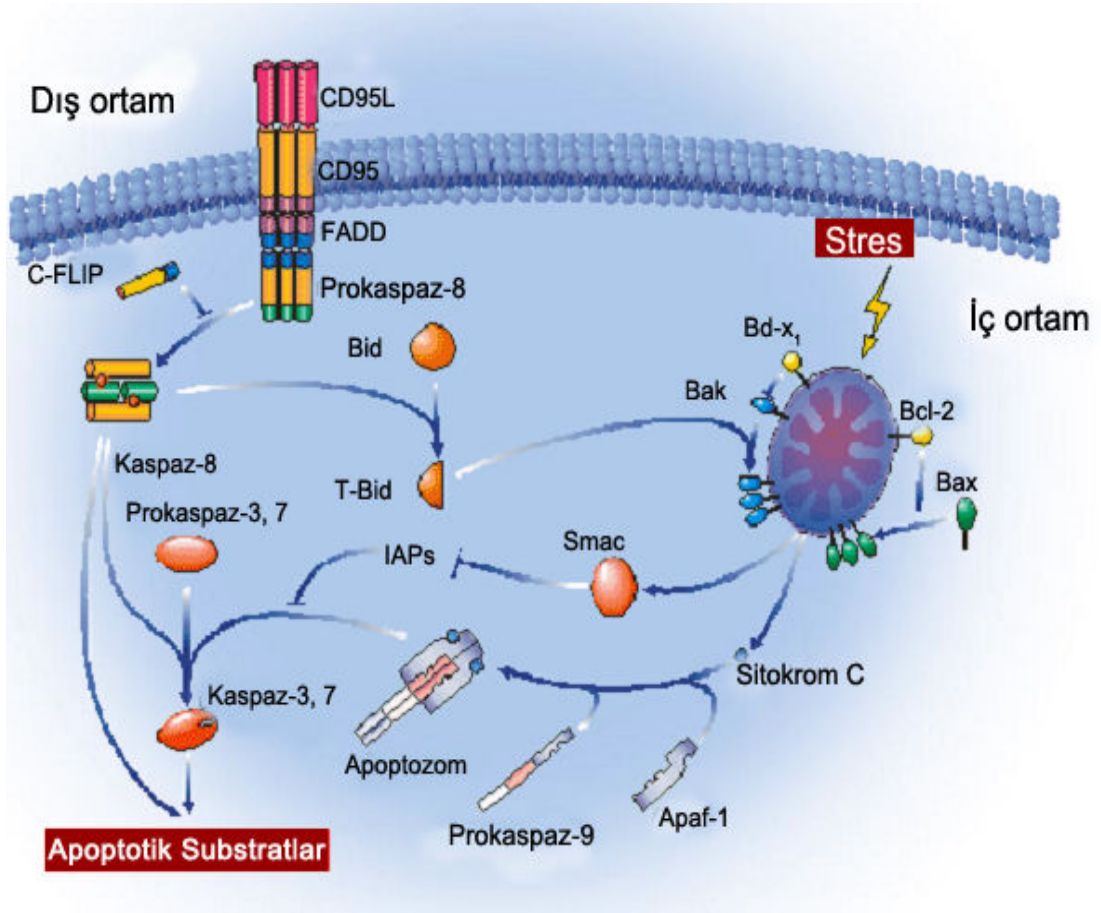


Şekil 1.9. Kaspaz inhibisyonu (Thome ve ark., 1997).

İç sinyallerle oluşan apoptoziste mitokondri önemli rol oynar. Bcl-2 proteini antiapoptotiktir ve mitokondri dış membranına ve apoptozis proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf 1)’e tutunmuştur (Gren ve ark.,2005). Hücre içinden alınan apoptotik sinyaller normal şartlarda Bcl-2 proteinine bağlı olarak mitokondri membranında sabit olan Apaf 1’in mitokondriden ayrılmasına neden olur. Bu ayrılma dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına ve porların açılmasını başlatır. Bu geçirgenlik artışı, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom C’nin sitozole çıkmasına yol açar. Sitokrom C’nin sitoplazmada Apaf1, kaspaz 9 ve ATP ile birleşmesi ile apoptozom oluşur. Apaf-1/sitokrom-c/dATP kompleksi “Apoptozom” adını almaktadır. Sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3’ün aktive olması apoptozisin gerçekleşmesini sağlar (Turgut ve ark.,2006). Kaspazların ard arda aktive olması ve bunların da diğer proteolitik enzimleri aktive etmesi sonucu stoplazmik proteinler yıkılır, endonükleaz aktivitesi sonucu geri dönüşsüz olarak DNA kırıkları oluşur (Gren ve ark., 2005).



Şekil 1.10. Kaspaz kaskadı (Anonim, 2005).



Şekil 1.11. Ekstrinsik ve intrinsik sinyaller sonucu aktive olan apoptotik yollar (Anonim, 2005)

1.3.1.3. Apoptoziste Hücrede Oluşan Diğer Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler

Sonlandırıcı kaspazların (kaspaz 3, 6, 7) aktive olması ile sitoplazma ve nükleus içerisinde hedef proteinler yıkılır. Nükleus içerisindeki hedef proteinlerden biri de DNA endonükleaz ile çapraz bağlanma yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı aktifleştirirler. Nükleus içerisinde Ca^{++} ve Mg^{++} bağımlı endonükleazın aktifleşmesi ile 180 baz çifti ve katları şeklinde kırıklar oluşur. Ayrıca aktin flamanları yıkımlanır, hücre membran yapısı değişir ve fagositoza hazır hale gelir (Lavrik ve ark.,2005).

Transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar, membranların parçalanmasını ve apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlar (Öztürk, 2002). Morfolojik olarak da hücreler su kaybedip büzülürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve hücrelerin birbirine yaklaştığı gözlenir. Membranlar bütünlüklerini korur. Mitokondriler genellikle sağlam kalır. Morfolojik olarak en önemli değişiklik nükleusta izlenir (Lavrik ve ark. 2005).

1.3.1.4. Fagositoz

Apoptotik cisimler, çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosit edilerek dokudan temizlenirler (Öztürk , 2002).

Farklı tümörlerde apoptozisi düzenleyen biyolojik faktörler çeşitlidir ve tümörün türüne bağlı olarak apoptozisin prognozu belirleyici özelliği olabilir. Bazı tümörlerde tümör dokusunda yüksek düzeyde apoptozis bulunan hastaların prognozlarının daha iyi olabileceği belirtilmektedir (Lavrik ve ark.,2005).

Çizelge 1.2. Nekroz İle Apoptozis Arasındaki Farklar (Öniz , 2004 ; Öktem ve ark., 2001)

Özellik	Apoptozis	Nekroz
Ölüm Şekli	Dokuda dağınık olarak, tek tek hücrelerde	Komşu hücre gruplarında
Hücre Büyüklüğü	Azalır	Artar (şişme)
Hücre Zarı	Bütünlük Korunur Tomurcuklanma görülür Zar yüzeyinde fosfatidilserin Erken parçalanma	Düzleşme
Mitokondri	Zar geçirgenliğinde artma Sitoplazma içine sitokrom C ve Apaf-1 salınımı Yapı korunur	Şişme Yapıda bozulma
Organel Şekli	Kontrakte Apoptotik cisimler	Şişme Bozulma
DNA Parçalanması	Fragmante İnternükleozomal bölünme Serbest 3' sonları Elektroforezde merdiven paterni	Yaygın ve rastgele
Hücre Temizlenmesi	Fagositoz	Makrofaj invazyonu
Genel Uyarı	Gelişimsel programlar Endojen sinyaller Hücrel sinyaller Hastalık süreçleri	Hastalık süreçleri
Spesifik Uyarı	Büyüme faktörü eksikliği Ölüm aktivatörleri Radyasyon Orta derece iskemi Oksidanlar Artmış DNA hasarı	Toksisite Ağır iskemi Radyasyon
Hücrel Süreçler	Kaspaz aktivasyonu İnternükleozomal endonükleazlar Transglutaminaz aktivasyonu Protein sentezi devam	Protein sentezi yok RNA transkripsiyonu yok Enerjiden bağımsız ATP azalması
Nedenler	Her zaman patolojik	Fizyolojik / Patolojik
Eksüdatif yangı	Genellikle var	Yok ya da hücrel immünite
Işık mikroskopik görünüm	Bazofili, piknoz, karyoreksis, karyolizis	Kresentrik görünüm, eosinofilik parçacık

1.3.2. Kanser ve Apoptozis

Malign hastalıklar kontrolsüz aşırı hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının olduğu hastalıklar olarak tanımlanır. Ancak aşırı çoğalmanın yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişiminde rol oynadığı görülmüştür. Fizyolojik ömrünü tamamladığı halde çeşitli nedenlerle apoptozise gidemeyen hücreler malign hücrelere dönüşme potansiyeline sahiptir (Stratton ve ark., 2009).

Hücrede iç ya da dış etkenlerle DNA hasarı oluştuğunda bazı genler aktive olmaktadır. Bu genlerden en bilineni ve en önemlisi malign tümörlerin % 50'sinden fazlasında mutasyona uğradığı belirlenmiş olan p53 genidir. Bu nedenle p53 geninin kanser oluşumunda kilit rol oynadığı düşünülmektedir. Örneğin, pelvik high-grade karsinomların % 80'inde p53 mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonun sonucunda kanserli dokuda p53 proteininin miktarında artış görülmektedir. Bu artışın ovaryum kistlerinde immunokimyasal yöntemlerle saptanması ve ovaryumun profilaktik olarak uzaklaştırılması önerilmektedir (Ann ve ark., 2008).

Kansere neden olan bazı virüsler enfekte ettikleri hücrelerde fizyolojik apoptozisi engellerler. Bu şekilde davranan iki tip Human papilloma virüsü (HPV)'nin serviks kanseri oluşturdukları saptanmıştır. HPV virüslerinden biri E6 adında protein üreterek apoptozisi başlatan p53'e bağlanır ve apoptozisi inaktive eder (Lowe ve Lin, 2000).

Burkitt lenfoma ve Mononükleozise neden olan Epstein-Barr Virüsü de Bcl-2'ye benzer bir protein salgılar veya salgıladığı bir diğer proteinle hücrenin Bcl-2 protein üretimini arttırmasını indükler. İki olay da hücreyi apoptozise karşı daha dirençli kılar. Bu şekilde çoğalmaya devam eden hücre kanser hücresi haline gelir (Lowe ve Lin, 2000).

Kanser hücreleri virüsler olmadan da apoptozisi engelleyebilirler. B-hücre lösemilerinin ve lenfomaların bazı tiplerinde Bcl-2 proteini yüksek seviyede eksprese edilir. Bu apoptozis uyarılarını bloke eder (Lowe ve Lin, 2000).

Malign melanom, apoptozise karşı Apaf-1'i kodlayan genin ekspresyonunu engelleyerek direnç gösterir. Bazı kanser hücreleri sitotoksik T-hücrelerinin FasLigand kısımlarını bağlayan bir molekül salgılayarak T-hücrelerinin apoptozis mekanizmalarını başlatmalarına izin vermezler. Dolayısıyla bozulan bu mekanizma kanser hücrelerinin fizyolojik apoptozisini engeller (Hetts, 1998; Lowe ve Lin, 2000).

1.3.3. Oksidatif Stres ve Kanser

Reaktif oksijen türleri (ROS) terimi ilk olarak 1950'li yılların başında tanımlanmıştır. İlk tanımlandığı yıllarda oldukça zararlı, önlenmesi gereken bir olay gibi görülüyordu. Keşfedildiği ilk yıllardan günümüze kadar geçen süreçte konu ile ilgili ilerlemeler kaydedilmiştir. Özellikle hücrelerin oksidatif strese karşı geliştirdiği savunma mekanizmaları ve hücrelerin nasıl redoks homeostazisini sağlayıp hayatta kaldıkları ile ilgili pek çok yayın yapılmıştır (Rahman ve MacNee, 2000). Bu çalışmalar sırasında elde edilen bilgiler, oksidatif stresin terapötik gücü hakkında da kanıtlar ortaya çıkartmaya başladı. Elde edilen sonuçlar, ROS üretiminin ve bunun sonucunda hücrelerde oluşan apoptozisin kanser tedavisinde ve daha pek çok hastalığın tedavisinde kullanılabilecek bir araç olduğunun gösterdi (Benhar ve ark., 2002).

Geçen 50 yıl içerisinde yapılan çalışmalar sonucunda ROS üretiminin farklı mekanizmalar tarafından gerçekleştiği kanıtlandı. Bu mekanizmalar ; iyonize radyasyon, hücrenin yaşamak için yaptığı oksijenli solunum, kimyasal ajanlar ve

NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz gibi fagositler tarafından sentezlenen anti-bakteriyel enzimlerin aktivasyonu olarak özetlenebilir (Poli ve ark., 2004).

ROS, maruziyetin süresine ve şiddetine göre farklı sonuçlar doğurur. Genel olarak, düşük seviyedeki ROS mitojendir ve hücre çoğalmasını hızlandırır, orta seviyedeki hücre döngüsünü geçici yada kalıcı olarak durdurur ve hücre farklılaşmasını uyarır. Yüksek düzeyde ROS ise oldukça zararlıdır ve apoptozisi uyarır yada nekroza neden olur (Finkel ve Holbrook, 2000). Akut yüksek düzeyde ROS hücrel komponentlerden DNA, proteinler ve lipidlere zarar verir. Güçlü reaktivite nedeniyle DNA baz oksidasyonları ve DNA zincir kırıkları meydana gelebilir. Ayrıca, akut maruziyet apoptozisi uyarabilir, bu uyarının sağlanması günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların etki mekanizmalarından biridir. Özellikle inorganik arsenik bileşikler tarafından meydana getirilen akut yüksek düzey oksidatif stres günümüzde kanser araştırmacılarının ilgi odağı haline gelmiştir (Lau ve Chiu, 2006).

Kronik düşük seviyede ROS maruziyeti ise hücrenin redoks dengesini bozar, DNA bazlarında oksidatif modifikasyonlara ve bunun sonucunda da mutasyonlara neden olur. Ayrıca hücre içerisinde bir mesajcı gibi görev alıp hücre çoğalmasını uyarır, malignant çoğalmalara ve bunun yanında ateroskleroz gibi çeşitli lezyonlara neden olur (Barchowsky ve ark., 1996).

Oksidatif stres, sadece zararlı etkileri olan kimyasal bir olay değildir. Bunun yanında organizmanın savunma mekanizmasının da bir parçasıdır. Örneğin, makrofajlar, nötrofiller ve eozinofiller vücuda giren patojenleri öldürebilmek için ROS üretirler ve patojenleri bu yolla inaktive ederler. Ayrıca günümüzde kanser tedavisinde kullanılan pekçok ilaç ROS üretimi ile kanserli hücreleri öldürmektedir. Bu nedenlerden dolayı oksidatif stres günümüzde biyomedikal alanda pekçok çalışmanın konusu olmaktadır (Lau ve ark., 2008)

Doğal kaynaklardan elde edilmiş ya da kimyasal olarak sentezlenmiş çok sayıda ROS üretimine neden olan kimyasal madde hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Örneğin, tatlı biberden izole edilen kapsaisinoid'ler ROS üretimini arttırarak Jurkat hücre serisinde mitkondri membran geçirgenliğini arttırarak apoptozise neden olmakta, mavi-yeşil aglerden elde edilen c-fikosiyanin AK-5 tümör hücre serisinde ROS oluşumunu arttırıp Bcl-2 sentezini azaltarak apoptozisi uyarmaktadır (Pardhasaradhi ve ark., 2003).

Terapötik açıdan bakıldığında, ROS kesinlikle gelecekte üzerinde çalışılması gereken, yeni özellikleri ve etkileri incelenmesi gereken bir konudur. Günümüzde pekçok grup, ROS üretimini arttıran pekçok doğal ya da yapay kanser terapötik ajanları üzerinde çalışmaktadır. Bunlardan birinin yada birkaçının kombinasyonunun gelecekte umut vaadeden ilaçlara dönüşmesi beklenmektedir (Lau ve ark., 2008).

Son yıllarda sıkça sorulan sorulardan birisi de kanser kemoterapisi sırasında antioksidanların verilmesi, antineoplastik etkinliği engeller mi ya da kemoterapi sırasında oluşan yan etkilerin gelişimini önler mi sorusu akla gelmektedir. In vitro sistemlerde ve bazı hayvan deneylerinde elde edilen sonuçlar, kemoterapi sırasında antioksidatif dozda vitaminlerin kullanılmasının yararlı olduğunu gösterse de halen klinik çalışmalar devam etmektedir. Burda en önemli nokta kullanılan kemoterapötik ajanın oksidatif stres yaratarak apoptozis yoluyla öldürmeye çalıştığı malign karakterli hücreleri, dışarıdan verilen antioksidanlarla apoptozise gitmesini engellememektir. Bununla beraber, eğer oluşan radikaller ilacın sadece yan etkilerinden sorumlu yani ilacın antineoplastik aktivitesinden sorumlu değilse, antioksidanların kullanımı yan etkilerin en aza indirgenmesi için yararlı olabilmektedir (Conklin ve Kenneth, 2004).

Bu çalışma kapsamında, bir herbisid olan paraquat ile oluşturulmuş oksidatif stresin, hepatosellüler karsinom hücre kültürü hattı olan HepG2 üzerine apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla paraquat ile oksidatif stres oluşturulan HepG2 hücrelerinde apoptozis belirteçlerinden olan kaspaz 3, kaspaz 9, sitokrom c, DNA laddering tayini ve MTT hücre canlılık testleri paraquat ilave edilmeyen ve kontrol grubunu oluşturan Hep G2 hücreleri ile karşılaştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Agaroz (moleküler biyoloji saflıkta)	Sigma	A5093
Ethidium bromide çözeltisi 10mg/ml	Sigma	E1510
WFI saflıkta, hücre kültürü için, steril su	Irvine Scientific	9309
Phosphate Buffered Saline (PBS) 10X Hücre kültürü için hazırlanmış, steril, Ca ve Mg tuzları içermeyen	Irvine Scientific	9242
2-Propanol	Reidel-de Haen	24137
Ethanol (absolut)	Reidel-de Haen	3221
Dimetil sülfoksit (DMSO) freeze medium,steril	Bioveris	210002
Tris-Borik asit-EDTA tamponu Ultrapure, 10X yoğun	Invitrogen	15581-028

Fetal dana serumu (FBS) Hücre kültürü saflıkta, steril	Irvine Scientific	3000A
Gentamisin sülfat solüsyonu 50 mg/ml, hücre kültürü kullanımı için	Irvine Scientific	9355
Trypan Blue	Fluka	93595
Paraquat (Metilviolagen hidrat) (%98)	Aldrich	85617-7
DNA standardı 100bp 500µg/ml	New England Biolabs	
Tripsin EDTA 1X Hank's balanced salt sol. 1 l solüsyon içinde 0,5 g Tripsin ve 0,2 g EDTA Fenol red içeren, Ca ve Mg tuzları içermeyen	Irvine Scientific	9341
RPMI medium 1640 300mg/l L-Glutamin'li	Irvine Scientific	9161

2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

<u>Sarf Malzeme Adı</u>	<u>Üretici Firma</u>	<u>Katalog Numarası</u>
Hücre kültürü flaskı, 75 cm ² , filtre kapaklı	CellStar/GB0	658175
Cryo.S cryovial, Dnase-Rnase free, 2ml	CellStar/GB0	
Steril, polipropilen, 15ml konik santrifuj tüpü	TPP	91015
Steril, polipropilen, 50ml Konik santrifuj tüpü	CellStar/GB0	227261
Pipet uçları, DNase-RNase free, steril, filtreli 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Neptune	BT10E,BT100,BT1000
Steril serolojik pipet, tekli paketli 1 ml, 5 ml, 25 ml	CellStar/GB0	7760180
Lam, 76 x 26 mm	Isolab	7522
Lamel, 20 x 20 mm	Isolab	7512
Neubauer hemositometri lamı	Isolab	
Hücre kültürü flaskı, 25 cm ²	BD Falcon	353108
96 kuyucuklu, düz tabanlı, steril plaka	BD Falcon	3530

2.1.3. Kullanılan Kitler

<u>Kitin Adı</u>	<u>Üretici Firma</u>	<u>Katalog Numarası</u>
Kaspaz-3 kolorimetrik testi	R and D Systems,Inc	BF3100
Kaspaz-9 Kolorimetric testi	R and D Systems,Inc	BF10100
TACS MTT hücre çoğalma ve canlılık testi	R and D Systems,Inc	TA5355
TACS DNA Laddering kit	R and D Systems,Inc	TA4630
Sitokrom C ELISA	R and D Systems,Inc	Quantikine

2.1.4. Kullanılan Cihazlar

<u>Cihaz Adı</u>	<u>Üretici Firma</u>	<u>Katalog Numarası</u>
Su banyosu, ısıtmalı	Nüve	BM402
Saf su cihazı	Millipore Synergy	185
Horizontal mini elektroforez tankı	Amersham Bioscience	
Güç kaynağı	LabNet	PS300
Mikrodalga fırın	Kenwood	
Spin santrifuj	Continental Lab Products	
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik	Derin
Jel görüntüleme sistemi	Kodak	GelLogic200
Otomatik pipetler 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson	Pipetman
Transluminatör	Herolab	UVT-20M
Kırık buz makinesi	Fiocchi	AF-100
Santrifuj, masa üstü, Yüksek hızlı, soğutmalı	MPW	MPW350R
Sıvı azot tankı, 40 l	Arpage	A40

Buharlı sterilizatör (otoklav)	Erna	
Santrifuj, masa üstü, Yüksek hızlı, soğutmalı	Sigma	3K30
Mikroskop, invert, trinoküler	Olympus	CKX41
Mikroskop, klasik ışık mikroskobu	Leica	CME
CO ₂ 'li inkubatör	Sanyo	MCO-18AIC
Steril güvenlik kabini(Laminar Flow)	Holten	Laminair 1,8
Vorteks	Biosan	BiovortexV1
Hassas Terazı	Shimadzu	AUW320
Dijital grafik yazıcı	Sony	UP-D 895
ELISA okuyucu	Tecan	Sunrise

2.2. Yöntem

2.2.1. HepG2 Hücre Kültürünün Hazırlanması

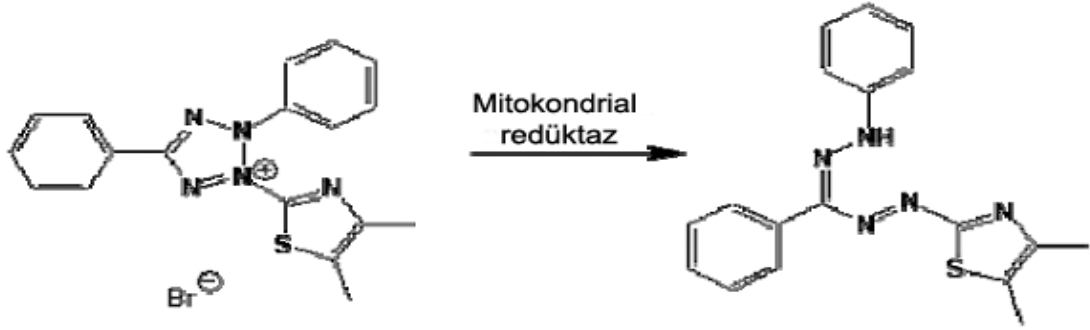
Çalışma sırasında kullanılan hepatosellüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücreleri, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr.Cemalettin Aybay'dan temin edilmiştir. Hücreler % 10 Fetal Dana Serum (FBS), 50 mg/l Gentamisin sülfat ve 300 mg/l L-glutamin içeren RPMI 1640 Medium besi ortamı içerisinde, 37 °C'de % 5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkubatoründe üretildi. Üretim sırasında kontaminasyonu önlemek amacıyla filtre kapaklı hücre kültürü flaskları kullanıldı. Hücrelerin besiyeri iki günde bir değiştirildi ve canlılıkları, çoğalma hızları ve morfolojik yapıları invert mikroskop ile takip edildi.

Yeterli hücre yoğunluğuna sahip flaskların besiyerleri vakumlanarak boşaltıldı. Hücreler bir kez Ca ve Mg tuzları içermeyen steril PBS ile yıkandı. Daha sonra 1 : 250 Trypsin-EDTA çözeltisi ile 8-10 dakika 37 °C'de inkubasyona bırakıldı. Yüzeyden ayrılan hücreler trypan mavisi ile boyanıp Neubauer Hemositometri Lamı ile sayıldıktan sonra 1/3 oranında pasajlandı. Bu işlemlerin tamamı hücre kültürü laboratuvarında ve steril güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi.

2.2.2. MTT Hücre Canlılık Testi

MTT hücre proliferasyon ve canlılık testi, hücre çoğalması ve canlılığını in vitro ortamda hassas bir şekilde belirleme testidir. Hücreler düz zeminli 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında üretildikten sonra tetrazolium bileşiği olan MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) hücreler üzerine eklenip inkube edilir. Sarı renkli MTT, mor renkli çözünmeyen formazan'a indirgenir. Bu

indirgenme yalnızca mitokondrial redüktaz enzimi varlığında gerçekleştiği için formazan'ın oluşum miktarı ile canlı hücre sayısı doğru orantılıdır. Daha sonra deterjan çözeltisinin ortama eklenmesi ile formazan kristalleri çözünür ve sonuç spektrofotometrik olarak okunur.

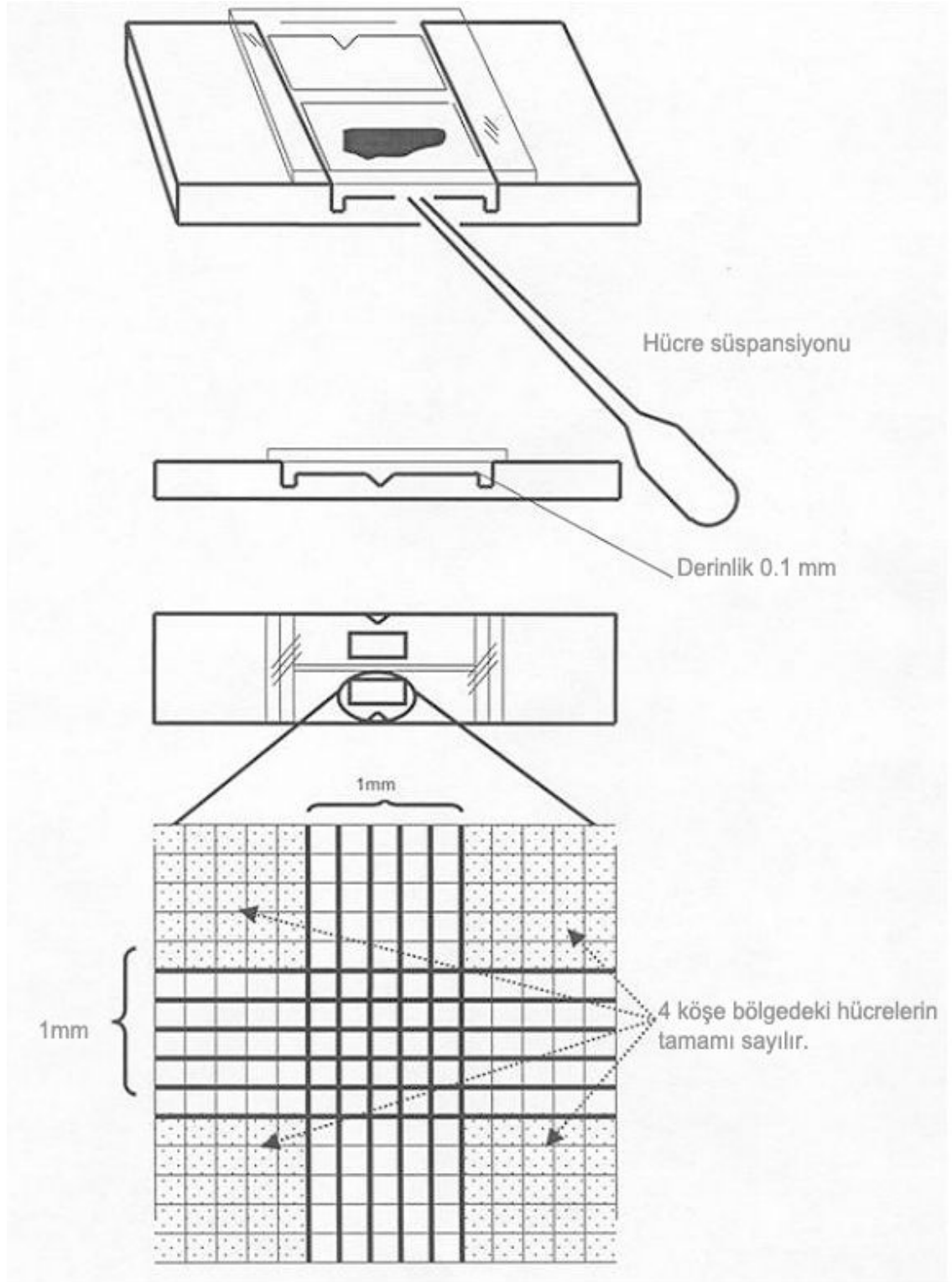


Şekil 2.1. MTT'nin formazana biyokimyasal olarak dönüşümü (Mosmann, 1983).

Her hücre hattının çoğalma hızı ve hücre büyüklüğü farklıdır. Bu nedenle MTT testine başlamadan önce kullanılan hücreye göre standardizasyon çalışması yapılmalıdır. HepG2 hücrelerinin optimum kaplama yoğunluğunu belirlemek amacıyla flasklarda üretilen hücreler tripsin ile muamele edilerek toplandı. Toplanan hücreler 2-8 °C'de 500 x g'de santrifuj edildi. Üstte kalan süpernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 5 ml taze besiyeri hücrelerin üzerine eklendi ve hemositometri lamı ile sayıldı.

2.2.3. Hücrelerin Sayımı

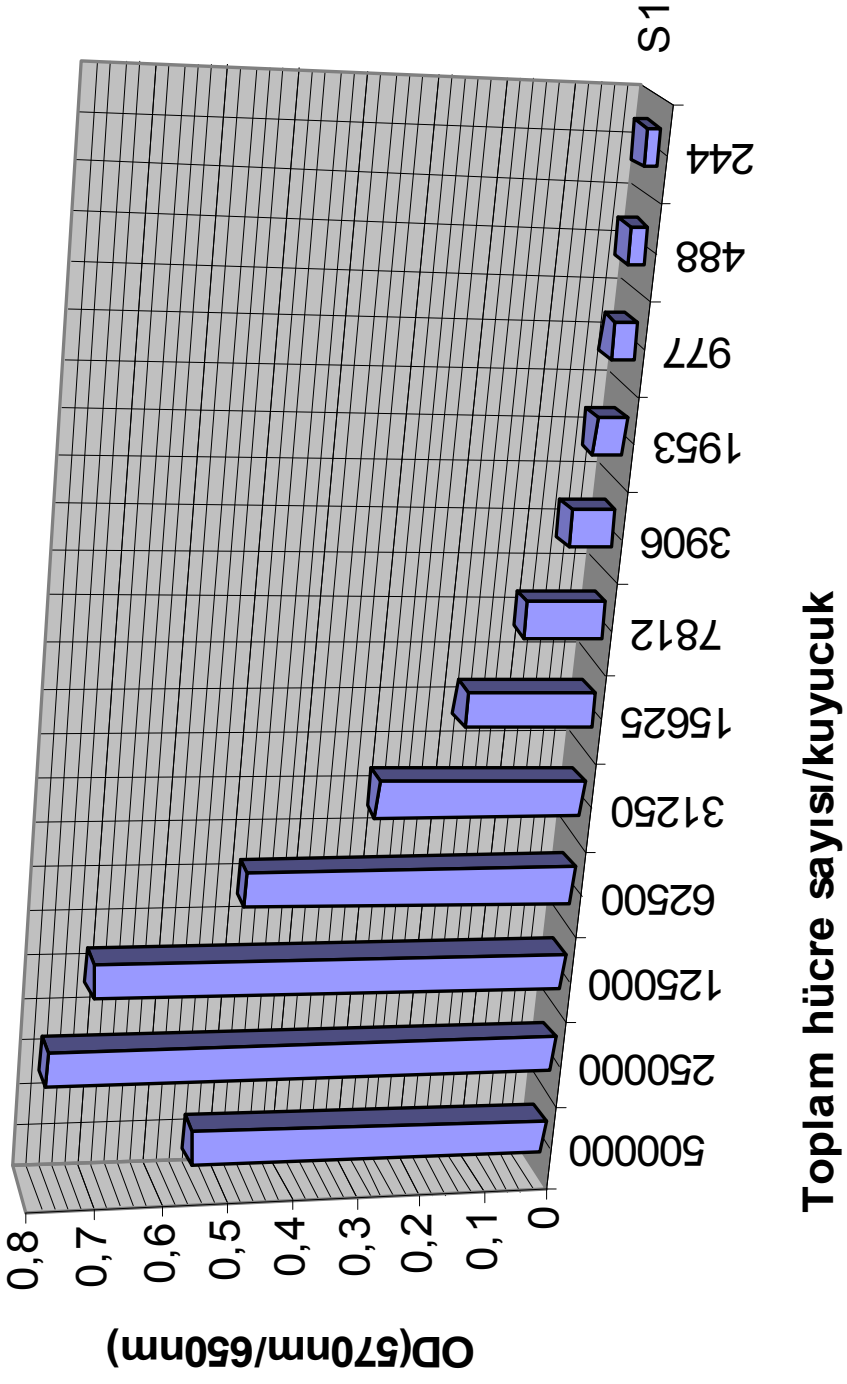
Hücrelerin 5 ml besi yeri içerisinde homojen şekilde dağılması için, steril konik tüp içerisinde altüst edildi. Bu hücre süspansiyonundan Neubauer Hemositemetri Lamı'nda sayılmak üzere 100 µl örnek alındı. Hemositometrede dört karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındı. Elde edilen sayı Dilüsyon Etkeni x 10⁴ ile çarpılıp 1 ml'deki hücre sayısı (hücre/ml) bulundu. Bu işlem üç kez tekrarlanıp ortalaması alınarak değerlendirildi. Bu işlem hücre sayımının gerekli olduğu tüm aşamalarda uygulandı.



Şekil 2.2. Neubauer Lamı ile hücre sayımı

Hücre kültürü plakları (96 kuyucuklu) 5×10^6 hücre/ml'den $0,0244 \times 10^6$ hücre/ml'ye kadar 12 farklı seri dilüsyonda kaplandı. Bu kaplama sırasında her bir kuyucuğa 100 µl besiyeri eklendi. 24 saatlik inkubasyondan sonra her kuyucuğa 10 µl MTT reaktifi eklendi ve 2 saat süreyle 37 °C'de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda invert mikroskop ile mor formazan kristallerinin oluşumu kontrol edildi. Her kuyucuğa 100 µl deterjan çözeltisinden eklenip 18 saat karanlıkta inkubasyona bırakıldı. Sonuçlar spektrofotometrik olarak 570–650 nm'de okunarak değerlendirildi ve hücrelerin logaritmik fazda ürettiği en uygun kaplama yoğunluğu elde edildi. Bu deneme beş kez tekrarlandı ve ortalamaları alındı.

Sonuç olarak 100.000 hücre / kuyucuk ve 24 saat inkubasyon süresi HepG2 hücreleri için optimum üreme şartları olarak belirlendi ve diğer analizler bu şartlarda gerçekleştirildi.



Şekil 2.3. MTT hücre canlılık testi ile hücre kaplama yoğunluğunun belirlenmesi

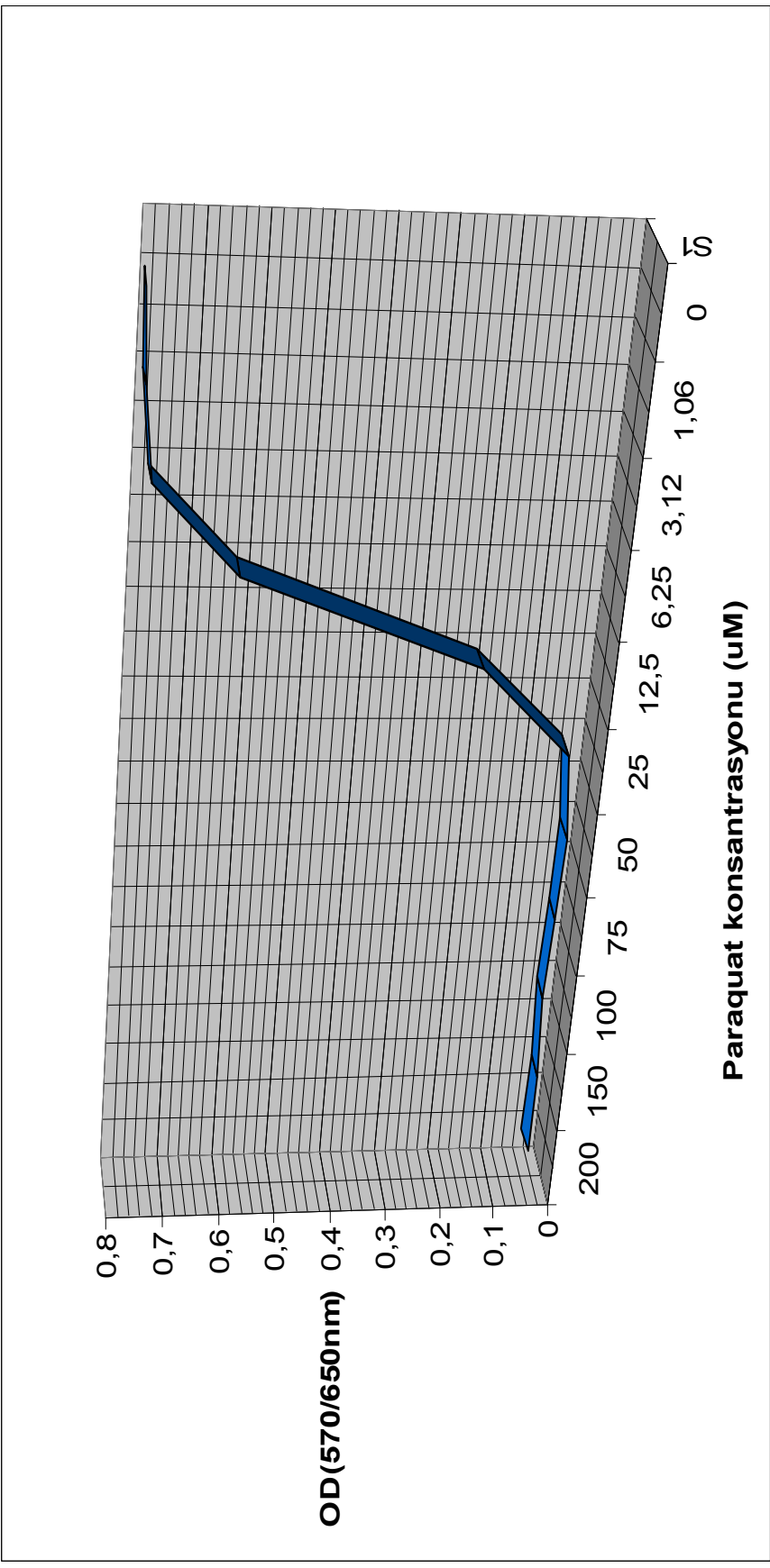
Çizelge 2.1. MTT hücre canlılık testi ile hücre kaplama yoğunluğunun belirlenmesi

Toplam hücre sayısı	500000	250000	125000	62500	31250	15625	7812	3906	1953	977	488	244
Deneme 1 (O.D.)	0,605	0,816	0,662	0,521	0,311	0,195	0,114	0,071	0,051	0,033	0,032	0,019
Deneme 2 (O.D.)	0,549	0,779	0,759	0,537	0,328	0,191	0,119	0,066	0,044	0,037	0,021	0,018
Deneme 3 (O.D.)	0,643	0,772	0,653	0,487	0,315	0,195	0,118	0,069	0,047	0,032	0,026	0,018
Deneme 4 (O.D.)	0,547	0,778	0,716	0,438	0,314	0,201	0,127	0,068	0,046	0,032	0,026	0,018
Deneme 5 (O.D.)	0,548	0,817	0,725	0,504	0,292	0,192	0,106	0,069	0,042	0,064	0,024	0,019
Ortalama (O.D.)	0,551	0,778	0,716	0,501	0,315	0,195	0,118	0,066	0,044	0,033	0,026	0,019
Max. O.D.	0,643	0,817	0,759	0,537	0,328	0,201	0,127	0,069	0,051	0,064	0,032	0,019
Min. O.D.	0,547	0,772	0,653	0,438	0,292	0,191	0,106	0,068	0,042	0,032	0,021	0,018

HepG2 hücrelerinin MTT hücre canlılık testi için uygun kaplama konsantrasyonu ve inkubasyon süreleri belirlendikten sonra paraquat toksisite testine (IC_{50}) geçildi. Bu amaçla daha önceden belirlenen kaplama konsantrasyonu olan 1×10^6 hücre / kuyucuk ile hücreler 96 kuyucuklu, düz tabanlı, steril hücre kültürü plaklarına kaplandı. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat $37^{\circ}C$ 'de %5 CO_2 'li inkubatörde bekletildi.

Paraquat (Metylviologen hidrat), RPMI 1640 besiyeri içerisinde 200 μM , 150 μM ,100 μM , 75 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,12 μM , 1,06 μM ve 0 μM konsantrasyonlarda hazırlandı.

MTT testi için 96 kuyucuklu plakaya kaplanan hücrelerin üzerindeki besiyeri boşaltıldı ve hücreler bir kez steril PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 100 μl farklı konsantrasyonlarda Paraquat içeren besiyeri ilave edildi ve $37^{\circ}C$ 'de %5 CO_2 'li ortamda 24 saat inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda her kuyucuğa 10 μl MTT reaktifi eklendi ve iki saat daha $37^{\circ}C$ 'de inkübe edildi. İnkubasyon sonunda mor renkli formazan kristallerinin oluşumu invert mikroskop ile kontrol edildi. Her kuyucuğa 100 μl deterjan solüsyonu eklenip 18 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda formazan kristallerinin çözünmesi beklendi. Sonuçlar 570-650nm'de spektrofotometrik olarak okunarak değerlendirilip, paraquat'ın HepG2 hücre hattında IC_{50} değeri **10 μM** olarak belirlendi. Bu analizler "TACS MTT cell viability assay" ticari kiti kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 2.4. HepG2 hücre hattında paraquat'ın IC₅₀ değerinin belirlenmesi

Çizelge 2.2. HepG2 hücre hattında paraquat'ın IC₅₀ değerin belirlenmesi

Paraquat (µM)	200µM	150µM	100µM	75µM	50µM	25µM	12,5µM	6,25µM	3,12µM	1,06µM	0µM
Deneme 1 (O.D.)	0,040	0,035	0,048	0,034	0,036	0,048	0,214	0,688	0,84	0,802	0,803
Deneme 2 (O.D.)	0,036	0,036	0,074	0,035	0,037	0,049	0,212	0,701	0,742	0,761	0,833
Deneme 3 (O.D.)	0,037	0,037	0,032	0,033	0,033	0,05	0,219	0,664	0,778	0,781	0,79
Deneme 4 (O.D)	0,036	0,033	0,033	0,039	0,034	0,057	0,22	0,712	0,727	0,798	0,806
Deneme 5 (O.D.)	0,035	0,044	0,034	0,047	0,035	0,047	0,201	0,645	0,804	0,825	0,761
Ortalama O.D.	0,036	0,037	0,044	0,037	0,035	0,050	0,213	0,682	0,778	0,793	0,798

2.2.4. Kaspaz 3 Kolorimetrik Analizi

Kaspaz 3, aynı zamanda CPP-32 olarak da bilinen hücre içi sistein proteazıdır. Proenzim olarak sentezlenir ve apoptozis sırasında kaspaz kaskadının uyarılması ile aktif hale geçer. Kaspaz 3 enzimi, DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) aminoasit motifi içeren PARP (poli ADP-riboz polimeraz) ve 70 kD büyüklüğündeki U1-ribonükleoprotein gibi molekülleri parçalar. Kaspaz 3'ün varlığının apoptozisin gerçekleşmesi sırasındaki önemi pek çok yayında kanıtlanmıştır (Nicholson ve Thornberry, 1997). Kaspaz 3 analizleri “R and D systems, Inc. Caspase-3 colorimetric assay” kiti ile gerçekleştirildi

Kit İçeriği :

DEVD-pNA Substrat	: 500 µl, p-nitroalanin ile konjuge edilmiş 4mM DEVD substrat peptid.
Lizis Tamponu	: 100 ml lizis tamponu.
Reaksiyon Tamponu 3	: 4 x 2ml yoğun Reaksiyon Tamponu 3.
Dilüsyon Tamponu	: 100ml dilüsyon tamponu.

2.2.4.1. Kaspaz 3 Testinin Prensipli ve Uygulama Yöntemi

Hücre lizatındaki proteaz aktivasyonu p-nitroanaline (pNA) ile konjuge edilmiş kaspaz 3 spesifik peptid ile belirlenir. Peptidin kaspaz 3 tarafından parçalanması sonucu kromofor madde olan pNA serbest kalır. pNA'nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm de spektrofotometrik olarak okunup kantitatif sonuç elde edilir. Oluşan rengin şiddeti hücre lizatındaki kaspaz 3 enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Paraquat'ın HepG2 hücre hattında IC₅₀ derişimini MTT hücre canlılık testi ile belirlendikten sonra, kaspaz 3 kolorimetrik analizi için gerekli hücre sayısı olan 2 x 10⁶ hücre sayılarak flasklara konuldu. 24 saat süreyle hücrelerin flaskların tabanına yapışması için inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon normal hücre kültürü şartlarında yani 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda 25 cm²'lik filtre kapaklı hücre kültürü flasklarında gerçekleştirildi. İnkubasyon sonrası hücreler bir kez PBS ile yıkanarak teste hazır hale getirildi. Hücreler 10µM paraquat'ın RPMI 1640 + %10 FBS ve gentamisin içeren besiyerinde çözülmesi ile hazırlanan test ortamında 24 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Kontrol grubunu ise paraquat içermeyen besiyerinde test grubu ile aynı fiziki şartlarda inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. İnkubasyon sonrası hücreler tripsin ile muamele edilerek toplandı. Bu toplama sırasında ölen ve yüzeyden ayrılan hücreleri de elde edebilmek için inkubasyon sırasında kullanılan besiyeri de 250 x g'de santrifuj edildi. Elde edilen hücre peletinin üzerine 50 µl soğuk lizis tamponu eklendi ve 10 dakika süreyle buz üzerinde inkubasyona bırakıldı. Daha sonra 10000 x g'de 1 dakika süreyle 2–8 °C'de santrifuj edildi. Üstte kalan süpernatant daha önceden soğutulmuş başka bir santrifuj tüpüne aktarıldı. Reaksiyon Tamponu 3 üzerine DTT (dithiothreitol) stok çözeltisi 1 / 100 oranında taze olarak ilave edilerek reaksiyon tamponu hazırlandı. 96 kuyucuklu plaka içerisinde, hazırlanan 50 µl hücre lizatı üzerine 50 µl reaksiyon tamponu ve 5 µl kaspaz 3 kolorimetrik substrat (DEVD-pNA) eklenip 37 °C'de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda mikropilaka okuyucuda 405 nm dalgaboyunda optik dansiteler okundu. Bu test üç kez tekrarlanıp kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

2.2.5. Kaspaz 9 Kolorimetrik Analizi

Kaspaz 9 aynı zamanda ICE-LAP6 ve Mch6 olarak da adlandırılan ve kaspaz kaskatında apoptozise gitmesi için uyarılmış hücrelerde zimojen prokaspaz 9 olarak sentezlenip daha sonra aktive olan bir enzimdir. Mitokondriden sitokrom C'nin sitoplazmaya salınmasından sonra kaspaz 9 aktive olur ve sitokrom c, kaspaz 9 ve Apaf-1 birleşerek kompleks oluşturur. Kaspaz 9 enziminin hücre içerisinde en iyi

tanıyıp parçalayabildiği sekans LEHD'dir. Kaspaz 9 aktivasyonu pekçok pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler tarafından düzenlenir ve embriyonik dönemde meydana gelen apoptoziste önemi büyüktür (Thornberry ve Lazebnik Y., 1998).

Kaspaz 9 analizleri de ticari test kiti (R and D systems, Inc. Caspase-9 colorimetric assay) ile gerçekleştirildi.

Kit İçeriği:

LEHD-pNA Substrat	: 500 µl, p-nitroalanin ile konjuge edilmiş 4mM LEHD substrat peptid.
Lizis Tamponu	: 100 ml lizis tamponu
Reaksiyon Tamponu 3	: 4 x 2ml konsantre Reaksiyon Tamponu 3
Dilüsyon Tamponu	: 100ml dilüsyon tamponu

2.2.5.1. Kaspaz 9 Testinin Prensibi ve Uygulanması

Hücre lizatındaki proteaz aktivasyonu p-nitroanaline (pNA) ile konjuge edilmiş kaspaz 9 spesifik peptid ile belirlenir. Peptidin kaspaz 9 tarafından parçalanması sonucu kromofor madde olan pNA sertbest kalır. pNA'nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm de spektrofotomentrik olarak okunup kantitatif sonuç elde edilir. Oluşan rengin şiddeti hücre lizatındaki kaspaz 9 enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Kaspaz 9 kolorimetrik analizi için gerekli hücre sayısı olan 2×10^6 hücre sayılarak flasklara konuldu. 24 saat süreyle hücrelerin flaskların tabanına yapışması için inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon normal hücre kültürü şartlarında yani 37°C 'de %5 CO_2 'li ortamda 25 cm^2 'lik filtre kapaklı hücre kültürü flasklarında

gerçekleştirildi. İnkubasyon sonrası hücreler bir kez PBS ile yıkanarak teste hazır hale getirildi. Hücreler, belirlenen 10 μ M konsantrasyonda paraquat'ın RPMI 1640 + % 10 FBS ve gentamisin içeren besiyerinde çözülmesi ile hazırlanan test ortamında 24 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Kontrol grubunu ise paraquat içermeyen besiyerinde test grubu ile aynı fiziki şartlarda inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. İnkubasyon sonrası hücreler tripsin ile muamele edilerek toplandı. Bu toplama sırasında ölen ve yüzeyden ayrılan hücreleri de elde edebilmek için inkubasyon sırasında kullanılan besiyeri de 2-8 °C'de 250 x g'de santrifuj edildi. Elde edilen hücre peletinin üzerine 50 μ l soğuk lizis tamponu eklendi ve 10 dakika süreyle buz üzerinde inkubasyona bırakıldı. Daha sonra 10000 x g'de 1 dakika süreyle 2-8 °C'de santrifuj edildi. Üstte kalan süpernatant daha önceden soğutulmuş başka bir santrifuj tüpüne aktarıldı. Reaksiyon Tamponu üzerine DTT (dithiothreitol) stok solüsyonu 1/100 oranında taze olarak ilave edilerek reaksiyon tamponu hazırlandı. 96 kuyucuklu plaka içerisinde, hazırlanan 50 μ l hücre lizatı üzerine 50 μ l reaksiyon tamponu ve 5 μ l kaspaz 9 kolorimetrik substrat (LEHD-pNA) eklenip 37 °C'de iki saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda mikrolaka okuyucuda 405 nm dalgaboyunda optik dansiteler okundu. Bu test üç kez tekrarlanıp sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

2.2.6. DNA Laddering Testi

Apoptozis, hücrelerin programlı şekilde ölmesi anlamına gelip, sitoplazmada yoğunlaşma, hücre membranında tomurcuklanma, çekirdekte piknoz ve hücre DNA'sının endonükleaz enzim aktivitesi sonucunda yaklaşık 180-200bp uzunluğunda oligonükleozomal fragmentlere ayrılması ile karakterizedir (Ioannou ve Chen 1996). DNA fragmentasyonu tek hücre bazında TUNEL (terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP nick end labeling) testi ile histopatolojik olarak gösterilebilir. Kitlesel hücre ölümlerinde ise hücre DNA'sının saflaştırılıp

elektroforetik olarak incelenmesine dayanan DNA laddering testi kullanılmaktadır (Reshef ve ark., 2008).

2.2.6.1. Testin Prensibi ve Uygulama Yöntemi

Apoptozis sırasında endonükleaz enzim aktivasyonu sonucu DNA'da fragmentler oluşur. Bu testin prensibi hücreden genomik DNA'nın izole edilmesi ve izole edilen DNA'nın agaroz jel elektroforezde yürütülüp EtBr ile boyanması esasına dayanır.

DNA laddering testi için HepG2 hücreleri pasajlanarak 24 saat süreyle flaskların tabanına yapışması için inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon normal hücre kültürü şartlarında (37 °C'de %5 CO₂'li ortamda) 25 cm²'lik filtre kapaklı hücre kültürü flasklarında gerçekleştirildi. İnkubasyon sonrası hücreler bir kez PBS ile yıkanarak teste hazır hale getirildi. Hücreler, 10 µM yoğunlukta paraquat'ın RPMI 1640 + % 10 FBS ve gentamisin içeren besiyerinde çözülmesi ile hazırlanan test ortamında 24 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Kontrol grubunu ise paraquat içermeyen besiyerinde test grubu ile aynı fiziki şartlarda inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. İnkubasyon sonrası hücreler tripsin ile muamele edilerek toplandı.

2.2.6.1. DNA İzolasyonu

Toplanan hücreler Neubauer hemositometri lamında sayıldı ve DNA izolasyonu için gereken miktar olan 1×10^6 hücre santrifüj tüpüne konuldu. Hücrelerin üzerine 5 ml soğuk PBS ilave edilerek yıkandı. PBS'in ortamdan uzaklaştırılması için 250 x g'de 2-8 °C'de santrifuj edildi ve üstte kalan PBS pipetle çekilerek atıldı. Dipte kalan hücre peletinin üzerine 100 µl örnek tamponu ve 100 µl hücre lizis solüsyonu eklenip

10 dakika oda sıcaklığında inkubasyona bırakılıp hücrelerin tamamen lize olmaları sağlandı. Hücre lizati 2 ml'lik mikrosantrifuj tüpüne aktarıldı ve 700 µl ekstraksiyon çözeltisinden ve 400 µl ekstraksiyon tamponundan eklenip 10 saniye vortekslendi. Vorteksleme işleminden hemen sonra 12000 x g'de 5 dakika süreyle santrifuj edildi ve üstte kalan faz yeni bir mikrosantrifuj tüpüne aktarıldı ve bu fazın üzerine 50 µl sodyum asetat çözeltisinden eklendi. Tüpteki total hacim ölçüldü ve üzerine aynı hacimde 2-propanol ilave edildi. 1200 x g'de 10 dakika santrifuj edildi ve üstte kalan faz, tüpün dibinde toplanan DNA peletine zarar vermeden pipetle çekilerek uzaklaştırıldı. DNA peletinin üzerine % 70 etanol eklendi ve tüp alt-üst edilerek karıştırıldı. 12000 g'de 5 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrası üstte kalan etanol dikkatlice uzaklaştırılıp dipteki DNA peleti oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan DNA peletinin üzerine 100 µl Dnase-free su ilave edildi ve elde edilen toplam DNA miktarı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Ölçüm için, 5 µl dilüe DNA ile 995 µl distile su karıştırıldı ve 260 nm dalga boyunda distile suya karşı okundu.

$$\text{Konsantrasyon (} \mu\text{g / } \mu\text{l)} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 9.88^*$$

*9,88 sayısı 1:200 dilüsyondaki DNA için geçerlidir

Elde edilen toplam DNA miktarı hesaplanıp 1 µg / µl olacak şekilde Dnase-free steril su içerisinde sulandırılıp -20 °C'de saklandı.

2.2.6.2. Agaroz Jel Elektroforez ve EtBr ile Boyama

- 10x Tris-Borik asit-EDTA tamponu hem jel hazırlarken hem de tank tamponu olarak kullanılmak üzere 1 : 10 distile su ile sulandırıldı.

- 0,5 g Agaroz, 55 ml 1 x TBA tamponu üzerine cam erlende eklendi. Bu karışım 150 saniye mikrodalga fırında kaynatıldı.
- Mikrodalga fırından çıkartılan erlen yavaşça devamlı çalkalanarak oluşan hava kabarcıklarının kaybolması sağlandı.
- Jelin soğumasına izin verilmeden 3 µl EtBr solüsyonundan eklendi ve iyice karıştığından emin olunana kadar erlen çalkalandı.
- Jel, mini horizontal elektroforez tankına döküldü, örnek uygulama kuyucukları jele açıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında ve onu takiben 15 dakika 2-8 °C'lik buzdolabında bekletilerek donması sağlandı.
- Hazırlanan jel, horizontal tank içerisine yerleştirildi. 1 x TBE tamponu tanka dolduruldu.
- Daha önceden izole edilen DNA örnekleri, 1 µg/kuyucuk olacak şekilde steril su içerisinde sulandırıldı ve 2 µl yükleme tamponu (loading buffer) ile karıştırılıp jelde daha önceden açılmış kuyucuklara uygulandı.
- Güç kaynağı bağlandı ve 100 Volt'a ayarlanarak çalıştırıldı. Yaklaşık olarak 45-50 dakika elektroforez devam ettirildi. Elektroforez sonunda jel tanktan çıkartıldı ve jel görüntüleme sistemi kullanılarak U.V. ışık altında fotoğraflandı.

2.2.7. Sitokrom C Tayin Yöntemi

Somatik sitokrom c, 15 kDa ağırlığında, 104 amino asitten oluşan bir polipeptiddir. Oksidatif fosforilasyonda ve apoptoziste önemli görevleri vardır. Fare, rat ve insan somatik hücrelerinde sentezlenen sitokrom c, % 91 oranında benzerlik gösterir. Sitoplazmada 12 kDa ağırlığında bir apoprotein olarak sentezlenen sitokrom c, daha

sonra reseptör bağımsız bir taşınma ile mitokondri dış membranından geçerek intermitokondrial alana yerleşir. Burada mitokondri iç membranına bağlı bulunan bir enzim olan sitokrom c hem liyaz (CCHL) ile fonksiyonel sitokrom c'ye dönüşür (Matsumoto ve ark., 1999).

Fonksiyonel hale geçen sitokrom c, oksidatif fosforilasyonda görev alarak elektronları sitokrom c redüktaz kompleksinden sitokrom c oksidaz kompleksine taşır. Bu görevinin dışında, apoptotik sinyallerin etkisi ile mitokondriden sitoplazmaya salınır. Sitoplazmaya geçen sitokrom c, burada kaspaz aracılı yolları aktive eder. Sitoplazmaya geçen 15 kDa ağırlığındaki sitokrom c, burada 130 kDa Apaf-1 (apoptotic protease activating factor), dATP ve kaspaz 9 ile birleşerek kompleks oluşturur. Bu kompleks, kaspaz 9'u aktive ederek kaspaz kaskadını başlatır (Skulachev, 1998).

2.2.7.1. Testin Prensipli ve Uygulanması

Sitokrom c, kantitatif sonuç veren sandviç enzim immunoassay formatında hazırlanmış ve western blot tekniğine alternatif olarak geliştirilmiş ELISA yöntemi ile çalışan kit kullanılarak gerçekleştirildi. Önceden sitokrom c'ye spesifik monoklonal antikorlar ile kaplanmış mikrop plaklar katı faz olarak kullanıldı. Standartlar ve örnekler kuyucuklara pipetlendikten sonra sitokrom c'ler katı fazdaki antikorlara bağlanır. Bağlanma sonrası kuyucuklar yıkanır ve bağlanmayan moleküller ortamdaki uzaklaştırılır. Daha sonra ikinci aşamaya geçilir ve kuyucuklara enzimle işaretli, sitokrom c'ye spesifik antikorlar ilave edilir. Inkubasyon süresinin sonunda bağlanmayan enzim ile işaretli antikorlar yıkanarak uzaklaştırılır. Ortama substrat ilavesinin ardından oluşan renk miktarı, başlangıç aşamasında örneğimizde ya da standardımızda bulunan sitokrom c miktarı ile doğru orantılıdır. Sonuçların değerlendirilmesi, 450 – 570 nm dalga boyunda mikrop plak okuyucuda absorbansların okunması ve standartlar ile çizilen grafik yardımı ile yapılır. Sitokrom c tayini için

“R and D Systems, Human cytochrom C Immunoassay” ticari kiti kullanıldı (Katalog no: DCTC0).

Kit İçeriği:

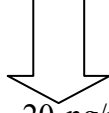
Sitokrom C Mikroplaka	: 96 kuyucuklu, polistiren mikroplaka
Sitokrom C Konjugat	: 21 ml horseradish peroksidaz ile işaretli anti-sitokrom c antikor.
Sitokrom C Standart	: 40 ng sitokrom c, liyofilize
Kalibratör Dilüent RD5P Concentrate	: 21 ml konsantre tampon özeltisi.
Hücre Lizis Tamponu 2	: 21 ml x 2 adet lizis özeltisi.
Renk Reaktifi A	: 12,5 ml hidrojen peroksit.
Renk Reaktifi B	: 12,5 ml tetrametilbenzidin.
Durdurma Tamponu	: 6ml , 2 N sülfirik asit.

Hücre lizatının hazırlanması:

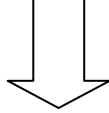
- 1- Hücreler tripsin ile muamele edilip toplandı.
- 2- Toplanan hücreler üç kez soğuk PBS ile yıkandı.
- 3- Hücreler sayılarak $1,5 \times 10^6$ hücre / ml olacak şekilde Hücre Lizis Tamponu 2 içerisinde süspanse edildi.
- 4- Oda sıcaklığında, arada karıştırılarak inkubasyona bırakıldı.
- 5- $1000 \times g$ 'de 15 dakika süreyle santrifuj edildi.
- 6- Süpernatant ayrıldı ve 50 μ l süpernatant + 200 μ l Kalibratör Dilüent RD5P kullanılarak beş kat dilue edildi.
- 7- Örnekler – 80 °C’de saklandı.

Çalışma Akış Şeması:

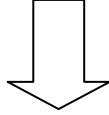
1 – Örneklerin ve reaktiflerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.



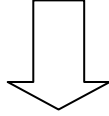
2 - Standartlar, 40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml , 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml ve 0,625 ng/ml olacak şekilde stok standarttan seri dilüsyon ile hazırlandı.



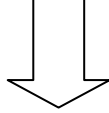
3 - Mikroplakadaki kuyucukların her birine 100 µl Kalibratör Dilüent RD5P pipetlendi.



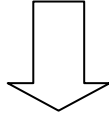
4 - Kuyucuklara 100 µl Standart, kontrol ve örnekler pipetlendi ve iki saat oda sıcaklığında inkubasyona bırakıldı.



5 - Kuyucuklar boşaltılıp dört kez yıkandıktan sonra her kuyucuğa 200 µl konjugat pipetlendi ve iki saat oda sıcaklığında inkubasyona bırakıldı.



6 - Kuyucuklar boşaltılıp dört kez yıkandıktan sonra her kuyucuğa 200 µl substrat pipetlendi ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkubasyona bırakıldı.



7 - İnkubasyon sonunda 50 µl Stop solüsyonu pipetlenip 30 dakika içerisinde mikroplaka okuyucusunda 450 – 570 nm’de okundu.

Standartlar, kontrol ve örnekler çift çalışıldı ve ortalamaları alınıp sıfır standartın optik dansitesi çıkartılarak hesaplamaya geçildi.

Sonuçların hesaplanması için standartların sonuçları kullanılarak 4-parameters logistic (4-PL) grafik çizildi ve örneklerin ng/ml cinsinden içerdikleri sitokrom c miktarı belirlendi. Hücre lizatının hazırlanması sırasında tüm örnekler beş kat sulandırıldığı için, elde edilen ng/ml biriminden sonuçlar beş ile çarpılarak son değerler elde edildi.

2.2.8. Malondialdehid Tayin Yöntemi:

Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan bir ürün olan MDA, kısa zincirli bir aldehidtir ve çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif parçalanmasını belirlemek için kullanılır.

Laboratuvar şartlarımızın uygunluğu ve analiz yönteminin standardize edilmesi nedeniyle Yoshioka ve arkadaşlarının (1979) geliştirdiği yöntem kullanılarak MDA miktar tayini gerçekleştirildi.

2.2.8.1. Testin Çalışma Prensibi ve Uygulanması:

İki molekül tiyobarbitürik asitin (TBA) bir molekül MDA ile asit ortamda sitokiyometrik olarak reaksiyona girerek pembe renkli bir ürün oluşturması esasına dayanır. Oluşan bu bileşik 532–535 nm’de maksimum absorbans verir. Standart olarak 1.1.3.3. Tetraetoksipropan kullanılır.

Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları:

1. Trikloroasetik asit (%20) : 200 g trikloroasetik asit (TCAA) tridistile suda çözülerek hacim 1 litreye tamamlandı.

2. Tiyobarbitürik asit (%0,67) : 1,675 g tiyobarbitürik asit tridistile suda çözülerek hacim 250 ml'ye tamamlandı.
3. n-Butanol
4. 1.1.3.3.Tetraetoksipropan standartı ($C_{11}H_{24}O_4$) : 1.1.3.3. Tetraetoksipropan'dan 0,494 ml alınarak etanol ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu karışımdan 0,1 ml alınarak tridistile su ile 100 ml'ye tamamlandı (= 20 $\mu\text{mol/l}$) . Uygun sulandırılmalarla çalışılarak grafik çizildi.

Çizelge 2.3. MDA tayini için çalışma şeması

Kullanılan Maddeler	Kör Tüpü	Örnek Tüpü
Örnek	-	250 μl
TCAA çözeltisi	1,5 ml	1,25 ml
TBA çözeltisi	0,5 ml	0,5 ml
30 dakika kaynar su banyosunda inkubasyon ve soğutma		
n-Butanol	2 ml	2 ml

3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra butanol tabakası başka bir tüpe aktarılarak 535 nm'de absorbanlar okundu. 1.1.3.3.tetraetoksipropan kullanılarak hazırlanmış standartlar ile çizilen grafikten yararlanılarak okunan absorbanlara karşılık gelen MDA değerleri tespit edildi. Sonuçlar nmol/ml olarak verildi.

2.2.9. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel analizler non-parametrik independent Mann-Withney testi kullanılarak gerçekleştirildi (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu, 2000).

3. BULGULAR

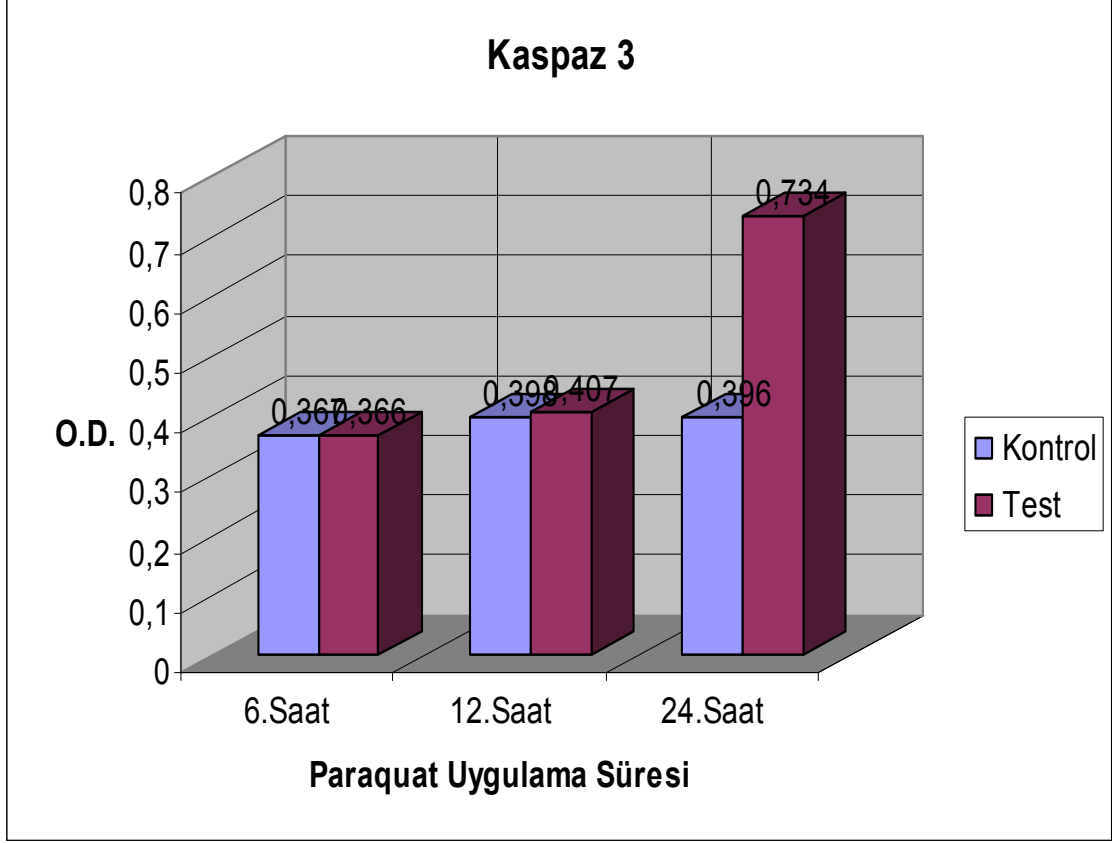
3.1. Kaspaz 3 Sonuçları

Test grubunu 10 μ M paraquat'ın RPMI 1640 + %10 FBS ve gentamisin içeren besiyerinde çözülmesi ile hazırlanan test ortamında 24 saat süreyle inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. Kontrol grubunu ise paraquat içermeyen besiyerinde test grubu ile aynı fiziki şartlarda inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. Test ve kontrol grupları inkubasyon süresinin 6., 12. ve 24. saatlerinde kaspaz 3 enzim aktivasyonu yönünden analiz edildi ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1. de verildi.

İstatistiksel analiz non-parametrik independent Mann-Withney testi ile yapıldı. Kontrol grubu ile inkubasyonun 6. ve 12. saatleri arasında istatistik olarak önemli fark bulunmadı. Kontrol grubu ile inkubasyonun 24. saati arasındaki fark istatistik olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

Çizelge 3.1. Kaspaz 3 düzeyindeki zamana bağlı değişim sonuçları

	İnkubasyon Süresi		
	6.Saat	12.Saat	24.Saat
	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD
Test Grubu	0,366 $\pm$ 0,007 a	0,408 $\pm$ 0,032 a	0,734 $\pm$ 0,142 b
Kontrol Grubu	0,367 $\pm$ 0,002 a	0,398 $\pm$ 0,015 a	0,396 $\pm$ 0,026 a



Şekil 3.1. İnkubasyon süresine bağlı olarak Kaspaz 3 düzeyindeki değişim

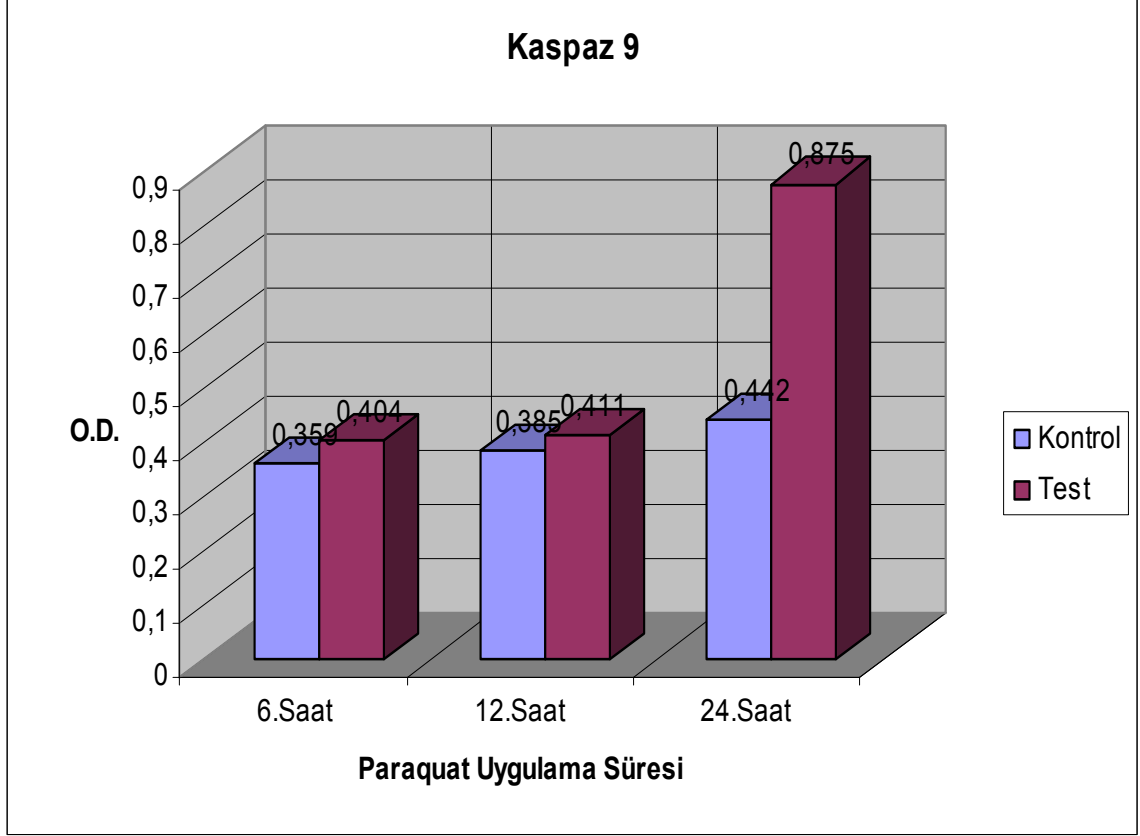
3.2. Kaspaz 9 Sonuçları

Test grubunu 10 μ M paraquat'ın RPMI 1640 + %10 FBS ve gentamisin içeren besiyerinde çözülmesi ile hazırlanan test ortamında 24 saat süreyle inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. Kontrol grubunu ise paraquat içermeyen besiyerinde test grubu ile aynı fiziki şartlarda inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. Test ve kontrol grupları inkubasyon süresinin 6., 12. ve 24. saatlerinde kaspaz 9 enzim aktivasyonu yönünden analiz edildi ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı ve Çizelge 3.2.'de verildi.

İstatistiksel analiz non-parametrik independent Mann-Withney testi ile yapıldı. Kontrol grubu ile inkubasyonun 6. saati arasında istatistik olarak önemli fark bulunmadı. Kontrol grubu ile inkubasyonun 12. ve 24. saatleri arasındaki fark istatistik olarak önemli bulundu ($p < 0.05$).

Çizelge 3.2. Kaspaz 9 düzeyindeki zamana bağlı değişim sonuçları.

	İnkubasyon Süresi		
	6.Saat	12.Saat	24.Saat
	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD
Test Grubu	0,404 $\pm$ 0,080 a	0,414 $\pm$ 0,028 b	0,875 $\pm$ 0,179 c
Kontrol Grubu	0,359 $\pm$ 0,005 a	0,385 $\pm$ 0,004 a	0,442 $\pm$ 0,034 a



Şekil 3.2. İnkubasyon süresine bağlı olarak Kaspaz 9 düzeyindeki değişim

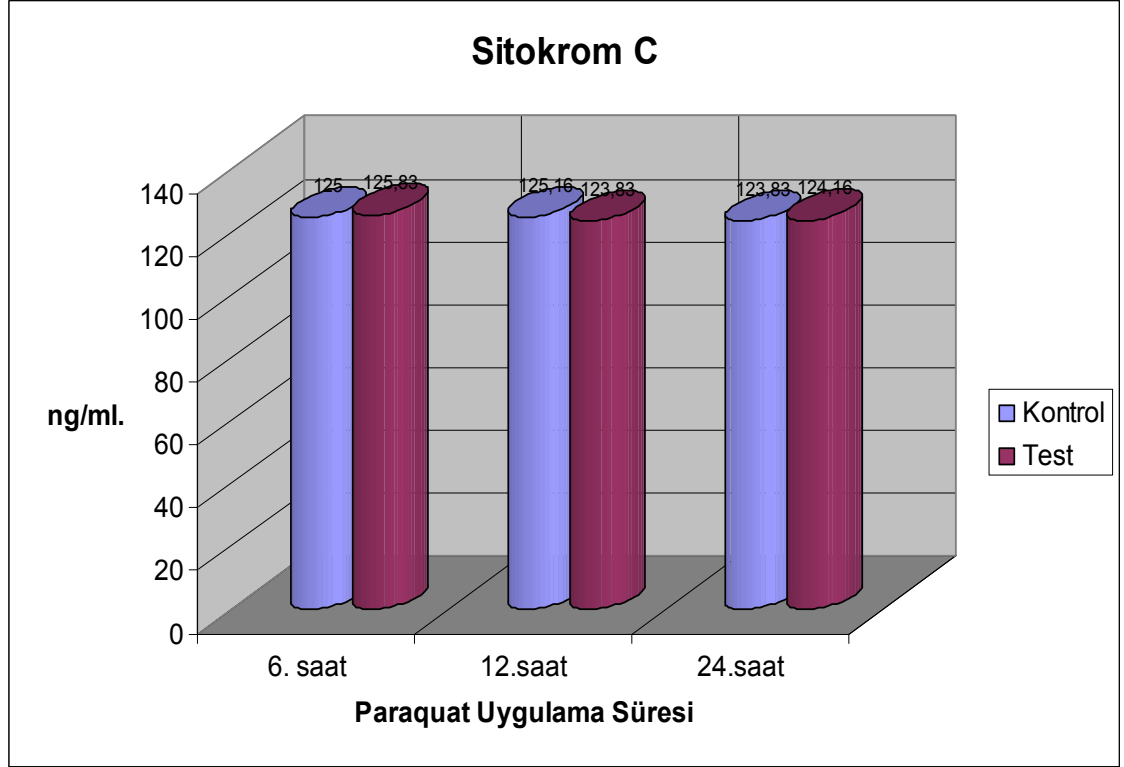
3.3. Sitokrom C Sonuçları

Test grubunu 10 μ M paraquat'ın RPMI 1640 + % 10 FBS ve gentamisin içeren besiyerinde çözülmesi ile hazırlanan test ortamında 24 saat süreyle inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. Kontrol grubunu ise paraquat içermeyen besiyerinde test grubu ile aynı fiziki şartlarda inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. Test ve kontrol grupları inkubasyon süresinin 6., 12. ve 24. saatlerinde sitokrom c miktarları ELISA yöntemi ile kantitatif olarak analiz edildi ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Örnekler ve standartlar çift çalışıldı. Elde edilen ham sonuçların ortalaması alındı, kör standartın optik dansitesinin tüm standart ve örnek optik dansitelerinden çıkartılması ile veriler elde edildi. Standartlar kullanılarak çizilen grafik yardımı ile örneklerin içerdiği sitokrom c miktarları kantitatif olarak belirlendi. Hücre lizatının hazırlanması sırasında tüm örnekler beş kat sulandırıldığı için, elde edilen ng/ml biriminden sonuçlar beş ile çarpılarak son değerler elde edildi.

Kontrol ile test grubu arasında inkubasyonun 6. 12. ve 24. saatlerindeki sitokrom c düzeylerinde istatistik olarak önemli fark bulunmadı ($p>0,05$).

Çizelge 3.3. Sitokrom c düzeyindeki zamana bağlı değişim sonuçları

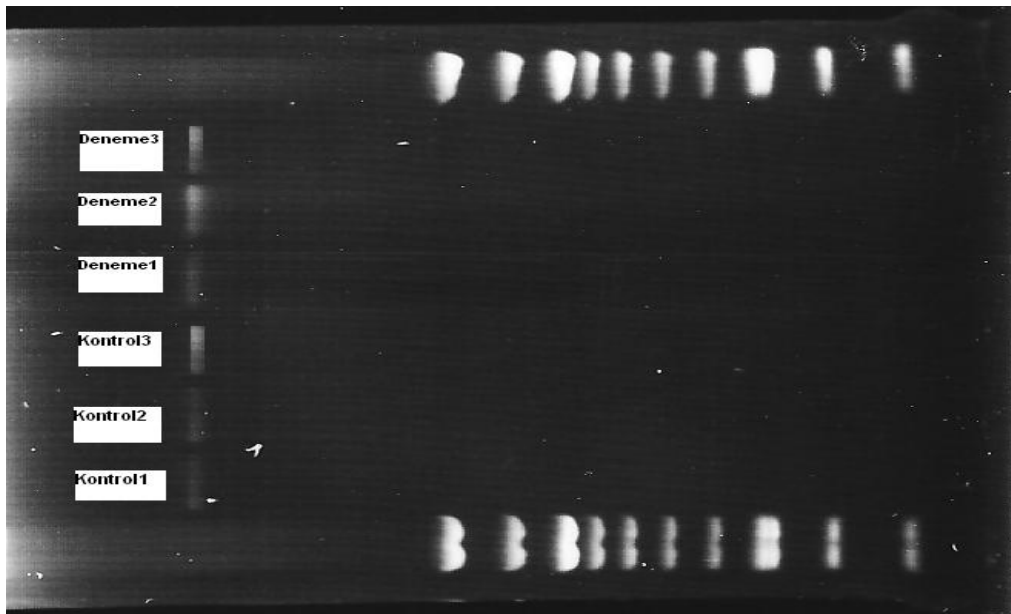
	İnkubasyon Süresi		
	6.Saat	12.Saat	24.Saat
	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD
Test Grubu	125,83 $\pm$ 2,64	123,83 $\pm$ 7,18	117,50 $\pm$ 5,19
Kontrol Grubu	121,00 $\pm$ 5,19	125,16 $\pm$ 6,65	124,00 $\pm$ 3,60



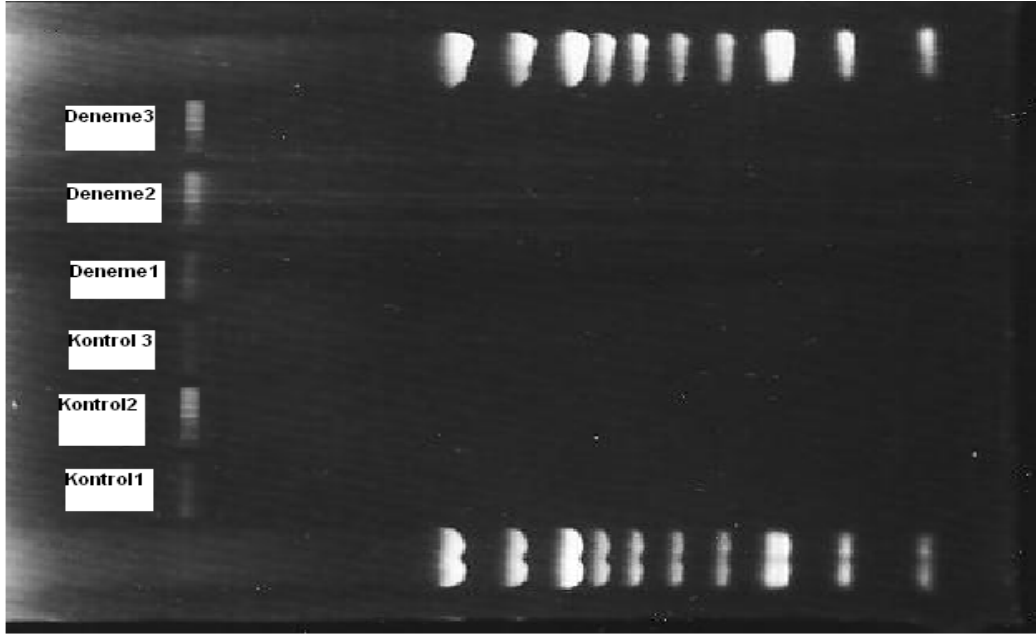
Şekil 3.3. İnkubasyon süresine bağlı olarak sitokrom c düzeyindeki değişim

3.4. DNA laddering testi sonuçları

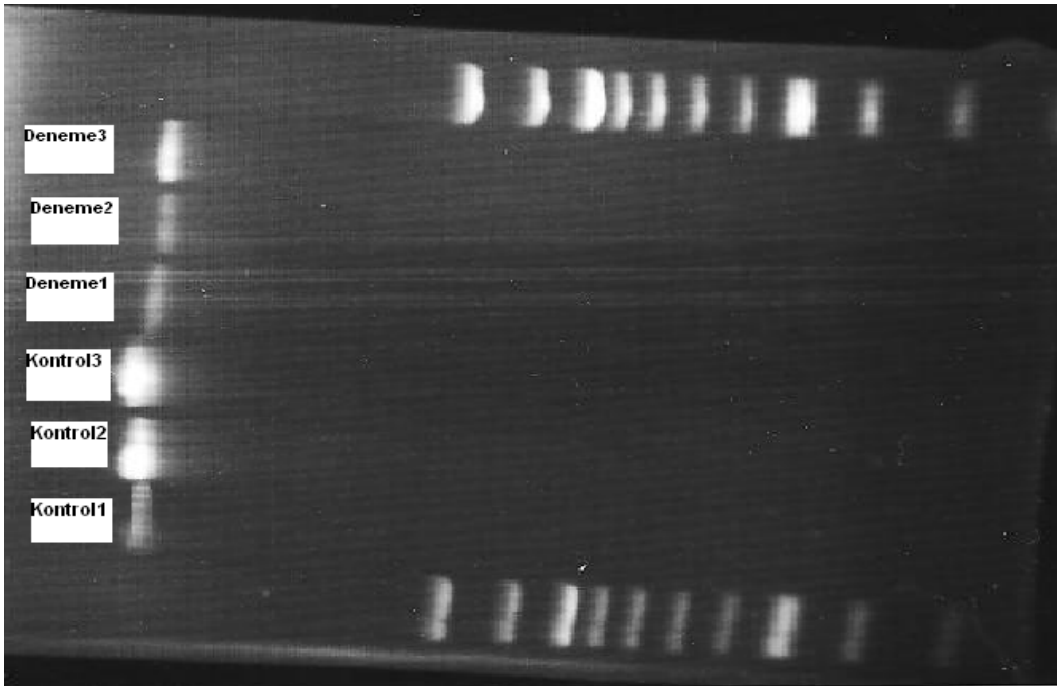
Test grubunu 10 μ M paraquat'ın RPMI 1640 + %10 FBS ve gentamisin içeren besiyerinde çözülmesi ile hazırlanan test ortamında 24 saat süreyle inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. Kontrol grubunu ise paraquat içermeyen besiyerinde test grubu ile aynı fiziki şartlarda inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. Test ve kontrol gruplarını oluşturan hücreler inkubasyon süresinin 6., 12. ve 24. saatlerinde toplanarak nükleer DNA izolasyonu yapıldı. Agaroz jel elektroforezi sonrası sonuçlar ultraviyole ışık altında değerlendirildi.



Şekil 3.4. DNA Laddering sonucu (6. saat)



Şekil 3.5. DNA Laddering sonucu (12. saat)



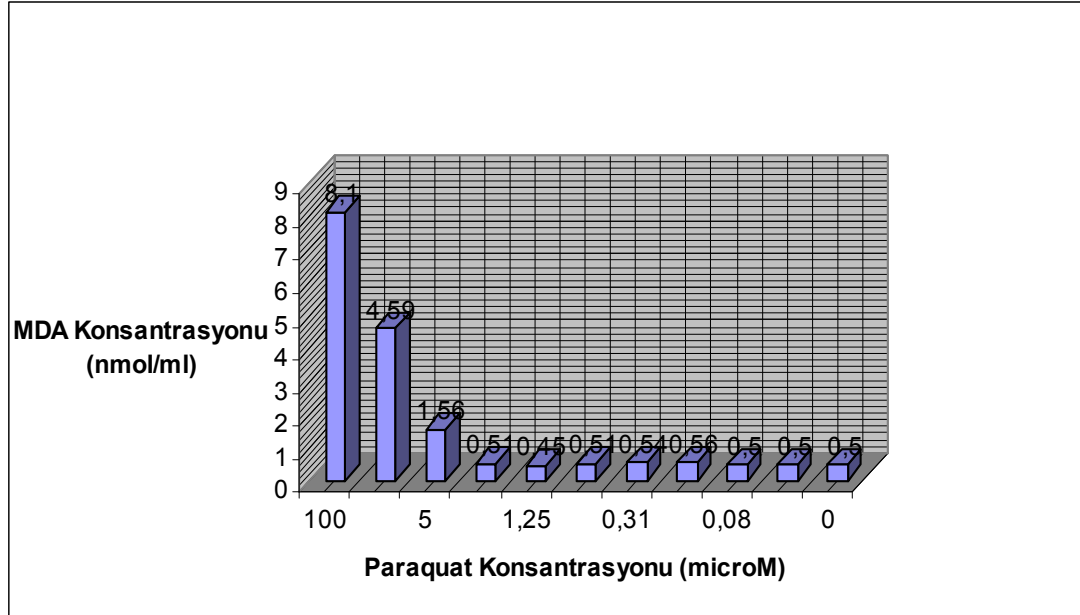
Şekil 3.6. DNA Laddering sonucu (24. saat)

3.5. MDA testi sonuçları

Paraquat içeren besiyeri ortamında üretilen hücrelerin MDA düzeyleri ölçüldü ve doza bağımlı olarak artış ya da azalışları değerlendirildi. Doza bağımlı olarak paraquatın oluşturduğu oksidatif streste artış ya da azalışlar MDA düzeyleri olarak Çizelge 3.4. de verildi ve Grafik 3.4’de gösterildi.

Çizelge 3.4. MDA düzeyinin paraquat dozuna bağlı değişimi

PQ (μM)	100	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039
MDA(nmol/l)	8,10	4,59	1,56	0,51	0,54	0,56	0,50	0,50	0,51	0,50



Şekil 3.7. MDA düzeyinin paraquat dozuna bağlı değişimi

4. TARTIŞMA

Birçok madde serbest radikal oluşturarak oksidatif hasara neden olmaktadır. Serbest radikaller kararsız moleküllerdir ve hızla zincir reaksiyonuna girerek daha fazla serbest radikal oluşturmak üzere diğer bileşiklerle reaksiyona girerler. Yüksek konsantrasyondaki reaktif radikallerin lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu ve DNA hasarı oluşturarak apoptozise ya da nekroza neden olduğu bilinmektedir (Suresh ve ark., 2003). Paraquat ve diquat hücrelerde süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşumuna yol açmaktadır (Sharma ve ark., 2005). Bu çalışma kapsamında, oksidatif stres kaynağı olduğu pek çok çalışmada kanıtlanmış ve kanserojen olmadığı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilen bir molekül olan paraquatın hepatosellüler karsinom hücrelerinden HepG2 hücre hattında in-vitro koşullarda apoptozis üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Apoptozis belirteci olarak kaspaz 3, kaspaz 9, sitokrom c ve DNA laddering testleri kullanılmıştır.

Paraquat'ın HepG2 hücre hattında IC_{50} değerini belirlemek amacıyla hücre çoğalması ve canlılığının in vitro ortamda belirlemesinde bir kriter olan MTT testi uygulanmıştır. Hücrelerin 24 saat inkubasyon sonunda % 50 oranında öldüğü yani IC_{50} yoğunluğu olarak 10 μ M belirlenmiştir. Protein kinaz inhibitörleri olan staurosporin ve H-7 (1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine) ile nöroblastoma hücre hatında yapılan bir çalışmada, MTT testi ile bu maddelerin 100 nM dozda hücre ölümünü indüklediğini ve ölüm oranının doza bağımlı olarak arttığını bildirmişlerdir (Lopez ve Ferrer, 2000). Sakinah ve ark. 2007 yılında, vahşi zencefilden elde edilen ve sitotoksik aktivitesi kanıtlanmış zerumbone maddesi ile hepatosellüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde yaptıkları çalışmada bu maddenin 3,45 μ M IC_{50} dozunda hücreler üzerinde antiproliferatif etkisinin olduğunu MTT testi kullanarak ortaya koymuşlardır (Sakinah ve ark., 2007). Farklı doku ve organlardan köken alan hücrelerin metabolizma hızları, detoksifikasyon yetenekleri, oksidatif strese dayanıklılıkları ve yaşam süreleri birbirinden farklıdır. Bu nedenle farklı hücre hatlarında aynı kimyasal maddenin lethal dozları farklılık göstermektedir. Örneğin; Nakamura ve Lipton'un (2007) nöroblastoma (SK-N-SH)

hücreleri kullanarak paraquatın apoptotik etkilerinin araştırdıkları çalışmada, 200 μM yoğunlukta paraquat, bu hücre hattında 18 saat inkubasyon için IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir (Nakamura ve Lipton, 2007). 32D/Neo fare miyeloid hücre hattında paraquatın apoptotik etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise 400 μM dozunda uygulanan paraquatın, 24 saatlik inkubasyon sonunda hücrelerin yaklaşık % 30'unu öldürdüğü bildirilmiştir (Fabisiak ve ark., 1998). Cappelletti ve arkadaşlarının (1998) insan akciğer epitel hücre hattı olan A549 kullanarak paraquat toksisitesi ve antioksidanların bu toksisite üzerine koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmada, 160 μM paraquat ile 24 saat inkubasyona bıraktıkları hücrelerde 24. saat sonunda apoptozisin indüklendiğini belirtmişlerdir. Çalışmada belirlenen 10 μM yoğunlukta paraquatın IC_{50} dozu yukarıda belirtilen çalışmalarda bildirilen yoğunluklardan daha düşük dozda olduğu görülmektedir. Niso-Santano ve ark. (2006)'nın rat beyin nöroblast hücre hattında (E18) yaptıkları çalışmada ise, düşük doz paraquatın (2,5 μM yoğunlukta) 24 saat inkubasyon sonunda hücrelerin % 50'sini öldürdüğünü bildirmektedir.

Çalışmada, paraquatın HepG2 hücreleri üzerine etkisini hangi metabolik yol üzerinden gösterdiğini anlayabilmek amacıyla, intrinsik apoptozis yolunda önemli rol oynayan kaspaz 9 enziminin aktivasyonu, paraquat inkubasyon süresine bağlı olarak incelenmiştir. Kaspaz 9, başlatıcı kaspazlar grubu içerisinde bulunan ve mitokondri aracılı apoptoziste rol alan aspartik asit spesifik proteazdır (Lei ve ark.,2002). Prokaspaz 9 un aktive olabilmesi ve kaspaz kaskadını başlatabilmesi üç aşamada olur. İlk olarak dATP/ATP, APAF-1 e bağlanır ve hidroliz olarak ADP'ye dönüşür. İkinci aşamada sitokrom c APAF-1 'e bağlanır ve multimerize olur, son aşamada ise prokaspaz 9 bu multimerik yapıya bağlanır ve otokatalizasyonla aktive olur. Aktive olan kaspaz 9, APAF kompleksinden serbest hale geçer ve diğer kaspazları uyararak apoptozisin devamını sağlar (Zou ve ark.,1999). Lopez ve Ferrer (2000), nöroblastoma hücrelerinde diğer apoptozis belirteçleri pozitif olmasına rağmen kaspaz 9'un aktive olmadığını, intrinsik olarak apoptozisin uyarılması durumunda kaspaz 9'un aktivasyonunun şart olmadığı, sitokrom c'nin kaspaz kaskadının başlatılmasında kilit rol oynadığını bildirmişlerdir. Xu ve ark. (2009), alisom B asetat

kullanarak gastrik adenokarsinom hücre hattında yaptıkları çalışmada, doza bağımlı olarak apoptozis yüzdesinin yükseldiğini, kaspaz 9 ve kaspaz 3 ifadesinin arttığını ve buna paralel olarak pro-apoptotik protein olan Bax miktarındaki artış ile Bax/Bcl-2 oranının yükseldiğini bildirmişlerdir. Sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3 aktivasyonu için kaspaz 9'un mutlaka aktive olması gerektiği ve sitokrim c'nin mitokondri dışı membran potansiyelindeki azalma ile sitoplazmaya salıverilmesinin gerektiği sonucuna varmışlardır (Xu ve ark., 2009). HepG2 hücrelerinin paraquat ile inkubasyon süresinin 6. saatinde kontrol ve deneme grupları arasında kaspaz 9 düzeylerinde istatistik olarak fark bulunmazken, 12. ve 24. saatlerde deneme gruplarında kaspaz 9 aktivasyonunun arttığı gözlenmiştir.

Efektör kaspazlar kendilerine spesifik proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (Lavrik ve ark., 2005). Pro-kaspaz 9'un aktive olması sonucu kaspaz yolu aktive olur ve bunun sonucunda da efektör kaspaz olan kaspaz 3 aktivasyonu gerçekleşir (Gren ve ark., 2005). Çalışmada, efektör kaspaz olan kaspaz 3 aktivasyonunun zamana bağlı olarak değişimine bakıldığında, inkubasyon süresinin 6. ve 12. saatlerinde kontrol ve deneme grupları arasında istatistiksel bir fark bulunmazken, 24. saatte kaspaz 3 aktivasyonunun arttığı ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür.

Nöroblastoma hücrelerinde staurosporinin uyardığı apoptozis sırasında inkubasyonun 12. saatinde kaspaz 3 seviyesinin en üst düzeye çıktığı bildirilmiştir (Lopez ve Ferrer, 2000). Ying ve arkadaşlarının 2008 yılında flavanon türevi olan (3*aRS*,4*SR*)-2-(2-chloro-4-methylsulfonylphenyl)-4-chloro-3,4-diethoxy-flavane[4,3-d]-D1,9*b*-1,2,3-thiadiazoline) MAFTZ'nin hepatosellüler karsinom hücreleri üzerinde apoptotik etkilerini araştırdıkları çalışmada, apoptotik etkinin doz ve zamana bağlı olarak kaspaz 3 aktivasyonu ve poly (ADP-riboz) polimeraz aktivasyonunun meydana geldiğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak ROS miktarında artış ve mitokondrial membran potansiyelinde kayıp olduğu ve bunun sonucunda da

ölüm sinyalinin mitokondrial oksijen stres yolağından kaynaklandığı gösterilmiştir (Meidan ve ark.,2008).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı kanser hücre hatlarında kaspaz 3'ün belirlenebilir limitlerin çok altında sentezlendiği ortaya konulmuştur. MCF-7 hücre hattında yapılan bir çalışmada bunun nedeninin kaspaz 3 genindeki (CASP-3) parsiyal delesyondan kaynaklandığı ortaya konulmuştur (Janicke ve ark., 2008). Kanser oluşum nedenlerinden biri apoptozisi kontrol eden genlerin mutasyonu ve sonucunda da kaspazların sentezinde azalma ya da hiç sentezlenememesidir. Olası kanser terapötik ajanlarının geliştirilmesi, bu enzimlerin sentezlerinin uyarılabilmesinin sağlanması esasına dayanır.

Primer hepatosellüler karsinom hücreleri ile Sun ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada, in-situ hibridizasyon yöntemi ile kaspaz 3 gen ifadesi ölçülmüş ve kanserli dokularda normal karaciğer dokusuna oranla kaspaz 3 ifadesinin düşük olduğu ve ayrıca diferansiyasyon ve kaspaz 3 arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Kaspaz 3 ifadesindeki azalmanın HCC oluşumunda etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmada dikkat çeken bir nokta da kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonlarının inkubasyon süresine göre farklılık göstermesidir. İnkubasyonun 12. saatinde ilk olarak başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 9 aktive olmuş bunu takiben kaspaz 3 inkubasyonun 24. saatinde aktive olarak apoptotik süreci devam ettirmiştir. Bu ard arda devam eden süreç bugüne kadar tanımlanmış kaspaz kaskadı fenomeni ile uyumludur.

Kaspaz 3'ün aktive olması ile sitoplazma ve nükleus içerisinde hedef proteinler yıkılır. Nükleus içerisindeki hedef proteinlerden biri de DNA endonükleaz

ile çapraz bağlanma yapan bir proteindir (PARP). Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı aktifleştirir, endonükleazın aktifleşmesi ile 180 baz çifti ve katları şeklinde kırıklar oluşur ve DNA laddering paterni meydana gelir (Lavrik ve ark., 2005). HepG2 hücrelerinde 10 μ M dozunda paraquat inkubasyonunun 6., 12. ve 24. saatlerinde DNA üzerinde kırıklar oluşturup oluşturmadığını incelemek amacıyla çekirdek DNA'sını izole ettikten sonra agaroz jel elektroforez uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve deneme gruplarında 6., 12. ve 24. saatlerde belirgin bir DNA kırılması gözlenememiştir. DNA laddering testi, kitlesel hücre ölümlerini ve çok miktarda DNA'nın yıkımlanmasını gösterebilen bir testtir. 32D/Neo fare miyeloid hücre hattında paraquatın apoptotik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, 400 μ M dozunda uygulama sonucunda DNA laddering görünümünün ortaya çıktığı bildirilmiştir (Fabisiak ve ark., 1998). MCF-7 hücre hattında, çeşitli apoptozis uyarıcıları ile (TNF/sikloheksimid, staurosporin) yapılan çalışmalarda, hücre ölümünün DNA fragmentasyonu olmadan gerçekleştiği bildirilmiştir. Diğer yandan HeLa D98 hücrelerinde aynı uyarıcılar kullanıldığında, apoptozisin meydana geldiği fakat MCF-7 hattından farklı olarak bunlarda DNA fragmentasyonunun da olduğu görülmüştür (Janicke ve ark., 1998). Daha hassas ve tek hücre bazında sonuç verebilen TUNEL testinin ileride yapılacak çalışmalarda DNA laddering testi yerine kullanılması tavsiye edilmektedir (Reshef ve ark., 2008).

Paraquat dozuna bağlı olarak sitozolde sitokrom c miktarının arttığı ve bu artışın kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak meydana geldiği ortaya konulmuştur (Nakamura ve Lipton, 2007). Sitokromlar elektron taşıyan proteinler olup, hemoglobinin hem halkasına benzer bir porfirin halkasına bağlı demir içerir. Sitokrom c, apoptozis sırasında kolayca sitoplazmaya geçebilen küçük bir moleküldür. Diğer sitokromlar ise mitokondri iç membranında yer alan proteinlerdir. HepG2 hücrelerinde, paraquatın sitokrom c düzeyi üzerine etkisini incelemek amacıyla inkubasyonun 6., 12. ve 24. saatlerinde hücre içi toplam sitokrom c miktarı ELISA yöntemi ile ölçüldü. Belirtilen saatlerde kontrol ve deneme grupları arasında sitokrom c düzeylerinde fark bulunamadı. İntrinsik hücre ölüm yolunda kilit rolü sitokrom c oynar. Nöroblastoma hücrelerinde paraquatın apoptozisi başlatması

intrinsik hücre ölüm yolu üzerinden olduğu bildirilmiştir. Sitokrom c'nin sitozole salınımı ve kaspaz 3 aktivasyonu sonucu apoptotik hücre ölümleri şekillenmesine rağmen mitokondri membran geçirgenliğinde herhangi bir fonksiyon bozukluğu gözlenmemiştir (Fei ve ark., 2007).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanserde görülen azalmış apoptozisin oluşum nedenleri; apoptozisi kontrol eden genlerin mutasyonu ve sonucunda da kaspazların sentezinde azalma ya da hiç sentezlenememesidir. Olası kanser terapötik ajanlarının geliştirilmesi, bu enzimlerin sentezlerinin uyarılabilmesinin sağlanması esasına dayanır.

Hepatoselüler karsinoma hücrelerinden HepG2 hücrelerinin paraquat ile 24 saat inkubasyonu sonunda % 50 oranında öldüğü yani IC_{50} yoğunluğunu, hücre çoğalması ve canlılığının in vitro ortamda belirlemede bir kriter olan MTT testi ile 10 μ M olarak belirlenmiştir.

Başlatıcı kaspazlar grubu içerisinde bulunan ve mitokondri aracılı apoptoziste rol alan aspartik asit spesifik proteazlardan Kaspaz 9'un HepG2 hücrelerinin 10 μ M paraquat ile inkubasyon süresinin 12. ve 24. saatlerinde kaspaz 9 aktivasyonunun arttığı gözlenmiştir.

Efektör kaspaz olan kaspaz 3 aktivasyonunun zamana bağlı olarak değişimine bakıldığında, inkubasyon süresinin 24. saatinde aktivasyonunun arttığı tesbit edilmiştir.

Kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonlarının inkubasyon süresine göre farklılık göstermektedir. İnkubasyonun 12. saatinde ilk olarak başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 9 aktive olmakta bunu takiben inkubasyonun 24. saatinde kaspaz 3 aktive olmaktadır. Bu ard arda devam eden aktivasyon ile bugüne kadar tanımlanmış kaspaz kaskadı fenomeniyle uyumlu olarak apoptotik süreç başlamıştır.

HepG2 hücrelerinde 10 μ M dozunda paraquat ile 24 saat inkubasyonu sonunda DNA üzerinde kırıklar oluşturup oluşturmadığı, izole edilen çekirdek DNA'sının agaroz jel elektroforez uygulaması ile gerçekleştirilmiştir, 6., 12. ve 24. saatlerde belirgin bir DNA kırılması gözlenmemiştir.

Mitokondri dış membranında geçirgenlik artışı sonucu meydana gelen sitozolik sitokrom c artışı, 10 μ M dozunda paraquat ile 24 saat inkubasyona tutulan HepG2 hücrelerinde 6., 12. ve 24. saatlerde tesbit edilememiştir.

Terapötik açıdan bakıldığında, ROS kesinlikle gelecekte üzerinde çalışılması gereken, yeni özellikleri ve etkileri incelenmesi gereken bir konudur. Günümüzde pekçok grup, ROS üretimini arttıran pekçok doğal ya da yapay kanser terapötik ajanları üzerinde çalışmaktadır. Bunlardan birinin ya da birkaçının kombinasyonunun gelecekte umut vaadeden ilaçlara dönüşmesi beklenmektedir

Son yıllarda üzerinde durulan konulardan birisi de kanser kemoterapisi sırasında antioksidanların verilmesi, antineoplastik etkinliği engeller mi yada kemoterapi sırasında oluşan yan etkilerin gelişimini önler mi olmaktadır. In vitro sistemlerde ve bazı hayvan deneylerinde elde edilen sonuçlar, kemoterapi sırasında antioksidatif dozda vitaminlerin kullanılmasının yararlı olduğunu gösterse de halen klinik çalışmalar devam etmektedir. Burada en önemli nokta kullanılan kemoterapötik ajanın oksidatif stres yaratarak apoptozis yoluyla öldürmeye çalıştığı kanser hücrelerini, dışarıdan verilen antioksidanlarla apoptozise gitmesini engellememelidir. Bununla beraber, eğer oluşan radikaller sadece yan etkilerinden sorumlu yani ilacın antineoplastik aktivitesinden sorumlu değilse, antioksidanların kullanımı yan etkilerin en aza indirilmesi için yararlı olabileceğinden, oksidatif stres oluşturulan hücrelerde antioksidanların etkilerinin incelendiği çalışmalara yer verilmelidir.

ÖZET

Paraquat İle Oluşturulmuş Oksidatif Stresin HepG2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkisinin Araştırılması

Apoptozisin spesifik olarak kanser hücrelerinde indüklenebilmesi, apoptoziste meydana gelen biyokimyasal değişikliklerin ortaya konulduğu zamandan beri ilgi odağı olmuştur. Uygun zamanda gerçekleşmeyen apoptozis çok sayıda hastalığın etiyolojisinde yer almaktadır. Kaspaz aktivasyonunun kontrolü, apoptoziste kilit rol oynamaktadır. Çünkü kaspazlar apoptoziste meydana gelen biyokimyasal değişikliklerde birincil öneme sahiptir. Kanser gibi yetersiz apoptozisin meydana geldiği hastalıklarda ya da sendromlarda kaspaz aktivasyonunun sağlanabilmesi tedavi için gerekli bir adımdır.

Paraquat (PQ), bipyridyl yapısında, herbisit olarak kullanılan, toksik etkileri insanlarda ve hayvanlarda iyi tanımlanmış bir kimyasaldır. Paraquat uygulaması sonrası gözlenen hücresel hasar P450 redüktaza bağımlı olarak reaktif oksijen türlerinin oluşması sonucu meydana gelir. Oksidatif stres sırasında meydana gelen membran lipidlerinin peroksidasyonu, apoptozisin başlatılmasında potansiyel bir hedeftir.

Bu çalışmanın amacı, paraquat ile oluşturulmuş oksidatif stresin HepG2 hücre hattında kaspaz bağımlı apoptozis üzerine etkilerini incelemek, sitokrom c düzeylerindeki değişimi ve DNA kırıklarının oluşumunu ortaya koymaktır.

MTT hücre canlılık testi, farklı PQ yoğunluklarında ve zaman periodlarında uygulandı. HepG2 hücreleri için 24 saat inkubasyon süresinde PQ'nın IC₅₀ 10mM olarak belirlendi. Lipid peroksidasyonunun belirteci olarak malondialdehit düzeyleri TBA testi ile analiz edildi. Kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeyleri, paraquat inkubasyonunun 6., 12. ve 24. saatlerinde kolorimetrik olarak tesbit edildi. Aynı zaman aralıklarında sitokrom c düzeyleri ELISA ile belirlendi. DNA laddering testi, DNA fragmentasyonunu gösterebilmek amacıyla gerçekleştirildi.

Sonuç olarak, inkubasyonun 6. ve 12. saatlerinde kaspaz 3 değerleri kontrol ve deneme grupları arasında istatistiksel olarak fark önemli bulunmazken, 24. saatte fark önemli bulundu. Diğer taraftan kaspaz 9 düzeyinde inkubasyonun 12. ve 24. saatlerinde kontrol ve deneme grupları arasında istatistik olarak önemli fark bulundu. Bütün gruplarda ve inkubasyon sürelerinde sitokrom c düzeyleri arasında fark bulunamadı. Ayrıca DNA fragmentasyon analizi sonucunda, kontrol ve deneme gruplarında DNA kırıkları belirlenemedi.

HepG2 hücre hattında paraquat ile oluşturulan oksidatif stres sonucunda kaspaz aktivasyonu gözlenmekle birlikte DNA laddering ve sitokrom c salınımı belirlenememiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, HepG2, Paraquat, Kaspaz

SUMMARY

The Effect of Oxidative Stress Induced by Paraquat on Apoptosis in Hep G2 Cells

The capacity to specifically induce apoptosis in cancer cells by manipulating components of the apoptotic pathway has been a goal since this pathway was first described. Inappropriate apoptosis clearly underlies the etiology of several human diseases. The control of caspases, as a key and central component of the biochemical pathway that mediates apoptotic cell death, is an attractive first step in modulating this process. Caspase activation for the treatment of disorders as cancer where insufficient apoptosis occurs.

Paraquat (PQ), a bipyridyl herbicide, toxic effects of which have been well described in both humans and animals. The mechanisms of cellular damage after PQ involve the P-450 reductase-dependent formation of reactive oxygen species which have been implicated in the final common pathway that triggers apoptosis; peroxidation of membrane lipids during oxidative stress represents one potential target for signaling apoptosis

The goal of the current study was to evaluate paraquat induced oxidative stress on caspase dependent apoptosis, cytochrom c levels and DNA laddering pattern in hepatocellular carcinoma cell line.

MTT cell viability and proliferation assay were performed different PQ concentrations and time periods. 24h 10mM paraquat treatment was settled as IC₅₀ for HepG2 cell line. Malondialdehyde, a marker of lipid peroxidation was estimated with TBA method. Caspase 3-9 were analyzed at 6., 12. and 24.h as apoptosis indicator with colorimetric assay. Cytochrom c levels also estimated same time periods. DNA laddering assay performed to evaluate DNA fragmentation during apoptosis.

The results indicated that there was no statistically significant after 6.h and 12.h but significant increase in 24.h for caspase 3. On the other hand statistically significant increase has been found 12. and 24.h for caspase 9 compare to control group. In all groups and time periods cytochrom c levels has been found at the same level. DNA fragmentation pattern hasn't been found in control and experiment groups.

Key words: Apoptosis, HepG2, Paraquat, Caspase

KAYNAKLAR

- AKKUŞ,İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza yayınları*, Yayın no: 38, Konya.
- ANONİM (2005) www.caspases.com Erişim Tarihi: 12-2005
- ANONİM (2006) www.panap.net Erişim Tarihi: 03-2006
- BARCOWSKY, A., DUDEK, J., TREADWELL, D., WETTERHAHN, E. (1996). Arsenic induces oxidant stress and NF-kappa B activation in cultured aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **21**:783–790.
- BENHAR, M., ENGELBERG, D., LEVITZKI, A. (2002). ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer . *EMBO Rep* **3**:420-425.
- BRAUNWALD, E. (2008). Biomarkers in heart failue. *New England J of Med* **358**:2148-59.
- BRONCHUD, M.H., FOOTE, M.A., PETERS, P.W., ROBINSON, M.O. (2000). Principles of Molecular Oncology. Human Press Inc, Ottawa New Jersey, pp: 237-255.
- BUDIHARDJO, I., OLIVER, H., LUTTER, M., LUO, X., WANG, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:269-290 .
- BURÇAK, G., ANDİCAN, G. (2004). Oksidatif stres ve yaşlanma. *Cerrahpaşa J Med.* **35**:159-169.
- CAPPELLETTI, G., MAGGIONI, M., MACI, R. (1998). Apoptosis in human epithelial cells: trigersing by paraquat and modulation by antioxidants. *Cell Biology International* **22**: 671–678
- CHERRADI, L., ZHENG, S., TISCH, M., CHEN Y.H. (2003). Critical roles of tumor necrosis factor releated apoptosis inducing ligand in type1 diabetes. *Diabetes* **52**(9) : 2274-2278.
- CUTHBERST, C., WANG, Z., ZHANG, X., TAM, S. (1997). Regulation of human apolipoprotein A-I gene expression by gramoxane. *J.Bio Chem.* **272**:14957-14960.
- DIKER, S. (1998). İmmunoloji. Medisan yayınevi, , birinci basım. Sf:137-145, Ankara
- EARNSHAW, C.W., MARTINS, M.L., KAUFMANN, H.S. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**:383-424.
- FABISIAK, J., KAGAN, V., TYURINA, Y., TYURIN, V., LAZO, J. (1998). Paraquat induced phosphatidylserine oxidation and apoptosis are independent of activation of PLA2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **274**:793-802.
- FARRIS, M.W., CHAN, B.C., PATEL, M., HOUTEN, V.B., ORRENIUS, S. (2005). Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Int* **5**(2): 94-111.

- FESIK, W.S. (2000). Insight into programmed cell death through structural biology. *Cell* **103**: 273-282.
- FEI,Q., MCCORMAC, A., MONTE, D., ETHELL, D. (2007). Paraquat neurotoxicity is mediated by a Bak-dependet mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* **4**: 1-8
- FOLKINS, A., JARBOE, E., SALEEMUDDIN, A., LEE, Y., CALLAHAN, D., DRAPKIN, R., GARBER J., MUTO, M., TWOROGER, S., CRUM, C. (2008). A candidate precursor to pelvic serous cancer (p53 signature) and its prevalence in ovaries and fallopian tubes from women with BRCA mutations. *Gynecologic Oncology* **109**: 168-173.
- FRENKEL, K. (1989). Oxidation of DNA bases by tumor promoter –activated process. *Environ Health Perspec* **81**: 45-54.
- FINKEL, T., HOLBROOK, J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**:239-247.
- GARRIDO, N., MESEGUER, M., SIMON, C., PELLICER, A., REMOHI, J. (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its releation with male fertility. *Asian J Androl* **6**:59-65.
- GREEN, D., KROEMER, G. (2005). Pharmacological manipulation of cell death: Clinical applications in sight? *J. Clinic Invest* **115**:2610-2617.
- GREEN, R.D. (2006). At the gates of death. *Cancer Cell*. **9**(5): 328-330.
- GRIEVE, D.J., SHAH, A.M. (2003). Oxidative stress in heart failure: more than just damage. *Eur Heart J* **24**:2161- 2163.
- GRIFITH, T., S., FERGUSON, T., A. (1995). The FasL-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* **270**: 1189-1192.
- GÜNEŞ, H. (1999). Sitokinlerin hücre döngüsü üzerinde etkileri. *Tr J of Biology* **23**: 283-292.
- HANNA, R., CAMPBELL, R., DAVIES, P. (2008). Calcium bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature* **456**: 409-412 .
- HALLIWEL B., GUTTERIDGE M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: An overview . *Methods in Enzym* **186**: 1-42.
- HALLIWELL, B., BORISH, E. (1989). Current Status Review: Free radicals, reactive oxygen spicies and diseases . *Br J Exp Path* **70**: 737-757.
- HENCHCLIFFE, C., BEAL, F. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stres in Parkinson disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice Neurology* **4**: 600-6009.
- HENGARTNER, O.M. (2000). The biochemirty of apoptosis. *Nature*. **407** :770-776.

- HETTS, SW. (1998). To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* **279**: 300-307.
- HIROSE, Y., YOSHIMI, N., SUZUI, M., KAWABATA, K., TANAKA, T., MORI, H. (1997). Expression of bcl-2, bax, and bcl-XL proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas. *Mol Carcinog* **19(1)**: 25-30.
- HO, P., HAWKINNS, J.C. (2005). Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS journal* **272**: 5436-5453.
- KERR, J.F. (1972). Shrinkage necrosis. *J of Path* **105(1)**: 13-20.
- IRMLER, M., THOME, M., HAHNE, M. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**: 190-195.
- IOANNOU, A.Y., CHEN, WF. (1996). Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis. *Nucleic Acid Research* **25**: 992-993.
- ITOH, N., YONEHARA, S., ISHII, A., YONEHARA, M. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**: 233-43
- JANICKE, U.R., SPRENGART, M., WATIR, R., PORTER, A. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation on morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 9357-9360
- KAUFMANN, S.H., GREGORY, J.G. (2000). Apoptosis in cancer: cause and cure. *BioEssays* **22**: 1007-1017.
- KENNETH, C. (2004). Cancer Chemotherapy and Antioxidants. *J Nutr* **134**: 3201-3204.
- KERR, J.F. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257
- KNOX, P., G., MILNER, A., GREEN, N. (2003). Inhibition of metalloproteinase cleavage enhances the cytotoxicity of Fas ligand. *J Immunol* **170**: 677-685.
- KUMAR, S. (2007). Caspases and their many biological functions. *Cell death and differentiation* **14**: 1-2.
- KINLOCH, R., TREHERNE, J., FURNESS, L., HAJIMOHAMADREZA, I. (1999). The pharmacology of apoptosis. *Trends in Pharma Sci* **20**: 35-42
- KÖKEN, T., KAHRAMAN, A., SERTESER, M., GÖKÇE, Ç. (2004). Hemodiyaliz ve oksidatif stres. *The Medical Journal of Kocatepe* Ek Sayı 9-13
- KÜLTÜRSAY, H., KAYIKÇIOĞLU, M. (2002). Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar. *Anadolu Kardiol Derg* **4**: 323-9
- LAMKANFIL, M., FESTJENS, N., DECLERC, W., BERGH, T., VANDENABEELE, P., (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death and Differentiation* **14**: 44-55.

- LAU, T., CHIU, F. (2006). Proteomic and biochemical analyses of in vitro carcinogen-induced lung cell transformation: synergism between arsenic and benzo(a)pyrene. *Proteomics* **6**:1619-1630.
- LAU, T., WANG, Y., CHIU, J. (2008). Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem* **104**(2),657–667.
- LAVRIK, N., GOLKS, A., KRAMMER, P. (2005). Caspases: Pharmacological manipulations of cell death. *The J Clin Invest* **115**: 2665-2672.
- LEHNER, T., BARNERS, C.G. (1979). Criteria for diagnosis of Behce's syndrome. In Behcet's syndrome .London: Academic Press:1-9.
- LEI, K., NIMNUAL, A., ZONG, W., KENNEDY, N., FLAVVEL, R., THOMPSON, C., BARSAGI, D., DAVIS, R. (2002). The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol* **22** (13): 4929–42.
- LI, J., YUAN, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* **27**: 6194–6206.
- LOPEZ, E., FERRER, I. (2000). Staurosporine and H-7 induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation but not with activation of Fas/Fas-L-caspase 8 signaling pathway. *Mol Brain Res* **85**: 61-67.
- LOWE, WS., LIN AW. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**: 485–495.
- LUTY, S., JADWIGA, L., HALLIOP, J., TOCHMAN, A., OBUCHOWSKA, D., KORCZAK, B., BYCHAWSKI, E. (1997). Dermal toxicity of paraquat. *Ann Agric Environ Med* **4** : 217-227.
- MARSDEN, V., O'CONNOR, L., O'REILLY, L., SILKE, J., METCALF, D., EKERT, P., HUANG, D., CECCONI, F., KUIDA, K., TOMASELLI, K., ROY, S., NICHOLSON R., VAUX, D., BOULLET, P., ADAMS, M.J., STRASSER, A. (2002). Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* **419**: 634-637.
- MATSUMOTO, S., FRIBERG, H., FERRAND, M., WIELOCH, M. (1999). Blockage of the mitochondrial permeability transition pore diminishes infarct size in the rat after transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **19**: 736-741.
- MATTSON, P.M., CHAN, L.S. (2003). Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biology* **5**: 1041 – 1043
- MCCARTHY, N. (2008). Tumorigenesis :First or last? *Nature Reviews Cancer* **8**: 78-79.
- MEIDAN, Y., TU CHONGXING, T., YING, H., HU, Y., HE, Q., YANG, B. (2008) MSFTZ, a flavanone derivative, induces human hepatoma cell apoptosis via a reactive oxygen species and caspase dependent mitochondrial pathway. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **325**:758-765.

- MELINO, G. (1994). Tissue transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells. *Mol Cell Bio* **14**:6584-6596.
- MELLER, R., SKRADSKI, L., SIMON, P. (2002). Expression proteolysis and activation of caspases 6 and 7 during rat C6 glioma cell apoptosis. *Neurosci Lett.* **10**: 33-36.
- MERCAN, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU VetFak Derg.* **15**(1-2):91-96.
- MIYATA, T. (2002). Alterations in non-enzymatic biochemistry in uremia: Origin and significance of carbonyl stress in longterm uremic complications. *Kidney Int* **62**:301-310.
- MOLLACE, V., LANNONE M., MUSCOLI C., PALMA E., GRANATO T., RISPOLI V., NISTICO R., ROTIROTI D., SALVEMINI D., (2003). The role of oxidative stress in paraquat induced neurotoxicity in rats: protection by non peptidyl superoxide dismutase mimetic. *Neurosci Lett* **335**:163-166.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**(1-2), 55-63.
- NAGATA, S., GOLSTEIN, P. (1995). The Fas death factor. *Science* **267**:1449-56.
- NAGATA, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**:355-65.
- NAKAGAWA, T., YUAN, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families: activation of Caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Bio* **150**: 887-894.
- NAKAMURA, T., LIPTAN, A. (2007). Molecular mechanisms of nitrosative stress-mediated protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Cell and Mol L Sci* **64**(13):1609-20.
- NICHOLSON, W. (2000). From bench to clinic apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* **407**: 810-816 .
- NICHOLSON, W., THORNBERRY, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**: 299–306.
- NIKI, E. (1987). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem and Phys of Lipids* **44**:227-253.
- NIKI, E. (1991). Action of ascorbic acid as a scavenger of active stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr* **54**,1119-1124.
- NORIKO, B., WAKAMATSU, S., TERAOKA, J. (2007). Effect of excessive intake of quercetin on the vitamin E level and antioxidative enzyme activities of mouse liver under paraquat-induced oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem* **71** : 2569-2572.
- OEHRMANN, A., BEHRMANN, I., FALK, W., PAWLITA, M. (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily: sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* **267**:10706–10715.

- OSTHOFF, K.S., FERRARI, D., LOS, M., WESSELBORG, S., PETER, M.E., (1998). Apoptosis signaling by death receptor. *Eur J Biochem.* **254**, 439–459.
- ÖNİZ, H. (2004). Apoptosis: The death decision. *SSk Tepecik Hast Derg.* **14**(1): 1-20.
- ÖKTEM, S., ÖZHAN, M., ÖZOL, D. (2001). Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* **2**(1):91-95.
- ÖZTÜRK, F. (2002). Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fak Derg.* **9**(2): 143-148.
- PARDHASARADHI, V., ALI, M., KUMARI, L., REDDANNAN, P., KHAR, A. (2003). Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. *Molecular Cancer Ther* **2**:1165-1170.
- PETERSEN, S. L. (2007). Autocrine TNF α signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic induced apoptosis. *Cancer Cell* **12**, 445–456 .
- PETROS, A., M., OLEJNICZAK, E., T., FESIK, S., W. (2004). Structural biology of the bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* **1644**(2-3): 83-94.
- POLE, R.J., QI, B.Q., BEASLEY, S.W. (2002). Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. *J Urol* **167**:269-71.
- POLI, G., LEONARDUZZI, G., BIASI, F., CHIARTPOTTO, E. (2004). Oxidative stress and cell signaling. *Curr Med Chem* **11**:1163-1182.
- QINN, D., ROY, N., STENNICKE H., ARASDALE TV., ZHOU, Q. (1998). IAPs block apoptotic events induced bu caspase-8 and cytochrom c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO journal* **17**: 2215–2223.
- RAHMAN, I., MACNEE, W. (2000). Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: Therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med* **28**:1405-1420.
- RESHEF, A., SHIRVAN, A., SHOHAMI, E., GRIMBERG, H., LEVIN, G., COHEN, A., TREMBOVLER, V., ZIV, I . (2008). Targeting cell death In Vivo in experimental traumatic brain injury by a novel molecular probe. *Journal of Neurotrauma* **25**:1-12.
- RICHARD, D., CHERVENAK, R., COHEN J.J. (1983). Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: An early event in -cell-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci* **80**:6361-6365.
- SAKINAH, S., HANDAYANI, T., HAWARIAH, A. (2007). Zerumbone induced apoptosis in liver cancer cells modulation of Bax/Bcl-2 ratio. *Cancer Cell International* **7**: 1-11.
- SANDERS, E.J., TORKELLI, P.H., FRENCH, A.S. (1997). Patterns of cell death during gastrulation in chick and mouse embryos. *Anat Embryol* **195**:147-154.
- SCHULZE-OSTHOFF K., FERRARI D., LOS, M., WESSELBORG, S., PETER, M. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J of Biochem* **254**: 439-459.
- SHARMA, Y., BASHIR, S., IRSHAD, M., NAG, T.C., DOGRA, T.D. (2005). Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. *Toxicology* **215**: 173-181.

- SKULACHEV, V. P. (1998). Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* **423**: 275-280.
- SPIERINGS, CD., VRIES, G., VELLENGA, E., HEUVEL, F.A., KOORNSTRA, J., WESSELING J., HOLLEMA, H., JONG S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and it's receptors. *J Histochem and Cytochem* **52**(6): 821-831.
- SRINIVASULA, S., HEDGE, R., SALEH, A., DATTA, P., SHIOZAKI, E., CAHI, J., LEE, R., ROBBINS, P., ALNEMRI, T., SHI, Y., ALNEMRI, E. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**:112- 115.
- STAUNTON, M.J, GAFFNEY G., (1998). Apoptosis. Basic concepts and potential significance in human cancer. *Arch Pathol Lab Med* **122**:310-319.
- STRATTON, M., CAMPBELL, P., FUTREAL, A. (2009).The cancer genome. *Nature* **458**: 719–724.
- SUN, C., CAI, M., MEADOWS, P., XU, N., NG C. (1999). NMR structure and mutagenesis of the third BIR domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem* **275**: 33777-33781.
- SUN, H.B., ZHANG, B., ZHAO, P.X., WANG, K.Y., YU Q., YANG L.D., HAO, J.L. (2000). Analysis of in vivo patterns if caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21Waf1 expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroentero* **6**(3):356-360.
- SURESH, A., GUEDEZ, L., MOREB, J., ZUCALI, J. (2003). Overexpression of manganese superoxide dismutase promotes survival in cell lines after doxorubicin treatment. *British Journal of Haematology* **120**: 457-463.
- SÜMBÜLOĞLU, K., SÜMBÜLOĞLU, V. (2000).Biyoistatistik. Hatipoğlu yayınları No.53. 9.Baskı, Ankara.
- TAIT, S., GREEN, D. (2008). Caspase independed cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* **27**: 6452–6461.
- THOME, M., SCHNEIDER, P., HOFFMAN, K., FICKENSCHER, H., MEINHL E., NEIPL, F., MATTMAN, C., BURNS, K., BODMER, L., SCHOTER, M. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**: 517-521.
- THOMPSON, C.B. (1995). Apoptosis in the pathologenesi and treatment of disease. *Science* **267**:1456–62.
- THORNBERRY, N., LAZEBNIK, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-17.
- TURGUT, B., DEMİR, T., ÇELİKER, Ü. (2006). Oftalmolojide apoptozis. *Fırat Tıp Derg* **11**(1): 6-11.

- VALANZUELLA, A., (1991). The biological significance of Malondialdehyde determination in the Assessment of tissue oxidative stress. *Life Science* **48**:301–309.
- VUCIC, D., FAIRBROTHER, W. (2007). The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* **13**:(20).
- XU, Y., ZHAO, L., LI, Y. (2009). Alisol B acetate induces apoptosis of SGC7901 cells via mitochondrial and phosphatidylinositol 3-kinases / Akt signaling pathways. *World Journal of Gastro* **15**: 2870-2877.
- YEHIELLY, F., DEISS, L.P. (2000). Apoptosis and cancer. Chapter 11, Current Medicine Inc. Philadelphia, USA .
- ZOU, H., Li, Y., LIU, X., WANG, X. (1999). An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase 9. *The Journal of Biological Chemistry* **274**:11549-11556.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Görkem KISMALI

Doğum Tarihi : 6 Nisan 1980

Doğum Yeri : İzmir/Bornova

Medeni Hali : Bekar

İletişim adresi ve Telefonu: Örnek mah. 22.sok AB/4 Blok 2. Giriş D.1

0312 318 97 35

0532 474 30 55

II. Eğitim-Öğretim

Üniversite : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1996-2002

Doktora : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2003-2009

Doktora Tez Konusu : Paraquat ile oluşturulmuş oksidatif stresin HepG2 hücrelerinde apoptozis üzerine etkisinin araştırılması

Doktora Tez Danışmanı : Prof. Dr. Tevhide SEL

III. Akademik Yükselmeler

Araştırma Görevlisi : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı, Şubat 2007- Devam ediyor

Yabancı Dil : İngilizce

Yabancı Dil Sınavı : ÜDS - 75

IV. Yayınlar, Bildiriler ve Projeler

“The Evaluation of Epigallocatechin Gallate and N-Acetylcystein on Serum Testosterone Levels in Male Guinea Pigs Exposed to Cell Phone Microwave”
G.Kismali, E.Ozgur, S.Sayiner, B.Alpaslan, G.Guler, N.Seyhan, T.Sel
JAVA 8(6): 1149-1151, 2009

“Effects of Coenzyme Q10 on Blood Biochemistry in Rats”
G.Kismali
Kafkas Univ Vet Fak Derg 15(2):191-194, 2009

“The Effects of Epigallocatechin Gallate and N-Acetylcystein on Mobile Phone-Induced Oxidative Stress in Guinea Pigs”
G.Kismali, E.Ozgur, S.Sayiner, B.Alpaslan, G.Guler, N.Seyhan, T.Sel
JAVA 8(5):959-961, 2009

Uluslararası ve Ulusal Kongrelerdeki Bildiriler:

“Assessment of C-Reactive Protein with SDS-Page and Starch Gel Electrophoresis of Dogs on Which Prednisolone With Immunosuppressive is Applied”

G.Kısmalı, B.M.Alpaslan, T.Sel

4.Veterinary Medicine Students Research Congress poster sunumu

En iyi poster 3.lük ödülü 20-24 Mayıs 2002

“Research of Changes on Serum Ca and Mg Levels of Dogs, on Which Prednisolone With Immunosuppressive Dosage is Applied”

B.M.Alpaslan, G.Kısmalı, T.Sel, A.Kurtdede

4. Veterinary Medicine Students Research Congress sunumu

20-24 Mayıs 2002

“Subklinik Mastitisli İneklerde Süt ve Kan Serum Sodyum, Potasyum, Klor ve Demir Düzeyleri.”

M. Pekcan, H. Karagül, G. Kısmalı, S. Sayiner, U.R. Fidancı, T. Sel, M.Kaymaz.

III. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı)

21 - 23 Haziran 2007, Konya

“The effects of Epigallocatechin gallate and N-Acetylcysteine on mobile phone-induced oxidative stress in Guinea pigs.”

G. Kısmalı, E. Ozgur, S. Sayiner, B. Alpaslan, G. Guler, N. Seyhan, T.Sel .

32. FEBS Meeting 7-12 July 2007 Wien, Avusturya.

“The effects of Epigallocatechin gallate and N-Acetylcysteine on serum testosterone levels in mobile phone-exposed Guinea pigs.”

S. Sayiner, E. Ozgur, B. Alpaslan, G. Kısmalı, G. Guler, N. Seyhan, T.Sel.

32. FEBS Meeting 7-12 July 2007 Wien, Avusturya.

“Oxidative stress induce caspase mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma cells”

G.Kısmalı, T.Sel .

1st International Multidisciplinary Cancer Research Congress sözlü sunum

21-24 Mayıs 2009 Antalya-Türkiye

Görev Aldığı Projeler

“Vitamin E'nin HepG2 Hücre Hattında Apoptoz Üzerine Etkileri.”
T.Sel, H.Karagül, **G.Kısmalı**, B.Alpaslan

(Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmektedir.)

Başlangıç: Temmuz 2008-devam ediyor

“Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti’nde Bitkilerde, Yemlerde ve Düvelerin Kanlarında Bazı Vitamin ve Mineral Düzeylerinin Araştırılması”
H.Karagül,S.Saymer,S.Küçükersan,**G.Kısmalı**
(Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmektedir.)
Başlangıç: Temmuz 2008-devam ediyor)

V. Katılan Kongre, Sempozyum ve Çalıştaylar

*1st International Multidisciplinary Cancer Research Congress

Antalya-Türkiye

21-24 Mayıs 2009

*Neuroendocrinology Symposium and Workshop “Experimental Models for Studying Neuroendocrine Disorders”

İstanbul-Türkiye

23-25 Nisan 2009

*II.Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu
Bursa -Türkiye

24-27Şubat 2008

* European Molecular Biology Organisation Young Scientist Forum
İstanbul-Türkiye (EMBO katılımcı bursu ile desteklenmiştir)
. 20- 22 Şubat 2008

*II.Medikal Jeoloji Sempozyumu Yürütme Kurulu Üyesi
Ankara – Türkiye 6-9 Şubat 2008

*32. FEBS Congress

7-12 Temmuz 2007

Viyana - Avusturya

*DNA Damages, Repair and Importance in Diseases 14-17 Mayıs 2007
İzmir- Türkiye (TUBİTAK katılımcı bursu ile desteklenmiştir)

*4.Ulusal Deneysel Cerrahi Kongresi
Ankara- Türkiye

1-2 Aralık 2007

*Apoptosis in Health and Diseases Workshop
İzmir-Turkiye

25-27 Eylül 2006

*31.FEBS Congress
İstanbul - Türkiye

24-29 Haziran 2006

*1. Medikal Jeoloji Sempozyumu
Ankara-Turkiye

16-17 Nisan 2006

*1. National Molecular Medicine Congress 16-19 Nisan 2005
İstanbul-Türkiye

*I.V.S.A (International Veterinary Student Association) Switzerland-Turkey
Veterinary Student Exchange Program Zurich University Faculty of Veterinary
Medicine Zürih – İsviçre
Mayıs-Nisan 2003

*International Wildlife Animal Rehabilitation Concill 2nd Euroasian IWRC Wildlife
Rehabilitation Symposium and Workshop (organizasyon görevlisi) Ankara/Türkiye
18-23 Nisan 2002

*4. International Veterinary Student Research Congress İstanbul/Türkiye
20-24 Mayıs 2002

*RT-PCR application area and what it is? Work-shop
19 Nisan 2005 İstanbul /Türkiye

*Sigma-Aldrich Molecular Biology Seminerleri
6 - 7 Nisan 2006 Ankara/ Türkiye

*G.A.T.A 2.Uygulamalı Deneysel Cerrahi Kursu Ankara/ Türkiye
29 -30 Kasım 2007

VI. Diğer Bilgiler

*Göteborg University Department of Molecular Biology and Genetics
Prof.Peter Carlsson danışmanlığında ziyateçi doktora öğrencisi
Mart - Haziran 2004 Göteborg / İSVEÇ

*Immunobiologycal Laboratories Hamburg GmbH Research & Development
Department, ELISA kit üretim teknikleri eğitim programı
Temmuz – Ekim 2004 Hamburg / ALMANYA

“Bologna University Department of Biochemistry, Prof.Emilio Carpena yanında
görgü-bilgi arttırma ziyareti ” *Avrupa Birliği, Socrates-Erasmus Doktora öğrencisi
değişim Programı
1 Haziran - 1 Eylül 2007 Bologna – İTALYA

*Avrupa Birliği, Life Long Learning Vocational Training Program
Göteborg University Department of Molecular and Cell Biology
1 Mayıs – 1 Eylül 2008 Göteborg / İSVEÇ