

**KANSERLİ HÜCRELERDE FOLİK ASİT
İÇEREN MAGNETİK NANOPARTİKÜL
ETKİLEŞİMİ**

Nagehan SALTAN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2009

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nagehan Saltan'ın “Kanserli Hücrelerde Folik Asit İçeren Magnetik Nanopartikül Etkileşimi” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 05.06.2009 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. H.MEHTAP KUTLU	
Üye : Prof. Dr. RIDVAN SAY	
Üye : Doç. Dr. LÜTFİ GENÇ	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KANSERLİ HÜCRELERDE FOLİK ASİT İÇEREN MAGNETİK NANOPARTİKÜL ETKİLEŞİMİ

Nagehan SALTAN

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

2009, 51 sayfa

Dünyada ölümcül hastalıkların başında yer almakta olan kanserin tedavisinde, çeşitli sitotoksik ajanlar kullanılarak, çoğalan kanser hücrelerinin yok edilmesi amaçlanmaktadır. Aslında bu sitotoksik ajanların spesifik hücre özgüllükleri olmayıp, toksisiteyi başlatıp tüm sistemde yan etkileri olduğu görülmektedir. Kanser hücrelerinde pek çok reseptör üretilmektedir. Bu özelliklerinden faydalanılarak çeşitli kanser hücreleri hedeflenip, bu hedef reseptörlere uygun kompleksler sitotoksik ajan olarak oluşturulabilir.

Bu çalışmada folik asit ile magnetik nanopartiküllerin kanserli hücrelerle etkileşimleri değerlendirilmiştir. Folik asit ile modifiye edilmiş magnetik nanopartiküller, çeşitli kanser hücrelerine hücre kültürü tekniği ile uygulanıp, bu yeni komplekslerin kanser hücreleri tarafından endositozis yoluyla alınıp alınmadığının, hem hücresel hem de ince yapı seviyesinde incelenmesi amaçlanmıştır.

İlk aşamada nanopartiküller folik asit ile bağlanarak, bu kompleksin kanserli dokular içine geçmeleri sağlanmıştır. Folik asidin, kanser hücreleri yüzeyindeki folat reseptörüne yüksek affinite ile bağlanması düşünülmüştür. Böylece folik asit bağlanmasının, nanopartiküllerin hedef hücrelere geçişini kolaylaştırdığı düşünülmüştür. Hücrelerin ince yapı görüntüleri ve nanopartiküllerle etkileşimi Geçirimli Elektron Mikroskobu kullanılarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Magnetik Nanopartikül, Folik Asit, Hücre Kültürü

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INTERACTION OF CANCER CELLS WITH FOLIC ACID MODIFIED MAGNETIC NANOPARTICLES

Nagehan SALTAN

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Biology Program

Supervisor: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

2009, 51 pages

Cancer takes the first place around the world of deadly illness. The known cancer therapies arms to destroy the proliferating cancer cells using some cytotoxic agents. These cytotoxic agents are not specific for the cells but they begin the toxicity and have side- effects in all systems. There are lots of strategies about drug-cell interactions. Cancer cells also produce lots of receptors and biomarkers. Using this properties, different types of cancer cells can be chosen and complex cytotoxic agents may be produced adaptive to these cells receptors.

In this study, cancer cells with magnetic nanoparticles which include folic acid of interaction was estimated. We aim to investigate in cellular and ultrastructural levels if these particles are taken by cancer cells by endocytosis or not. At first stage, nanoparticles were conjugated with folic acid and that complex can be transported into tumour tissues. Folic acid connected to folat receptor existing on the surface of tumoral cells. Thus, nanoparticles to target spesific cells were facilitated. Cancer cells with folic acid modified magnetic nanoparticles of interaction were displayed on TEM. Furthermore, Transmission Electron Microscope used to determine ultrastructure of the cells.

Keywords: Cancer, Magnetic Nanoparticle, Folic Acid, Cell Culture

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşan, beni yönlendiren ve güler yüzünü esirgemeyen tez danışmanım, Sayın Hocam Prof. Dr. H. Mehtap Kutlu'ya,

Her aşamada tüm sorularımı sabırla cevaplayan Sayın Hocam Prof. Dr. Rıdvan Say'a,

Bana her daim vakit ayıran ve desteğini her zaman hissettiğim Sayın Hocam Doç. Dr. Lütfi GENÇ'e,

Tezimin her aşamasında, bana destek olan canım dostum Biyolog Arzu İŞCAN'a,

Her ihtiyacım olduğunda sorunlarıma çözüm bulan arkadaşım Arş.Grv.Dr. Gökalp İŞCAN'a,

Güler yüzlerini hiç esirgemeyen arkadaşlarım Arş.Grv. Gülşen AKALIN, Rüstem KEÇİLİ ve Güner SAKA'ya,

Hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak, beni her konuda destekleyen ve bana güvenen aileme,

En zor zamanlarda hep ama hep yanımda olan, canım kardeşim Mustafa Fırat DAĞDEVİREN'e,

Bana yaşattığı tüm güzellikler için eşim Mustafa SALTAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Nagehan SALTAN

Haziran 2009

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücre Siklusunun Süreçleri	3
2.2. Kanserin Oluşum Mekanizması	5
2.3. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genler	6
2.3.1. Proto-Onkogenlerin Yapısı	6
2.3.2. Onkogenlerin Yapısı	6
2.3.3. Tümör Baskılayıcı Genlerin Yapısı	7
2.4. Ras Onkogeni ve Kanser	7
2.5. Apoptoz	8
2.5.1. Apoptozun Kanser Oluşumundaki Rolü	8
2.5.2. Apoptotik Hücrelerde Gözlenen Morfolojik Değişiklikler	9
2.5.3. Apoptozis ile Nekroz Arasındaki Farklar	10
2.5.4. Apoptoz Tayin Yöntemleri	11
2.6. Hücre Kültürü	12
2.7. Folik Asit	14
2.7.1. Folik Asidin Biyokimyasal Yapısı	14
2.7.2. Folik Asidin Hücreye Alım Mekanizmaları	15
2.7.3. Folat Metabolizmasına Katılan Enzimler	17
2.8. Nanoteknoloji	17
2.8.1. Kanserle Mücadelede Nanobiyolojik Uygulamalar	17
2.8.2. Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileşimi	18
2.8.3. Nanopartiküller ve Hedefleyici Bir Ajan Olarak Folik Asit	19

3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Gereç	20
3.2. Yöntem	21
3.2.1. NIH/3T3 (Fare Embriyo Fibroblast) Hücre serisi ve 5RP7 Sıçan Embriyo Fibroblast Hücreleri ile Hücre Kültürü Uygulamaları	21
3.2.2. Magnetik Nanopartiküllerin Folik Asit İle Modifiye Edilmesi	22
3.2.3. Folik Asit ile Modifiye Edilmiş Magnetik Nanopartiküllerin NIH/ 3T3 ve 5RP7 Hücre Serileri ile 24 Saat Süreyle Etkileşimi	22
3.2.4. Folik Asit ile Modifiye Edilmiş Magnetik Nanopartiküllerin NIH/ 3T3 ve 5RP7 Hücre Serileri ile 48 Saat Süreyle Etkileşimi	23
3.2.5. Akım Sitometri ile Apoptotik Etkinin Gözlenmesi	23
3.2.6. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) ile İnce Yapı Değişikliklerinin Saptanması	24
4. BULGULAR	27
4.1. NIH/3T3 ve 5RP7 Hücre Serileri ile Folik Asit ile Modifiye Edilmiş Magnetik Nanopartiküllerin Etkileşiminin Değerlendirilmesi ...	27
4.2. NIH/3T3 Hücre Serisinde 24 ve 48 Saat Sonundaki Apoptotik Etkinin Akım Sitometri (Flow Cytometry) ile Değerlendirilmesi	27
4.3. 5RP7 Hücre Serisinde 24 ve 48 Saat Sonundaki Apoptotik Etkinin Akım Sitometri ile Değerlendirilmesi	31
4.4. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) ile Saptanan İnce Yapı Değişikliklerinin Değerlendirilmesi	34
5. TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Standart Ökaryotik Hücre Devrinin Birbirini İzleyen Dört Fazı.....	4
2.2. <i>Ras</i> Onkogeni Mekanizması	8
2.3. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar.....	11
2.4. Folik Asidin Kimyasal Yapısı.....	14
4.1. Kontrol grubu olan NIH-3T3 hücrelerinin akım sitometride değerlendirilmesi.....	28
4.2. DMSO içeren kontrol grubu NIH-3T3 hücrelerinin, akım sitometride değerlendirilmesi.....	29
4.3. Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin, NIH-3T3 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi	29
4.4. Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin, NIH/3T3 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi	30
4.5. Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin, NIH/3T3 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi	30
4.6. Kontrol grubu olan 5RP7 hücrelerinin akım sitometride değerlendirilmesi	31
4.7. DMSO içeren 5RP7 hücrelerinin akım sitometride değerlendirilmesi	32
4.8. Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin, 5RP7 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi.....	32
4.9. Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin, 5RP7 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi.....	33
4.10. Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin, 5RP7 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi.....	33

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

4.1. DMSO içerisinde dispers edilen Metakrilamido folik aside ait geçirimli elektron mikroskop görüntüsü (160kx).....	35
4.2. DMSO içerisinde dispers edilen Metakrilamido folik aside ait geçirimli elektron mikroskop görüntüsü (105kx)	35
4.3. NIH/3T3 hücrelerinin geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi. Kontrol grubu (x 16500).....	36
4.4. NIH/3T3 hücrelerinin geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi. Kontrol grubu (x 16500).....	36
4.5. NIH/3T3 hücrelerine 4,5ug/ml konsantrasyonda 24 saat süreyle Metakrilamido folik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi (x 6000).....	37
4.6. NIH/3T3 hücrelerine 4,5ug/ml konsantrasyonda 48 saat süreyle Metakrilamido folik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi (x 16500)	38
4.7. 5RP7 hücrelerinin geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi. Kontrol grubu (x 8200)	39
4.8. 5RP7 hücrelerine 4,5ug/ml konsantrasyonda 24 saat süreyle Metakrilamido folik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi (x 8200).....	40
4.9. 5RP7 hücrelerine 4,5ug/ml konsantrasyonda 48 saat süreyle Metakrilamido folik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi (x 11500).....	41

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

NIR	:	Near infrared (kıızıl ötesi)
TEM	:	Transmission Electron Microscope
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
RNA	:	Ribonükleik asit
M	:	Mitozis
UV	:	Ultraviyole, morötesi
PGA	:	Pteroil glutamik asit
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
F-12	:	F-12 HAM Nutrient Mixture
FBS	:	Fetal Bovine Serum
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
PBS	:	Dulbecco's sodyum-fosfat Tamponu
Fe	:	Demir
PI	:	Propidyum iyodür
FITC	:	Fluorescein isothiocyanate
pH	:	Power of Hydrogen

1. GİRİŞ

Kanser vücuttaki bir hücre grubunun farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucunda meydana gelmektedir. Kas ve sinir hücreleri hariç sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar, fakat bu yetenekleri de sınırlıdır, sonsuz bölünemezler. Sağlıklı bir hücre gerektiği yerde ve gerektiği kadar bölüneceğini bilir. Kanser hücreleri bu bilinci kaybeder, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Bu şekilde hızla çoğalan hücreler tümör adı verilen kitlenin oluşumuna yol açarlar [1]. Geçmişten günümüze kadar, kanserle mücadelede pek çok tedavi yöntemi denenmiştir. Kanserlin erken evrede başarılı bir şekilde tespit edilebilmesi için, çok az hücrede meydana gelmiş moleküler değişikliklerin tespit edilebilmesinin gerekliliği göz önünde bulundurularak, sağlıklı ve normal hücrelere zarar vermeden uygulanabilecek yöntemler üzerindeki çalışmalar, her geçen gün önemini arttırmaktadır.

Nanoteknolojinin, spesifik hücreleri hedefleyebilecek ve içerdikleri toksinleri kontrollü bir şekilde salabilecek terapötik ajanlar üretmekte kullanabileceği düşünülmektedir. Amaç, kanserli hücreyi hem tanıyıp hem de yok edebilen tek bir ajan üretebilmektir. Bu araştırmaların amacı vücutta dolaşan, kanserle ilişkili moleküler değişiklikleri tespit edebilen, görüntülemeye yardım eden, terapötik ajan salabilen ve daha sonra da tedavinin etkinliğini görmemizi sağlayan nanopartiküller üretebilmektir [2].

Nanoteknoloji kavramını ilk defa dile getiren Amerika Birleşik Devletleri'nden Eric Drexler'dir [3]. Kelime anlamı olarak nanoteknoloji, maddenin atom seviyesinde bilinçli olarak işlenmesiyle, daha gelişmiş ve tepeden tırnağa değişmiş materyaller, araçlar ve sistemler elde etme olarak tanımlanabilir [4]. Günümüzde, nanoteknoloji ve nanomateryaller biyolojik sistemlerde çok farklı amaçlar için kullanılmaktadır [5]. Nanoteknoloji ismi, köken olarak ölçü birimi olan “nanometre” den gelmektedir.

Nanoteknoloji, bir başka anlamı ile metrenin milyarda biri boyutunda makineler yapmak olarak tanımlanmaktadır [6,7]. Biyoloji dünyası için nanoteknolojinin geçmişi üç milyar yıldan fazladır. İlk canlı hücrenin varlığından bu yana hayatsal faaliyetleri yürütme maksatlı nanometre boyutlarındaki çeşitli fonksiyonel yapılar yani hücresel komponentler, canlı hücreler içerisinde

üretilmektedir. Doğada benzer pek çok örnekle karşılaşmak mümkündür [7,8]. Nanotüplerin folate ile kaplanarak kanserli hücreler için selektif hale getirilmesi ve NIR (near infrared=kızıl ötesi) absorpsiyonu ile ısınması sayesinde kanserli hücrelerin öldürülmesi başarılmıştır [9]. Kanser hücrelerinin normal hücrelerden daha fazla folat reseptörüne sahip olması, folik asidin hedefleyici ajan olarak kullanılmasını etkin kılmıştır.

Bu çalışmada da, folik asit gibi düşük molekül ağırlığına sahip bir ajan kullanılarak, hedeflenen kanserli hücrelerle etkileşimin sağlanması amaç edinilmiştir. Folik asit taşıyan magnetik nanopartiküllerle kanserli hücrelerin etkileşimleri değerlendirilmiştir. Hücre kültürü tekniği ile çoğaltılan kanserli ve normal hücre serilerine, folik asit ile modifiye edilmiş olan magnetik nanopartiküller belirlenen dozlarda verilerek, saptanan değişikliklerin Akım Sitometri (Flow Sitometri) ve Geçirimli Elektron Mikroskop (Transmission Electron Microscope=TEM) ile değerlendirilmesine çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

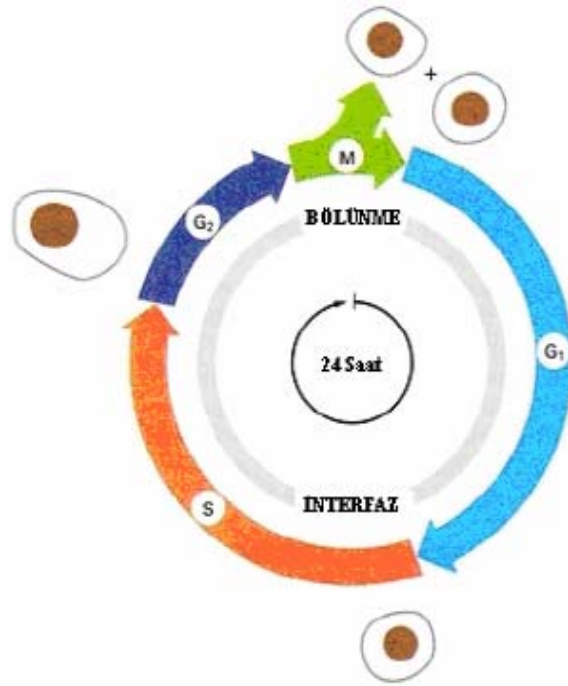
2.1. Hücre Siklusunun Süreçleri

Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması (replikasyonu) dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazlardan geçmekte ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir.

- G0 fazında (istirahat fazı); hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar.
- G1 fazında (ara faz, interfaz); spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA (Ribonükleik asit) sentezlenir. Geç G1 fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Ayrıca, DNA (Deoksiribonükleik asit) sentezi için gereken birçok enzim üretilir.
- S fazında (DNA sentezi fazı); hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır.
- G2 fazında; DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder.
- M fazında (mitozis); protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Mitozisi takiben oluşan yeni hücreler ya G0 ya da G1 fazına girerler.

Kinazlar, fosforilasyon yoluyla çeşitli nükleotidleri ve proteinleri düzenleyen enzimlerdir. Hücre bölünme fazı kinazları tüm ökaryotik hücrelerde bulunur ve hücrelerin G2 fazından M fazına geçişi için şarttır. Siklinler ise hücre siklusunun çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinlerdir. Çoğalma kapasitesine sahip hücreler normal olarak belli kontrol noktalarında dururlar. Bunların ilki DNA sentezinden hemen önce, ikincisi ise mitozdan hemen öncedir. Gerçekte bu fazdaki hücreler, hücre siklusunun bir sonraki fazına girecek proteinleri sentezlediklerinden biyokimyasal olarak aktiftirler. Bu geçiş dönemlerinde (kontrol noktalarında), varsa genetik defektler düzeltilir. Sonuç olarak, hücre siklus boyunca ilerlerken iki kontrol noktasında durur ve kontrol edilmiş olur. İlk kontrol noktası geç G1 fazında, S fazına girmeden hemen önce gelir. DNA sentezi için uygun ekstrasellüler sinyaller ve tüm mekanizma işler durumda olsa bile, hücre G1 fazını terk etmeden önce DNA'nın doğru (hasarsız) bir durumda olması lazımdır. Eğer herhangi bir lezyon saptanırsa, hücreler ya hasarı onarır ya da apoptozise giderek ölürler. Bu kontrol noktası p53 proteinin etki yerlerinden biridir. İkinci kontrol noktası hücreler M (mitozis) fazına girmeden hemen önce gelir. Hücre siklusu inhibitörleri, hücreyi, yeni oluşacak hücrelerin doğru genetik kopyaya sahip olacaklarından emin oluncaya kadar durdurur.

DNA replikasyonu tamamıyla ve doğru şekilde tamamlanamamışsa, veya beraberindeki tüm proteinler, iplikçik materyalleri, ve mitozisin tamamlanması için gerekli diğer tüm maddeler eksiksiz olarak tamamlanamamışsa, hücre bu kontrol noktasında herşey başarıyla düzenleninceye kadar durur ve ardından M fazına girer [10]. Dengeli büyüme için karşılıklı düzenleyici sistemler bir arada bulunur. Kanseri hücrelerinde ise bu dengeler bozulmuştur [11]. Yenileyen hücrelerin büyümenin durması sinyallerine uyma yetenekleri, bu hücrelerin ani büyümelerini, kanseri hücrelerinin kontrol altına alınmamış büyümelerinden farklı kılar. Diğer hücre türlerinin aksine, kanseri hücrelerinde normal hücrelerde görülen büyümeyi durdurucu kontrol mekanizması yoktur. Kanseri hücreleri bir ölçüde kontrol altına alınmamış stem (kök) hücrelere benzer. Bunlar farklılaşmış veya farklılaşmamış olabilir. Ancak herhangi bir sınırlama olmaksızın bölünmeye devam ederler. Çoğalarak komşu hücrelerin yerini alırlar. Kanseri hücrelerinin büyümesi besin maddelerini alarak, normal hücrelerin fonksiyonlarını ve büyümesini de etkiler [12].



Şekil 2.1. Standart Ökaryotik Hücre Devrinin Birbirini İzleyen Dört Fazı [1]

2.2. Kanserin Oluşum Mekanizması

Kanser, hücrelerin sürekli olarak birikmesi ile karakterize bir düzen bozukluğudur. Bu durum, sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının, normal olarak gerçekleşen uygun miktarda hücre kaybıyla dengelenmemesi sonucu gerçekleşir [10].

Genlerin yapısında ortaya çıkan ve hastalık oluşumuna yol açan değişikliğe mutasyon denir. Mutasyona uğramış bir gende nükleotid sayısında ya da dizilişinde farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda bu genin kontrolü altında üretilen kimyasal maddeler de anormal yapı ve fonksiyonda olmaktadır. Eğer bu gen hücrenin büyümesi, farklılaşması ya da bölünmesi ile ilgili genlerden birisi ise oluşan mutasyon kanser oluşumuna yol açabilmektedir [13]. Kanserli hücreler hızla bölünür ve tümör denilen kütleleri oluştururlar. Çeşitli hormonlar üretirler ve bu hormonların hücre yüzeyindeki reseptörleriyle etkileşimi sonucunda kendi büyümelerini otokrin yollarla stimüle ederler [14].

Kanser hücrelerinin oluştukları tümörden ayrılıp, kan veya lenf yoluyla vücudun diğer bölgelerinde tümör oluşturarak yayılmasına metastaz denir [15]. Bu normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir [10]. Metastaz primer tümörün en erken oluşum evresinden itibaren başlar ve zaman içinde tümörün büyümesine paralel olarak büyür. Tümör oluşumu pozitif yönde (aktive onkogenler, büyüme faktörleri, proteazlar, motilite sitokinleri) ve negatif yönde (tümör baskılayıcı genler, büyüme faktör inhibitörleri, metastaz baskılayıcı genler, proteaz inhibitörleri) etkili olan elemanların pozitif yönde doğru kaymaları sonucunda meydana gelir [15].

Kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör supresör genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (angiogenez, invazyon, metastaz) sonucunda tümöral kitle oluşur [16,17].

Kanser, hastalık grubudur. Kökenlendiği doku, kansere farklı özellikler kazandırır. Kanserlerin yaklaşık % 85 i epitel hücrelerinden kökenlenir ve karsinomalar olarak adlandırılır [1].

2.3. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genler

2.3.1. Proto-Onkogenlerin Yapısı

Mutasyonla aktive olarak onkogenik olabilecek normal genlere ise proto-onkogen denir [1]. Proto-onkojenler tüm hücrelerimizde bulunup, hücrede farklı yerlerde yer alabilirler. Hücrenin bölünmesinde ve farklılaşmasında görev alan temel sinyallerin oluşmasını sağlarlar [18]. Normal hücrelerde proto-onkogenlerin, hücre bölünmesi ve hücre farklılaşmasını düzenlemelerinden dolayı sıkı bir kontrol altında olduğu görünür. Bunlar ayrıca ameliyat gibi bir olaydan sonra yaralı vücut dokusunu onarmak için gerekli olan hücre büyümesini de kontrol etmektedirler. Buna ek olarak organ gelişiminde de rol oynarlar. Normal hücrelerde proto-onkojen fonksiyonunun kontrolü, kanseri ortaya çıkaran maddeler nedeniyle zayıflayabilir. Örneğin bir proto-onkogen, nokta mutasyon ile bir onkogene dönüşebilir [12].

2.3.2. Onkogenlerin Yapısı

Onkogenler hücre büyümesini kontrol eden normal genlerin mutasyona uğramış şekilleri olup, mutasyona uğradıktan sonra bulundukları hücreyi kanser hücresi olma yolunda değişikliklere sürüklemektedirler [13]. Ayrıca hücre sinyalizasyonu ve hücre büyümesinin regülasyonunda önemli rol oynayan proto-onkogenler, mutasyon gibi çeşitli faktörlerle fonksiyon değişikliğine uğrayarak, anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olmaktadır [19]. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirirler. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise adından da anlaşılacağı üzere tümör baskılayıcı genlerdir [20,21,22]. Son yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermektedir [23].

Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır [24,25,26,27]. Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondri olup, seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verir [26]. İnsan kanserlerinde en sık görüleni, en çok tanınanı ve üzerinde en çok çalışma yapılanı ise “*Ras* geni”dir [13]. *Ras* onkogeni tarafından kodlanan *Ras* proteini (*ras* p21); hücre canlılığı, çoğalması ve farklılaşması için gerekli olan ekstraselüler sinyallerin çekirdeğe iletimini sağlar [28].

2.3.3. Tümör Baskılayıcı Genlerin Yapısı

Kanser oluşumundan sorumlu tutulan başlıca iki grup genden biri olan tümör baskılayıcı genler (anti-onkogenler), normalde hücrelerin bölünmesine engel olan ve hücrede tümör gelişmesini önleyen genlerdir. Bu genlerin mutasyona uğraması ile oluşan genler hücrenin bölünmesini engelleyememekte ve tümör oluşumuna yol açmaktadır [13]. Yani organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir [10]. Bu genler içerisinde en iyi bilineni p53 genidir. Bu gen etkisini, kontrolü altında üretilen p53 proteini ile gösterir ve resesiftir. Bu protein, DNA sarmalının kırıkları gibi DNA lezyonlarını ve radyasyon veya kemoterapi ile oluşan DNA hasarlarını saptayabilir [10].

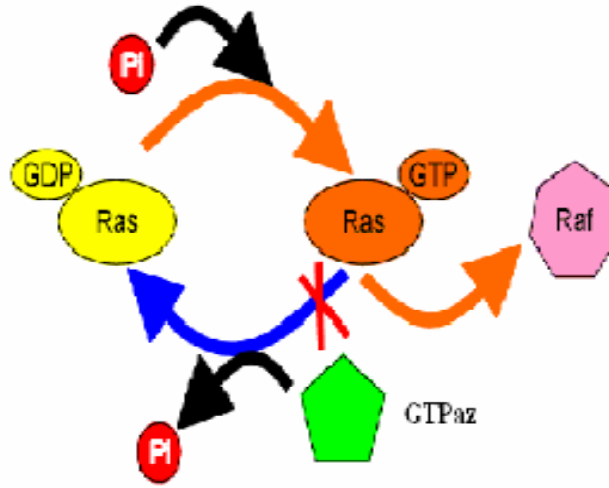
Normal p53 geni, hücre siklusunun G1-S fazında kontrol nokta monitörü olarak iş görür ve DNA'sı zarar görmüş hücrenin hücre siklusunda ilerlemesini önler. Ancak ilgili bu genin mutasyona uğraması durumunda hücrede kontrolsüz bir bölünme başlamaktadır. Bu da kanser gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Bugüne kadar yapılan birçok araştırmada, insan kanserlerinin % 50'sinden fazlasında p53 geninin anormal yapıda olduğu saptanmıştır [13].

2.4. *Ras* Onkogeni ve Kanser

Hücre büyüme ve farklılaşmasının önemli bir regülatörü olan *ras* geni, mutasyon veya amplifikasyonlarla aktivasyon kazanarak transformasyon ve tümör progresyonunda rol oynar. *Ras* geni mutasyona uğradıktan sonra oluşumuna yol açtığı “*Ras* proteini” ile hücrede bölünmeyi ve kanser oluşumunu başlatmaktadır. Tüm insan tümörlerinin % 20–30 kadarında anormal *Ras* geni gösterilmiştir [13]. Pankreas kanserlerinin % 90'ında, kolon kanserlerinin % 50 sinde *Ras* genlerindeki nokta mutasyonları belirlenmiştir.

Normal fonksiyonu esnasında; *c-ras* proteinlerinin proto-onkogen prekürsörleri, sinyalleri hücre yüzeyinden nükleusa iletirler. Bu proteinler GDP(Guanozindifosfat) ve GTP (Guanozintrifosfat) ile birleşirler. Protein-GTP kompleksi (örn. p21-GTP) kimyasal olarak aktif formdur ve bu form nükleusdaki çeşitli promotor proteinleri aktive eder. Bu proteinler GTPaz (Guanozintrifosfataz) aktivitesine sahiptir. Bu aktivite, GAP (GTPaz aktive eden protein) olarak isimlendirilen bir sitoplazmik protein tarafından arttırılır. GTPaz GTP'yi GDP'ye dönüştürür, böylece bu kompleks (Protein-GTP) inaktifleşir [10].

Ras onkogenindeki mutasyon sonucunda ise; *Ras* proteini GTPaz aktivitesini kaybeder ve sürekli olarak GTP-bağılı aktif forma dönüşür, böylece nükleusa sürekli olarak sinyal yollar. Bunun sonucunda kansere özgü olan kontrol edilemeyen hücre çoğalması meydana gelir [1]. Tüm olaylarda, onkogenlerin direktifi ile yapılan proteinler oldukça büyük miktarlarda üretilirler. Sonuçta bu proteinler hücrenin anormal olarak büyümesine ve kansere neden olurlar [12]. Onkogenler ve bunların protein ürünleri yalnızca bir hücrenin kansere dönüşme eğilimi için meydana gelmesi gereken bir dizi anormallik içerir.



Şekil 2.2. *Ras* Onkogeni Mekanizması [1]

2.5. APOPTOZ

2.5.1. Apoptozun Kansere Oluşumundaki Rolü

Hücre ölümü fizyolojik veya patolojik olabilir [29,30]. Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz; organizma gelişiminde, dokuların homeostasisinin korunmasında ve çok hücreli organizmalarda istenmeyen ya da hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında önemli bir moleküler mekanizmadır [31]. Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında ilk kez 'Apoptozis' terimi kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır [32].

Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir [33,34].

Apoptozis ve mitozis dokuda sürekli bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir [33, 35,36].

Dengelenmiş bir hücre ölümü olan apoptoz, anormal DNA'lı hücreleri, belirli bir tür için gerekli kromozom sayısının uygun miktarda devam ettirilmesi için yok eden ana mekanizmadır. Ayrıca apoptoz ile yaşlanmış ve işe yaramaz hale gelmiş hücreler de ortamdan elemine edilir. Anormal hücrelerin apoptoza gidememesi aşırı kanser hücresi üretiminin temel sebeplerindendir. Apoptozis, klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisten birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır [37]. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur [38]. Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir [39].

2.5.2. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

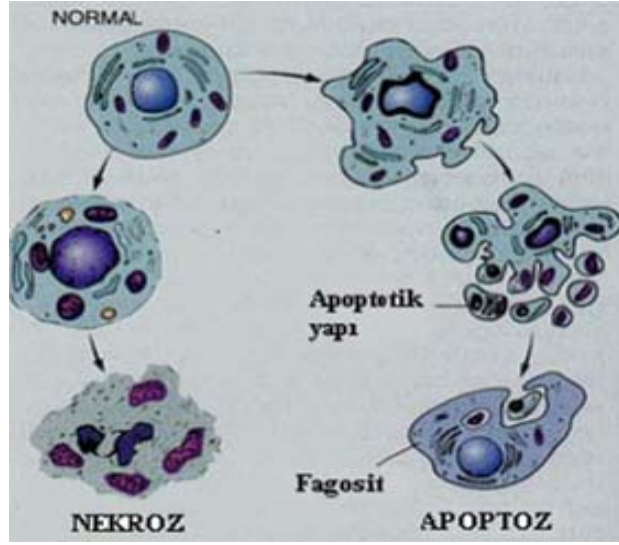
Apoptotik hücreler mikroskobik olarak tanınabilirler [10]. Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüsle ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır [41,42]. Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçüktür ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur. Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır.

Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür [41,30]. Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez [41,42,29].

Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken, fosfotidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfotidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür [43]. Apoptozun başlangıç evresinde hücre küçülmesi, çekirdekte kromatinin yoğunlaşması ve hücre zarında kabarmalar meydana gelmektedir. Apoptozun geç fazında ise çekirdek birkaç parçaya ayrılarak dağılmaktadır [44]. Hücreler büzülerek, etrafa dağılmadan elemine edilirken, nekrozda hücre içeriği dokulara dağılıp, inflamasyona neden olur. Genetik olarak düzenlenen apoptoz, çeşitli onkogenler tarafından uyarılır ya da inhibe edilebilir. Ancak kanser hücreleri apoptotik sinyallerden kaçarlar [1]. Örneğin, p53 tümör supressör onkogeni apoptozisi uyarır. Bcl-2 onkogeni ise apoptozisi inhibe eder. Böylece, normal hücre ölümünü yavaşlatarak aşırı hücre birikmesine yol açar [10].

2.5.3. Apoptozis ile Nekroz Arasındaki Farklar

- a) Nekroz bileşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptoziste tek tek hücreler etkilenir [34,30].
- b) Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptozise uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar [33,34,35].
- c) Nekrozda zar bütünlüğü bozulur, apoptoziste zarda kabarcıklar görülür, fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz [29-30].
- d) Nekroz sitoplazma ve mitokondride şişme ile başlar, apoptoziste ise sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür [29,31,34].
- e) Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptozis hücrenin daha ufak fragmanlara dönüşmesi ile sonlanır (apoptotik cisimler) [34].
- f) Nekroz enerjiye ihtiyaç duymaz, pasif bir olgudur ve +4°C'de bile gerçekleşebilir. Apoptozis ise enerji gerektiren aktif bir olgudur ve +4°C'de gerçekleşemez [42].



Şekil 2.3. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar [1]

2.5.4. Apoptoz Tayin Yöntemleri

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmiştir. Oysa, günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların, moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlanmıştır. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulunmuştur [45]. Apoptotik hücrelerdeki morfolojik değişiklikleri saptamak için ışık mikroskobu, elektron mikroskobu, flow sitometri yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca çeşitli sitoplazmik değişikliklerin saptanması, membran değişikliklerinin belirlenmesi, apoptoz esnasında ve/veya apoptozun kontrolünde görevli çeşitli proteinlerin düzeylerinin ölçülmesi de apoptozu saptamak için kullanılan yollardandır.

Morfolojik görüntüleme yöntemlerinden biri olan elektron mikroskobu çalışmalarında, nükleus fragmentasyonu net olarak izlenebilir. Apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu gözlenmektedir [46].

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan fosfatidilserinler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Annexin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur. Flow sitometri yardımıyla, işaretlenmiş antikör kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozis deteksiyonu açısından kullanışlıdır. Kompleks bilgisayar işlemleri kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarının kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptozis lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu tayin edilir [46].

2.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar günümüzde araştırma çalışmalarının önemli bir yerini tutmaktadır. Çeşitli patolojik durumlarda (örneğin kanser) belli bir maddenin etkilerini, bir hücre ya da dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini (örneğin bir protein) belirlemek amacıyla belli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak, canlı ortamında (in vivo) elde edilebilecek sonuçlara ulaşılabilir. Hücre kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamaktadır. İlk olarak 1885'te Roux embriyonik tavuk hücrelerinin hayvanın vücudunun dışında tuz çözeltisinde canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir. Carrel 1913'te hücrelerin aseptik koşullar altında düzenli olarak beslenmeleri halinde kültür ortamında uzun süre artabildiklerini göstermiştir [47].

Bir organizmanın dokularından doğrudan hazırlanan, yani in vitro hücre çoğalması olmaksızın hazırlanan, kültüre primer kültür denir. Bu hücrelerin kültür kabından alınıp çoğaltılmasıyla elde edilen kültürlere de sekonder kültür denir. Böylece elde edilen hücreler asıl kökenlerinin özelliklerini yansıtmayı sürdürürler. Transforme edilmiş ya da ölümsüz hücre serileri sıvı azotta (-196°C) saklanabildiği ve çözöldükleri zaman da canlılıklarını korudukları için hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar [47].

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli donanımdaki araç-gereçler, laminar akımlı kabin, karbon dioksit (CO₂) etüvü, faz kontrast mikroskop, hücreleri saklama ve koruma için sıvı azot tankı ve hücrelerin üremek için tutunma ve hareketlerine olanak sağlayacak toksik olmayan, biyolojik olarak inert ve optik olarak saydam, tek kullanımlık steril plastik kaplardır.

Laminar akımlı kabinler partikül filtresine sahiptirler. Bu kabinler dikey ya da yatay olabilirler. Kabinlerin kullanım öncesi UV (ultraviyole, morötesi) ışıkla sterilizasyonu sağlanmalıdır. Hücre kültürü besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikroçevreyi sağlayan besleyici solusyonlardır. Besiyerleri içeriklerindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini desteklerler. Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için uygun pH, sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki iyonlarla gerekli ozmolarite ve pH'ı da sağlarlar. Besiyeri ihtiyacı hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir. Hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına göre hücrenin besiyeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir. Serum hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan ve içeriği tam olarak tanımlanmamış zengin bir protein çözeltilisidir. Bu protein çözeltilisinin içinde hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinleri bulunur. Hücre çeşidine ve uygulamalara göre besiyerindeki serum oranı değişebilir. Standart bir somatik hücre kültüründe serum oranı %10'dur. Hücreler yaklaşık olarak %5 CO₂ içeren ortamda üretildikleri için, CO₂ etüvlerinden yararlanılmaktadır. Hücreleri gözlemek için de faz kontrast mikroskoplar kullanılır. Kültürler günlük olarak kontrol edilmelidir. Besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu gözlemlenmelidir. Kültürde hücreler; hücre tipine, ekilme yoğunluğuna, ortamın yoğunluğuna ve daha önceki işlemlere bağlı olarak önce sessiz (inaktif) ya da lag faz (evre) denilen bir döneme girerler. Bunu en yüksek metabolik aktivitenin gözlemlendiği logaritmik artış (üreme) dönemi izler. Bundan sonra da hücreler hücre sayısının sabit kaldığı bir durağan evreye girer (tüm üreme yüzeyleri kaplanmıştır). Hücrelerin nüfus yoğunluğu üremeyi baskıladığı zaman besiyerinden alınırlar. Hücrelerin kültür kabından alınmaları için değişik yöntemler kullanılabilir;

- Mekanik: Bir spatül kullanarak hücreler yüzeyden fiziksel olarak ayrılabilir. Ancak hızlı bir yöntem olmasıyla birlikte bu yöntemde hücreler zarar görebilirler. Bu nedenle ancak hücre canlılığının önemli olmadığı koşullarda bu yöntem tercih edilebilir.

- Proteolitik enzimler: Tripsin, kollajenaz ya da pronaz genellikle EDTA ile kombine edildiğinde hücrelerin üreme yüzeyinden ayrılmasına neden olur. Bu yöntem de hızlı ve güvenilir olmasına karşın, hücre yüzeyine zarar verebilir. Proteolitik reaksiyon serum içeren tam kültür ortamının katılmasıyla hızlı bir biçimde sona erdirilebilir [47].

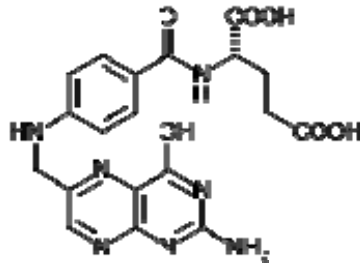
Kültür kapları CO₂ etüvüne (37°C; % 5 CO₂) konduğu zaman gaz giriş çıkışı için kapların ağzı hafif açık olmalıdır. Ayrıca ortamın nemli olması ve görünür ışıktan sakınılması da gereklidir. Hücre kültürü çalışmalarında da tüm laboratuvar çalışmalarında olduğu gibi güvenlik önlemlerine dikkat edilmelidir.

Hücre kültürleri kullanılarak yapılan çalışmaların artırılmasıyla hem daha hızlı, hem de daha kontrollü bir biçimde araştırma sonuçlarına ulaşılması sağlanabilecek ve buna bağlı olarak hayvan çalışmalarının yaygınlığının azalması sağlanacaktır.

2.7. FOLİK ASİT

2.7.1. Folik Asidin Biyokimyasal Yapısı

Kimyasal adı pteroil glutamik asit (PGA) tir. Bc faktörü de denir. B grubundan bir vitamindir (B9 veya B11). Bu madde suda mızrak şeklinde kristallenen portakal sarısı renginde bir katıdır. Isıtılmakla erimez, fakat 250°C' de esmerleşerek bozunur. Serbest asit halinde az, fakat sodyum tuzu halinde suda çok çözünür. Bazik ve nötr çözeltilerinde ısıya pek dayanıklı değildir.



Şekil 2.4. Folik Asidin Kimyasal Yapısı [48]

Eksikliği sonucu megaloblastik kansızlık meydana getirir. Tropikal bölgelerde çok rastlanır. Bu eksikliğin başlıca sebebi protein-kalori eksikliğine dayanmaktadır. Normal beslenen insanlarda eksikliği, ancak sindirim bozukluğunda ve gebelikte görülebilir [48].

2.7.2. Folik Asidin Hücreye Alım Mekanizmaları

Folik asit ya da folat, bütün hücrelerin sağlıklı fonksiyon görebilmesi için gerekli olan önemli bir vitamindir. Folik asidin makromoleküllerle konjugasyonu, in vitro çalışmalardaki tüm testlerde, folat reseptörlerine sahip kanser hücrelerine ulaşmalarını hızlandırır. Folik asit, pek çok metabolik yolda, bir karbon transfer reaksiyonları için gereksinim duyulan bir vitamindir. Çünkü nükleotid bazlarının biyosentezinde temel teşkil etmektedir [49,50]. Hedefleme ajanı olarak seçilen folat, nükleik asitlerin ve bazı aminoasitlerin sentezlenmesinde temel bir habercidir. Memeli hücreler tarafından endojen olarak üretilemez ve hücre içine alınması için, reseptörler ile endositoz ya da bir taşıyıcıya bağlı olarak alım mekanizmasına ihtiyaç duyar [51,52]. Folat reseptörü (FR), folik asit için yüksek bir affiniteye sahiptir. Bu sayede FR (+) hücreler tarafından hücre içine yüksek miktarda alımını sağlar [52,53]. Lipozomların hedeflenmesi [54,55] plazmid kompleksleri [56,57] ve nanopartiküller [58,59] için tümör hücreleri tarafından seçici olarak alınması gibi cazip özelliklerinden dolayı folat konjugasyonu, yaygın olarak kullanılan bir strateji haline gelmiştir [60]. Folik asit reseptörüne bağlı mekanizma, özellikle spesifik tümörleri hedefleyerek ilaç dağıtımının gerçekleştirilmesinde yararlıdır. Folik asit reseptörünün yoğunluğu, kanserin ilerleme derecesine bağlı olarak görünür düzeyde artar [61].

Normal hücreler fizyolojik folatları plazma membranından ya redükte folat taşıyıcıları ya da folat reseptörleri ile geçirirler. Redükte folat taşıyıcıları tüm hücrelerde bulunurlar ve fizyolojik folatların alımından sorumludurlar. Folat reseptörleri ise polarite epitel hücreler ve aktive edilmiş makrofajlarda bulunmuşlardır [49,50].

Redükte folat taşıyıcısının düşük konsantrasyonları pek çok normal hücrenin folat gereksinimlerini karşılamada yeterli iken, folat reseptörleri kanserli hücrenin vitamin için rekabetini sağlayarak, sıklıkla kanser hücreleri üzerinde yerleşmiştir [62,63]. Kanser tedavilerinde, pek çok kanser hücresindeki FR (folat

reseptörü) potansiyel bir hedefleme reseptörü olarak tespit edilmektedir [64]. Folat reseptörü ayrıcalıklı olarak normal polarize epitel hücrelerinin apikal membran yüzeylerinde yerleşmiştir [53]. Bu yüzden spesifik tümör hedeflemede nitelikli olup, damar yoluyla dağıtılan ilaçlar için ulaşılabilir. Çünkü seçici olarak epitel hücrelerin apikal membran yüzeylerinde bulunur [65]. Bugüne kadar pek çok kimyasal ve biyolojik tedavi edici ajanlar başarıyla folik aside bağlanmıştır. Pek çoğunun in vivo ve in vitro koşullarda FR pozitif olan tümörlü hücrelere dağıtımının arttığı gösterilmiştir [65,66].

İnsan FR ailesinin karakterize edilmiş 3 izoformu vardır. Bunlar %70-80 aynı aminoasit dizisine sahip olup, modelleri farklıdır [67]. Hücre içine folik asidin FR ile transportu tam olarak çözünmemiş olmakla birlikte, folat konjugatları memelilerdeki endositoz reseptörleriyle ortadan kaldırılırlar [68,69]. Folat konjugatları, kanser hücre yüzeyindeki folat reseptörüne bağlandıktan sonra, boyuta aldırılmayarak intrasellüler unsurlar olan endozomlar tarafından özümserler [69]. Hücre yüzey folat reseptörü, immunoterapotik ajanları kanserli hücre yüzeylerinde toplamayı sağlarlar. Örneğin folik asit, T hücrelerini tümör hücrelerine yeniden yönlendirmek için, immun sistemi tümör hücrelerini tanımaya ve yok etmeye zorlar [70,71].

Kanser hücreleri ortalama miktarın üzerinde folata ihtiyaç duyarlar. Olabildiğince çok folatı yakalamak için bazı kanser hücreleri hücre zarlarında folat reseptörleri eksprese ederler. 2005 yılında Michigan Üniversitesi bilim adamları tarafından yapılan bir çalışmada folik asit ve metotreksat kullanılmıştır. Nanoparçacıktaki folat molekülü tümör hücre zarındaki reseptöre bağlanır ve ihtiyacı olan vitamini aldığını sandığı için onu hemen hücre içine alır. Fakat folatı zardan içeri alırken aynı zamanda onu zehirleyecek metotreksatı da almış olmaktadır. Geleneksel kemoterapide metotreksat gibi ilaçlar, kanser hücrelerinin içine girebilmek için hücre zarını difüzyonla geçer. Bu yavaş bir iştir ve hücre dışı sıvıda yüksek konsantrasyonda ilaç olmasını gerektirir. Normal hücre ve dokular da bu yüzden zarar görebilirler. İnsan epitelyel hücre kanserlerini taşıyan farelerle laboratuarda yapılan testlerde, folik asit ve metotreksat kullanılan nanoparçacık temelli tedavinin, ilacın tek başına verilmesine göre 10 kez daha etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca nanoparçacık tedavisi, ilacın tek başına verilmesine göre fareye çok daha az toksik olmuştur [72].

2.7.3. Folat Metabolizmasına Katılan Enzimler

Folat metabolizması ve homeostazında görevli anahtar enzimleri (MTHFR (5'-10' metilen tetrahidrofolatreduktaz, vb.) kodlayan genlerdeki polimorfizmler bireyler arası farklılıklara neden olmaktadır. Metotraksat; lösemi, lenfoma ve meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan bir folik asit antagonistidir. 5'-10' metilen tetrahidrofolatreduktaz (MTHFR) enzimi indirgenmiş folat ve homosistein düzeylerini normal düzeylerde tutar [73].

2.8. NANOTEKNOLOJİ

2.8.1. Kanserle Mücadelede Nanobiyolojik Uygulamalar

Kanserin erken evrede tespiti kanser tedavisinde kritik bir adımdır. Kanserin tespiti genellikle kanser hücrelerinin, doktorun fizik muayenede fark edebileceği büyüklüğe erişmelerine bağlıdır. Buna karşılık bilim adamları, kanseri henüz fizik muayene ya da görüntüleme yöntemleriyle tespit edilemediği, en erken moleküler değişikliklerin gerçekleştiği evrede fark edebilmek için çalışmaktadır.

Kanserin erken evrede başarılı bir şekilde tespit edilebilmesi için çok az hücrede meydana gelmiş moleküler değişikliklerin tespit edilebilmesi gerekmektedir. Bunun için, kullanılacak araçlar çok duyarlı olmalıdır.

Nanoyapıların tek tek hücrelere girip onları analiz etme potansiyeli, bu ihtiyaca cevap verebileceklerini düşündürmektedir. Pek çok nanoteknolojik yöntem doktorlara hastadan aldıkları hücre ve dokular üzerinde, onlara fiziksel zarar vermeden testler uygulayabilmelerini mümkün kılacaktır. Klinikçilerin kanseri taramak için aldıkları örnekler üzerinde genelde sınırlı testler yapılabilmektedir. Hücrelere zarar vermeden uygulanabilecek testlerle daha ileri araştırmalar yapmak mümkün olacaktır. Araçların küçülmesi pek çok testin aynı küçük cihazda yapılabilmesini sağlayacaktır. Bu da, taramaları daha hızlı ve maliyet açısından daha hesaplı kılacaktır. Kanser hücrelerinin, sağlıklı ve normal hücrelere zarar vermeden yok edilmesinde de nanoteknoloji yararlı olabilir [2].

2.8.2. Nanopartiküllerin Hücre ile Etkileşimi

Fonksiyonel özellikleriyle nanopartiküller, biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar [74,75]. Örneğin ilaç dağıtımı, hücre ve doku mühendisliği ve medikal görüntülemeye, teşhis ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bu uygulamalar için, özgül, etkin ve spesifik olarak hedeflenmiş hücrelerin hızla içine alabileceği nanopartiküllere ihtiyaç duyulmaktadır. Fakat bazı sınırlayıcı faktörler vardır.

Bunlar; a) nanopartiküllerin çökmesi, b) partiküllerin kan sirkülasyonundaki yarı ömürlerinin kısa olması, c) nanopartiküllerin hücre içine alımlarındaki düşük verimlilik, d) nonspesifik hedeflemedir [76,77]. Güncel antikanser ajanları yüksek toksisiteye sahip olmaları ve nonspesifik olarak hem normal hem kanserli hücrelerde birikmeleri gibi sınırlayıcı pek çok faktörden dolayı önemini yitirmektedir. Düşük çözünürlük ve sınırlandırılmış stabiliteden dolayı biyouyumluluk sağlayamamakta ve yarı ömürleri kısalarak, vücuttan hızla uzaklaştırılmaktadırlar [78].

Süperparamagnetik demir oksit nanopartiküller, manyetik rezonans görüntüleme, doku tamiri, biyolojik sıvıların detoksifikasyonu, ilaç dağıtımı, hücre ayrımı gibi pek çok uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır [79,80]. Tüm bu biyomedikal ve biyomühendislik uygulamalarında, yüksek miktarda toplanma değerine, küçük boyuta ve aynı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan nanopartiküllere gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca tüm bu uygulamalar, toksik olmayan ve biyouyumlu maddeler ile manyetik partiküllerin kaplanması gerektirmektedir [81]. Nanopartiküllerin kan sirkülasyonundan hızlı eliminasyonu, mononükleer fagosit sistemin makrofajları tarafından tanınmalarından dolayı gerçekleşir [82].

Nanopartiküller büyük bir alan/hacim oranına sahip olup, toplanma eğilimindedirler. Nanopartiküller agrega olduklarında, adsorbe edilmiş plazma proteinleri ile kaplanır ve hedeflenmiş hücrelere ulaşmadan, makrofajlar tarafından hızlıca temizlenir. Bu yüzden, kan akışı içerisinde sirkülasyon süresince nanopartiküller, hedef hücrelere ulaşmaları için, çeşitli maddeler ile modifiye edilirler [81]. Yine manyetik nanopartiküllerin spesifik hücreleri etiketlemesindeki stratejiye göre, nanopartiküllerin yüzeyleri, reseptörler ile endositoz yoluyla hücreye alınmalarını gerçekleştirmek için, ligand ile modifiye edilir [83].

Bu ligandlar, nanopartikül yüzeylerine konjuge olarak, partiküllerin reseptörlerle endositoz yoluyla alımını, içerdiği monoklonal antikorlar ile kolaylaştırır [84,85]. Bununla birlikte antikorların boyutları ve doğal immunojeniteleri nanopartiküllerin, biyolojik bariyerlerin içinden zayıf şekilde dağılmasına neden olurlar [86]. Transferin, laktoferrin, albumin, insülin...gibi hedefleyici ajanlar, kendilerine ait reseptörleri memeli hücrelerin yüzeylerinde bulunduğu için hücre yüzeylerini hedeflerler [87,88]. Bu reseptörler sadece hücresel işaretleyiciler olmayıp, alınan moleküllerin kendilerine bağlanmasını da sağlarlar [87]. Ayrıca bu ligandların çoğu stabil olup, zayıf immunojenite gösterirler [89].

2.8.3. Nanopartiküller ve Hedefleyici Bir Ajan Olarak Folik Asit

Nanopartiküllerin dağılımlarını ve biyouyumluluklarını geliştirebilmek ve bu sayede hedeflenen hücreler tarafından alınabilmelerini sağlamak için, onların hedefleyici ve biyouyumlu ajanlar ile kaplanması gerçekleştirilmektedir. Düşük molekül ağırlıklı, hedefleme ajanı olan folik asit, folat reseptörleri sıklıkla kanserli hücre yüzeylerinde yerleşmiş olduğu için, bu hücre yüzeylerine yönelirler [90]. Spesifik kanser hücreleri tarafından tanınma ve reseptörler ile endositoz yoluyla, nanopartiküllerin hücre içine alınmasındaki etkinliği arttırması amacıyla, folik asit gibi düşük molekül ağırlıklı bir hedefleme ajanı ile nanopartiküller kaplanır. Çünkü kanserli hücrelerin yüzeylerindeki fazlaca miktardaki folat reseptörleri ile bağlantı kurabilirler [91].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasal Maddeler

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma
- F-12 HAM Nutrient Mixture (F-12), Sigma
- Fetal Bovine Serum (FBS), Sigma
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin), Sigma
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit (Tripsin/EDTA), Sigma
- Dulbecco's sodyum-fosfat Tamponu (PBS), Sigma
- Folik Asit, Sigma
- Magnetik Demir Oksit Partikül, Fluka
- Osmium tetroksit, Electron Microscopy Science
- Gluteraldehit, Electron Microscopy Science
- Aradit, Electron Microscopy Science
- Annexın V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen™, San Jose, CA USA)

3.1.2. Sarf Malzemeler

- Otoklavlanabilir cam şişe (Iso-Lab, Hollanda)
- 10, 200 ve 1000 µl'lik pipet takımı ve uçları (Eppendorf, Almanya)
- 1000 µl'lik mikrosantrifüj tüpü (Eppendorf, Almanya)
- Thoma lamı (Marienfeld, Almanya)
- 25 ve 75 cm²'lik kültür şişeleri (TPP, İsviçre)
- 15 ve 50 ml'lik Santrifüj Tüpleri (TPP, İsviçre)
- Steril cam petri kapları (Corning, ABD)
- Analiz tüpleri, 12 x 75 mm (BD Pharmingen™, San Jose, CA USA)

3.1.3. Cihazlar

- Hassas terazi (Ohaus, ABD)
- Inverted Mikroskop (Olympus, ABD)
- Karbonioksit inkübatörü (Heraeus, Almanya)
- Kuru hava sterilizatörü (Heraeus, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı, (Heraeus, Almanya)
- Megafuge 1.0/1.0R santrifüj (Heraeus, Almanya)
- Otoklav (Hirayama, Japonya)
- Steril kabin (Holten, İngiltere)
- Etüv (Heraeus, Almanya)
- TEM (FEI, Hollanda)
- Çeker Ocak (İnterlab)
- FACS Aria flow cytometer (BD Pharmingen™, San Jose, CA USA)

3.2. Yöntem

3.2.1. NIH/3T3 (Fare Embriyo Fibroblast) Hücre serisi ve 5RP7

Sıçan Embriyo Fibroblast Hücreleri ile Hücre Kültürü Uygulamaları

Deneylerde sıçan embriyo fibroblast 5RP7 (*H-ras* onkogeni transform hücreler) hücreleri ve NIH/3T3 fare embriyo fibroblast hücreleri kullanılmıştır. NIH/3T3 (fare embriyo fibroblast) hücre serisi George Todaro ve Howard Green tarafından 1962 yılında türetilmiştir. 5RP7 sıçan embriyo fibroblast (*H-ras* onkogeni transform hücreler) hücreleri ise Garbisa [92] ve arkadaşları tarafından 1987 yılında türetilmiştir.

Deneylerde kullanılmak üzere pasajlanacak hücreler stoktan çıkarılmıştır. -196 °C' de sıvı azot tankında bulunan hücre stoklarını içeren viyaller (cryovial) su banyosunda sıvı hale gelince, uygun besiyeri içine alınarak, 1200 rpm' de 10 dk santrifüj edilir. Süpernatant kısmı dökülür, hücreler yeni medium içinde dağıtılarak yeni kültür flasklarına koyularak 37 °C' de, % 95 bağıl nem içeren CO₂ inkübatöründe kültüre alınır. Hücrelerin çoğaltılmasında % 10 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyeri kullanılır. DMEM hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukoza, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir.

Serum hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan ve içeriği tam olarak tanımlanmamış zengin bir protein çözeltisidir. Sıçan embriyo fibroblast 5RP7 hücreleri ve NIH/3T3 fare embriyo fibroblast hücreleri, %10 FBS, 100 ünite/ml penisilin-streptomisin, % 1 glutamin içeren DMEM içerisinde 37 °C’de kültürde tutulmuşlardır. Hücreler 2 günde bir, PBS (Phosphate Buffered Saline) ve tripsin/EDTA solusyonu ile muamele edilerek, 1:3 ile 1:6 oranları arasında alt kültürle ayrılmışlardır. PBS, hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solusyonudur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler ve hücreler için uygun bir ortam sağlar. Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan bir serin proteaz tipi enzimdir. Bu çalışmada, %0,25 EDTA’lı tripsin solusyonu kullanılmıştır. Hücreler yüzeyden ayrılır ayrılmaz tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edilmiştir. Çünkü, tripsin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlar. Hücreler deneye alınmadan önce, hücre sayısı thoma lamında tespit edilip, deney koşullarına uygun ortamlara ekildikten sonra, folik asit ile modifiye edilmiş magnetik nanopartiküllerin 24 saat ve 48 saat süreyle hücrelerle etkileşimi % 5 CO₂ içeren atmosfer ortamında sağlanmıştır.

3.2.2. Magnetik Nanopartiküllerin Folik Asit İle Modifiye Edilmesi

0.1 gram Fe (demir) nanopartiküllerinin yüzeyi 2,5ml toluen içerisinde 0,5 ml TMSPM (trimetoksi sillil propil metakrilat) eklenmesi ile modifiye edilmiştir. Sillilenen Fe nanopartikülleri 5mg/ml derişimindeki 1ml metakrilamido folik asit (MA folik asit) ile 1 ml DMSO’da etkileştirilmiştir.

3.2.3. Folik Asit ile Modifiye Edilmiş Magnetik Nanopartiküllerin

NIH/ 3T3 ve 5RP7 Hücre Serileri ile 24 Saat Süreyle Etkileşimi

Stoktan çıkarılan sıçan embriyo fibroblast 5RP7 hücreleri ve NIH/3T3 fare embriyo fibroblast hücreleri, % 10 FBS içeren DMEM besiyerinde çoğaltılmıştır. Gerekli sayıya ulaşan hücreler, deneye alınmıştır. 25 cm²’ lik flasklara 10⁶/ml olarak ayarlanan hücrelere, 5 ml medium içinde, magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş metakrilamido folik asit maddesi 2,5ug/ml, 4,5ug/ml ve 9ug/ml konsantrasyonlarında (%0,1 DMSO) uygulanmıştır. 24 saat süreyle % 5 CO₂ içeren karbondioksitli inkübatörde bekletilmiştir.

3.2.4.Folik Asit ile Modifiye Edilmiş Magnetik Nanopartiküllerin

NIH/ 3T3 ve 5RP7 Hücre Serileri ile 48 Saat Süreyle Etkileşimi

Deneye alınmak üzere stoktan çıkarılan sıçan embriyo fibroblast 5RP7 hücreleri ve NIH/3T3 fare embriyo fibroblast hücreleri % 10 FBS içeren DMEM besiyerinde çoğaltılmıştır. Hücreler 2 günde bir, tripsin/EDTA solusyonu ile muamele edilerek, 1:3 ile 1:6 oranları arasında alt kültürle ayrılmışlardır. Gerekli sayıya ulaşan hücreler, deneye alınmıştır. 25 cm²' lik flasklara 10⁶/ml olarak ayarlanan hücrelere, 5 ml medium içinde, magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş metakrilamido folik asit maddesi 2,5ug/ml, 4,5ug/ml ve 9ug/ml konsantrasyonlarında (%0,1 DMSO) uygulanmıştır. 48 saat süreyle % 5 CO₂ içeren karbondioksitli inkübatörde bekletilmiştir.

3.2.5. Akım Sitometri (Flow Sitometri) ile Apoptotik Etkinin Gözlenmesi

Akım sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikör kullanılarak apoptozisde eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozis deteksiyonu açısından kullanışlıdır [46]. 25 cm²' lik flasklara 10⁶/ml olarak ayarlanan hücrelere 5 ml medium içinde, magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş metakrilamido folik asit maddesi 2,5ug/ml, 4,5ug/ml ve 9ug/ml konsantrasyonlarında (%0,1 DMSO) uygulanmıştır. 24 saat ve 48 saat süreyle karbondioksitli inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler santrifüjlenip, 2 kere soğuk PBS ile yıkanmıştır. Bu hücre süspansiyonundan 10⁵/ml hücre analiz tüpüne alınarak, 100 µl Annexin V Binding Buffer içinde süspande edilmiştir. Üzerine 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI ilave edildikten sonra , oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dk süreyle bekletilmiştir. FITC (Fluorescein isothiocyanate), floresan bir madde olup, hücrelerin işaretlenerek tespit edilebilir hale gelmesini sağlar. Bu süre sonunda, 400 µl Annexin V binding buffer eklenmiş ve hücreler 1 saat içinde analize alınmıştır. FACS Aria flow cytometer cihazında Diva 6.0 software kullanılarak, hücrelerin apoptoz yüzdeleri saptanmıştır. Annexin V-FITC ve PI (Propidyum iyodür) negatif olan bölge canlı hücreleri (Q3), Annexin V-FITC ve PI pozitif olan bölge geç apoptotik veya nekrotik hücreleri (Q2), ifade etmektedir.

3.2.6. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) ile İnce Yapı

Değişikliklerinin Saptanması

25 cm²' lik flaslara 10⁶/ml olarak ayarlanan hücrelere, 5 ml medium içinde, magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş metakrilamido folik asit maddesi (MA folik asit) 4,5ug/ml konsantrasyonda (%0,1 DMSO) uygulanmıştır. 24 saat ve 48 saat süreyle karbondioksitli inkübatörde bekletilmiştir. Bu süreler sonunda, magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş metakrilamido folik asit maddesi (MA folik asit) ile etkileştirilen hücrelerin Geçirimli Elektron Mikroskop ile incelenmesi aşamasına geçilmiştir. Ayrıca kontrol gruplarında da doku takibi yöntemi uygulanmıştır.

3.2.6.1. Fiksatif Hazırlama: İlk fiksatif, tamponlanış gluteraldehittir.

Fosfat tamponu;

1,484 gr. Na₂HPO₄ 82,5 ml. distile su içinde çözülür.

1,135 gr. KH₂PO₄ 5 ml. distile su içerisinde çözülür.

72 ml Na₂HPO₄,

11 ml. KH₂PO₄ oranında karıştırılarak, tampon solusyonu içinde hazırlanmıştır. (Tampon için ph= 7,4 olmalıdır).

İncelenecek hücrelerin yapısı ve büyüklüğüne göre, hücreler tespit içerisinde 4-24 saat arasında +4°C'de fikse edilmiştir.

3.2.6.2. Yıkama: Falkon şişelerdeki dokulardan fiksatifi uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılmıştır (3x 15'er dk.). Hücreler tampon solusyonu ile yıkanmıştır.

3.2.6.3. İkinci Tespit (Osmium Tetroksit): Yıkanan hücreler % 1'lik OSO₄ içerisine alınıp, 2 saat süreyle rotatorda döndürülerek, fikse edilmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda tampon ile 3 kere 15'er dk. yıkanmıştır.

3.2.6.4. Dehidratasyon: Etil alkol ile yapılmıştır.

% 50 Alkol	15 dk. x 2	+4°C
% 70 Alkol	15 dk. x 2	+4°C
% 90 Alkol	15 dk. x 2	+4°C
% 96 Alkol	30 dk. x 2	+4°C
Absolu Alkol	30 dk. x 2	+4°C

3.2.6.5. Şeffaflandırma: Propilenoksit ile yapılmıştır.

Propilenoksit 30 dk.

Propilenoksit 30 dk.

Resin + Propilenoksit (1/1)

Hücreler bu karışımda 2 saat süreyle rotatorda döndürülmüştür. Daha sonra saf resin içerisinde 1 gece bekletilerek, resine gömülmeye hazır hale getirilmiştir.

3.2.6.6. Bloklama: Taze hazırlanmış resinle bloklama işlemi yapılmıştır.

Polimerizasyon işlemi 48 saat boyunca 60 °C’de yapılmıştır.

Resin Solusyonunun Hazırlanması:

Araldit CY212	20 ml.
DDSA	20 ml.
BDMA	0,6 ml.
Dibütilfitalat	1 ml.

3.2.6.7. Kesitlerin Boyanması: Uranil asetat boyasının hazırlanması;

Metil Alkol	80 ml.
Uranil asetat	2 gr.
Distile su	20 ml.

Bu boya içerisinde gridler 45-60 dk. bekletilmiş ve distile suyla yıkanmıştır (boya kullanmadan önce süzölmelidir).

3.2.6.8. Kurşun Sitrat Boyasının Hazırlanması:

A Karışımı

10 N NaOH 2 gr.

Distile su 5 ml.

B Karışımı

Kurşun sitrat 200 mgr.

Distile su 50 ml.

B karışımı üzerine 0,5 ml. A karışımı katılıp, kuvvetlice çalkalanarak karıştırılmıştır (ph=12-13 arası olmalıdır). Temiz bir falkona konup, karanlıkta ve +4 °C’de saklanmıştır. Kullanmadan önce süzümüştür. Boyanan kesitler elektron mikroskopunda incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. NIH/3T3 ve 5RP7 Hücre Serileri ile Folik Asit ile Modifiye

Edilmiş Magnetik Nanopartiküllerin Etkileşiminin Değerlendirilmesi

Çeşitli antikanser ajanları yüksek toksisiteye sahip olmaları ve nonspesifik olarak hem normal hem kanserli hücrelerde birikmeleri gibi sınırlayıcı pek çok faktör içermektedir. Bundan dolayı kanserle ilişkili moleküler değişiklikleri tespit edebilecek, görüntülemeye yardım edecek, sağlıklı hücreler zarar vermeden tedaviyi mümkün kılacak hedefleyici olarak düşünülen nanopartiküllerin kendilerine ait sınırlayıcı faktörleri vardır. Bunu ortadan kaldırmak amacıyla nanopartiküllerin yüzeyleri, reseptörler ile endositoz yoluyla hücreye alınmalarını gerçekleştirmek için, hedefleyici ajan ile modifiye edilir. Bu çalışmada hedefleyici ajan olarak düşük molekül ağırlığına sahip olan folik asit kullanılmıştır. Modifiye edilen metakrilamido folik asit sağlıklı ve kanserli hücreler uygulanmış, değerlendirmeler Akım Sitometri ve Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) kullanılarak yapılmıştır.

4.2. NIH/3T3 Hücre Serisinde 24 ve 48 Saat Sonundaki Apoptotik

Etkinin Akım Sitometri (Flow Sitometri) ile Değerlendirilmesi

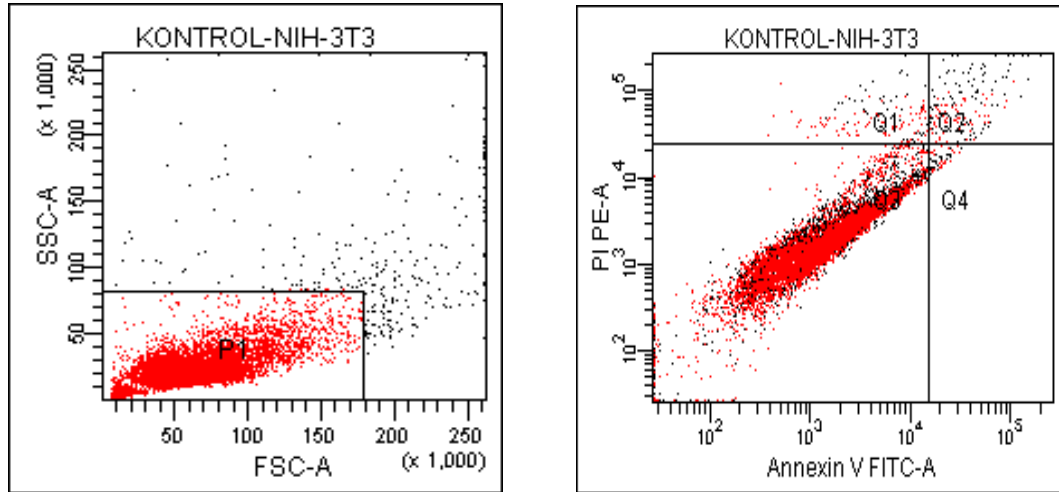
Akım Sitometri ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir [46].

Flow Sitometri analiz sonuçlarında; kontrol, DMSO kontrol, 2,5ug/ml, 4,5ug/ml ve 9ug/ml konsantrasyonları kullanılmıştır. DMSO oranı %0,1'i geçmemektedir. Apoptotik oranlar değerlendirildiğinde 4,5ug/ml'lik konsantrasyonda, kanserli hücrelerdeki apoptotik oranın en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Agregasyona bağlı olarak, hücrelerin bu konsantrasyonda doygunluğa ulaşılmış olacağı düşünülmektedir. Buna bağlı olarak 9ug/ml'lik konsantrasyonda apoptotik oranın düşüklüğü gözlenmiştir (Şekil 4.10). Kanserli hücrelerin yüzeyinde, sağlıklı hücrelere oranla daha fazla bulunan folat

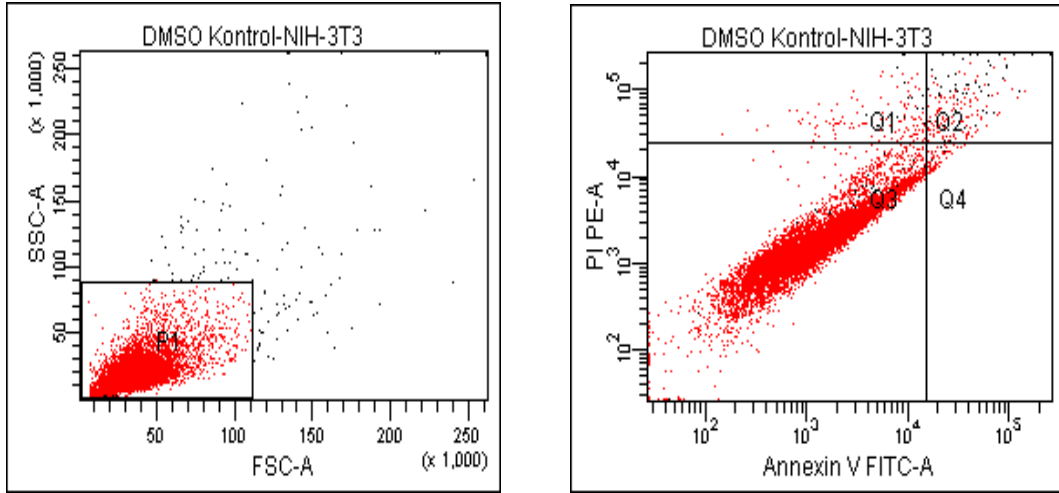
reseptörleri sayesinde hücre içine alımı kolaylaşan folik asidin, antioksidan etkisi sayesinde kanserli hücreleri apoptoza götürdüğü düşünülmüştür.

Metakrilamido folik asidin sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi Annexin V-FITC kullanılarak, akım sitometride değerlendirildiğinde; kontrolde canlı hücre yüzdesi %96.3; yüzde apoptotik oran %1.5 (Şekil 4.1), DMSO kontrolde canlı hücre yüzdesi %96.4; yüzde apoptotik oran %1.6'dır (Şekil 4.2). Madde konsantrasyonları hücrelere uygulandıktan 24 saat sonra; 2,5ug/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %94.9; apoptotik oran % 2.7 (Şekil 4.3A), 4,5ug/ml olan konsantrasyonda canlı yüzdesi %88.8; apoptotik oran %4.5 (Şekil 4.4A), 9ug/ml olan konsantrasyonda canlı yüzdesi % 94.5; apoptotik oran % 2.9 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5A).

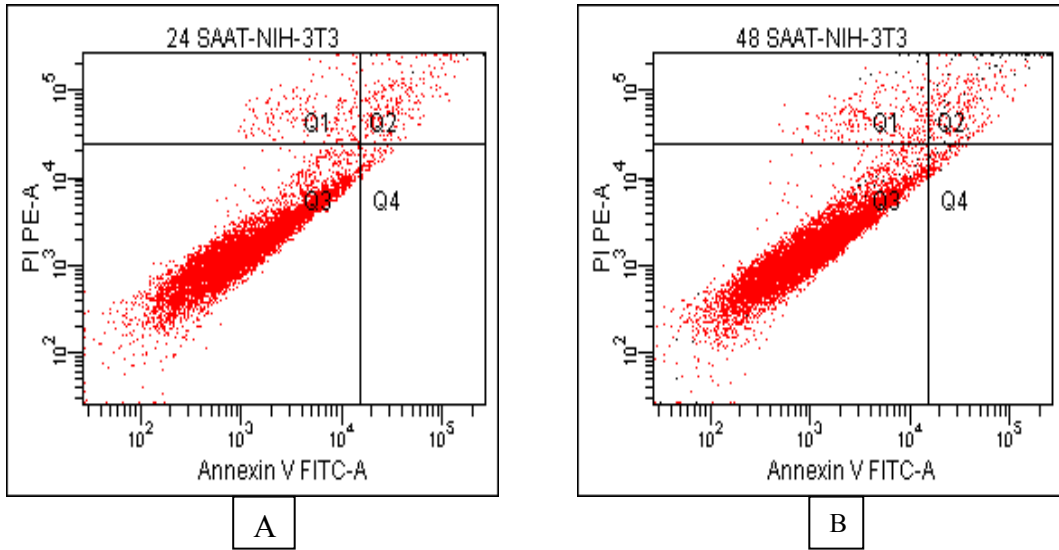
48 saat sonunda; 2,5ug/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %93.4; yüzde apoptotik oran % 2.8 (Şekil 4.3B), 4,5ug/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %89.7; yüzde apoptotik oran %4.7 (Şekil 4.4B), 9ug/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %94.7; apoptotik oran %2.9 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5B).



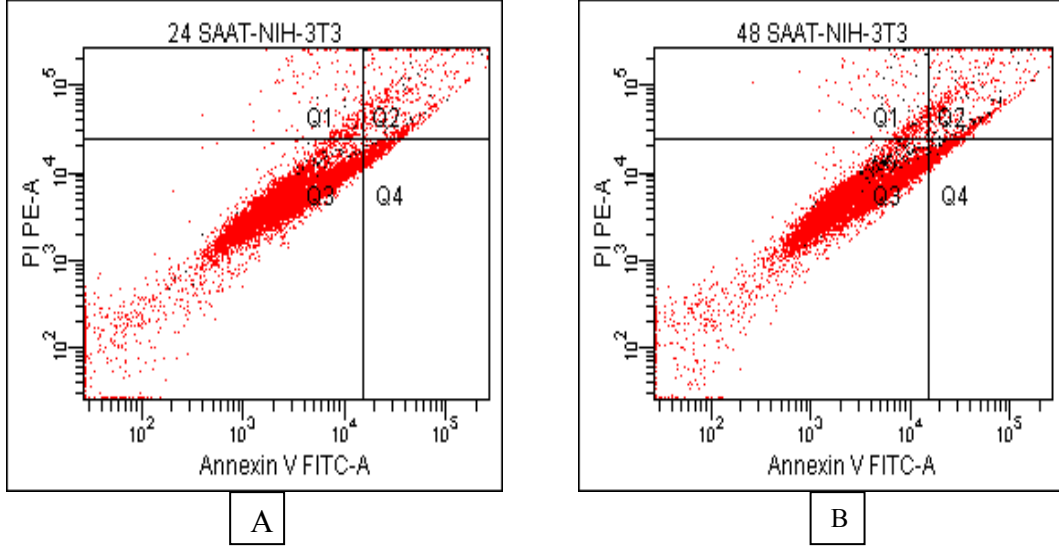
Şekil 4.1. Kontrol grubu olan NIH/3T3 hücrelerinin akım sitometride değerlendirilmesi



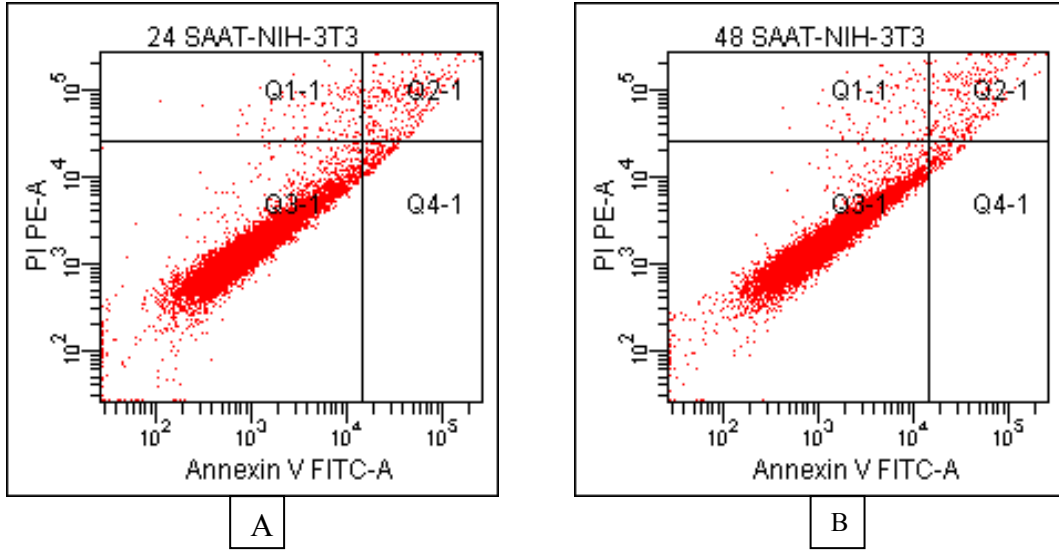
Şekil 4.2. DMSO içeren kontrol grubu NIH/3T3 hücrelerinin, akım sitometride değerlendirilmesi



Şekil 4.3. Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin, NIH-3T3 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi A- 2,5ug/ml konsantrasyonda 24 saat, B- 2,5ug/ml konsantrasyonda 48 saat



Şekil 4.4. Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin NIH/3T3 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi A- 4,5µg/ml konsantrasyonda 24 saat, B- 4,5µg/ml konsantrasyonda 48 saat

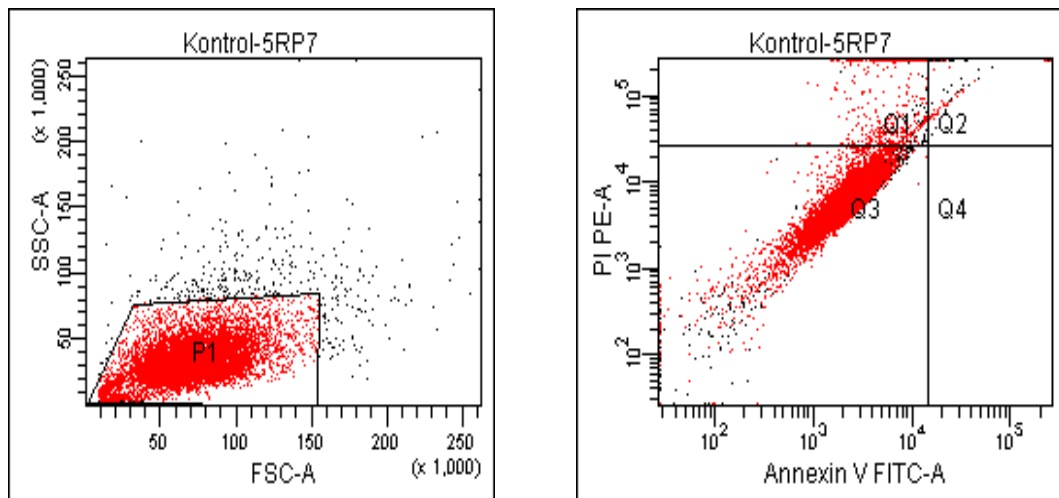


Şekil 4.5. Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin NIH/3T3 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi A- 9 µg/ml konsantrasyonda 24 saat, B- 9 µg/ml konsantrasyonda 48 saat

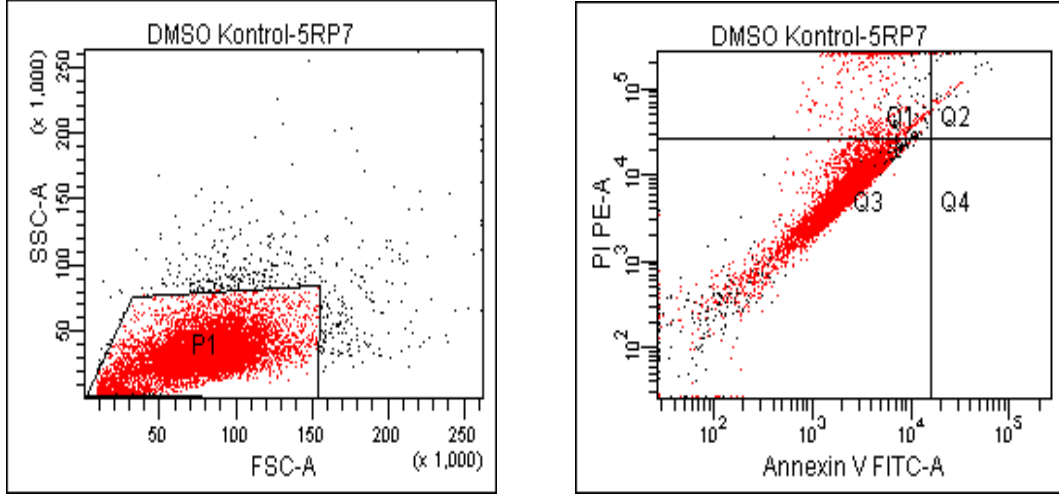
4.3. 5RP7 Hücre Serisinde 24 ve 48 Saat Sonundaki Apoptotik

Etkinin Akım Sitometri (Flow Cytometry) ile Değerlendirilmesi

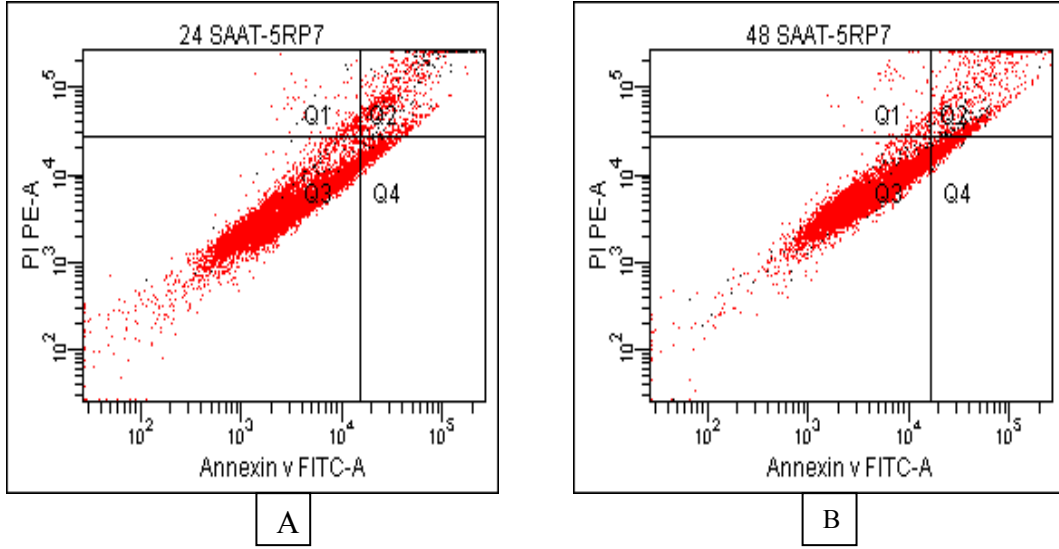
Aynı yöntem 5RP7 hücrelerinde de uygulanıp, Annexin V-FITC kullanılarak akım sitometride değerlendirildiğinde ise; kontrolde canlı hücre yüzdesi % 94.1; yüzde apoptotik oran % 0.7 (Şekil 4.6), DMSO kontrolde canlı hücre yüzdesi % 94.7; yüzde apoptotik oran % 1.2'dir (Şekil 4.7). Metakrilamido folik asit konsantrasyonları uygulandıktan 24 saat sonra; 2,5ug/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi % 85.5; yüzde apoptotik oran % 7.0 (Şekil 4.8A), 4,5ug/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %82.2; apoptotik hücre oran % 10.5 (Şekil 4.9A), 9ug/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %87.7; yüzde apoptotik oran %5.2 olarak bulunmuştur (Şekil 4.10A). Aynı maddenin hücrelerle etkileşiminin 48. saatinde ise; 2,5ug/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi % 78.7; yüzde apoptotik oran % 8.1 (Şekil 4.8B), 4,5ug/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi % 83.2; yüzde apoptotik oran % 12.9 (Şekil 4.9B) 9ug/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi % 83.2; yüzde apoptotik oran % 7.3 olarak bulunmuştur (Şekil 4.10B) 4,5ug/ml konsantrasyonda apoptotik oran kanser hücrelerinde en yüksek seviyededir. Bu yüzden 9ug/ml olan konsantrasyonda, hücrelerin doygunluğa ulaştığı, nanopartiküllerin agregasyona uğraması dolayısıyla çökelediği ve hücre içine giremediği düşünülmektedir (Şekil 4.10). Buna bağlı olarak apoptotik oranın azaldığı düşünülmektedir.



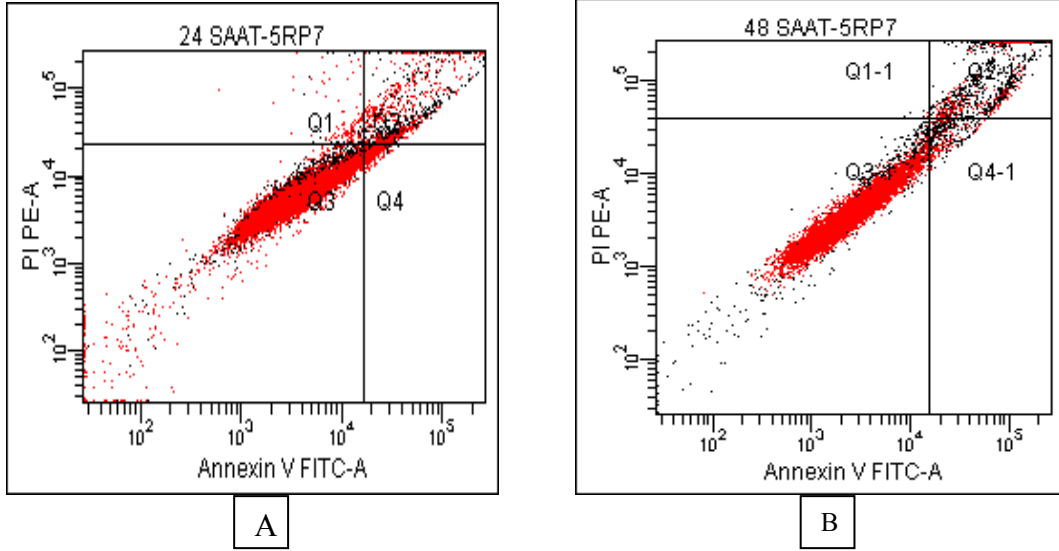
Şekil 4.6. Kontrol grubu olan 5RP7 hücrelerinin akım sitometride değerlendirilmesi



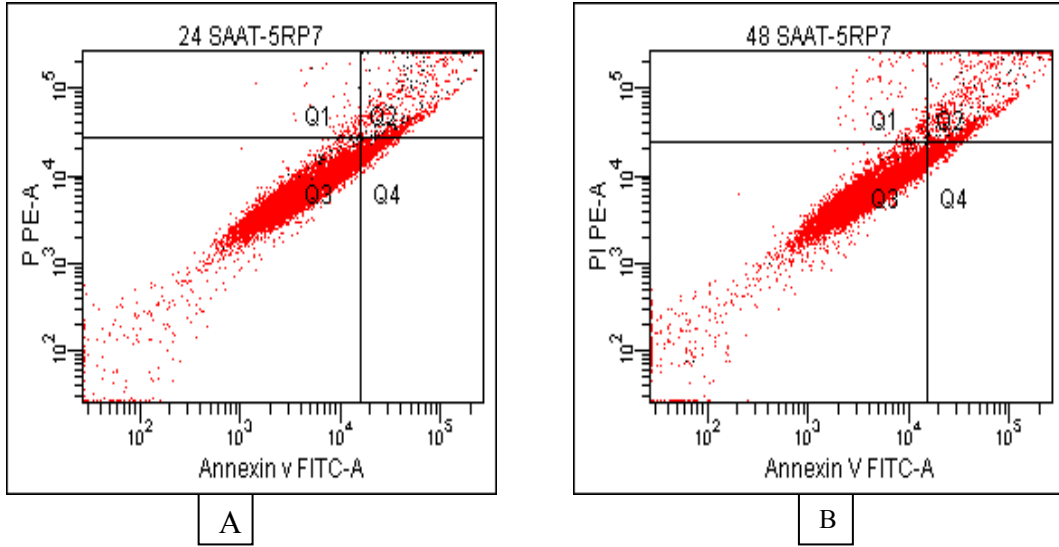
Şekil 4.7. DMSO içeren 5RP7 hücrelerinin akım sitometride değerlendirilmesi



Şekil 4.8. Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin 5RP7 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi A- 2,5 ug/ml konsantrasyonda 24 saat, B- 2,5 ug/ml konsantrasyonda 48 saat



Şekil 4.9 Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin 5RP7 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi A- 4,5 ug/ml konsantrasyonda 24 saat, B- 4,5 ug/ml konsantrasyonda 48 saat



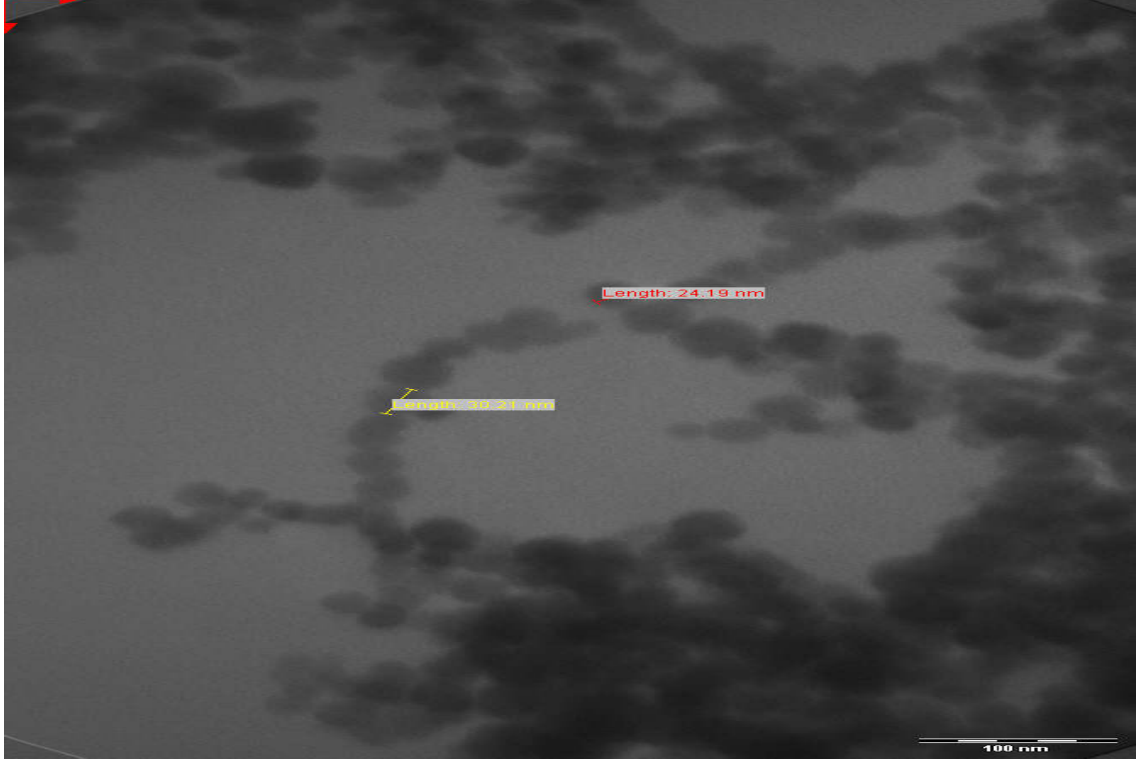
Şekil 4.10. Magnetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş olan Metakrilamido folik asidin 5RP7 hücreleri üzerine olan etkisinin akım sitometride değerlendirilmesi A- 9 ug/ml konsantrasyonda 24 saat, B- 9 ug/ml konsantrasyonda 48 saat

4.4. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) ile Saptanan İnce

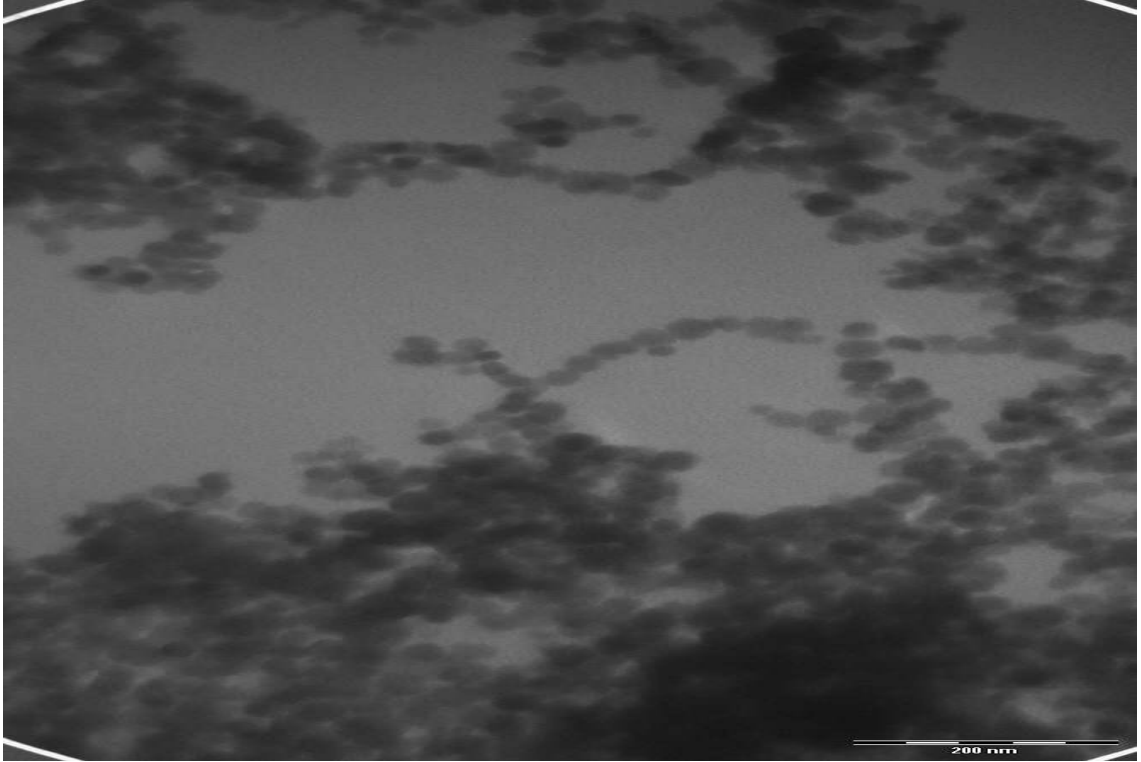
Yapı Değişikliklerinin Değerlendirilmesi

Elektron mikroskopu ile değerlendirme apoptozisde en değerli yöntem olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlendiği bir yöntemdir. Üstelik subsellüler detaylar (örn. mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) da incelenebilir. Optik mikroskoplarda görüntünün elde edilmesinde ışık kullanılırken, elektron mikroskoplarında, ışık yerine elektron kullanılır. Elektronun dalga boyu, ışığa göre birkaç bin defa daha küçük olduğu için, bu mikroskopla daha ayrıntılı görüntüler elde etmek mümkündür. Bu yöntem, cismin içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanır. Max Knoll ve Ernst Ruska tarafından 1930'larda yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkan geçirimli elektron mikroskop, optik mikroskoba kıyasla çok daha küçük ayrıntıları görmeye olanak tanır. Geçirimli elektron mikroskopta elektronlar çok kolay yollarından sapabileceklerinden, bütün işlem ve görüntünün elde edilmesi tamamen bir vakum içerisinde gerçekleştirilir.

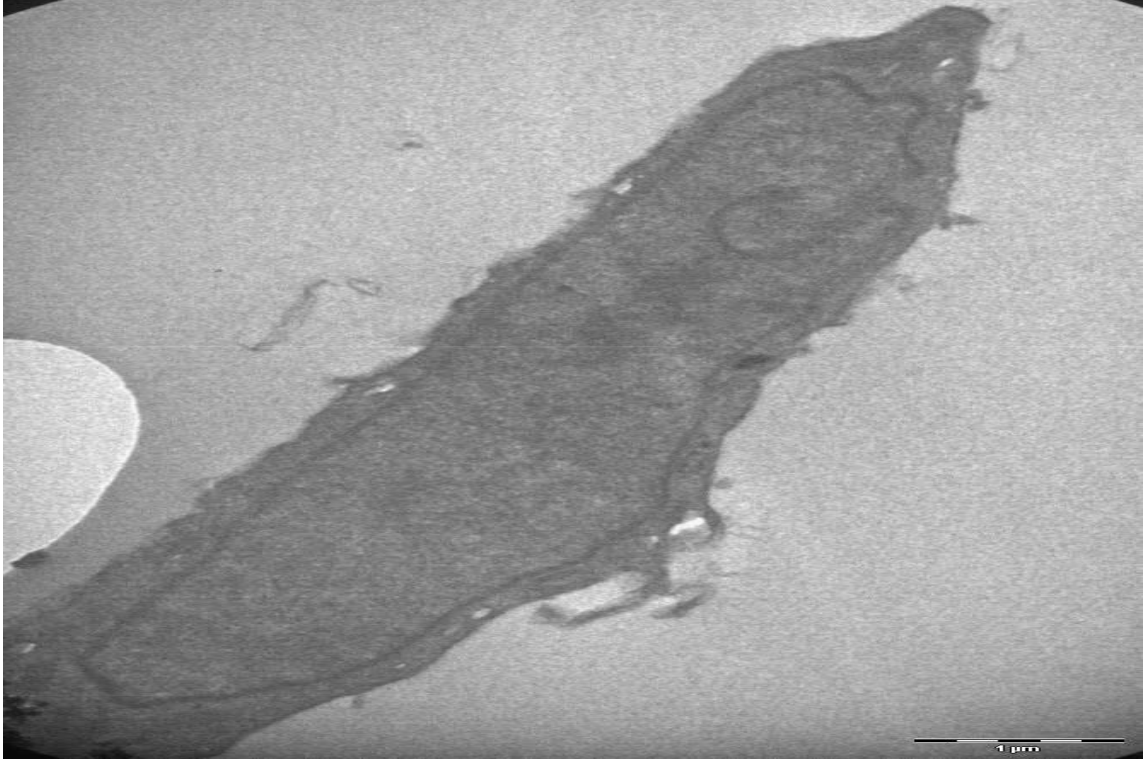
Bu çalışmada, öncelikle modifiye edilmiş Metakrilamido folik asit DMSO içerisinde dispers edilerek, Geçirimli Elektron Mikroskop ile görüntülenmiştir. Boyutları 25-30nm arasındadır (Fotoğraf 4.1, 4.2).



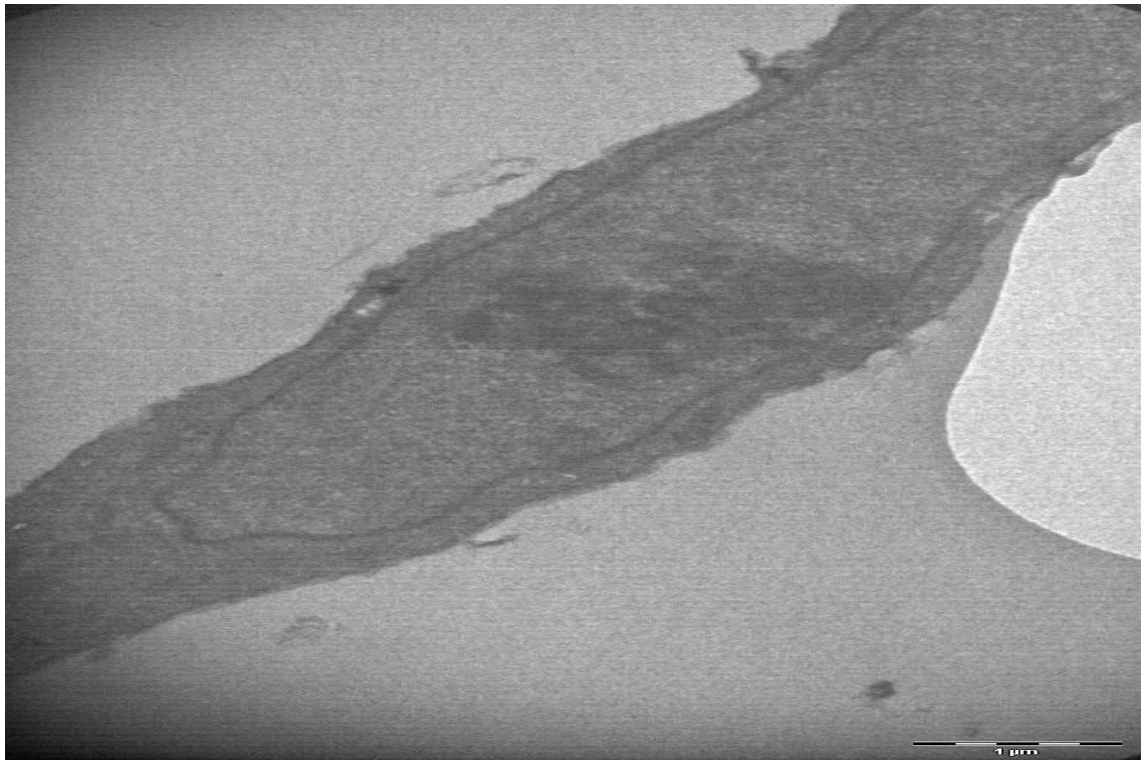
Fotoğraf 4.1. DMSO içerisinde dispers edilen Metakrilamido folik aside ait geçirimli elektron mikroskop görüntüsü (160kx)



Fotoğraf 4.2. DMSO içerisinde dispers edilen Metakrilamido folik aside ait geçirimli elektron mikroskop görüntüsü (105kx)



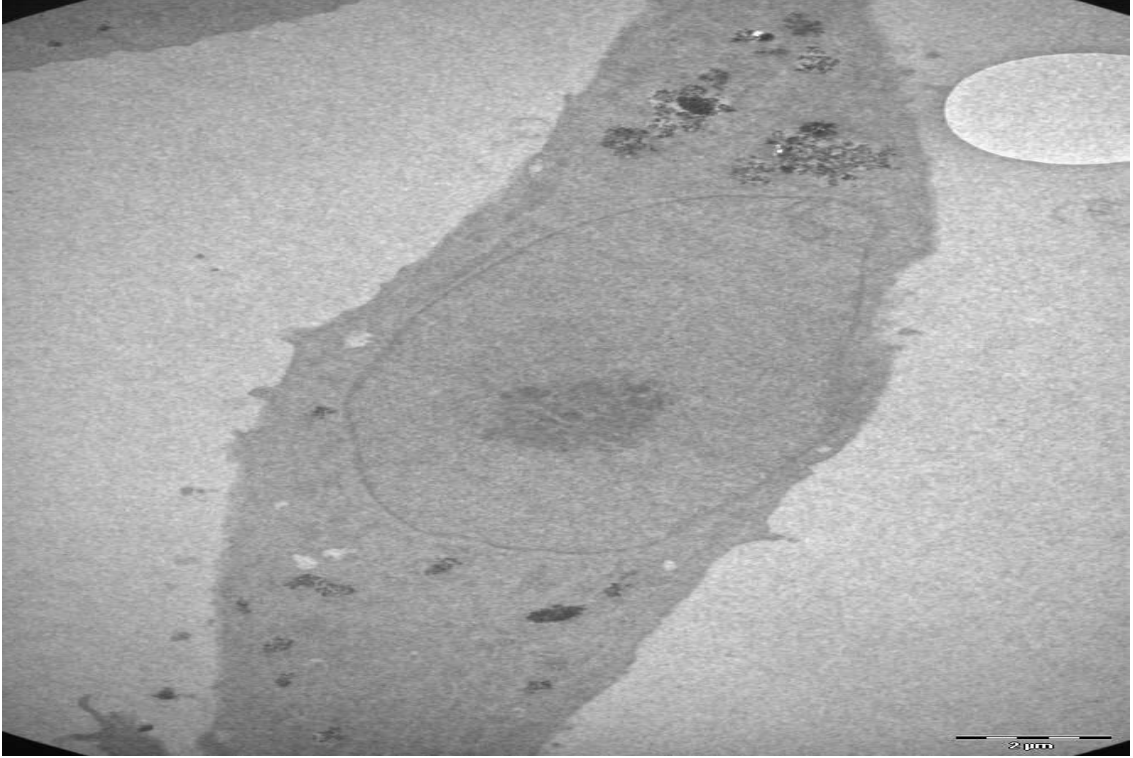
Fotoğraf 4.3. NIH/3T3 hücrelerinin geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi. Kontrol grubu (x 16500)



Fotoğraf 4.4. NIH/3T3 hücrelerinin geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi. Kontrol grubu (x 16500)

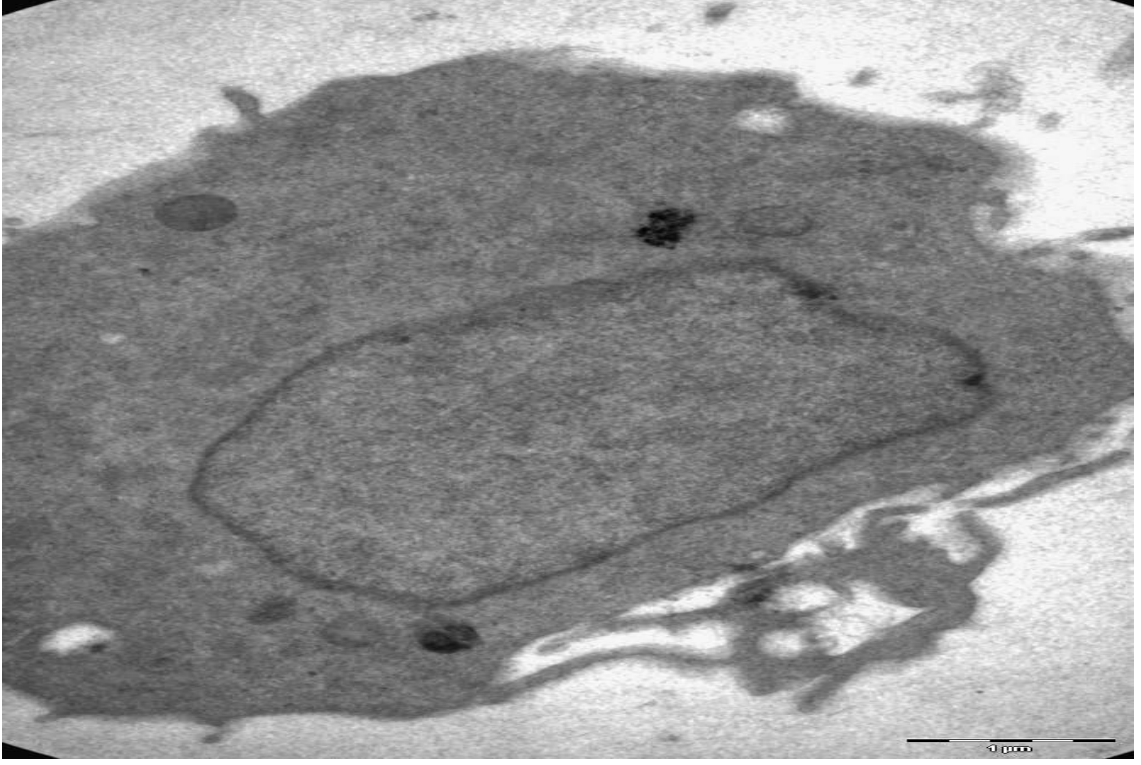
NIH/3T3 hücrelerinde kontrol grubundaki hücreler hiçbir madde ile etkileştirilmemiştir. Bu grupta hücrelerin plazma ve çekirdek zar bütünlüğünde bozulmaya rastlanmamıştır (Fotoğraf 4.3,4.4). Hücreler spesifik morfolojik yapılarını korumuştur.

Hücrelerin doygunluğa ulaştığı konsantrasyon olarak düşünülen 4,5ug/ml, TEM (Geçirimli Elektron Mikroskop) uygulamalarında dikkate alınarak, NIH/3T3 ve 5RP7 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle olmak üzere uygulanmıştır. NIH/3T3 hücreleri, sağlıklı hücreler olup, kontrol grubu olarak deneye alınmıştır.



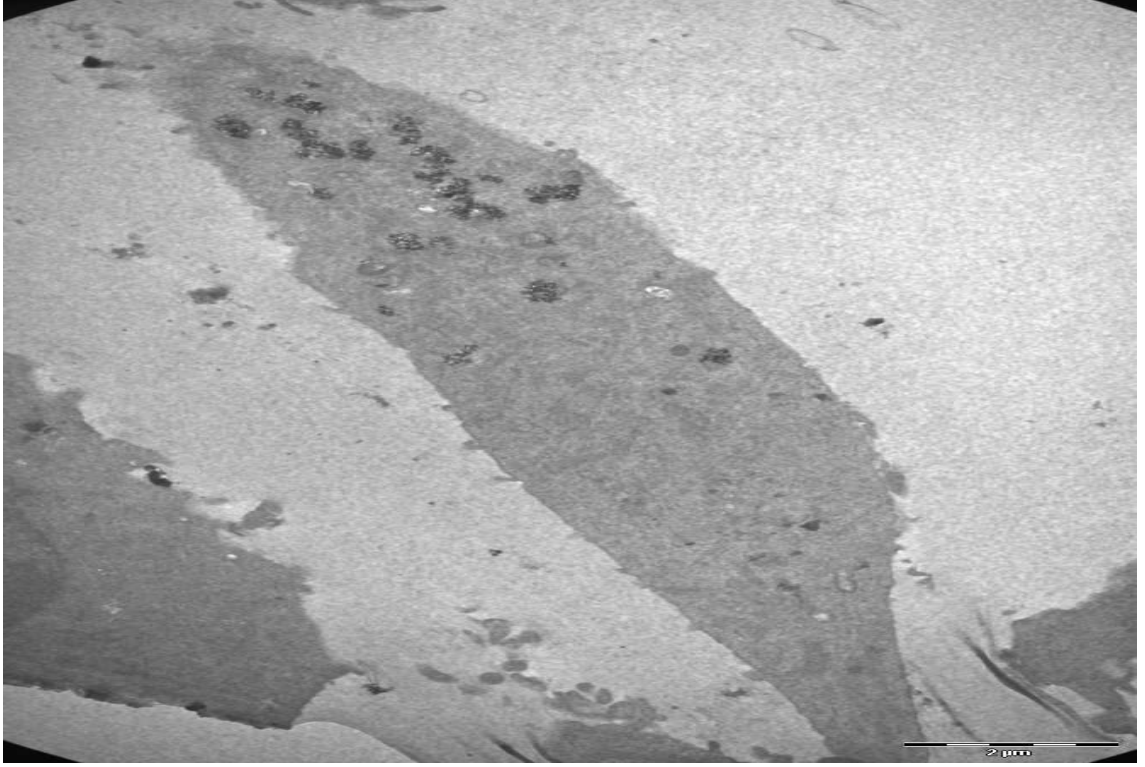
Fotoğraf 4.5. NIH/3T3 hücrelerine 4,5ug/ml konsantrasyonda 24 saat süreyle Metakrilamido folik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi (x 6000).

4,5ug/ml Metakrilamido folik aside 24 saat süreyle maruz kalan sağlıklı hücrelerde nanopartiküllerin hücre içine girdiği, ancak herhangi bir deformasyona sebep olmadığı gözlenmiştir (Fotoğraf 4.5). Metakrilamido folik asidin hücrelerin zarında bulunan folat reseptörleri ile hücre içerisine alındığı düşünülmektedir.



Fotoğraf 4.6. NIH/3T3 hücrelerine 4,5ug/ml konsantrasyonda 48 saat süreyle Metakrilamido folik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi (x 16500)

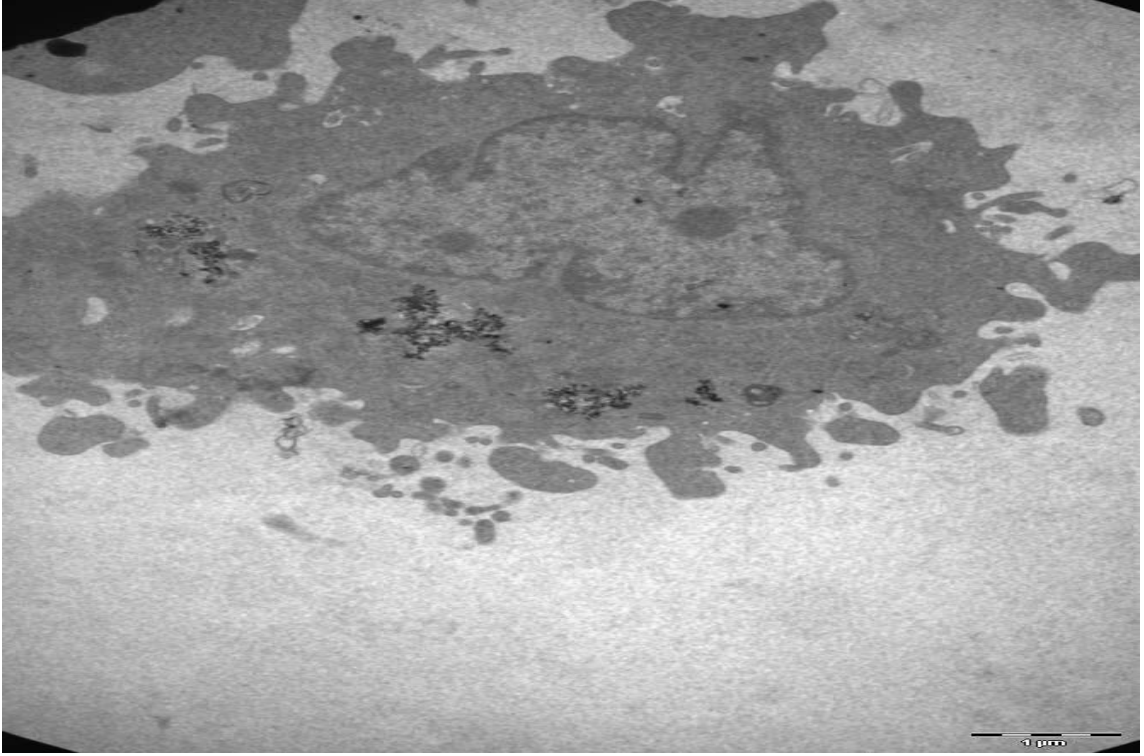
4,5ug/ml Metakrilamido folik aside 48 saat süreyle maruz kalan sağlıklı hücrelerde nanopartiküllerin hücre içine alımının gerçekleştiği tespit edilmiştir (Fotoğraf 4.6). Ancak bu süre sonunda herhangi bir deformasyon gözlenmemektedir. Çekirdek zarı bütünlüğünü korumaktadır.



Fotoğraf 4.8. 5RP7 hücrelerine 4,5ug/ml konsantrasyonda 24 saat süreyle Metakrilamido folik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi (x 8200).

4,5ug/ml Metakrilamido folik aside 24 saat süreyle maruz kalan grupta maddeyi taşıyan nanopartiküllerin hücre içine sağlıklı hücrelere oranla daha fazla miktarda girdiği ve deformasyona sebebiyet verdiği tespit edilmiştir (Fotoğraf 4.8). Ayrıca hücrelerde sekonder lizozom oluşumları ortaya çıkmış, mitokondriler şekillerini yitirmeye başlamıştır. Mikronükleus oluşumlar gözlenmiş, hücre çekirdeği spesifik şeklini kaybetmiştir.

Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Hücre küçülmeye ve kondanase olmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erir. Apoptoza uğrayan bir hücrede laminin ve aktin filamentlerinin kesilmesi sonucu sitoplazma çekilmeye ve küçülmeye başlar. Hücre büzölmeye ve küçölmeye devam eder ve makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği membranla çevrili küçük parçalara ayrılır.



Fotoğraf 4.9. 5RP7 hücrelerine 4,5ug/ml konsantrasyonda 48 saat süreyle Metakrilamido folik asit uygulanması sonucunda geçirimli elektron mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin değerlendirilmesi (x 11500).

4,5ug/ml konsantrasyona 48 saat süreyle maruz kalan 5RP7 hücrelerinde ise, hücre içine fazla miktarda girdiği gözlenen nanopartiküller, çekirdeğe oldukça yakın olarak bulunmaktadır (Fotoğraf 4.9). Bunun kanser hücrelerinin ortalama miktarın üzerinde folata ihtiyaç duymaları, dolayısıyla olabildiğince çok folatı yakalamak için hücre zarlarında fazla sayıda folat reseptörlerini eksprese etmelerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimlerin meydana geldiği gözlenmiştir. Ayrıca hücre çekirdeğinin oval şekil olarak büzüştüğü, kenara doğru hareket itildiği tespit edilmiştir. Mitokondriler tamamen şekillerini yitirmiş, kristaları parçalanmıştır. Endoplazmik retikulum zar bütünlüğünü kaybetmiş, birbirinden bağımsız parçacıklar şeklinde sitoplazmaya dağılmıştır (Fotoğraf 4.9).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada NIH/3T3 ve 5RP7 hücreleri üzerinde Metakrilamido folik asidin etkileri araştırılmıştır. Bunun için Annexin V-FITC kullanılarak Akım Sitometri analiziyle apoptoz değerlendirilmiştir. Geçirimli Elektron Mikroskobu ile ince yapı değişikliklerinin yanı sıra, nanopartiküllerin hücre içerisine girdiği tespit edilmiştir. Metakrilamido folik asidi 5RP7 hücrelerine 24 saat süreyle uyguladığımızda, Annexin V-FITC ile akım sitometri ile 4,5ug/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %79,5; yüzde apoptotik oran % 11.5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.9). Annexin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde olan FITC (Fluorescein isothiocyanate) ile işaretlenerek apoptotik hücreler görünür hale getirilmiştir. Metakrilamido folik asidin 4,5ug/ml olan konsantrasyonunun sağlıklı hücelere (NIH/3T3) 24 saat sonundaki apoptotik etkisi % 4,5 iken (Şekil 4.4), kanserli hücrelerde bu oranın %11.5 'e ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu da bize maddemizin sağlıklı hücelere göre kanser hücrelerinde daha fazla apoptotik etki gösterdiğini ve daha detaylı çalışmalarla etkinliği açıklığa kavuşturulmalı düşüncesini oluşturmuştur. Ayrıca Metakrilamido folik asidin 4,5ug/ml olan konsantrasyonuna maruz kalan 5RP7 hücrelerindeki apoptotik oran 24 saat sonunda % 10.5 iken (Şekil 4.9), 48 saat sonunda % 12.9 olarak tespit edilmiştir. Bu da apoptotik etkinin, maddeye maruz kalınan zamana bağlı olarak arttığını düşündürmüştür.

Geçirimli Elektron Mikroskop ile yapılan incelemelerde; NIH/3T3 hücre serisinde 4,5ug/ml Metakrilamido folik aside 24 saat süreyle maruz kalan hücrelerde nanopartiküllerin hücre içine girdiği, ancak herhangi bir deformasyona sebep olmadığı gözlenmiştir (Fotoğraf 4.5). Aynı konsantrasyona 48 saat süreyle maruz kalan NIH/3T3 hücrelerinde de nanopartiküllerin hücre içine alımının gerçekleştiği tespit edilmiştir (Fotoğraf 4.6). Hücrelerde herhangi bir deformasyona rastlanmamıştır.

5RP7 hücre serisinde ise, 4,5ug/ml Metakrilamido folik aside 24 saat süreyle maruz kalan grupta maddeyi taşıyan nanopartiküllerin hücre içine sağlıklı hücelere oranla daha fazla miktarda girdiği ve deformasyona sebebiyet verdiği tespit edilmiştir (Fotoğraf 4.8). 4,5ug/ml konsantrasyona 48 saat süreyle maruz kalan 5RP7 hücrelerinde ise, hücre içine fazla miktarda girdiği gözlenen

nanopartiküller, çekirdeğe oldukça yakın olarak bulunmaktadır. Ayrıca içlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimlerin meydana geldiği gözlenmiştir. Hücre büzülmeyle başlayarak, makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği hale gelmeye başlamıştır (Fotoğraf 4.9). Tespit edilen oranlar, gözlenen değişiklikler ve uygulanan konsantrasyonlar özgündür.

Bulgulara göre Metakrilamido folik asidin NIH/3T3 hücreleri üzerine sınırlı etkisi bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan TEM özellikle biyolojik numuneler için tasarlanmış olup, 300 bin kez büyütme gücüne sahiptir. Dolayısıyla metakrilamido folik asidin hücreleri ve organellerini nasıl etkilediğinin araştırılması bakımından büyük bir öneme sahiptir.

Nanoteknolojinin yaşayan sistemlere moleküler seviyede müdahale edebilme imkanı yaratabileceği düşünülmektedir. Bu da yaşayan organizmalar ile etkileşime geçebilecek boyutlarda araçlar üretilmesi ile birçok yeni teşhis ve bunu takiben yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesinin olası olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Ünsal N., Kanser Biyolojisi Ders Notları, İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 2007.
- [2] Anonim, *Nanotechnology and Cancer National Cancer Institute National Institutes of Health*, NCI Press Office, **301**, 496-6641, 2001.
- [3] Anonim, *Nanoteknoloji Tarihi ve Gelişimi*, 2002.
<http://www.turk-bilim.com/nanoteknoloji-tarihi-ve-gelisimi.htm>
- [4] Uldrich, J., Newberry, D., *Nano Teknoloji-Sıradaki Büyük Şey Ashında Çok Küçük*, Ledo Yayıncılık, İstanbul 2008.
- [5] Konuk, M., Oktay S., ‘‘Biyolojik Sistemlerde Uygulamalara Yeni Bir Yaklaşım: Nanoteknoloji ve Nanomateryaller, Gıda Teknolojileri’’ *Elektronik Dergisi.*, **3**, 23-34, 2007.
- [6] Çıracı, S., ‘‘Nanobilim ve Nanoteknolojide Türkiye’nin Bir Mükemmelliyet Merkezi’’, *Bilim ve Teknik Dergisi Yeni Ufuklara Eki*, Tübitak., sf: 2-4, Aralık 2006.
- [7] Gürsel, İ., ‘‘Nanobiyolojide Yeni Ufuklar’’, *Bilim ve Teknik Dergisi Yeni Ufuklara Eki*, Tübitak., sf: 12-14, Aralık 2006.
- [8] Yılmaz, A., ‘‘Proteinlerin Yürüdüklerini Keşfeden Bir Yıldızımız’’, *Bilim ve Teknik Dergisi*, Tübitak., **460**, sf.66-69, 2006.
- [9] Kam, N.W.S., O’Connell, M., Wisdom, J.A., Dai, H., ‘‘Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction’’, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, sf.11600–11605, 2005.
- [10] Lowitz, B.B., and Casciato, D.A., *Manual of Clinical Oncology*, Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2004.
- [11] Türkmen, D., Yurtçu, E., Ergun, M.A., Menevşe, A., ‘‘İnsan Epidermoid Larinks Karsinom (Hep-2) Hücre Serisinde Resveratrol’ün Apoptotik Etkisi’’, *Gazi Medical Journal.*, **18** (3); 117-120, 2007 .
- [12] Cabadak, H., ‘‘Hücre Siklusu ve Kanser’’, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* **9** (3) ; 51 – 61, 2008.
- [13] Ayan, N., ‘‘Baş-Boyun Skuamöz Hücreli Kanserlerinde Moleküler Biyolojik Değişiklikler’’, *K.B.B. ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi*, **3** , 166-168, 1995.

- [14] Fernandes, A.M., Hamburger, A.W., Gerwin, B.I., ‘‘Production of epidermal growth factor related ligands in tumorigenic and benign human lung epithelial cells’’, *Cancer Letters.*, **142**, 55-63, 1999.
- [15] Ataergin, A., ‘‘Kanser tedavisinde Anjiyogenez İnhibitörlerinin Yeri’’ Türkiye Klinikleri, *J Med Sci.*, **19**, 100-105, 1999.
- [16] Akbulut, H., Akbulut, K.G., *Karsinogenez Tıbbi Onkoloji*, Antip Afi Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar, Ankara, 23-38, 1997.
- [17] Lecture, GFF., ‘‘Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors’’, *Chest* 109 (Suppl): 14-19, 1996.
- [18] Lodish, H., Baltimore, D., Brek, A., Zipursky, L., Matsudaira, P. and Darnell, J., *Molecular Cell Biology*, Third Edition, Scientific American Books, 1258-1259, 1995.
- [19] Köktürk, N., Kırıçoğlu, C.E., Öztürk, C., ‘‘Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi’’, *Solunum*, **5** (4): 127-138, 2003.
- [20] Akins, P.T., Liu, P.K., Hsu, C.Y., ‘‘Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia’’, *American Heart Association, Inc.*, **27**, 1682- 1687, 1996.
- [21] Millerk, D.M., Blume, S., Borst, M., ‘‘Oncogenes: Malignant transformation and modern medicine’’, *Am J Med Sci.*, **300**, 59-65, 1990.
- [22] Nowell, P.C., ‘‘Cytogenetics of tumor progression’’, *Cancer* **65**, 2172-2175, 1990.
- [23] Caotes, P.J., Hales, S.A., Hall, P.A., ‘‘The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha’’, *J Pathol.*, **178**, 71-7, 1996.
- [24] Choi, W.S., Lee, E.H., Chung, C.W., ‘‘Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2’’, *J Neurochem.*, **77**, 1531-1541, 2001.
- [25] Nakano, R., ‘‘Apoptosis: Gene directed cell death’’, *Horm Res* **48**, 2-4, 1997.
- [26] Newton, K., Strasser, A., ‘‘The Bcl-2 family and cell death regulation’’, *Curr Opin Genet Dev .*, **8**, 68-75, 1998.
- [27] Wyllie, A.H., ‘‘The genetic regulation of apoptosis’’, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 97-104, 1995.

- [28] Kim, H.S., Kim, J.W., Gnag, J., Wen, J., Koh, S.S., Koh, J.S., Chung, H.H., Song, S.Y., ‘‘The farnesyltransferase inhibitor LB42708 inhibits growth and induces apoptosis irreversibly in H-*ras* and K-*ras* transformed rat intestinal epithelial cells’’, *Toxicol. App. Pharmacol.*, **215** (3), 317-329, 2006.
- [29] Cohen, JJ., ‘‘Apoptosis: The physiological pathway of cell death’’, *Hosp Pract.*, **15**, 35-43, 1993.
- [30] Spencer, S., Cataldo, NA., Jaffe, RB., ‘‘Apoptosis in the human female reproductive tract’’, *Obstetrical and Gynecological Survey.*, **5**, 314-323, 1996.
- [31] Park, JW., Choi, YJ., Suh, SI., Baek, WK., Suh, MH., Jin, IN., Min, DS., Woo, JH., Chang, JS., Passaniti, A., Lee, YH., Kwon, TK., ‘‘Bcl-2 overexpression attenuates resveratrol-induced apoptosis in U937 cells by inhibition of caspase-3 activity’’, *Carcinogenesis.*, **22**, 1633-1639, 2001.
- [32] Kerr, JFR., Wyllie, AH., Currie, AR., ‘‘Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics’’, *Br J Cancer.*, **26**, 239-245, 1972.
- [33] Bellamy, CO., Malcomson, RD., Harrison, DJ., Wyllie, AH. ‘‘Cell death in health and disease, the biology and regulation of apoptosis’’, *Cancer Biology.*, **6**, 3-16, 1995.
- [34] Cummings, MC., Winterford, CM., Walker, NI., ‘‘Apoptosis’’, *Am J Surg Pathol.*, **21**, 88-101, 1997.
- [35] Majno, G., Torisl. A., ‘‘Apoptosis oncosis and necrosis’’, *Am J Pathol.*, **146**, 3-15, 1995.
- [36] Schwartzman, RA., Cidloski, JA., ‘‘Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death’’, *Endocrine Reviews.*, **14**, 133-144, 1993.
- [37] Öktem, S., Özhan, M., Özol, D., ‘‘Apoptozisin Önemi’’, *Toraks Dergisi.*, **2** (1); 91-95, 2001.
- [38] Thompson, CB., ‘‘Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease’’, *Science.*, **267**, 1456-1462, 1995.
- [39] Kiess, W., Gallaher, B., ‘‘Hormonal control of programmed cell death apoptosis’’, *Eur J Endocrin.*, **18**, 482-491, 1998.
- [40] Konca, M., *Endometriozisli Hastaların Menses Kanında Apoptozis*, Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları Ve Doğum Kliniği, İstanbul, 2005.

- [41] Balakumran, A., Champbell, GA., Maslen, MT., "Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats", *Toxicol Appl Pharmacol.*, **139**, 122-127, 1996.
- [42] Wyllie, AH., "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation", *Nature.*, **284**, 555-556, 1980.
- [43] Lu, J., Ashwell, K., Ken, WS., Waite, P., "Advances in spinal cord injury, Role of Apoptosis", *Spine.*, **25**, 1859-1866, 2000.
- [44] Bohm, I., Schild, H., "The complex scenario for a silent cell death", *Mol Imaging Biol.*, **5**, 2-14, 2003.
- [45] Antar, V., *Bir Genel Kaspaz İnhibitörü Olan Qvd-Oph'nin Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi*, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul, 2005.
- [46] Ulukaya, E., Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 2003.
<http://www20.uludag.edu.tr/~eulukaya>
- [47] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (Eds.), "Isolating cells and growing them in culture", *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, 2002.
- [48] Anonim, Folik asit, 2009.
http://tr.wikipedia.org/wiki/Folik_asit
- [49] Nakashima-Matsushita, N., Homma, T., Yu, S., Matsuda, T., Sunahara, N., Nakamura, T., Tsukano, M., Ratnam, M., Matsuyama, T., "Selective expression of folate receptor beta and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum.*, **42**, 1609–1616, 1999.
- [50] Turk, M.J., Breur, G.J., Widmer, W.R., Paulos, C.M., Xu, L., Grote, L.A., Low, P.S., "Folate-targeted imaging of activated macrophages in rats with adjuvant-induced arthritis", *Arthritis Res Ther.*, **46** (7); 1947-1955, 2002.
- [51] Massaro, E. J., Rogers, J. M., "Folate and Human Development", Humana Press, NJ, p 376, 2002.
- [52] Sabharanjak, S., and Mayor, S., "Folate receptor endocytosis and trafficking". *Adv. Drug Delivery Rev.* **56**, 1099-1109, 2004.

- [53] Elnakat, H., Ratnam, M., "Distribution, functionality, and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy", *Adv. Drug Delivery Rev.*, **56**, 1067-1084, 2004.
- [54] Rui, Y., Wang, S., Low, P.S., Thompson, D.H., "Diplasmenylcholine-folate liposomes: an efficient vehicle for intracellular drug delivery", *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11213-11218, 1998.
- [55] Aronov, O., Horowitz, A.T., Gabizon, A., Gibson, D., "Folate-targeted PEG as a potential carrier for Carboplatin analogues, Synthesis and in vitro studies", *Bioconjugate Chem.*, **14**, 563-574, 2003.
- [56] Gottschalk, S., Cristiano, R.J., Smith, L.C., and Woo, S.L.C., "Folate receptor mediated DNA delivery into tumor cells: lysosomal disruption results in enhanced gene expression", *Gene Ther.*, **1**, 185-191, 1994.
- [57] Ward, C.M., Pechar, M., Oupický, D., Ulbrich, K., and Seymour, L.W. "Modification of pLL/DNA complexes with a multivalent hydrophilic polymer permits folate-mediated targeting in vitro and prolonged plasma circulation in vivo", *J. Gene Med.*, **4**, 536- 547, 2002.
- [58] Turek, J.J., Leamon, C.P., and Low, P.S., Endocytosis of folate-protein conjugates: ultrastructural localization in KB cells, *J. Cell. Sci.*, **106**, 423-430, 1991.
- [59] Stevens, P. J., Sekido, M., and Lee, R. J., "A folate receptor targeted lipid nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug", *Pharm. Res.*, **21**, 2153-2157, 2004.
- [60] Lee, E.S., Na, K., Bae, Y.H., "Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting", *J. Controlled Release.*, **91**, 103-113, 2003.
- [61] Parker, N., Turk, M.J., Westrick, E., Lewis, J.D., Low, P.S., and Leamon, C.P., "Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay", *Anal. Biochem.*, **338**, 284-293, 2005.
- [62] Garin-Chesa, P., Campbell, I., Saigo, P.E., Lewis JR., Old, L.J., Rettig, W.J., "Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26, Sensitivity and specificity in immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein", *Am. J. Pathol.*, **142**, 557–567, 1993.

- [63] Toffoli, G., Cernigoi, C., Russo, A., Gallo, A., Bagnoli, M., Boiocchi, M., "Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers", *Int. J. Cancer.*, **74**, 193–198, 1997.
- [64] Gruner, B.A., Weitman, S.D., "The folate receptor as a potential therapeutic anticancer target", *Invest. New Drugs.*, **16**, 205–219, 1998.
- [65] Reddy, J.A., Low, P.S., "Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers", *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **15**, 587–627, 1998.
- [66] Sudimack, J., Lee, R.J., "Targeted drug delivery via the folate receptor", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **41**, 147–162, 2000.
- [67] Shen, F., Ross, J.F., Wang, X., Ratnam, M., "Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type beta in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity", *Biochemistry.*, **33**, 1209–1215, 1994.
- [68] Leamon, C.P., Low, P.S., "Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **88**, 5572–5576, 1991.
- [69] Turek, J.J., Leamon, C.P., Low, P.S., "Endocytosis of folate-protein conjugates: ultrastructural localization in KB cells", *J. Cell. Sci.*, **106**, 423–430, 1993.
- [70] Kranz, D.M., Patrick, T.A., Brigle, K.E., Spinella, M.J., Roy, E.J., "Conjugates of folate and anti-T-cell-receptor antibodies specifically target folate-receptor-positive tumor cells for lysis", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **92**, 9057–9061, 1995.
- [71] Patrick, T.A., Kranz, D.M., Zachary, J.F., Roy, E.J., "Intracerebral bispecific ligand–antibody conjugate increases survival of animals bearing endogenously arising brain tumors", *Int. J. Cancer .*, **78**, 470–479, 1998.
- [72] Arbor, A., "Nanoparticles transport cancer-killing drug into tumor cells to increase efficacy, lower drug toxicity in mice", *Cancer Research.*, **65** (12), 2005.
- [73] Aydın M., "Hematolojide Farmakogenetik", İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, İstanbul Türk Hematoloji Derneği, Moleküler Hematoloji Sitogenetik THD Bilimsel AK Kursu, Antalya, 22-25, 2006.

- [74] Peppes, L.B., Blanchette, J.O., ‘‘Nanoparticle and Targeted Systems for Cancer Therapy’’, *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 1649-1659, 2004.
- [75] Lin, C.R., Chiang, R.K., Wang, J.S., Sung, T.W., ‘‘Magnetic Properties of Monodisperse Iron Oxide Nanoparticles’’, *Journal of Applied Physics*, **99**, 08N710, 2006.
- [76] Stella, B., Arpicco, S., Peracchia, M.T., Desmaele, D., Hoebeke, J., Renoir, M., Angelo, J. D., Cattel, L., Couvreur, P., ‘‘Design of folic acid conjugated nanoparticles for drug targeting’’, *J. Pharm. Sci.*, **89**, 1452-1464, 2000.
- [77] Allemann, E., Gurny, R., Doelker, E., ‘‘Drug-loaded nanoparticles-preparation methods and drug targeting issues’’, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **39**, 173-191, 1993.
- [78] Dixit, V., Bossche, J.V., Sherman, D.M., Thompson, D.H., Andres, R.P., ‘‘Synthesis and grafting of Thioctic Acid-PEG-Folate Conjugates onto Au Nanoparticles for Selective Targeting of Folate Receptor- Positive Tumor Cells’’, *Bioconjugate chem.*, **17**, 603-609, 2008.
- [79] Weissleder, R., Bogdanov, A., Neuwelt, E.A and Papisov, M., ‘‘Longcirculating iron oxides for MR imaging’’, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **16**, pp. 321–334, 1995.
- [80] Gupta P.K., and. Hung, C.T., ‘‘Magnetically controlled targeted microcarrier systems’’, *Life Sci.*, **44**, pp. 175–186, 1989.
- [81] Zhang, Y., Kohler, N., and Zhang, M., ‘‘Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake’’, *Biomaterials.*, **23**, (7), pp. 1553–1561, 2002.
- [82] Allemann, E., Gurny, R., Doelker, E., ‘‘Drug-loaded nanoparticles preparation methods and drug targeting issues’’, *Eur J Pharm Biopharm.*, **39**, 173–91, 1993.
- [83] Lowry, MB., Duchemin, AM., Robinson, JM., Anderson, CL., ‘‘Functional separation of pseudopod extension and particle internalization during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis’’, *J Exp Med.*, **187**, 161–76, 1998.
- [84] Gohrsenthal, S., Schmittwillich, H., Ebert, W., Conrad, J., ‘‘The demonstration of human tumors on nude-mice using gadoliniumlabeled monoclonal-antibodies for magnetic-resonance-imaging’’, *Invest Radiol.*, **28**, 789–795, 1993.

- [85] Tatsushi, S., Soji, O., Masakazu, U., Nobutoshi, A., Masaki, K., "Magnetic resonance imaging of esophageal squamous cell carcinoma using magnetite particles coated with anti-epidermal growth factor receptor antibody", *Int J Cancer.*, **75**, 626–34, 1998.
- [86] Moore, A., Basilion, J., Chiocca, E.A., and Weissleder, R., "Measuring transferrin receptor gene expression by NMR imaging", *Biochim. Biophys. Acta.*, **1402**, pp. 239–49, 1998.
- [87] Qian, Z.M., Li, H., Sun, H., and Ho, K., "Targeted drug delivery via transferin receptor-mediated endocytosis pathway", *Pharmacological Rev.*, **54**, (4), pp. 561–587, 2002.
- [88] Lauffenburger, D.A., and Linderman, J.J., "Receptors: Models for Binding, Trafficking, and Signalling", , Oxford Univ. Pres., Oxford., 261-262, 1996.
- [89] Ajay, G.K., Catherine, B., Mona, G., Adam, C., "Receptor-Mediated Targeting of Magnetic Nanoparticles Using Insulin as a Surface Ligand to Prevent Endocytosis", *IEEE Transactions on Nanobioscience.*, **2**, no.4, 2003.
- [90] Weitman, S.D., Lark, R.H., Coney, L.R., Fort, D.W., Frasca, V., Zurawski, V.R., Kamen, B.A., "Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues", *Cancer Res.*, **52**, 3396–401, 1992.
- [91] Yong, Z., Jing, Z., "Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells", *Journal of Colloid and Interface Science.*, **283**, 352-357, 2005.
- [92] Garbisa, S., Pozzatti, R., Muschel, R.J., Saffiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R.H., Khoury, G., Liotta, L.A., "Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotypr: induction by transfection with c-HA-ras but not c-HA-ras plus ad2-ela", *Cancer Research.*, **47**, (6), 1523-1528, 1987.