

**EGE ÜNİVERSİTESİ NÜKLEER BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**APOPTOSİS DEDEKSİYONUN**  
**<sup>99m</sup>Tc-GLUKOHEPTONAT İLE *İN VİTRO***  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Gamze KOCAGÖZOĞLU**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT**

**Nükleer Bilimler Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu: 622.02.01**

**Sunuş Tarihi: 29.07.2010**

**Bornova-İZMİR**

**2010**



Gamze KOCAGÖZOĞLU tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Apoptosis Dedeksiyonun  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat ile *in vitro* Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29.07.2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**Jüri Başkanı** : Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT  
**Raportör Üye** : Prof. Dr. Perihan ÜNAK  
**Üye** : Doç. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ

**İmza**

.....  
.....  
.....



**ÖZET****APOPTOSİS DEDEKSİYONUN <sup>99m</sup>Tc-GLUKOHEPTONAT İLE  
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ****KOCAGÖZOĞLU, Gamze**

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Fatma Yurt LAMBRECHT

Temmuz 2010, 54 sayfa

Radyofarmasötikler bazı hastalıkların teşhis ve tedavisi amaçla kullanılması yanı sıra kemoterapi ve radyoterapi etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bu radyofarmasötiklerden <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat; böbrek ve beyin görüntüleme ajanı olarak kullanılmaktadır. <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat akciğer kanserli dokunun görüntülenmesinde de yüksek duyarlılığa sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca meme, beyin ve böbrek tümörlerinde tutulum gösterir.

Bu çalışmada, A549 akciğer kanser hücrelerinde kemoterapi ajanı kullanılması sonucunda meydana gelen apoptosisin görüntülenmesinde <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat potansiyeli *in vitro* olarak incelenmiştir.

A549 akciğer kanser hücre hattında bir kemoterapi ajanı olan Cisplatin'in farklı miktarlarına maruz bırakılan tedavi grubu ve kemoterapik ajana maruz bırakılmayan kontrol grubu olmak üzere iki farklı grupta apoptotik etki Annexin V ve TUNEL Yöntemlerinden faydalanılarak incelenmiştir. Cisplatin uygulanan tedavi grubu A549 akciğer kanser hücrelerinin, kontrol grubu hücrelerine göre apoptosa uğrayarak azaldığı ve buna bağlı olarak <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat tutulum oranlarında azalma olduğu görülmüştür.

Elde edilen sonuçlara dayanarak, A549 akciğer tümör hücrelerine uygulanan tedavi sonrasında oluşan apoptosisin dedeksiyonu için <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat'ın potansiyeli olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Apoptosis, kanser, <sup>99m</sup>Tc, <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat



**ABSTRACT****IN VITRO EVALUATION OF APOPTOSIS DETECTION  
WITH <sup>99m</sup>Tc-GLUCOHEPTONATE**

KOCAGÖZOĞLU, Gamze

MSc in Nuclear Applications Department

Supervisor: Prof. Dr. Fatma Yurt LAMBRECHT

July 2010, 55 pages

Radiopharmaceuticals are useful to evaluate the effectiveness of cancer treatments as well as used to diagnosis and treatment of some diseases. <sup>99m</sup>Tc-Glucoheptonate from these radiopharmaceuticals is used as kidney and brain imaging agents when labeling with <sup>99m</sup>Tc. <sup>99m</sup>Tc-Glucoheptonate was found to have high sensitivity for imaging of lung cancer tissues. Moreover, <sup>99m</sup>Tc-Glucoheptonate shows also to uptake in breast, brain and kidney tumors.

In this study, <sup>99m</sup>Tc-Glucoheptonate potential is examined as in vitro for imaging of apoptosis that occur as a result of chemotherapy agents used in A549 lung cancer cells.

Apoptotic ratios in A549 lung cancer cells was investigated by using Annexin V and TUNEL methods, in two different groups as exposed to different amounts of Cisplatin for the treatment group and Cisplatin in the control group not exposed to.

A549 lung cancer cells in the treatment group compared to control groups of cells undergo apoptosis were depicted to reduced and <sup>99m</sup>Tc-Glucoheptonate uptake ratios decreased as depending on this.

Based on the results obtained, it is determined that <sup>99m</sup>Tc-Glucoheptonate might be a potential for detection of apoptosis occurred after treatment in A549 lung tumor cells.

**Keywords:** Apoptosis, cancer, <sup>99m</sup>Tc, <sup>99m</sup>Tc-Glucoheptonate.



## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim süresince ve tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar ki süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini esirgemeyen, çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatma Yurt LAMBRECHT'e, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı Başkanı ve Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Perihan ÜNAK'a, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı çalışanları ve sayın hocamız Doç. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e destekleri için teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım süresince beni yalnız bırakmayan dostluğunu ve yardımlarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma, her türlü maddi ve manevi desteğiyle hep yanımda olan aileme teşekkür ederim.

GAMZE KOCAGÖZOĞLU



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vii
TEŞEKKÜR .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xx
1.GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 Akciğer Kanseri .....	3
2.2 Kemoterapi ve Kemoterapi Ajanları.....	4
2.3 Apoptosis Nedir? .....	6
2.4 Apoptosisin Belli Aşamaları.....	7
2.5 Apoptosisin Morfolojik İşaretleri .....	9
2.5.1 Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler .....	9
2.5.1.1 Yüzey Organel Kaybı.....	9
2.5.1.2 Hücre Büzülmesi.....	9
2.5.1.3 Kromatin Yoğunlaşması.....	9

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
2.5.1.4 Stoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimciklerin Oluşması .....	10
2.5.2 Apoptosis ve Nekrozis Arasındaki Farklar .....	10
2.5.3 İnsan Organizmasında Apoptosisin İzlendiği Durumlar .....	11
2.6 Apoptosisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler .....	12
2.6.1 Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri .....	12
2.6.2 Histokimyasal Yöntemler .....	13
2.6.3 Biyokimyasal Yöntemler .....	15
2.6.4 İmmunolojik Yöntemler .....	15
2.6.5 Moleküler Biyoloji Yöntemler .....	15
2.7 Apoptosisi Saptamada Kullanılan Görüntüleme Ajanları .....	15
2.8 Teknesyum-99m ( <sup>99m</sup> Tc) Kimyası .....	18
2.9 <sup>99m</sup> Tc-Glukoheptonat (Gluseptat) .....	19
3. MATERYAL VE METOT .....	21
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar .....	21
3.1.1 Kullanılan Kimyasallar .....	21
3.1.2 Kullanılan Cihazlar .....	22

## İÇİNDEKİLER (devam)

### Sayfa

3.2 Radyo İnce Tabaka Kromatografi (RTLC) Yöntemi Kullanılarak <sup>99m</sup> Tc ile Glukoheptonat'ın İşaretlenmesi.....	23
3.3 Hücre Kültürü Çalışmaları .....	24
3.3.1 Hücre Dondurma/Stoklama .....	24
3.3.2 Hücre Çözme .....	24
3.3.3 Pasajlama.....	25
3.3.4 Hücre Canlılığının (Viabilite) Değerlendirilmesi .....	25
3.3.5 XTT ve Tripan Mavisi Boyası Testi .....	26
3.3.6 Annexin V-EGFP Testi ile Apoptosisin Saptanması .....	28
3.3.7 DeadEnd™ Fluorometrik TUNEL Testi.....	29
3.3.8 A549 Hücrelerinde <sup>99m</sup> Tc-Glukoheptonat Tutulumu .....	32
3.3.1.9 Bradford Protein Analizi .....	34
3.4 İstatistiksel Analizler.....	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1.Radyo İnce Tabaka Kromatografi (RTLC) Yöntemi Sonuçları.....	36
4.2 Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi Sonuçları .....	36
4.2.1 Tripan Mavisi Boyası Testi Sonucu.....	37

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
4.2.2 XTT Testi Sonucu .....	38
4.2.3 Annexin V-EGFP Testi Sonucu.....	39
4.2.4 DeadEnd™ Fluorometrik TUNEL Testi Sonucu.....	40
4.2.5 Bradford Protein Analizi Sonucu .....	41
4.2.6 A549 Hücrelerinde <sup>99m</sup> Tc-Glukoheptonat Tutulum Sonucu.....	42
4.2.7 İstatistiksel Sonuçlar.....	43
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	46
6. KAYNAKLAR DİZİNİ .....	48
7. ÖZGEÇMİŞ .....	54

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler .....	10
2.2 Apoptosis ile Nekrozis Arasındaki Farklar .....	11
2.3 Nükleus Fragmantasyonu .....	13
2.4 Normal Hücre-Apoptotik Hücre .....	13
2.5 Normal Hücre-Oluşan Cepcikler (blebs).....	13
2.6 Annexin V-FITC ile İzlenen Apoptotik Hücre .....	14
2.7 TUNEL Yöntemi İle Gözlenen Karaciğer Dokusundaki Apoptotik Hücreler (X).....	14
2.8 $^{99}\text{Mo}$ 'un $^{99}\text{Tc}$ 'a bozunması .....	19
2.9 Glukoheptonat.....	20
2.10 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Glukoheptonat.....	20
3.1 TLC Scanner cihazı (Bioscan 2000) .....	23
3.2 Flasktaki A549 Hücreleri .....	25
3.3 XTT uygulaması öncesi kuyucuktaki hücreler .....	27
3.4 XTT uygulaması sonrası kuyucuktaki hücreler .....	28
3.5 Grup Hücreler(Kontrol Grubu).....	29
3.6 Grup Hücreler(10 $\mu\text{M}$ Cisplatin) .....	29

## ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.7 Grup Hücreler(15 µM cisplatin) .....	29
3.8 Grup Hücreler(20 µM cisplatin) .....	29
3.9 Platelere ekilmiş hücreler .....	30
3. 10 Ependorflara alınan ve santrifüjlenen hücreler .....	30
3. 11 Lamlara uygulanan örnek .....	30
3. 12 1.Grup Hücreler(Kontrol Grubu) .....	32
3. 13 2.Grup Hücreler(10 µM Cisplatin).....	32
3. 14 3.Grup Hücreler(15 µM Cisplatin).....	32
3. 15 4.Grup Hücreler(20 µM Cisplatin).....	32
3. 16 Kuyucuklardaki Hücreler .....	33
3. 17 Ependorflara Alınmış Hücreler .....	33
4.1 <sup>99m</sup> Tc-GH SF banyosu RTLC kromotogramı.....	36
4.2 <sup>99m</sup> Tc-GH ACD banyosu RTLC kromotogramı.....	36
4.3 Tripan Mavisi Testi ile Cisplatin Sitotoksitesisi .....	37
4.4 XTT testi ile Cisplatin'in sitotoksitesisi .....	38
4.5 Annexin V-EGFP Testi .....	39
4.6 DeadEnd™ Fluorometrik TUNEL Testi .....	40

4.7 Cisplatin miktarına( $\mu\text{M}$ ) karşılık protein miktarı(g).....	41
4.8 Cisplatin miktarına( $\mu\text{M}$ ) karşılık %ID/protein miktarı(g) .....	43
4.9 Korelasyon katsayısı (r) .....	44

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Nükleer Tıpta Akciğer Kanserinin Tanısında, İzleminde ve Tedavisinde Kullanılan Başlıca Radyoaktif İşaretli Bileşikler .....	4
4.1 Banyolar için $R_f$ değerleri.....	36
4.2 Cisplatin Uygulamaları Sonrası Protein Miktarı (g) .....	41
4.3 Cisplatin uygulamaları sonrası %ID ve %ID/Protein .....	42
4.4 Pearson Korelasyonuna göre Cisplatin miktarı ile $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat Tutulumları arasındaki $p$ değeri ve korelasyon katsayısı= $r$ .....	45
4.5 Pearson Korelasyonuna göre Cisplatin miktarı ile TUNEL Metoduyla bulunan apoptotik hücre yüzdeleri arasındaki $p$ değeri ve korelasyon katsayısı..	45
4.6 Pearson Korelasyonuna göre Cisplatin miktarı ile Annexin V Metoduyla bulunan apoptotik hücre yüzdeleri arasındaki $p$ değeri ve korelasyon katsayısı..	45

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
<i>ELİSA</i>	Enzim Bağlı İmmunosorbent Test (Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay)
<i>TUNEL</i>	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz-Aracılı dUTP Etiketleme (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling)
<i>DMSA</i>	2,3-Dimerkaptosuksinik Asit
<i>FITC</i>	Fluoresan İsothiosiyanat
<i>SPECT</i>	Single Photon Emission Computation Tomography (Tek Foton Emisyon Bilgisayarlı Tomografi)
<i>PET</i>	Positron Emission Tomography (PET) (Pozitron Emisyon Tomografi)
<i>TLC</i>	İnce Tabaka Kromatografisi (Thin-Layer Chromatography)
<i>rpm</i>	Hız (1/ min) - Devir Sayısı
<i>nm</i>	Nanometre - Birim
<i>SCC</i>	Somatik Hücre Sayısı (Somatic Cell Count)
<i>SDS</i>	Sodyum Dodesil Sülfat
<i>EGFP</i>	Geliştirilmiş Yeşil Floresan Protein (Enhanced Green Fluorescent Protein)

## 1. GİRİŞ

Günümüzde nükleer tıp, kanserin moleküler biyolojisine ilişkin elde edilen yeni bilgilerin olası sintigrafik uygulamaları üzerinde yoğunlaşmıştır. Modern nükleer tıp yöntemleri, tümör dokusunun fonksiyonel aktivitesinin araştırılmasını sağlamaktadır (Ünlü M., Akdemir Ü., 2003).

Tümör hücrelerine uygulanan kemoterapi veya radyoterapi işlemlerinden sonra Bilgisayarlı Tomografi (BT), Manyetik Rezonans (MR) gibi görüntüleme yöntemleriyle tümörlü hücrelerin anatomisindeki değişiklikler gözlenmektedir. Bu görüntüleme modellerinde kemoterapiye verilen cevabın değerlendirilmesi için, tümörün lokalizasyonu ve yayılımıyla ilgili anatomik bilgilere ihtiyaç duyulmaktadır. Tümördeki anatomik değişiklikler, tedavi süresince oluşan metabolik değişikliklerden daha sonra meydana geleceği için tedavinin erken safhalarında kemoterapiye verilen cevap bu metotlarla görüntülenememektedir.

Geliştirilen görüntüleme yöntemleri ise tedavi süresi boyunca in vivo veya in vitro olarak tümörlü hücrenin metabolik değişiklikleri Single Photon Emission Computation Tomography (SPECT) (tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi), Positron Emission Tomography (PET) (pozitron emisyon tomografi) ile saptanabilmektedir. Apoptosis hücrelerin programlı hücre ölümünün gerçekleştiği, enerji bağımlı bir mekanizma ve aktif bir süreçtir. Apoptosis sırasında meydana gelen biyokimyasal ve fizyolojik süreçler, beyin, akciğer, meme tümörlerinde ve diğer tümörlü dokularda standart, klinik ve invaziv olmayan görüntüleme modelleriyle oluşan bilgilerle tanımlanır (Cohen JJ., 1998). Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadırlar ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir (Elmore S., 2007).

Hücrenin DNA'sında meydana gelen hasarlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlar onarılmadığında apoptosis indüklenmektedir. Bu nedenle apoptosis organizmada doğru işlemelidir. Hızlanmış, yavaşlamış veya olmaması gerekirken değişen apoptosis organizma için tehlike taşır. Artmış apoptosis sonucunda, AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip 2 diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokardiyal enfarktüs meydana gelir. Yavaşlamış apoptosis varlığında ise otoimmün hastalıklar ve kanser oluşur. Kanser

tedavisinde, çoğu yeni ilaç apoptosisi arttırmaya yönelik üretilmektedir. Son zamanlara kadar apoptosiz biyopsi materyallerinin histolojik deneyleriyle veya in vitro olarak değerlendirilebilmektedir ve terapinin etkinliğinin geliştirilmesinde katkısı çoktur. Nükleer tıpta kullanılan apoptosiz görüntüleme çalışmaları; apoptosiz sırasında plazma membranının iç kısmında bulunan negatif yüklü fosfotidilserin (PtdS) ve fosfotidiletanolamin (PtdE) moleküllerinin hücre dışına çıkmasıyla bu moleküle ilgisi olan protein vb. yapılar radyoişaretlenerek bunun daha etkili bir şekilde olabileceği düşünölmektedir.

Bunun yanı sıra rutinde kullanılan bazı  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretli kitlerin tümör görüntüleme potansiyellerinden yararlanarak apoptosiz görüntüleme için kullanılabilme potansiyelleri değerlendirilmesi yapılmaktadır.  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat'ın akciğer tümör görüntülemede kullanılabileceğine dair çalışmalarda bulunmaktadır. Bu çalışmada,  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat'ın apoptosizi görüntülemede potansiyelini değerlendirmek amacıyla akciğer kanserli hücrelerde kemoterapi ilacı olan Cisplatin kullanılarak apoptosiz oluşturulan hücreler üzerinde  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat tutulumu incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri yirminci yüzyılın gerçek epidemisi gibi görünmektedir. Birçok ülkede kadın ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir ve tüm kanser ölümlerinin % 28'ine neden olmaktadır (Ernster VL.et al.,1994). Akciğer kanseri erkeklerdeki malignitelerin %22'sini, kadınlardaki malignitelerin %10'unu oluşturmaktadır (Borring C.C. et al., 1992).

Akciğer kanserine tanılanması, akciğerdeki lezyonun malign ya da benign olduğunun ayırt edilmesi, malign hastalığın doğru evrelendirilmesi ve tedaviye alınan yanıtın değerlendirilmesi gerekmektedir. Elde edilen bilgiler daha etkin moleküler tanı araçlarının ve yeni tedavi olanaklarının ortaya çıkmasını sağlayacaktır. Nükleer tıp yöntemleriyle, radyonüklidlerle işaretlenmiş bileşikler kullanılarak kanserli hücrelerin genetik yapısı ve bu genetik yapıyla ilişkili biyokimyasal ürünler ve işlevler görüntülenebilmektedir (Ünlü ve Akdemir, 2003). Bu bileşiklerin düşük konsantrasyonlarda kullanımı ile görüntülemenin gerçekleştirilebilmesi sintigrafik yöntemlerin temel avantajını oluşturmaktadır. Yüksek enerjili radyonüklidlerle işaretlenerek bu bileşikler tedavi amacıyla da kullanılabilir.  $^{201}\text{Tl}$  ve  $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ , PET ile görüntüleme olanağının bulunmadığı durumlarda; benign-malign tümörlerin ayırımında ve tümörün malignite derecesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Tümör görüntülemesinde en çok kullanılan PET ajanı  $^{18}\text{FDG}$ , kanserli dokuda metabolizmasına ve yüksek glikoliz hızına bağlı olarak artan tutulum göstererek akciğer nodüllerinin ve kitlelerinin benign-malign ayırımını gerçekleştirilmesinde, metastaz yönünden tüm vücudun değerlendirilmesinde ve tedavi sonrası izlemede kullanılmaktadır.  $^{18}\text{FDG}$ ; PET sonucu %40 oranında klinik evrelendirme kararında ve tedavi modalitesi tercihinde değişikliğe neden olmaktadır (Ünlü ve Akdemir, 2003).

Nükleer tıpta çok sayıda radyofarmasötik tümör görüntüleme amacıyla denenmiştir. Akciğer kanserinin moleküler biyolojik özelliklerinin görüntülenmesini sağlayan nükleer tıp yöntemlerini bir tablo ile özetlersek;

**Çizelge 2.1** Nükleer tıpta akciğer kanserinin tanısında, izleminde ve tedavisinde kullanılan başlıca radyoaktif işaretli bileşikler (Ünlü ve Akdemir, 2003)

Grubu	Kullanılan Ajan	Kullanım Alanı	Görüntüleme Yöntemi	Tedavi Amaçlı Kullanım
Preefüzyon ajanları	Tl-201	tanı, tedavi sonrası izlem	SPECT	...
	Tc-99 MIBI	tanı, tedavi sonrası izlem, kemoterapi direnci	SPECT	...
Tümör Metabolizması	F-18 FDG	tanı, tedavi sonrası izlem	PET	...
İşaretli monoklonal antikorlar (Moab)	Anti-EGFR	tanı	SPECT	...
	Anti-CEA	tanı, tedavi sonrası izlem	SPECT	...
	ANTI-G(D2)	Tanı	SPECT	...
İşaretli peptitler	Octreotide, Iantreotid, depreotide	tanı, octreotide tedavisi öncesi değerlendirme	SPECT	EVET
Hüresel çoğalma	Metionin	tanı, tedavi sonrası izlem	PET	...
	Asetat	tanı, tedavi sonrası izlem	PET	...
	Timidin	tanı, pronozun belirlenmesi, tedavi sonrası izlem	PET	...
Anjiogenez	Anti-VEGF Moab	tedavi öncesi ve sonrası değerlendirme	SPECT, PET	...
Apoptosis	Annexin-V	tedaviye yanıtın değerlendirilmesi	SPECT	...
Hipoksi	FMISO	tedavi öncesi ve sonrası değerlendirme	PET	...
	ATSM	tedavi öncesi ve sonrası değerlendirme	PET	...
Gen Aktarımı	Herpes simpleks timidin kinaz geni	gen aktarımının başarısını değerlendirme	PET	EVET
	Dopamin (D2) reseptörü (SSTR) geni	gen aktarımının başarısını değerlendirme	PET	...

## 2.2 Kemoterapi ve Kemoterapi Ajanları

Kemoterapi ilaçla tedavi demektir. Bu tedavi ile vücutta bulunan istenmeyen hücrelerin öldürülmesi planlanır. Kemoterapi ilaçları bazen tek bazen

birkaç ilacın bir arada olduğu kürler şeklinde uygulanır. Her hastanın kemoterapi protokolü diğ erinden farklıdır ve hastaya özeldir.

Kemoterapi ilaçları kan yoluyla etki eder. Kemoterapi ilaçları zararlı hücreleri öldürürken normal hücrelere de zarar verebilir. Bu da yan etkilere yol açar. Kemoterapi ilaçları hızlı bölünen hücreleri etkiler (saç, mide-barsak sistemi, kemik iliğ i). Ancak etkilenme kiş iden kiş iye farklılık gösterebilir.

Tümörün cinsine ve hastanın özelliklerine göre değ işik nedenlerle kemoterapi uygulanabilir:

- Tümörün yayılmasını engellemek için,
- Tümörün büyümesini durdurmak veya yavaşlatmak için,
- Tümörün sebep olduğu belirtileri yok etmek için
- Tümörü tamamen yok etmek ve hastayı iyileştirmek için, kemoterapi uygulanır.

Bazı tümörlerde tek tedavi yöntemi kemoterapidir. Bazılarında ise kemoterapi cerrahi ve radyoterapi tedavileriyle peşpeşe veya eş zamanlı olarak uygulanabilir. Örneğ in ameliyat öncesinde tümörü küçültmek amacıyla, veya ameliyattan sonra yayılmasını önlemek için kemoterapi yapılabilir (Tıbbi Onkoloji Derneğ i, 2010).

Kemoterapide kullanılan ilaçların bir kısmı tümöre doğ rudan etkili biyolojik ajanlardır. Bazı ilaçlar ise tümöre doğ rudan etkili ilaçların yan etkilerini azaltmak veya yok etmek amacıyla kullanılır. En çok kullanılan kemoterapi ilaçlarından bazılarını şöyle sıralayabiliriz:

**Cisplatin:** Akciğ er kanseri (küçük hücreli ve küçük hücreli dışı), mesane kanseri, over kanseri, germ hücreli kanserlerin tedavisinde kullanılır. Ağır metal alkilleyicidir. Cisplatinin kesin etki mekanizması bilinmemekle birlikte çift fonksiyonlu alkilleyici ajanlara benzer şekilde DNA'da zincirler arası ve zincir iç i çapraz bağ lar oluşturarak etki yaptığ u tahmin edilmektedir, RNA üzerinde de kısıtlı etkisi vardır.

**Paklitaksel:** Meme, over, akciğ er kanseri ve kaposi sarkomu tedavisinde kullanılır. Uygulaması damar yoluyla'dır. Hissizlik, karıncalanma ve acıyla ortaya

çıkan nöropati (sinir hasarı) görülebilen yan etkileridir. Nöropati ilacın kullanımı kesildiğinde geri dönebilmektedir.

**Etaposid:** Uygulaması damar yoluyla yapılır. İlaç çok hızlı verildiği takdirde şiddetli hipotansiyon (düşük kan basıncı) ortaya çıkabilmektedir. Etoposid aynı zamanda ağız yoluyla da verilebilmektedir. Akciğer kanseri tedavisinde kullanılır. Başlıca yan etkisi kemik iliği baskılanmasıdır (Tıbbi Onkoloji Derneği, 2010).

### 2.3 Apoptosis Nedir?

Apoptosis; gelişim, dokularda hücre popülasyonunun korunması ve yaşlanma gibi hemostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla fizyolojik olarak meydana gelen, bunun yanında hücrelerin hastalık veya zararlı ajanlar tarafından zarar görmesi halinde yada immun reaksiyonlarda koruyucu bir mekanizmadır (Barai S. et al., 2008; Tesarik J. et al., 1998; Bardakçı F., 2007). Ayrıca apoptosis yaşlanan, fonksiyonlarını yitiren, fazla üretilen, düzensiz gelişen ve genetik olarak hasarlı hücrelerin organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümü olarak tanımlanabilir. Hücre ölümleri fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (physiological cell death) olarak da adlandırılır (Bellamy et al., 1995; Jochen, 1993; Schwartzman and Cidloski, 1993).

Canlının başarılı bir organ gelişimini sağlayabilmesi, embriyonik gelişme sırasında gerçekleşen hücre ölümlerine bağlıdır (Mojno and Joris, 1995; Pınarbaşı F., 2007). Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda bir denge halindedir (Barai S. et al., 2008). Çok hücreli organizmaların yaşamlarını sağlıklı bir şekilde devam ettirebilmeleri hücre bölünmesiyle artan hücre sayısı hücre ölümleriyle dengelenmesine bağlıdır. Eğer bir organizmada bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, hücre içi haberci sistemleri aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır. Bu intihar süreci Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptosis ya da programlı hücre ölümüyle gerçekleşir (Cummings M C. et al., 1997; Mak and The, 2003; Pınarbaşı F., 2007).

Apoptosis tanımının tarihine bakarsak, hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak Vogt tarafından 1842 yılında tanımlanmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (Yılmaz İ., 2005). Apoptosis 1885’de Flemming tarafından gözlenmiş ve bu durum kromatolizis (chromatolizis) olarak isimlendirilmiştir. Glücksman 1950’de, embriyodaki fizyolojik hücre ölümünü kromatolizise dayandırmıştır. Hücre nükleusunun ve sitoplâzmanın sıvı kaybıyla küçüldüğünü, nükleusun indirgenip ortadan kaybolduğunu ve sonrasında dejenere olan hücrenin komşusu tarafından fagosite edildiğini belirtmiştir. 1950’lerin sonlarına doğru DeDuve lizozomlardan kaynaklanan hücre intiharı fikrini ortaya atmıştır. 1960’larda ise hücresel organellere zarar verebilen serbest radikallerin hücre intiharının belirmesinde rol oynadığını belirtmiştir. 1984’de Wyllie ilk kez apoptosis terimini kullanmıştır. Spesifik biyokimyasal markerlar ekleyerek apoptotik hücrelerin farklı morfolojik değişimlerini gözlemiştir. Bununla birlikte apoptosisle ilgili araştırmalar artmıştır (Yalınay M.A., İmir T., 1995).

#### 2.4 Apoptosisin Belli Aşamaları

- Apoptosisin indüklenmesi
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması
- Sitokrom c’nin salıverilmesi
- Apoptozom oluşumu (sitokrom c+Apaf-1 +kaspaz-9)
- Mitokondriyal transmembran potansiyelin değişmesi
- Kaspazların aktivasyonu
- Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması
- DNaz’ın aktivasyonu sonucu DNA’nın fragmentasyonu
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptosise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi (Öniz H., 2004).

Apoptosis, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)’in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi sonucu

indüklenir. Apoptos genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptosisi başlatır. Ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptos başlatabilir. Apoptos ayrıca reaktif oksijen radikallerinin hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir. Apoptos büyüme faktörlerinin ortamdaki eksilmesiyle de başlatılabilir. Apoptosu başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salıverilen granzim B'lerin hedef hücrede kaspaz sistemini aktifleştirmesidir (Öniz H., 2004).

Apoptosun mekanizmasında üç temel grup rol alır:

- 1- Ölüm reseptörleri: TNF (Tümör Necrozis Factor) reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri ölüm alanı adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar.
- 2- Adaptör proteinler: Reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler ve kaspazlar aktive olan DNAz aracılığı ile DNA yıkımına neden olurlar.
- 3- Proteolitik enzimler (kaspazlar): Sistein proteaz ailesindedir. Aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplâzmada inaktif olarak bulunur. Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden keser, bu nedenle c-asp-ases adını almışlardır (Nicholson and Thornberry, 2003).

Mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteini olan Sitokrom c, apoptos sürecinin merkezi konumundadır. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplâzmaya salıverilmesi geri dönüşü olmayan bir döneme girildiğini işaret eder.

Apoptosun düzenleyicileri; iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53), organeller (mitokondri)'dir. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre

iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Plazma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünölen seramid, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Bcl-2 ailesi ise mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktördür. Hem proapoptotik hem de antiapoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle sitokrom c'nin sitoplâzmaya geçişi gerçekleşir baskılanır (Piret J. et al., 2004).

## **2.5 Apoptosisin Morfolojik İşaretleri**

Hücrede apoptosise neden olacak olaylar meydana geldiğinde örneğin DNA herhangi bir şekilde zarar gördüğünde apoptotik süreç başlar. Enerji gerektiren aktif işlemlerle zarar gören hücre ölüm yolunu seçer.

### **2.5.1 Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler**

Apoptotik hücrede gözlenen morfolojik değişiklikler şunlardır;

#### **2.5.1.1 Yüzey Organellerinin Kaybı**

Apoptosise uğrayan hücreler komşu hücrelerden ayrılır ve hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (Balakumran A. et al.,1996; Lee D. et al., 2000) (Şekil 2.1).

#### **2.5.1.2 Hücre Büzülmesi**

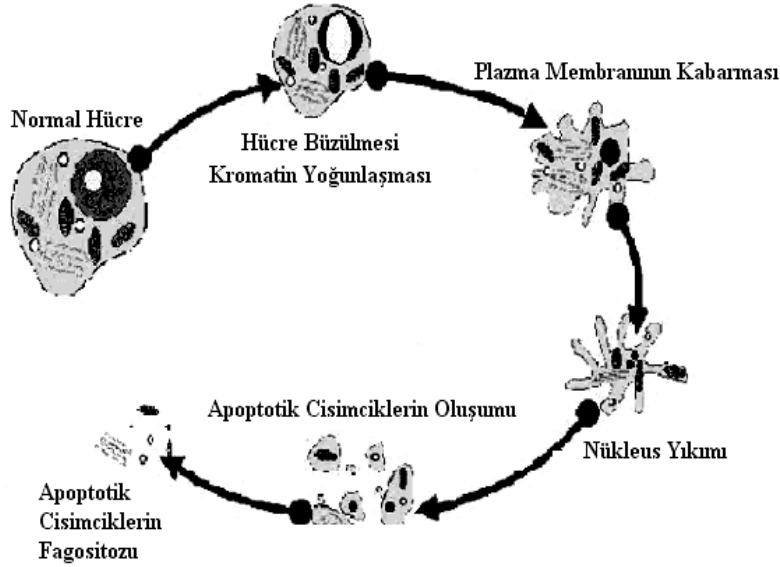
Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçüktür. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organellerinin yapıları korunur (Cohen J. 1993). Sitoplâzma yoğunluğu artar. Hücre zarı parçalanmaz bu nedenle nekrozda görölen inflamatuvar reaksiyon gözlenmemektedir. (Balakumran A.et al., 1996; Lee D.et al., 2000; Cohen J., 1993) (Şekil 2.1).

#### **2.5.1.3 Kromatin Yoğunlaşması**

Önemli yapısal değişiklik çekirdekten başlar. Çekirdek apoptosisin odak noktasıdır. Genellikle çekirdek büzüşür (Balakumran A.et al., 1996; Cohen J., 1993). Çekirdek şekli düzensizleşerek küçük çekirdek parçalarına bölünür. Apoptosiste kromatin yoğunlaşarak parçalar halinde bir araya toplanır (Balakumran A. et al., 1996; Lee D.et al., 2000; Cohen J., 1993) (Şekil 2.1).

### 2.5.1.4 Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması

Hücrede yüze doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve zarla kaplı küçük organellerden oluşan apoptotik cisimciklere dönüşür (Balakumran A.et al., 1996; Cohen J., 1993). Apoptosis sırasında sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfolipidlerin plazma membranının dış yüzüne çıkar ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (Lu J., 2000) (Şekil 2.1).

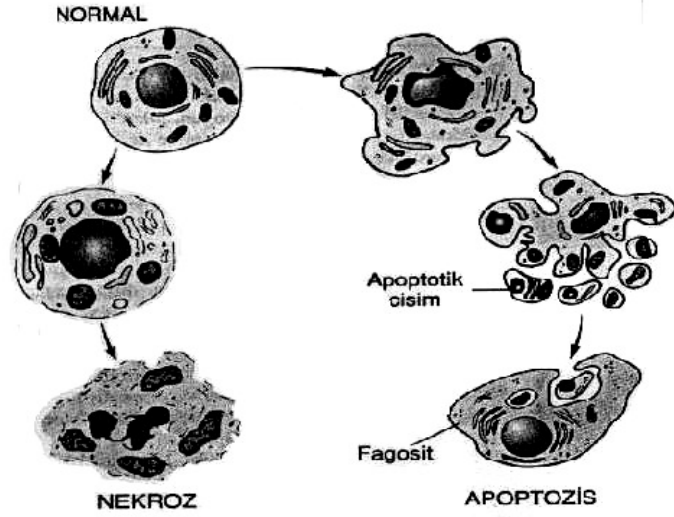


Şekil 2.1 Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

### **2.5.2 Apoptosis ile Nekrozis Arasındaki Farklar**

Hücre ölümü ya apoptosis veya nekroz ile olur. Apoptosis temelinde genetik mekanizma yatar. Apoptosis tipik morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Apoptotik hücreler küçülür, kromatin yoğunlaşır. Genomik DNA'nın (deoksiribonükleik asit) internükleozomal fragmentasyonu son yıllarda apoptosisin en belirgin biyokimyasal işareti olarak düşünülmektedir. Tüm bu özelliklerin oluşumu enerjiye bağımlıdır. Bundan dolayı apoptosis enerjiye bağımlı işlemlerle hücreyi ölüme sürükler (Antar V., 2005). Hücrelerin diğer bir ölüm şekli de **nekrozis**dir. Nekrozis, patolojik olaylar sonucu gelişen hücre ölüm şeklidir. Nekroziste organeller şişer, hücrenin bütünlüğü kimyasal ve yapısal olarak bozulur. Nekroz dışardan gelen hasarla plazma membranında oluşan değişiklikler

sonucu oluşur. Nekrotik hücrede meydana gelen şişme ve plazma membranının yırtılması sonucunda sitoplazmik içerik doku aralığına salınır. Hücrenin nekrotik artıkları dokuya çekerek bu dokunun parçalanmasına yol açar ve bu inflamasyona neden olur. Hücre zedelenmesi sonucu hücrede gelişen geri dönüşü olmayan harabiyet meydana gelir ve hücrenin ölümüne neden olur (Antar V., 2005).



Şekil 2.2 Apoptosis ile Nekrozis Arasındaki Farklar

### 2.5.3 İnsan Organizmasında Apoptosisin İzlendiği Durumlar

- Apoptosis sinir sistemi ve immün sistemin gelişiminde önemli role sahiptir. Sinir sistemi gelişirken çok fazla sayıda nöron ve sinaps oluşmaktadır. Apoptosis ile aksonları hedeflerine ulaşmayan nöronlar ortadan kaldırılır ve nöronlarla hedef organlar arasındaki hatalar onarılır. İmmun sistemde ise, oluşan fazla hücreler ortadan kaldırılır ve bunların embriyoya zarar vermesi engellenir. Örneğin, el ve ayak parmaklarının arası başlangıçta kapalı iken parmaklar arasındaki hücrelerin apoptos ile yıkılması ile parmaklar birbirlerinden ayrılmaktadır. Embriyonun gelişmekte olan epidermisinin en üst sırasındaki bazı hücreler (periderm) de apoptosa giderek amnion sıvısına atılırlar.
- Apoptosis erişkinlerde hormon yetmezliğine bağlı olarak gelişen organ gerilemelerinde de rol almaktadır.
- Tümörlerin özellikle regresyona gittikleri dönemlerde apoptos görülür.

- T ve B lenfositler sitokin yetersizliğine bağlı olarak apoptosa gidebilirler.
- Çeşitli viral hastalıklarda apoptoz görülür.
- Isı, radyasyon, antikanser ilaçlar, hipoksi gibi hücrelerde hasar oluşturan çeşitli etkenler normalde nekroza neden olurken düşük dozlarda apoptosiste oluşturabilmektedir.
- Ayrıca, DNA meydana gelen hasarlar kanser gelişimine neden olabileceği için bu hasarlı hücrelerin apoptosis yoluyla ortadan kaldırılması önemlidir (Biyologlar Forumu, 2010).

## 2.6 Apoptosisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptosisi saptamak için çeşitli morfolojik ve biyokimyasal yöntemler geliştirilmiştir.

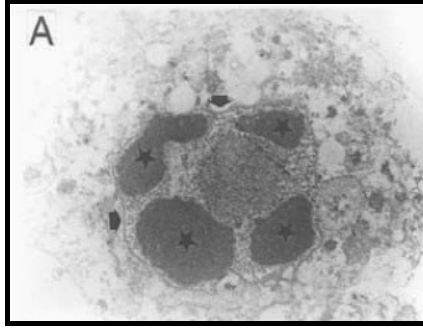
Apoptosisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler:

- 1- Morfolojik görüntüleme yöntemleri
- 2- İmmunohistokimyasal yöntemler
- 3- Biyokimyasal yöntemler
- 4- İmmunolojik yöntemler
- 5- Moleküler biyoloji yöntemleri' dir (Güleş ve Eren, 2005).

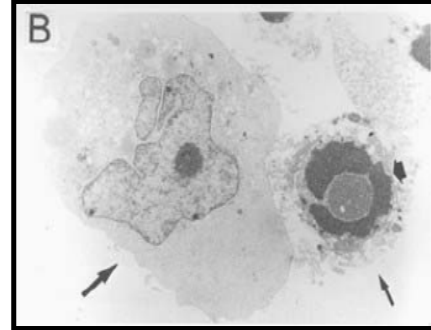
### 2.6.1 Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

**Işık mikroskopisinde** Hematoksilen ve Giemsa boyama yöntemleri kullanılır. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metot olarak başlanabilir ve çeşitli açılardan (ilk değerlendirme, maliyet) diğer metotlara karşı avantaj sağlar (Güleş ve Eren, 2005).

**Elektron mikroskopisi** ile değerlendirme apoptosiste en değerli yöntem olarak kabul edilmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği bir yöntemdir. Üstelik mitokondrinin durumu, hücre zarı ve nükleus zarının bütünlüğü incelenebilir (Güleş ve Eren, 2005) (Şekil 3, Şekil 4).

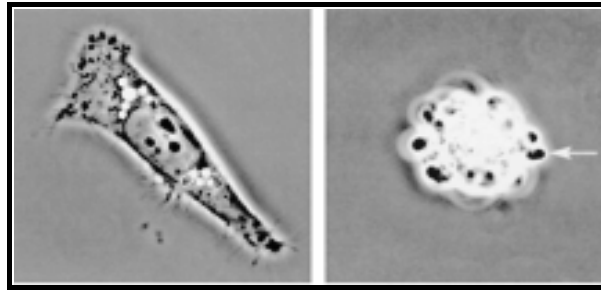


Şekil 2.3 Nükleus fragmentasyonu(A)



Şekil 2.4 Normal hücre- Apoptotik hücre

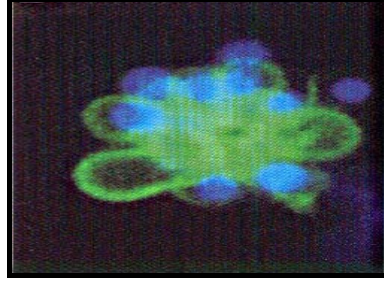
**Faz kontrast mikroskopisi** sadece hücrelerin kültür ortamında, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler (blebs) izlenebilir. (Güleş ve Eren, 2005).



Şekil 2.5 Normal Hücre – Oluşan Cepcikler(blebs)

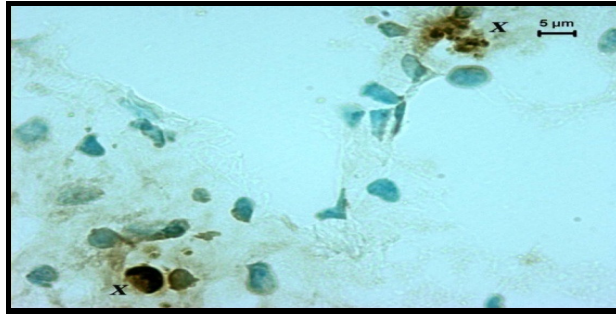
### 2.6.2 Histokimyasal yöntemler

**Annexin V** yönteminde, normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunan fosfatidilserin (PS) apoptotik hücrelerde, hücre zarının dış yüzüne transfer olmasından faydalanılmaktadır. Bu yer değiştirme apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Dış yüze transfer olan PS'ler, floresan bir madde ile işaretlenen Annexin V ile görünür hale getirilir. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur. Örneğin, FITC-Annexin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin ayrılabilmesi için ikinci boya olarak propidium iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (yeşil fluoresans) ve propidium iodide (kırmızı fluoresans) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler, erken apoptotik hücreler ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin birbirinden ayırt edilmesine olanak vermektedir (Kocksx M. et al., 1998; Tesarik J. et al.,1998) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Annexin V-FITC ile İzlenen Apoptotik Hücre

**TUNEL** (Terminal deoxynucleotidyl Transferase biotin – dUTP Nick End Labeling) yöntemi ile yapılan çalışmalarda testin sensitivitesi yüksektir. TUNEL yöntemi, parçalanmış DNA'nın 3-OH ucuna deoksinükleotidil transferaz (TdT)'in spesifik olarak bağlanması prensibine dayanmaktadır. TUNEL, apoptosise spesifik değildir; herhangi bir şekilde gerçekleşmiş olan hücre ölümü veya nekroz durumlarında da ortaya çıkan DNA kırıkları bu teknikle işaretlenebilir. Yine bu teknikle apoptosise uğrayan hücreler normal hücelere oranlanarak apoptosise oranı belirlenebilir (apoptotik indeks = AI). Kültürde çoğaltılan hücelerde, donmuş kesitlerde ve parafin bloklarda apoptosise tespitinde TUNEL yöntemi kullanılabilir (Küçükaltun S., 2007) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 TUNEL Yöntemi İle Gözlenen Karaciğer Dokusundaki Apoptotik Hüceler (X)

**Kaspaz-3 yöntemi** ile sadece apoptotik hücelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal metoduyla belirlenebilir (Güleş ve Eren, 2008).

### 2.6.3 Biyokimyasal yöntemler

**Agaroz jel elektroforezi**, DNA kırıklarının gösterilebildiği bir yöntemdir. Apoptosiste DNA, merdiven görüntüsü oluşturur. Bu apoptosise karesteristik

özelliğidir ve nekrozis de görülmez. O yüzden apoptosisi nekrozdan ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (Bardakçı F., 2007).

**Western blotting** yardımıyla apoptosise özgü bazı proteinlerin (bcl-2, kaspaz-3) aktivitelerinin saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriden çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metot ile saptanabilir.

**Flow sitometri** yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptosiste iç yüzden dış yüzeye transfer olan hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptosisin saptanmasında kullanışlıdır (Güleş ve Eren, 2008).

#### **2.6.4 İmmunolojik yöntemler**

**ELISA (Enzyme Linked İmmunosorbent Assay)** ile kültürü yapılmış hücre grupları ve insan plazmasında DNA fragmantasyonu bu yöntem ile tespit edilebilir. ELISA testi, viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonların tanısında ve apoptozun belirlenmesinde kullanılan serolojik tanı yöntemlerinden biridir. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir (Klein et al.,1981).

**Fluorimetrik yöntemde** kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir (Güleş ve Eren, 2008).

#### **2.6.5 Moleküler Biyoloji Yöntemleri**

**DNA microarray** çok yeni ve pahalı bir yöntemdir. Kısa bir süre içerisinde apoptosise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında bilgi edinebilme olanağı sağlar (Güleş ve Eren, 2008).

### **2.7 Apoptosisi Saptamada Kullanılan Görüntüleme Ajanları**

Tümör hücreleri, kompleks moleküller ile işaretlenmiş görüntüleme ajanları ile apoptosisin görüntülenmesi yoluyla *in vivo* ve *in vitro* olarak saptanabilmektedir. En çok kullanılan görüntüleme ajanları ve kompleks molekülleri şu şekilde sıralayabiliriz;

- $^{99m}\text{Tc}$  -Annexin V
- $^{123}\text{I}/^{125}\text{I}$ -Annexin V
- $^{123}\text{I}$ -rh-Annexin V
- $^{124}\text{I}$ -Annexin V
- $^{99m}\text{Tc}$ -N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-Annexin V
- $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Annexin V
- $^{99m}\text{Tc}$ -Duramycin
- $^{99m}\text{Tc}$ -Methoxyisobutylisonitrile (MIBI)
- $^{99m}\text{Tc}$ -Glukarat

- **$^{99m}\text{Tc}$  ile işaretli Annexin V**

Tümörlerin tedavisine alınan apoptotik yanıtın değerlendirilmesi ile ilgili, Belhocine et. al. 2002'de gerçekleştirdiği çalışmada, farklı kanser tiplerinde (akciğer n=10; lenfoma n=3; meme n=2) kemoterapinin neden olduğu apoptosisi görüntülemek için  $^{99m}\text{Tc}$ -Annexin V ile hastanın tümör bölgelerinde Annexin V tutulumu gözlemlendiği, bu hastaların tedaviye tam (n=4) veya kısmi (n=3) yanıt verdikleri bildirilmiştir (Belhocine T.et al, 2002; Mochizuki T.et al., 2003).

- **$^{123}\text{I}/^{125}\text{I}$ -Annexin V**

In vivo ve in vitro çalışmalarda kullanılmaktadır. İyotlanmış Annexin V ile, in vitro çalışmaların çoğu eritrositlerle, in vivo olarak ovaryum kanser hücrelerinde denenmiştir. Tümör dokularında tutulumun arttığı gözlenmiştir. Apoptosis saptanmıştır (Fait and Gibson, 1994; Rao et al., 1992).

- **$^{123}\text{I}$ -rh-Annexin V**

Kan kompartmanlarına hızla giriş yapmasıyla ve sıçanlarda, karaciğer, mide ve bağırsak sisteminde yüksek tutulumuyla karakterize edilmektedir.  $^{123}\text{I}$ -rh (recombinant human) - Annexin V ile yapılan çalışma sonucunda, miyokardiyal apoptotik dokuyu ayırt etmişlerdir (Lahorte et al.,2003).

- **$^{124}\text{I}$ -Annexin V**

Keen ve arkadaşları tarafından geliştirilen çalışmada, Annexin V, iyodojen metoduyla  $^{124}\text{I}$  ile işaretlenerek sıçanlarda in vivo apoptosisi görüntülenmesi

gerçekleştirilmiştir.  $^{124}\text{I}$ -Annexin V'in iyi in vivo stabilizasyonu ile kaliteli görüntü elde edilmiştir (Keen et al., 2003).

- **$^{99\text{m}}\text{Tc-N}_2\text{S}_2$ -Annexin V**

Kemoterapi ve radyoterapi sonrası akciğer, meme kanserli ve lenfoma tümörlü hastalardaki apoptosisin bu radyoligand ile incelenebileceği gösterilmiştir. Bu bileşik ile akciğer ve meme kanserli hastalarda kemoterapi ile indüklenmiş apoptosis dedeksiyonu, biyodağılım ve dozimetri çalışmalarında, platin bazlı kemoterapi alan akciğer kanserli hastalarda, kemoterapi alan foliküler lenfoid tümörlü hastalarda çalışmalar yapılmıştır (Hafstra et al., 2001; Haas et al., 2003).

- **$^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC}$ -Annexin V**

K. Ohtsuki ve arkadaşları tarafından 1999'da yapılan biyodağılım çalışması sonucunda  $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC}$ -Annexin V'in membran dışına çıkan fosfodilserine yüksek affinite gösterdiği ve  $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC}$ -Annexin V'nin apoptotik hücrelerin miktarı ve dedeksiyonu için direkt belirleyici olduğu gösterilmiştir.  $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC}$ -Annexin V ile; biyodağılım ve dozimetri çalışmalarında, kemoterapi alan foliküler lenfoid tümörlü hastalarda, baş ve boyun kanser hastalarında, intrakardiyak tümörler ve kalp içi zarı intihabında, akut miyokardiyal enfaktüste, platin bazlı kemoterapi alan akciğer kanserli hastalarda, iskemik durumlarda indüklenen apoptosiste çalışılmıştır (Ohtsuki et. al., 1999)

- **$^{99\text{m}}\text{Tc-Duramycin}$**

$^{99\text{m}}\text{Tc-Duramycin}$  de apoptotik hücreleri ayırmada başarılıdır. Fosfotiletanomil (PtdE) ikinci önemli fosfolipiddir. Apoptosiste, PtdE'nin fosfodilserin gibi hücre yüzeyine çıkması ve regülör rol oynaması dikkate alınarak  $^{99\text{m}}\text{Tc-Duramycin}$  PtdE molekül probu olarak kullanılmış, bu şekilde apoptosis görüntülenmesi direk olarak incelenmiştir (Zhao M. et al., 2008).

- **$^{99\text{m}}\text{Tc-Hegzakismetoksiisobutilisonitril (MIBI)}$**

Katyonik ve lipofilik bir madde olan  $^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$ 'nin, hücre içine girdiği ve mitokondri ile sitoplâzma biriktiği gözlenmektedir. Tümör hücrelerinde

artan metabolik ihtiyaç nedeniyle  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI birikimi daha fazladır. Rutinde miyokardiyal perfüzyon görüntülenmesi için kullanılmaktadır. Meme kanseri görüntülenmesi ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Zhu X. Et al., 2002).

Aktolun ve arkadaşları (1994) ile Gümüşer G. (1997) akciğer kanserli hasta ile yaptıkları çalışmalarda  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI'nin yüksek duyarlılıkta olduğunu saptamışlardır (Aktolun C., 1994 ve Gümüşer G., 1997).

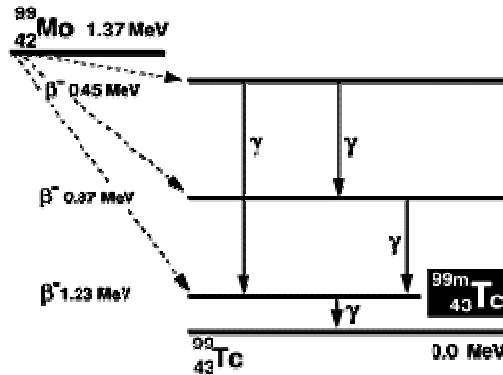
Kothan ve arkadaşları tarafından 2003'te yapılan çalışmada, meme kanserli hastalardaki apoptotik sürecin izlenmesinde  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI kullanılmıştır. Anti-kanser ilaçlarının tedavisinden sonra meme kanser hücrelerindeki  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI tutulumunun zamana ve doza bağlı olarak azaldığı tespit edilmiş, TUNEL yöntemiyle de gözlemlenmiştir (Kothan S. et.al., 2003).

- **$^{99m}\text{Tc}$ -Glukarat**

Babbar ve Sharma 2003'te  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukarat ile hayvan modellerinde miyokardiyal enfaktüste çalışmalar yapılmıştır. Bunun sonucunda,  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukarat'ın kandan hızlıca temizlenerek, böbreklerden atıldığı, DNA'nın fosfatına bağlanma yoluyla, miyokardiyal dokudaki hasarlı bölgede apoptosisin saptanabileceği gösterilmiştir (Babbar A.K. and Sharma R.K., 2003).

## 2.8 Teknesyum-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) Kimyası

Tc atom numarası 43 olan VIIB grubu metaldir. Doğal stabil izotopu yoktur.  $^{99}\text{Tc}$  yarı ömrü  $2,1 \times 10^5$  yıl,  $^{99m}\text{Tc}$  6,02 saat yarı ömre sahiptir ve  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  jeneratöründen perteknat formunda elde edilir (Şekil 2.8).

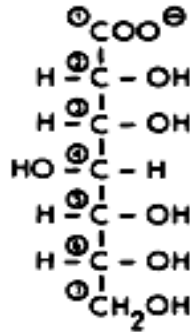


**Şekil 2.8**  $^{99}\text{Mo}$ 'un  $^{99}\text{Tc}$ 'a bozunması

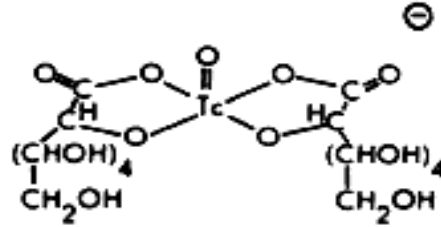
-1 ile +7 arasında sekiz oksidasyon durumu vardır. Tc +7 ve +4 değerliği en stabil hali olup oksidi, sülfidi, halidi ve perteknat bulunur. Düşük oksidasyon durumları -1, +1, +2 ve +3 değerleride normalde stabildir. +7 değerli diğer bileşiklerle direk olarak birleşmez. Bunu için daha alt oksidasyon düzeylerine indirgenmelidir. Çeşitli indirgen ajanlar; kalay klorür, kalay sitrat, kalay tartarat, konsantre HCl, sodyum borhidrit, ditionit, demir sülfat vb bu amaçla kullanılmaktadır (Monrol, 2010).

**2.9  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat (Gluseptat)**

Glukoheptonat yedi karbonlu karboksilik asittir (Şekil 2.9). Kiti sodyum gluseptat veya kalsiyum kalay+kalay klorid'in azot atmosferde liyofilize karışımını içerir.  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat perteknetat eklenip oda ısısında 15 dk karıştırılarak hazırlanır. Bağlanım yüzdesi % 95'den fazladır. Bağlanımdan 6 saat sonrada stabil kalabilir. İntravenöz verildikten sonra yaklaşık %50'si gevşek olarak plazma proteinlerine bağlanır. Kandan hızlı temizlenir. Böbreklerden değişmeden atılır. Biyolojik atılım yarı ömrü 24 saattir (Karaca E., 2010).



**Şekil 2.9** Glukoheptonat



**Şekil 2.10**  $^{99m}\text{Tc}$ - Glukoheptonat

$^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat; akciğer, meme, böbrek tümörlerinde tutulum gösterir. Bu radyoişaretili molekülün; fibroblasts, seçici lenfositler gibi hücrelerdeki intihaplı lezyonlarda tutulması ve pek çok metastatik lezyonları görüntüleme yüksek ayırma gücüne sahip olduğu belirlenmiştir.  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat'ın, akciğer kanserli dokunun görüntülenmesinde yüksek

duyarlılığa sahip olduğu bulunmuştur. Akciğer kanserinde, kötü huylu tümördeki  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat tutulumu ile normal akciğer dokusu ve iyi huylu tümör dokusundaki tutunum minimal düzeyde de olsa farklılık gösterir. Bu ayırım  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat ajanı için iyi bir başarıdır. Ayrıca  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat medulloplastlardaki beyin tümörünün fonksiyonel değerlendirmesi için ideal SPECT ajanıdır (Karaca E., 2010).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

##### 3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

- Sodyum Glukoheptonat (Sigma)
- Sodyum perteknetat ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) (E.Ü.Tıp Fak. Nükleer Tıp A.B.D.)
- Kalay klorür dihidrat ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck)
- Serum Fizyolojik (SF) (% 0.9 NaCl çözeltisi)
- TLC-SG (Merck 105554)
- Asit Sitrat Dekstroz (ACD) (Eczacıbaşı-Baxter)
- Tripsin (Biological Industries)
- Aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) (Merck)
- Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) (Merck)
- Amonyak (Merck)
- Diklorometan (Merck)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Biological Industries)
- RPMI 1640 (Biological Industries)
- Fötal Bovin Serum (FBS),
- DMEM-12(HAM)1:1 (Biological Industries)
- Propidium İyodür (PI),
- Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS),
- % 0,2 Triton-X Çözeltisi,
- Fiksatif (3:1 oranındaki metanol: asetik asit),
- DNase I tamponu (40 mM Tris-HCl (pH:7,9), 10mM NaCl, 6mM  $\text{CaCl}_2$ , 10mM  $\text{CaCl}_2$ ).
- Cell Proliferation Kit (Biological Industries)
- Annexin V-EGFP Kit (BioVision)
- DeadEnd Fluorometrik TUNEL Kit (Promega)
- Bradford Protein Analiz Kiti (Fermentes)
- Steril kültür kapları (flask) (Corning)
- Çok kuyucuklu plateler (Corning)

### 3.1.2 Kullanılan cihazlar

- RAD-501 Cd(Te) Tek Kanallı Sayım Sistemi (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC Scanner Cihazı (Bioscan AR-2000) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Santrifüj Cihazı (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı; Tıp Fakültesi, E. Ü. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı),
- İverted Mikroskobu (Olympus, Japan) (E. Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- ELISA Cihazı (Spektrofotometre) (Thermo) (E. Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- İnkübatör (E. Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı),
- Floresan Mikroskop (Olympus, Japan) (E. Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- Işık mikroskobu (Olympus, Japan) (E. Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- CO2'li inkübatör (Thermo, US) (E. Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- Laminar Air Flow (Heraeus) (E. Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- Otomatik mikropipetler (Eppendorf) (E. Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)
- Doz kalibratörü (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

#### Çalışmamızın aşamaları;

- Görüntüleme ajanlarından  $^{99m}\text{Tc}$  ile Glukoheptonat işaretlenmesi
- A549 akciğer kanser hücre hattının dondurulması ve çözülmesi

- A549 akciğer kanser hücre hattının çoğaltılarak platelelere ekilmesi, pasajlanması
- Deneyin kurulması, A549 akciğer tümör hücreleri kemoterapi ajanının (Cisplatin) farklı konantrasyonlarına (5–50  $\mu\text{M}$ ) maruz bırakılan tedavi grubu ve kemoterapik ajana maruz bırakılmayan kontrol grubu olmak üzere iki farklı grup oluşturulması
- Annexin V ve TUNEL yöntemleri ile in vitro olarak apoptotik hücre sayısı tespit edilmesi
- Cisplatin'e maruz bırakılmış hücrelerde oluşan apoptosun  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ile işaretlediğimiz Glukoheptonat tutulumu ile değerlendirilmesi.

### **3.2 Radyo İnce Tabaka Kromatografi (RTLC) Yöntemi Kullanılarak $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile Glukoheptonat'ın İşaretlenmesi**

1 mg Glukoheptonat 1mL deiyonize suda çözöldü. 1 mg kalay klorür 1 mL deiyonize suda çözölererek hazırlandı ve 100  $\mu\text{L}$   $\text{SnCl}_2$ , Glukoheptonat çözeltisine eklendi. 1 mCi  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ile işaretlendi. 25 dakika inkübasyon için bekletildi.

TLC için silikajelle kaplı, kalınlıkları 0.1 mm olan 20 x 20 cm boyutlarındaki alimünyum tabakalar kullanıldı ve bu tabakalar 1.5 x 10 cm'lik şeritler halinde kesildi. Hazırlanan TLC şeritlerin 0.5 cm yukarısına kapiler yardımıyla örnekten bir damla damlatıldı. TLC tanklarında hazırlanan SF ve ACD banyolarında yürütöldü. Çözücünün TLC şeridin sonuna yakın yerine kadar ilerlemesinden sonra şeritler tank içerisinden çıkartılıp oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan TLC örnekleri Şekil 3.1'de görölen TLC Scanner cihazı (Bioscan 2000) (E. Ü. Nökleer Bilimler Enstitüsü, Nökleer Uygulamalar Anabilim Dalı) ile tarandı,  $R_f$  değerleri saptandı.



Şekil 3.1 TLC Scanner cihazı (Bioscan 2000)

### 3.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü yöntemin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların in-vitro koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Tüp, şişe gibi laboratuvar gereçlerinde uygun besleyici sıvıların içinde üretilir.

#### 3.3.1 Hücre Dondurma/Stoklama

- 1- Hücre ortamları döküldü, hücreleri kaldırmak için 4 mL tripsin eklendi. 5 dakika inkübasyon için 37 °C’de bekletildi.
- 2- 5 dakika sonunda flaska hızlıca vurularak flask içindeki hücrelerin hareketlenmesi sağlandı.
- 3- Eklenen tripsin miktarının iki katı olacak şekilde serumlu ortamdan eklenerek falcon tüpe aktarıldı. 1200 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi.
- 4- Fötal Bovin Serum (FBS) / DMSO (9/1) hazırlandı.
- 5- Üst kısımdaki süpernatant atıldı ve cryo tüplerle birlikte buz içerisine alındı. 750 µL (FBS) / DMSO eklenerek resüspanse edildi ve -86 °C’de bekletildi.

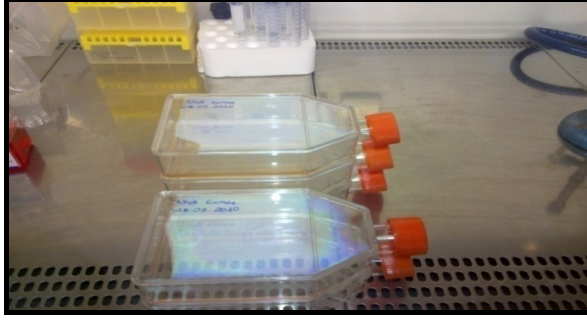
#### 3.3.2 Hücre Çözme

- 1- Çözeceğimiz hücre paleti -86 °C’den 37 °C’ye alındı.
- 2- Cryo tüpteki hücreler üzerine serumsuz besi ortamı (RPMI-1640) konuldu. Cam pipetle iyice karışımı sağlandı.
- 3- Sonrasında falcon tüpe aktarılarak üzerine besi ortamı (DMEM-12 (HAM) 1:1) eklendi ve 10 dakika 2500 rpm’de santrifüjlendi.

- 4- Üst kısımda kalan supernatant atıldı, altta kalan hücreler pıtpıtlanarak üzerine tekrar 15 mL besi ortamı eklendi. Tekrar 10 dakika 2500 rpm'de santrifüjlendi.
- 5- Üstteki kısım döküldü. 5 mL besi ortamı konularak 75 cm<sup>2</sup> flasklara ekim yapıldı.
- 6- Flasklar, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'li 37 °C'de etüve kaldırıldı.
- 7- Sağlıklı üremeyi sağlamak için flasklar belli aralıklarla kontrol edildi, eski besi yerleri döküldü ortam değişikliği ve pasajlama yapıldı.

### 3.3.3 Pasajlama

- 1- Mikroskopla flasklardaki hücrelerin (Şekil 3.2) sıklığı değerlendirildi.
- 2- 75'lik flask için hücrelerimizi kaldırmak amacıyla 4 cc tripsin eklendi. 5 dakika inkübasyon için 37 °C 'de bekletildi.
- 3- Beş dakika sonunda hücrelerimizi kaldırmak için flaskın tabanına hızlıca vuruldu. Mikroskopla hücrelerin serbest olup olmadığı kontrol edildi.
- 4- Serumlu besi yerinden (RPMI1640; DMEM; DMEM / F12 1:1) 75'lik flasklara 8 mL eklendi.
- 5- Ortamlar falcon tüpe dikkatlice boşaltıldı. Falcon tüpler 5 dakika 1200 rpm'de santrifüjlendi.
- 6- Üst kısımdaki supernatant çöpe dökülerek santrifüj sonrası oluşan pelleti çözmek için tüpün dibine biraz vuruldu.
- 7- Her bir tüp için 1 mL ortam konuldu.
- 8- Elde edilen hücrelerin 1/3-1/4'ü ayrı flasklara pasajlandı.
- 9- 8 mL daha ortam eklendi ve karıştırıldı.
- 10-Flaskın üstüne Hücre Hattı / Pasaj Numarası / Pasaj Oranı / Pasaj Tarihi yazıldı.
- 11-İnkübasyon için 37 °C 'de inkübatöre yerleştirildi.
- 12-Bir hafta sonunda hücreler mikroskopla kontrol edilerek gerekiyorsa ortam değişikliği yapıldı.



Şekil 3.2 Flastaki A549 Hücreleri

### 3.3.4 Hücre Canlılığının (Viabilite) Değerlendirilmesi

- 1- 3 gün boyunca 37 °C'de inkübatörde beklemiş olan A549 akciğer hücre hattı flastın A sırasına A-11'e kadar boşatıldı.
- 2- Kuyucukların her birinin içindeki besi ortamı boşaltılırken üzerlerine 50 µL serumsuz besi yeri (RPMI-1640) eklendi.
- 3- Sonra tekrar her bir kuyucuğun içindeki serumsuz besi yeri boşaltılırken üzerlerine 50µL Tripsin ekleyip 5 dakika inkübasyon için 37 °C'de bekletildi.
- 4- Beş dakika sonrasında her bir kuyucuğa % 0,5'lik tripan mavisi solusyonundan 50µL eklendi.
- 5- Neubauer lamında ışık mikroskobu ile canlı hücre sayımı yapıldı.

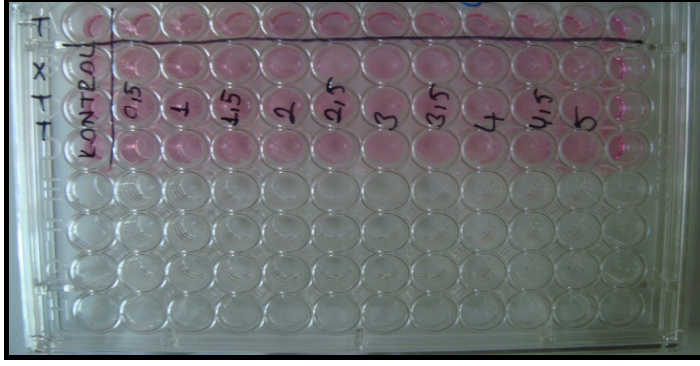
$$\% \text{ Sağ kalım} = \frac{\text{Canlı hücre sayısı/mL}}{\text{Toplam hücre sayısı/mL}} \times 100$$

6- Elde edilen sonuçlara göre, hücreler her kuyucukta  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde cisplatinin IC<sub>50</sub> dozunu belirlemek üzere platelere ekildi.

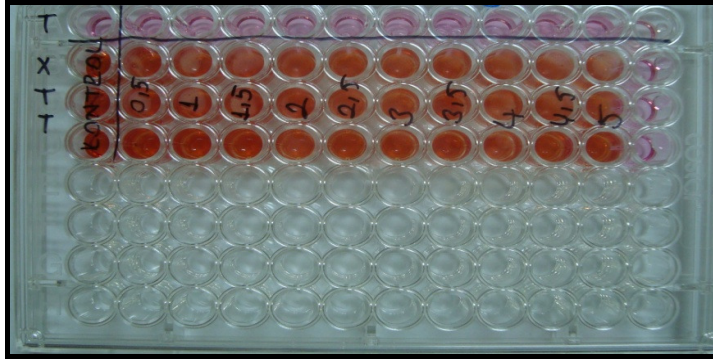
### 3.3.5 XTT ve Tripan Mavisi Boyası Testi İşlem Basamakları

- 1- Flastlarda (75 cm<sup>2</sup>) yeterli sayıda çoğalan hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla tripsinizasyon işlemi uygulandı.
- 2- Sonra, hücreler üzerine besi ortamı ilave edilip 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

- 3- Santrifüj sonrasında, üst kısımdaki süpernatant atıldı, dipte kalan hücreler üzerine 1 mL besiyeri eklendi.
- 4- Hücre sayımı için hücre solüsyonundan 50 µL alındı, üzerine 50 µL Tripan mavisi boyası eklendi ve hücre canlılığını belirlemek için Neubauer lamında sayım yapıldı.
- 5- 96 kuyucuklu plateler 1., 2., 3. ve 4. gün için ayrı ayrı hazırlandı.
- 6- Cisplatinin 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µM'lık konsantrasyonları XTT testi için her konsantrasyona 3 paralel değer olacak şekilde IC<sub>50</sub> dozunu belirlemek üzere hazırlandı.
- 7- Neubauer lamında sayılan hücreler gerekli dilüsyon yapıldıktan sonra, hazırlanan 96 kuyucuklu platelere her kuyucukta  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklendi.
- 8- Hazırlanan 4 günlük deney düzeneğinin ilk sırasına cisplatin uygulanmadı, kontrol grubu olarak ayrıldı, diğer kuyucuklara cisplatin 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µM'lık konsantrasyonları verildi.
- 9- 1. günlük deney düzeneği için, hücreye belirlenen farklı cisplatin konsantrasyonları uygulandı. 24 saat sonra, XTT testi için ayrılan kuyucukların her birine hazırlanan XTT solüsyonundan 50 µL eklendi. Madde eklenmesinden yaklaşık 4 saat sonra ise plate'in her bir kuyucuğunun absorbans değeri (OD) ELISA cihazında 450 nm ve 630 nm dalga boyunda okundu.
- 10- Aynı işlemler, madde verilmesinden 48, 72 ve 96 saat sonra 2., 3. ve 4. günlük plate'ler için yapıldı.
- 11- Plate'lerde bulunan Tripan Mavisi Boyası Testi için ayrılan kuyucuklarda bulunan serumlu besi ortamı enjektör yardımıyla çekildi, ortamdaki serumu uzaklaştırmak için ise 50 µL serumsuz ortam hücrelerin kurummasına izin vermeden kuyucuklara ilave edildi. Aynı şekilde hızlıca serumlu ortam çekilip, 50 µL tripsin ilave edildi. İnkübatörde 5 dakika beklendi.
- 12- Tripsin ile kaldırılan hücrelerin üzerine 100 µL serumlu besiyeri eklenerek hücreler süspanse edildi. Süspansiyondan 50 µL alınarak, 50 µL Tripan Mavisi Boyası ile karıştırıldı ve Neubauer Lamında hücre sayımı yapıldı.
- 13- XTT testi ve Tripan Mavisi Boya Testi sonuçlarına göre, Cisplatin'in A549 hücrelerinde IC<sub>50</sub> dozu belirlendi (Şekil 3.3 ve 3.4).



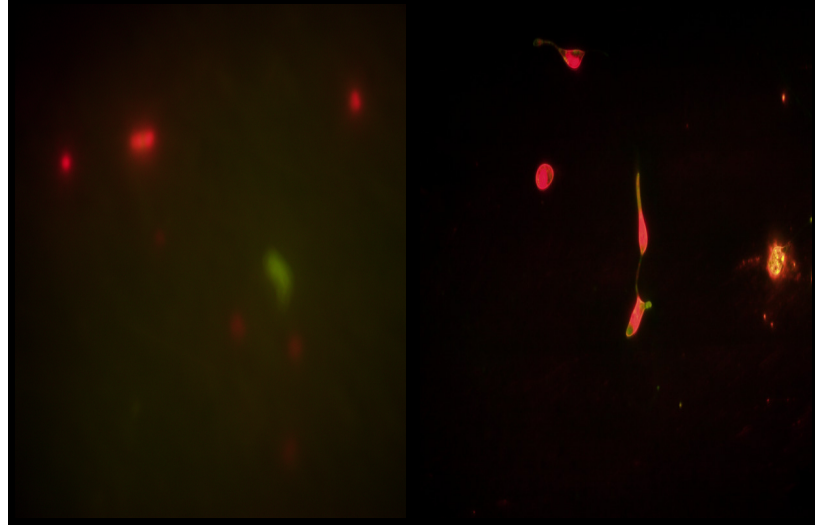
Şekil 3.3 XTT Uygulaması Öncesi Kuyucuktaki Hücreler



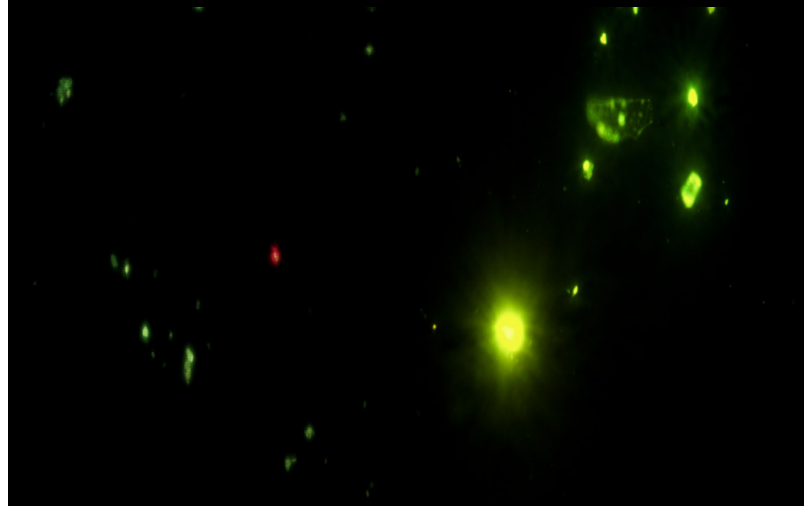
Şekil 3.4 XTT Uygulaması Sonrası Kuyucuktaki Hücreler

### 3.3.6 Annexin V-EGFP Testi ile Apoptosisin Saptanması

- 1- Her kuyucuğa  $1 \times 10^6$  hücre gelecek şekilde 4 farklı hücre grubu 6 kuyucuklu platalere ekilerek deney düzeneği hazırlandı.
- 2- Her bir kuyucuğa tripsin eklenerek hücreler kaldırıldı ve 1,5 mL'lik endorflara alındı. 2500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
- 3- Altta toplanan hücrelerin üst kısmındaki süpernatant atılarak kalan hücreler üzerine 500  $\mu$ l bağlayıcı tampon eklenerek resüspanse edildi.
- 4- Sonra üzerine 5  $\mu$ L Annexin V-EGFP ve 5  $\mu$ L propidyum iyodür eklendi. 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
- 5- 5 dakika sonrasında 4 hücre grubundan da lam üzerine damlatıldı ve üzerlerine lamel kapatıldı.
- 6- Floresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm) ve kırmızı (620 nm) filtreleri ile incelendi. Yeşil hücreler ve yeşil rengin gözlenmeye başladığı hücreler apoptosa uğramış hücreleri, kırmızı gözlenen hücreler ise canlı hücreleri göstermektedir (Şekil 3.5; Şekil 3.6; Şekil 3.7; Şekil 3.8).



Şekil 3.5 1.Grup Hücreler (kontrol grubu) Şekil 3.6 2.Grup Hücreler (10µM Cisplatin)



Şekil 3.7 3.Grup Hücreler (15µM Cisplatin) Şekil 3.8 4.Grup Hücreler (20µM Cisplatin)

### 3.3.7 DeadEnd™ Fluorometrik TUNEL Testi ile Apoptosisin Saptanması

- 1- Her kuyucuğa  $1 \times 10^6$  hücre gelecek şekilde 4 farklı hücre grubu 6 kuyucuklu platelere ekilerek deney düzeneği hazırlandı (Şekil 3.9).
- 2- Her bir kuyucuğa tripsin eklenerek hücreler kaldırıldı ve 1,5 mL'lik eppendorflara alındı.
- 3- Hücreler 2500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi (Şekil 3.10).

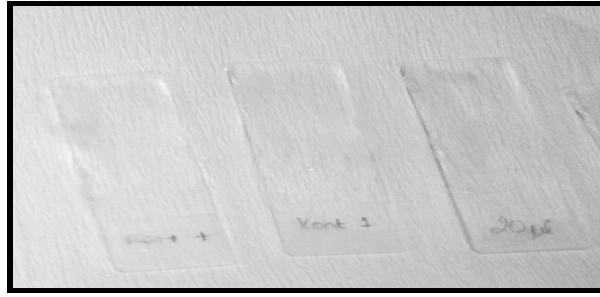
- 4- Üst kısımdaki süpernatant atılarak üzerlerine 1 mL PBS (Phosphate Buffered Saline: Fosfat Tampon Çözeltisi) eklendi ve yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi.



Şekil 3.9 Platelere Ekilmiş Hücreler



Şekil 3.10 Eppendorflara Alınan ve Santrifüjlenen Hücreler



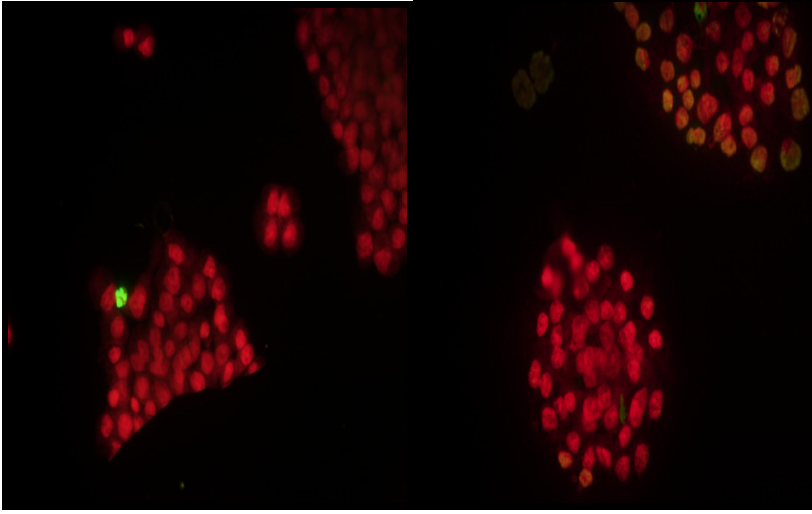
Şekil 3.11 Lamlara Uygulanan Örnek

- 5- Plate şeklindeki hücreler üzerine 3:1 oranındaki metanol:asetik asit (fiksatif) karışımı eklendi.
- 6- 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
- 7- Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra hücre plateleri üzerine 30 µL fiksatif eklendi.
- 8- Her hücre grubu pozitif kontrolle çalışıldı. Her hücre grubu için 2 adet lam  $-20^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.
- 9- Her hücre solüsyonundan 15 µL hazırlanan lamlara damlatıldı ve yayıldı (Şekil 3.11).
- 10- Kurutulan lamlar içerisinde %4'lük metanolsüz formaldehitin PBS (pH:7,4) çözeltisi içerisinde konuldu ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 25 dakika bekletildi.

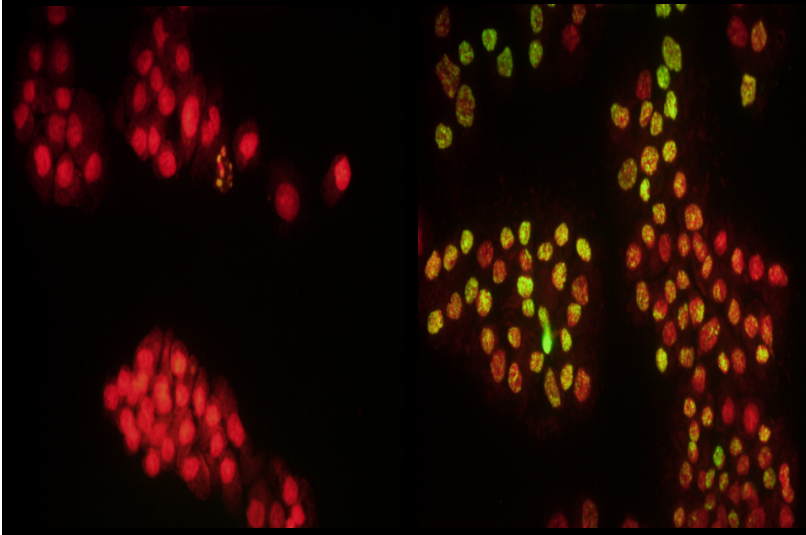
- 11-25 dakika sonrasında hücre geçirgenliğini sağlamak için lamalar PBS ile hazırlanmış % 0,2 Triton-X çözeltisinde 5 dakika bekletildi.
- 12-Lamalar PBS ile 5 dakika süre aralıklarıyla 3 kez yıkandı.

Pozitif kontrol için DNase uygulaması:

- a)100 µL DNase I tamponu (40 mM Tris-HCl (pH:7,9),10mM NaCl, 6mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>) pozitif kontrol lamaları üzerine eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- b)Üzerindeki sıvı uzaklaştırıldı. 5.5-10 ünite/mL DNase I içeren 100 µL DNase I tamponu eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon için bekletildi.
- c)Lamalar üzerindeki fazla sıvı uzaklaştırılarak 3-4 kez deiyonize su ile yıkandı.
- 13-Pozitif kontrol lamaları ve diğer lamalar üzerine 100 µL tampon çözelti eklenerek 10 dakika bekletildi.
- 14-rTdT tamponu (90 µL equilibration tamponu,10 µL nükleotit karışımı, 2µL rTdT enzimi) hazırlandı.
- 15-5-10 dakika sonrasında lamalar üzerindeki fazla sıvı uzaklaştırılarak yerine rTdT tamponu eklenerek üzerine lamel kapatıldı. 37 °C'de nemli etüvde 60 dakika bekletildi.
- 16-60 dakika sonrasında reaksiyonun durması için oda sıcaklığında SSC içinde 15 dakika bekletildi.
- 17-Lamalar PBS içinde 5 dakika yıkandı ve bu işlem 3 kez tekrar edildi.
- 18-1 mg/1 mL şeklinde hazırlanmış propidyum iyodit solusyonu içerisinde lamalar 15 dakika bekletildi.
- 19-Lamalar solüsyondan çıkartıldı, kurumasından sonra üzerine %50'lik 15 µL gliserol damlatılarak lam ile kapatıldı.
- 20-Floresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm) ve kırmızı (620 nm) filtreler ile incelendi (Şekil 3.12; Şekil 3.13; Şekil 3.14; Şekil 3.15).



Şekil 3.12 1.Grup Hücreler(Kontrol Grubu) Şekil 3.13 2.Grup Hücreler (10µm Cisplatin)



Şekil 3.14 3.Grup Hücreler (15µm Cisplatin) Şekil 3.15 4.Grup Hücreler (20µm Cisplatin)

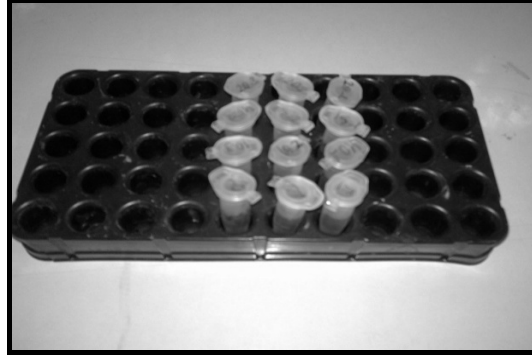
### 3.3.8 A549 Hücrelerinde <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat Tutulumu

- 1- Platelere kontrol, 10 mM, 15 mM, 20 mM ve her birinden 3'er kuyucuk ve her kuyucukta  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hazırlanmış ve ekilmiş olan hücreler üzerindeki besi ortamı alınarak aynı zamanda 500 µL serumsuz besi ortamı eklendi (Şekil 3.16).
- 2- Eklenen serumsuz besi ortamdan çekilip yerine hücrelerin kaldırılması için 400 µL tripsin eklendi. 5 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- 3- 5 dakika sonrasında 800 µL DMEM:F:12 serumlu besi ortamı eklendi.

- 4- Bütün ortam iyice pipetlenerek her biri ayrı ependorflara alındı (Şekil 3.17).
- 5- 2500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
- 6- Üst kısımdaki supernant atıldı. Alt kısımda kalan hücreleri çözmek için hafifçe vuruldu ve üzerine 1mL serumsuz besi ortamı eklendi.



Şekil 3.16 Kuyucuklardaki Hücreler



Şekil 3.17 Eppendorflara Alınmış Hücreler

- 7- Her bir kuyucuğa 1  $\mu\text{g}$  / 50  $\mu\text{Ci}$  gelecek şekilde  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Glukoheptonat, hücrelerin alındığı ependorfa ilave edildi.
- 8- 1  $\mu\text{g}/50 \mu\text{Ci}$   $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Glukoheptonat içerisinde hücre bulunmayan 3 ayrı eppendorfa  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Glukoheptonat tutulumunu saptamak amacıyla ilave edildi.
- 9- Cd(Te) dedektörü ile eppendorfların aktiviteleri sayıldı. Aynı işlemler 3 kez yapıldı.
- 10-  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Glukoheptonat ile hücreler  $37^\circ\text{C}$ 'de 2 saat inkübasyona bırakıldı.

- 11- Sonrasında serbest <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat'ı ayırmak için PBS ile hücreler 2 kez yıkandı. Aynı işlemler hücrelerin olmadığı ependorflar içinde tekrarlandı.
- 12- Yıkama işleminden sonra hücrelerin aktiviteleri Cd(Te) dedektöründe sayıldı.
- 13- İçerisinde hücre bulunan ependorflardaki tutulumlardan, içerisinde hücre bulunmayan ependorflar çıkarılarak hücrelerdeki net tutulumlar saptandı.
- 14- Tümör hücrelerindeki <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat tutulum % oranı hesaplandı.

### 3.3.9 Bradford Protein Analizi

- 1- Her kuyucukta  $1 \times 10^6$  hücre bulunan 4 farklı hücre grubu olacak şekilde plate ekilerek deney düzeneği kuruldu.
- 2- Hücreler serumsuz besiyeri ile 3 kez yıkandı ve yıkanan hücrelerin üzerine 500  $\mu$ L içerisinde SDS bulunmayan örnek tampon çözeltisi eklendi ve her hücre grubu ayrı ependorf içerisine alındı.
- 3- Hücreler kaldırıldıktan sonra proteaz enzimini inhibe etmek için 5 dakika sıcak su banyosu içerisinde bekletildi ve 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
- 4- Stok çözeltiden derişimi 25, 20, 15, 10, 5, 2.5, 1.25  $\mu$ g/mL olan standartlar (Bovin Serum Albumin) hazırlandı.
- 5- Plate içerisine 120  $\mu$ L hazırlanan standartlar ve kontrol grubu, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M'lık cisplatin gruplarından aynı miktarda örnek konuldu. Sonra 120  $\mu$ L Bradford reaktifinden her kuyucuğa eklenerek karıştırıldı.
- 6- İnkübasyon için 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 7- ELISA cihazında 595 nm'de kör örnek çözeltisiyle birlikte ölçüm alındı.
- 8- Protein konsantrasyonlarının dalga boyu 595 nm'deki absorbansı okundu her bir absorbansa karşılık standart eğri oluşturuldu.
- 9- Standart eğriye yardımıyla bilinmeyen örneklerin protein konsantrasyonları onların absorbansları karşılaştırılarak saptandı.

### 3.4 İstatistiksel Analizler

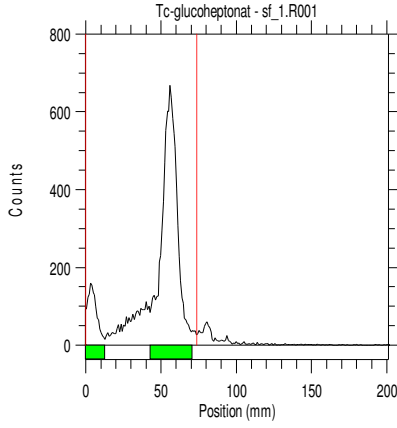
% ID/Protein ile % Apoptotik Hücre arasındaki oran hesaplanarak istatistiksel olarak korelasyon katsayısı (r) elde edildi. Ayrıca, Annexin V ve

TUNEL yöntemleriyle elde ettiğimiz apoptotik yüzde sonuçları ile in vitro olarak A549 akciğer hücre hattına uygulanan farklı dozdaki Cisplatin miktarlarına karşılık <sup>99m</sup>Tc-Glucoheptonat tutulum sonuçları SPSS 13 programında korelasyon analizi regresyon analizi ve varyans one-way ANOVA analizi ile hesaplandı. Bulunan değerlerin standart sapmaları ve *p* değerleri hesaplandı. *p* değeri <0.05 olanlar anlamlı kabul edildi.

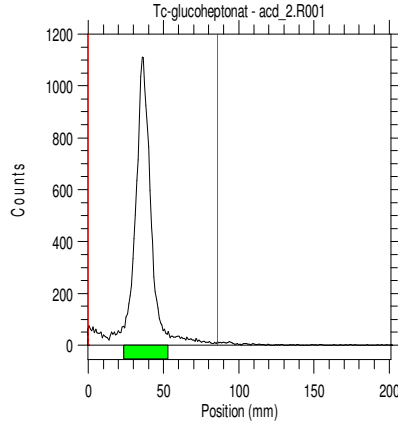
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Radyo İnce Tabaka Kromatografi (RTLC) Yöntemi ile elde edilen $R_f$ Sonuçları

Glukoheptonat'ın  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenme verimi  $\% 90,66 \pm 4$  olarak bulundu.



Şekil 4.1  $^{99m}\text{Tc}$ -GH SF banyosu  
RTLC kromotogramı



Şekil 4.2  $^{99m}\text{Tc}$ -GH ACD banyosu  
RTLC kromotogramı

Çizelge 4.1 Banyolar için  $R_f$  değerleri

Sf banyosu	indirgenmiş $^{99m}\text{Tc}$ $R_f$ : 0,06	$^{99m}\text{Tc}$ -GH $R_f$ : 0,75	$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ $R_f$ : 0,90
ACD banyosu	indirgenmiş $^{99m}\text{Tc}$ $R_f$ : 0,89	$^{99m}\text{Tc}$ -GH $R_f$ : 0,43	$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ $R_f$ : 0,94

Wim de Kieviet'in çalışmasında (1981), SF (Serum Fizyolojik) banyosunda ( $\% 0,9 \text{ NaCl}$ )  $^{99m}\text{Tc}$ -GH  $R_f$  değeri 0,89 olarak bulunmuş.

### 4.2 Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Cisplatin'in A549 hücreleri için sitotoksitesini belirlemek, morfolojik olarak hücresel hasarın gözlenmesi, hücresel hasarın çeşitli ölçüm yöntemleri ile belirlenmesi, hücresel büyümenin belirlenmesi, hücresel metabolizmadaki herhangi bir değişikliğin belirlenmesi açısından önemlidir.

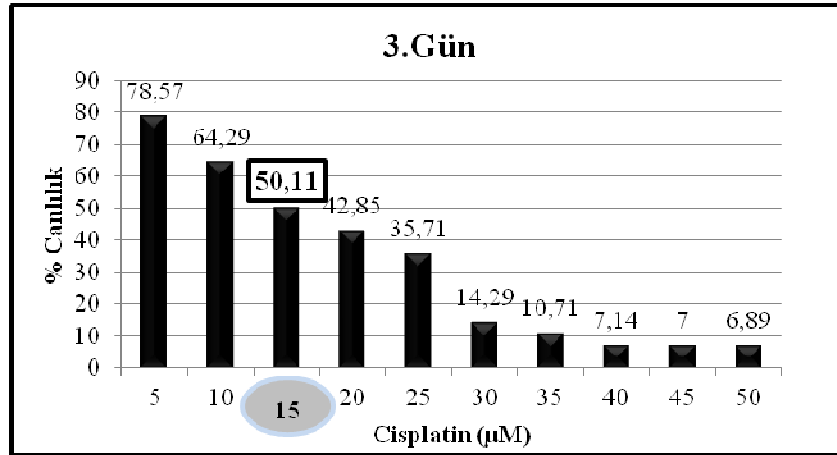
Hücre canlılığının  $\% 50$  oranında azaldığı değer bize Cisplatin'in A549 hücreleri için etkin değerini verecektir.

Hücreler, kemoterapi ajanının (Cisplatin) farklı konsantrasyonlarına (5-50  $\mu\text{M}$ ) maruz bırakılarak, apoptozun indüklendiği hücrelerde,  $\text{IC}_{50}$  değerleri Tripan Mavisi Boyası ve XTT Testi ile saptandı (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

#### 4.2.1 Tripan Mavisi Boyası Testi Sonuçları

Tripan mavisi boyası testi ile A549 akciğer kanser hücrelerinde, kontrol grubu A549 akciğer hücresinin canlılık yüzdesi % 100 kabul edilerek cisplatinin farklı konsantrasyonları için canlılık yüzdeleri incelendi. 5  $\mu\text{M}$  Cisplatin miktarı uygulandığında canlı hücre oranı % 78,57; 10  $\mu\text{M}$  Cisplatin uygulandığında ise bu oranın % 64,29 olduğu görüldü. 15  $\mu\text{M}$  Cisplatin uygulandığında hücrelerin apoptoza uğrayarak hücre canlılığının % 50,11'e düştüğü görüldü. Bu değer bize kemoterapi ajanının etkisiyle hücre canlılığının % 50 oranında azaldığı  $\text{IC}_{50}$  değerini vermektedir. Tripan Mavisi Boyası Testi sonucunda, A549 akciğer kanser hücresi için  $\text{IC}_{50}$  değeri = 15  $\mu\text{M}$ 'dir.

Oluşan apoptotik oranlar ise kontrol grubunu % 100 canlı olarak kabul ettiğimizde, 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  Cisplatin uygulaması sonucunda apoptosa uğrayarak canlılığını yitiren A549 akciğer kanser hücresi oranları sırasıyla, % 21,43; % 35,71'dir. 15  $\mu\text{M}$  Cisplatin uygulandığında ise bu oran % 49,89 olarak bulundu.



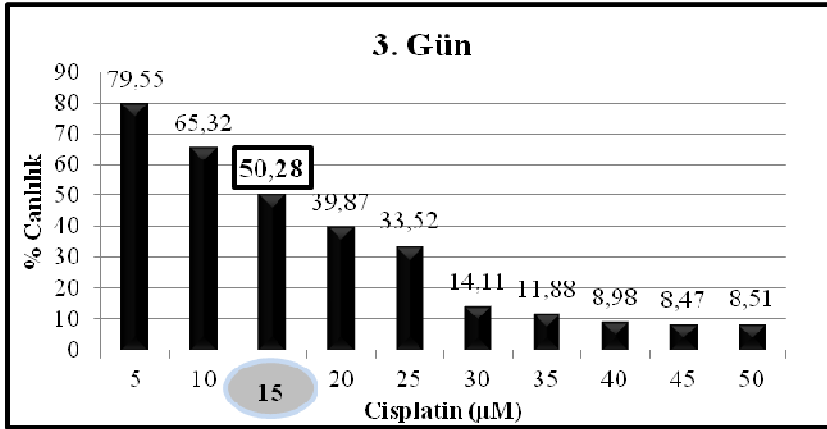
Şekil 4.3 Tripan Mavisi Testi ile Cisplatinin Sitotoksitesisi

J. Liang et al. 2008'de yaptıkları benzer çalışmada, A549 akciğer kanser hücreleri üzerine kemoterapi ajanı olan Cisplatin'in 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$

konsantrasyonlarını uygulanmışlar, oluşan apoptotik hücreleri Annexin V ve propidiyum iyodür (PI) ile boyanarak gözlemlenmiş ve oluşan apoptotik oran flow sitometri ile erken ve geç apoptosis belirlenmişlerdir. Bunun sonucunda, A549 akciğer tümör hücrelerindeki apoptosis oranı, kontrol grubunda %  $1.21 \pm 0,15$ ; 5  $\mu\text{M}$  Cisplatin uygulanan hücrelerde %  $36.68 \pm 1,56$ ; 10  $\mu\text{M}$  Cisplatin uygulanan hücrelerde ise apoptotik oran %  $43,60 \pm 2,82$  olarak bulunmuş. Canlı hücre oranları ise kontrol grubu, 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  Cisplatin uygulaması sonucunda sırasıyla, % 98,8 ; % 63,32 ve % 56,4 olarak bulunmuş. Cisplatin'in A549 tümör hücrelerinde etkin olduğunu göstermişlerdir.

#### 4.2.2 XTT Testi Sonucu

XTT yöntemi uygulanarak A549 hücreleri için cisplatinin 3. Gün sitotoksitesi incelendiğinde, hücre canlılığının yarıya düştüğü Cisplatin miktarının 15  $\mu\text{M}$  olduğu görüldü.



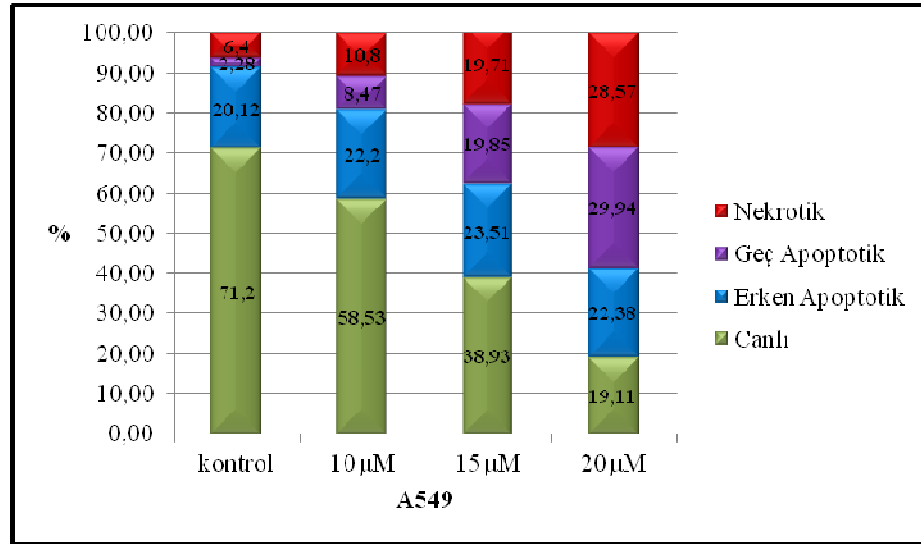
Şekil 4.4 XTT testi ile Cisplatinin sitotoksitesi

Nathalie Perek et al. 2008'de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Glukarat kullanarak yaptıkları çalışmada ise kemoterapi ajanı olarak etoposide kullanmışlar. Etoposide ile U937 tümör hücrelerinde 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  olarak 3 farklı konsantrasyonda çalışmışlar ve apoptotik hücre sayısı için artan bir eğri saptamışlar. U937 hücrelerinde etoposide  $\text{IC}_{50}$  değerini 75  $\mu\text{M}$  olarak bulmuşlardır.

#### 4.2.3 Annexin V-EGFP Testi Sonucu

Annexin V-EGFP Testi sonucumuzda; floresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm) ve kırmızı (620 nm) filtreleri ile incelenmesiyle elde edilen görüntülerdeki canlı, apoptotik, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre ayrımları yapılarak yüzde oranları hesaplandı ve Şekil 4.5'te oranlar görülmektedir. Cisplatin'in etkin dozu IC<sub>50</sub> değeri olan 15 µM'deki canlı hücre sayısı ile cisplatin uygulanmayan kontrol grubundaki canlı hücre sayısı yüzdelere bakıldığında, yaklaşık % 50 oranında azalma ile % 38,93'e düştüğü görüldü. Bu değerdeki apoptosa uğrayan hücre yüzdeside % 41,36'dır. Bu da kemoterapi ajanı olan Cisplatin'in A549 akciğer hücre hattı için etkin değerinin 15 µM olduğunu desteklemektedir.

Annexin V-EGFP Testi ile elde edilen görüntülerden erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrozise uğrayan hücre ayrımları yapıldı. Şekil 4.5'te görüldüğü üzere, nekrozise uğramış hücre oranı kontrol hücresinde % 6,4 iken, artan Cisplatin miktarıyla 10 µM'da % 10,8; 15 µM'da % 19,71; 20 µM'da ise % 28,57 olarak bulundu ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.5 Annexin V-EGFP Testi

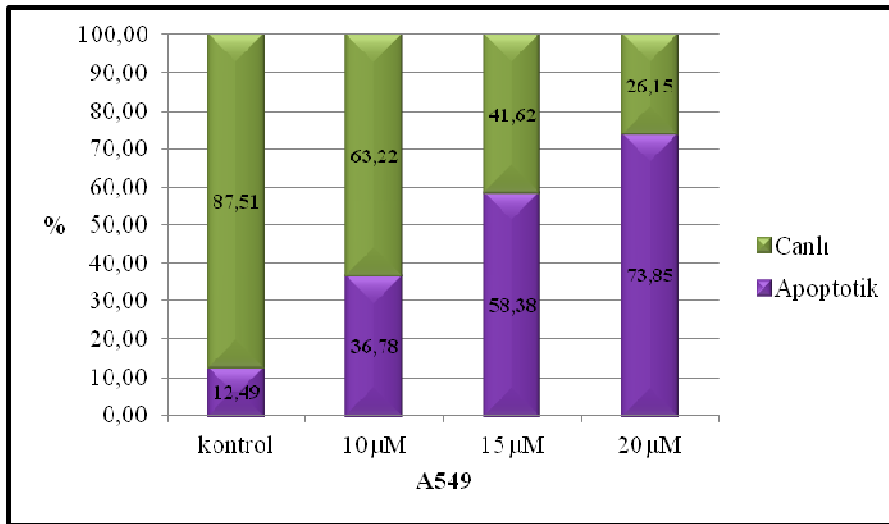
Benzer olarak, Nathalie Perek et al. (2008) çalışmasında, U937 insan lösemi monosit lenfoma hücrelerine in vitro olarak farklı miktarlardaki (50 µM, 75 µM,

100  $\mu\text{M}$ ) kemoterapi ajanı (Etaposit) uygulanmışlar. Annexin V – FITC kullanılarak fosfotidil serin (PS) dedekte edilerek apoptotik hücre membranları, Propidiyum İyodür (PI) kullanılarak nekrotik hücreler tespit edilerek apoptotik ve nekrotik hücre ayırımı yapılmıştır. Ayrıca, artan kemoterapi ajanı miktarı ile apoptosis ve nekrozisinde arttığı izlenmiştir. Kontrol hücresinde % 2 oranında apoptotik hücre sayılırken, 100  $\mu\text{M}$  kemoterapi ajanı kullanımıyla bu oran % 70'e çıktığını gözlemlemişler. Aynı şekilde nekrotik hücre miktarında kontrol grubunda % 2'den az iken, 100  $\mu\text{M}$  kemoterapi ajanı kullanımıyla % 18'e çıktığını tespit etmişlerdir (Perek N. et al.,2008).

#### 4.2.4 DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometrik TUNEL Testi Sonucu

DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometrik TUNEL Testi sonuçları Şekil 4.6'da görülmektedir. Çizilen bu grafik incelendiğinde, kontrol hücrelerinde apoptotik hücre oranının % 12,49 iken 20  $\mu\text{M}$  Cisplatin uygulamasından sonraki apoptoza uğrayan hücre oranının % 73,85'e çıktığını görmekteyiz. 15  $\mu\text{M}$  Cisplatin miktarında ise % apoptotik hücre oranı % 58,38 olarak hesaplandı. Varyans one-way ANOVA analizi ile sonuçların istatistiği yapıldı ve anlamlı olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ).

Sonuç olarak, artan Cisplatin miktarıyla apoptoza uğrayan tümör hücre sayısında artmaktadır.



Şekil 4.6 DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometrik TUNEL Testi

#### 4.2.5 Bradford Protein Analizi Sonucu

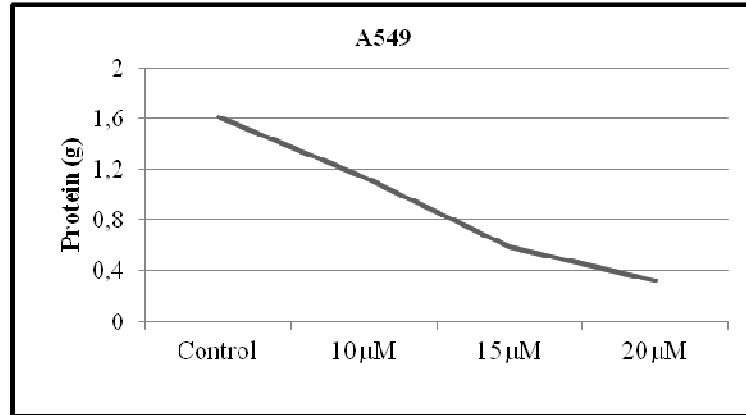
Bradford Protein Analiz prosedürüne göre A549 hücrelerimiz hazırlanarak Cisplatin'in 3 farklı dozu verildi ve Cisplatin dozuna karşılık protein miktarı çizelgesi oluşturuldu. Beklendiği üzere artan cisplatin dozuna karşılık protein miktarında düşüş olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 incelendiğinde Cisplatin miktarının artmasıyla tümör hücrelerinin (protein, mg) apoptoza uğrayarak azaldığı görüldü. Bulunan değerlere karşılık Şekil 4.7 çizildi. Çizilen grafikte de Cisplatin miktarının artmasına karşılık protein miktarında azalma izlenmektedir.

Benzer olarak, Elizabeth Alli et al. 2002'de yaptıkları meme kanser hücreleri ile kemoterapi ilacı olarak paklitaksel kullanılarak yaptıkları çalışmada Bradford Protein Analizi sonucunda paklitaksel oranının artmasıyla canlılığın dolayısıyla protein miktarının azaldığı görülmektedir.

**Çizelge 4.2** Cisplatin uygulaması sonrası protein miktarı (g)

A549 Hücre gruplarına uygulanan Cisplatin miktarı	Protein (g)
KONTROL	1,6083
10 $\mu$ M	1,1365
15 $\mu$ M	0,5841
20 $\mu$ M	0,3278



**Şekil 4.7** Cisplatin miktarına ( $\mu$ M) karşılık protein miktarı (g)

#### 4.2.6 A549 Hücrelerinde <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat Tutulum Sonuçları

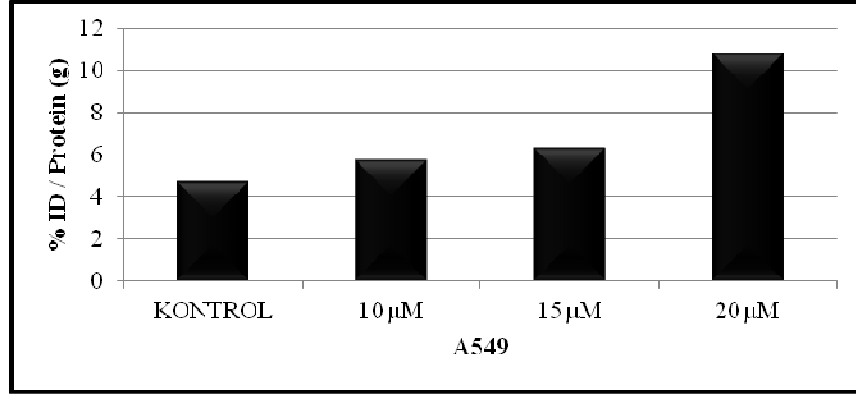
<sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat sadece tümörlü hücrelerde tutulum gösteren bir görüntüleme ajanıdır. Çalışmamızda, A549 akciğer hücre hattı her bir endorf için <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat ile 50 µCi/ µg olacak şekilde kullanıldı. Blankenberg F. et al. 1998'de, <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat ile çalışmışlar ve spesifik aktiviteyi protein başına 50µCi/µg olarak bulmuşlardır.

A549 akciğer hücresine kemoterapi ajanının (Cisplatin) uygulanmasıyla <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat'ın tutulum sonuçları Şekil 4.8'de görülmektedir. Çizelge 4.3 ve Şekil 4.8 incelendiğinde, uygulanan Cisplatin dozundaki artış ile tümörlü hücre sayısında azalma olduğu, <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat tutulumunun bu doz artışına bağlı olarak azaldığı görülmektedir. Bu azalış, Cisplatinin etkisiyle tümör hücrelerinin apoptosa uğradığını ve tümör canlı hücrelerinin azaldığını göstermektedir.

Bunun sonucunda, %ID (uygulanan doz)/Protein (g) oranı, kontrol hücreleri için % 4,72 iken Cisplatinin IC<sub>50</sub> dozu olan 15 µM için ise % 6,31 olarak bulunmuştur. Çizelge 4.3 incelendiğinde Cisplatin miktarı ile %ID arasında istatistiksel anlamlılık vardır ( $p < 0.05$ ). % ID değerleri ile protein (g) değerlerinin oranlanması ile çizilen % ID / Protein (g) grafiğinde (Grafik 4.8) artan bir grafik izlenmesi <sup>99m</sup>Tc-Glukoheptonat'ın kemoterapi değerlendirilmesinde etkin olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.3** Cisplatin uygulamaları sonrası %ID ve %ID/Protein

A549 Hücre gruplarına uygulanan Cisplatin miktarı	% ID	%ID/Protein
KONTROL	7,59	4,72
10 µM	6,51	5,73
15 µM	3,68	6,31
20 µM	3,53	10,77



Şekil 4.8 Cisplatin Miktarına (µM) karşılık %ID / Protein Miktarı (g)

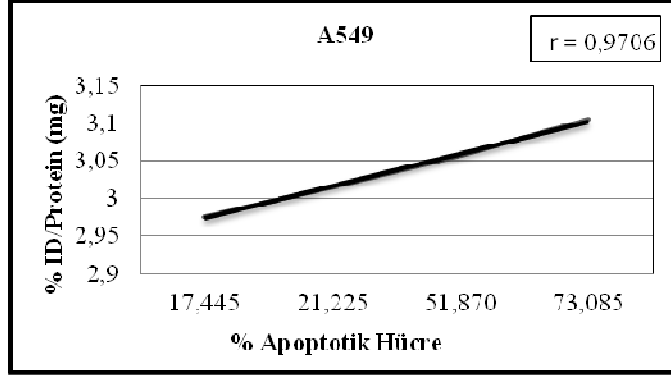
J. Liang et al. Tarafından 2008’de A549 kanser hücre hattında Cisplatin kullanarak in vivo ve in vitro olarak gerçekleştirdikleri çalışma,  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-DG’nin kanser hücrelerinde tutulumlarının in vitro olarak incelemesini kontrol grubu, 5 µM ve 10 µM cisplatin uygulanan grup olmak üzere 3 grup üzerinde yapmışlardır. Bunun sonucunda, kontrol grubunda  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-DG tutulumu % 0,79 iken, 5 µM ve 10 µM’lık gruplardaki tutulumlar ise sırasıyla % 0,59 , % 0,44 olarak bulmuşlardır.

Nathalie Perek et al. (2008) çalışmalarında da, kemoterapi ajanı olarak etaposide’in farklı konsantrasyonlarına (50 µM, 75 µM, 100 µM) maruz bırakılarak apoptosise uğratılan U937 kanser hücrelerinde  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukarat tutulumlarının incelenmesi sonucunda, %ID/Protein (mg) oranları, kontrol hücresinde % 2 iken 50 µM, 75 µM, 100 µM konsantrasyonlarda giderek artarak 100 µM’da %ID/protein (mg) oranını % 6,05 olduğunu göstermişlerdir.

#### 4.2.7 İstatistiksel Sonuçlar

Uygulanan Cisplatinin etkisiyle akciğer tümör hücreleri (A549) apoptosa uğrayarak azaldı. Tümörlü hücre sayısında azalma olmasından dolayı  $^{99m}\text{Tc}$  – Glukoheptonat tutulumunda da azalma görüldü. Bunun sonucunda % ID değerleri ile protein (g) değerlerinin oranlanması ile çizilen % ID / Protein (g) grafiğinde (Şekil 4.9) artan bir grafik izlendi. % ID / Protein (g) ile % Apoptotik Hücre arasında grafik çizildiğinde pozitif korelasyon olduğu görüldü. Pozitif korelasyon,

kullandığımız  $^{99m}\text{Tc}$ - Glukoheptonat dozunun Cisplatin miktarına bağlı olarak düştüğünü göstermektedir.



Şekil 4.9 Korelasyon Katsayısı (r)

D. Denoyer et. al. (2004) çalışmasında ise, U937 hücrelerinde kemoterapi ajanlarının apoptosise neden olduğu ve apoptotik hücre ölümleri sırasında oluşan değişikliklerin  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA kullanılarak değerlendirildiği görülmektedir. Bu çalışmada, meydana gelen apoptosisi Annexin V-(FITC) metoduyla izlemişler. Sonrasında, U937 hücresine in vitro olarak  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA kullanarak radyoaktivite çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Apoptosis sırasında hücrelerde fosfat tutulumunda azalış olduğu buna bağlantılı olarakta işaretli bileşiğin tutulumunda da azalma olduğu görülmüş ve bu şekilde apoptosis dedekte edilmiş. Protein başına verilen dozun yüzdesi (% DA/Protein) ile oluşan apoptotik hücrelerin yüzdesi ( % Apoptotik Hücre) arasında istatistiksel olarak korelasyon katsayısı (r) hesaplanarak grafiğe geçirildiğinde negatif korelasyon bulunmuş. Bunun sonucunda elde ettikleri korelasyon ile oluşan apoptosis sırasında meydana gelen değişiklikleri  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA ile değerlendirilebildiği gösterilmiştir (Denoyer D. et al., 2004).

Annexin V, TUNEL ve  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat tutulumlarından elde edilen verilerimizin SPSS 13 programı kullanılarak istatistiksel analizleri (Univariate Variance Analyses) yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi (p) değeri ile ifade edilecek olursa  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

**Çizelge 4.4** Pearson korelasyonuna göre Cisplatin miktarı ile  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat tutulumları arasındaki  $p$  değeri ve korelasyon katsayısı= $r$

	$p$ Değeri	Pearson korelasyon katsayısı= $r$
Cisplatin miktarı ( $\mu\text{m}$ ) ile $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat tutulumları	0.000	-0,949

Elde edilen değerlere göre, Cisplatin miktarı ile tutulumlar arasında yapılan bu korelasyonun istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu söyleyebiliriz ( $p<0,05$ ). Pearson katsayısı ( $r$ )'nın negatif çıkması Cisplatin miktarı ile yüzde tutulumlar arasında negatif korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu sonuç bize Cisplatin miktarının artmasıyla tutulumların azalmasının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu açıklamaktadır.

**Çizelge 4.5** Pearson korelasyonuna göre Cisplatin miktarı ile TUNEL Metoduyla bulunan apoptotik hücre yüzdeleri arasındaki  $p$  değeri ve korelasyon katsayısı= $r$

<b>TUNEL Metodu ile</b>	$p$ Değeri	Pearson korelasyon katsayısı= $r$
Cisplatin miktarı ( $\mu\text{m}$ ) ile apoptotik hücre oranları	0.000	0,995

Sonuçlar incelendiğinde, Cisplatin miktarı ile apoptotik hücre yüzdeleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bulunan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0,05$ ).

**Çizelge 4.6** Pearson korelasyonuna göre Cisplatin miktarı ile Annexin V Metoduyla bulunan apoptotik hücre yüzdeleri arasındaki  $p$  değeri ve korelasyon katsayısı= $r$

<b>Annexin V Metodu ile</b>	$p$ Değeri	Pearson korelasyon katsayısı= $r$
Cisplatin miktarı ( $\mu\text{m}$ ) ile apoptotik hücre oranları	0.000	0,999

Annexin V ile bulunan apoptotik hücre yüzdeleri ile Cisplatin miktarı arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (0,999). Bulunan sonucun  $p$  değeri  $<0,05$  olduğundan sonuçlarımız anlamlı kabul edilmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, akciğer kanser hücrelerinde kemoterapi ajanı kullanılması sonucunda meydana gelen apoptosisin görüntülenmesinde  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat potansiyeli in vitro incelenmiştir.

Glukoheptonat'ın  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenmesiyle oluşturulan  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat'ın radyoişaretleme verimi  $\%90,66 \pm 4$  olarak saptanmıştır.

Hazırlanan A549 akciğer tümör hücre hatları için kemoterapi ajanımız olan Cisplatinin sitotoksitesi Tripkan Mavis Boyası ile belirlenmiş ve A549 hücre hattı için  $\text{IC}_{50}$  değeri  $15 \mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Bu değere göre, Cisplatin kullanımıyla hücrelerimiz apoptoza uğratılmıştır.

Oluşan apoptosisin Annexin V ve TUNEL yöntemleri kullanılarak yeşil ve kırmızı floresans etkili mikroskop ile tespit edildi. Annexin V Metodu ile Cisplatinin etkin dozu  $\text{IC}_{50}$  değeri olan  $15 \mu\text{M}$ 'deki canlı hücre sayısı ile Cisplatin uygulanmayan kontrol grubundaki canlı hücre sayısı yüzdeleri karşılaştırıldığında, yaklaşık  $\% 50$  oranında azalma ile  $\% 38,93$ 'e düştüğü görüldü. Bu değerdeki erken apoptos hücre yüzdesinin  $\% 23,51$ , geç apoptos hücre yüzdesinin ise  $\% 19,85$  olduğu izlendi.  $\text{IC}_{50}$  değerinin alt ve üst değerleri olan  $10 \mu\text{M}$  ve  $20 \mu\text{M}$ 'daki canlı hücre yüzdeleri sırasıyla  $\% 58,53$ ,  $\% 19,11$  olarak bulundu. Kontrol hücresinde ise canlı hücre yüzdesi  $\% 71,2$ 'dir.

DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometrik TUNEL Testi sonuçlarına bakıldığında, kontrol hücrelerinde apoptotik hücre oranının  $\% 12,49$  iken  $20 \mu\text{M}$  Cisplatin uygulamasından sonraki apoptosa uğrayan hücre oranının  $\% 73,85$ 'e çıktığını görülmektedir.  $15 \mu\text{M}$  Cisplatin miktarında ise  $\%$  apoptotik hücre oranı  $\% 53,38$ 'dir.

Elde ettiğimiz bu sonuçlardan, Cisplatin'in A549 hücre hatları üzerinde etkin olduğu saptanmıştır. Sonrasında bu sonuçlar Bradford Protein Analizi ile desteklenmiştir.

Cisplatin'in üç farklı dozuna maruz bırakılan A549 hücre hattında  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat tutulumu incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan, Cisplatin uygulanmasıyla apoptotik hücre sayısında artış, canlı tümör hücre sayısında ise

azalış gözlemlendi.  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat'ın tutulum yüzdeleri (%ID), kontrol grubunda %7,59 iken 10  $\mu\text{M}$ 'da % 6,51, 15  $\mu\text{M}$ 'da 3,58, 20  $\mu\text{M}$ 'da ise % 3,53 olarak bulundu. Bu sonuçlar bize, kemoterapinin etkisiyle akciğer tümör hücrelerinde apoptozun arttığı ve  $^{99m}\text{Tc}$  - Glukoheptonat tutulumlarının azaldığını göstermektedir. %ID/Protein (g) oranı incelendiğinde, kontrol hücreleri için bu oran % 4,72 iken Cisplatin'in  $\text{IC}_{50}$  dozu olan 15  $\mu\text{M}$  için ise % 6,31 olarak bulundu. Apoptosun artışıyla A549 akciğer tümör hücrelerinde tutulum gösteren  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat'ın tutulumunda azalışa sebep olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak, tedavi sonrasında oluşan apoptos  $^{99m}\text{Tc}$ -Glukoheptonat ile dedeksiyon edilebilir.

Sonuç olarak, A549 akciğer tümör hücrelerine uygulanan tedavi sonrasında oluşan apoptosin dedeksiyonu için  $^{99m}\text{Tc}$  - Glukoheptonat'ın potansiyeli olduğu ve görüntüleme ajanı olarak kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

**Aktolun C, Bayhan H, Papuççu Y, Bilgiç H, and Acar H.,** 1994, Assesment of tumour necrosis and detection of mediastinal lymph node metastasis in bronchial carcinoma with technetium-99m-sesta-MIBI imaging: Comparison with CT-scan, Eur J Nuc Med., 21: 973-9.

**Alli E., Bash-Babula J., Yang J., Hait W. N.,** 2002, Effect of Stathmin on the Sensitivity to Antimicrotubule Drugs in Human Breast Cancer, Cancer Research 62, 6864–6869.

**Antar, V.,** 2005, 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.

**Aral H.,** 1996, Apoptotik hücrelerin tanınma yöntemleri.Sendrom, 38-42.

**Babbar A.K., Sharma R.K.,** 2003, Formulation Of Lyophilized Cold Kit For Instant Preparation Of <sup>99m</sup>Tc-Glucarate And Its Scintigraphic Evaluation In Experimental Models Of Infarction, Indian Journal Of Pharmacology, 35: 13-20.

**Balakumran A, Champbell GA, Maslen MT.,** 1996, Calcium channelblockers induce thymic apoptosis in vivo in rats, Toxicol Appl Pharmacol 139: 122-127.

**Barai,S et al.,** 2005, Evaluation of Tc99m-Glucoheptonate for SPECT functional imaging of medulloblastoma, Journal of Clinical Neuroscience, 12(1), 36–38.

**Barai,S et al.,** 2005, Thallium-201 versus Tc99m-Glucoheptonate SPECT for evaluation of recurrent brain tumours: a within-subject comparison with pathological correlation, Journal of Clinical Neuroscience, 12(1), 27–31.

**Bardakçı F,** 2007, Yenidünya A F., Moleküler biyoloji teknikleri 1:Nükleik asit analiz teknikleri (in) MolekülerBiyoloji. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör), Nobel Yayın, Ankara, 519-553.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)**

**Belhocine T, Steinmetz N, Hustinx R, et al.,** 2002, Increased uptake of the apoptosis-imaging agent (99m)Tc recombinant human Annexin V in human tumors after one course of chemotherapy as a predictor of tumor response and patient prognosis, *ClinCancer Res.*, 8:2766-2774.

**Bellamy C O, Malcomson, R D, Harrison, D J, Wyllie A H.,** 1995, Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis, *Cancer Biology*, 6: 3-16.

**Boring CC, Squires TS, Tong T.,** 1992, Cancer Statistic, *CA Cancer J.Clin.*, 42:19-38.

**Cohen JJ.,** 1993, Apoptosis, *Immunol Today*, 14: 126-130.

**Cohen J. J.,** 1998, Apoptosis. To be or not to be. Postgraduate Syllabus (AAAA-I);1:1-19.

**Cummings M C, Winterfold C M, Walker N I.,** 1997 Apoptosis, *Am. J. Surg. Pathol.*, 21: 88–101.

**Demir G.,** 2007, Akciğer Kanserinde Kemoterapi, Türkiye'de Sık Karşılaşılan Hastalıklar II Sempozyum Dizisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıp Eğitimi ABD, S.175-178.

**Denoyer D.,** 2004, in vitro and in vivo evaluation of the influence of type III NaPi co-transporter activity during apoptosis on 99m Tc-(V)DMSA uptake in the human leukaemic cell line U937, *Eur J Nucl Mol Imaging*, 31:1421-1427.

**Elmore S.,** 2007, Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 35(4): 495–516.

**Ernster VL, Mustacchi P, Osann KE.,** 1994, Epidemiology of Lung Cancer. In: Murray JF, Nadel JA; eds. *Textbook of Respiratory Medicine*, Vol 2. W.B. Saunders Company: Philadelphia 1504-2.

**Güleş,Ö.,Eren,Ü.,** 2008, Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2) 73-78.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)**

**Gümüşer, G.**, 1997, Primer Akciğer Kanserli Vakalarda Tc-99m-MIBI ve Tc-99m(v) DMSA'nın Bilgisayarlı Tomografi İle Karşılaştırılması, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Edirne.

**Haas RLM, Valdés-Olmos RA, De Jong D, Zerp SF, Van den Heuvel IJ, Hoefnagel CA, Bartelink H, Verheij M.**, 2003, Radiation induced apoptosis in follicular lymphoma patients assessed by <sup>99m</sup>Tc-Annexin V scintigraphy [abstract], Eur J Nucl Med Mol Imaging, 30(Suppl 2):S197.

**Hofstra L, Dumont EA, Thimister PWL, et al.**, 2001, In vivo detection of apoptosis in an intracardiac tumor, J Am Med Assoc., 285:1841–2.

**Keen H, Dekker B, Disley L, Hastings D, Lyons S, Smith N, Zweit J, Watson, A.**, 2003, Iodine-124 labelled annexin V for PET imaging of in vivo cell death, J Nucl Med., 44(5):180.

**Klein et al.**, 1981, Comparison of Technetium <sup>99m</sup>Tc-Glucoheptonate with Conventional Arteriography, Southern Medical Journal, Renal Imaging, 74:2.

**Kockx M M, Muhring J, Knaapen M W M, de Meyer G R Y.**, 1998, RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis, Am. J. Pathol., 152: 885.

**Kressel M, Groscurth P.**, 1994, Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA, Cell Tissue Res., 278: 549–56.

**Küçükaltun S.**, 2007, Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı'nda Havayolu Epitel Hücreleri, Lenfosit, Nötrofil Ve Makrofaj Apoptosisi, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ABD, Adana.

**Lahorte C, Van de Wiele C, Bacher K, et al.**, 2003, Biodistribution and dosimetry study of <sup>123</sup>I-rh-Annexin V in mice and humans, Nucl Med Commun., 24:871–80.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)**

**Lahorte C.,Vanderheyden J., Steinmetz N., Wiele C., Dierckx R., Slegers G.,** 2004, Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 31:887–919.

**Liang J., et al.,** 2008, Early Chemotherapy Response Evaluation in Tumors by  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-DG, *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, Vol.23(3).

**Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P.,** 2000, Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis, *Spine*, 25: 1859-1866.

**Majno G, Joris I.,** 1995, Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death, *Am. J. Pathol.*, 146: 3-15.

**Mak T ,The E.** 2003, Donnall Thomas Lecture-apoptosis: "tis death that makes life live", *Biol. Blood Marrow Transplant*, 9:483-8.

**Mochizuki T, Kuge Y, Zhao S, et al.,** 2003, Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with  $^{99m}\text{Tc}$ -annexin, *V. J Nucl Med.*, 44:92-97.

**Nicholson D. and Thornberry N.,** 2003, APOPTOSIS:Life and Death Decisions,*Science*,Vol. 299. no. 5604, pp. 214 – 215.

**Ohtsuki K, Akashi K, Aoka Y, Blankenberg FG, Kapiwoda S, Tait JF, Straus H.W.,**1999, Technetium- $^{99m}\text{Tc}$  HYNIC-annexin V:a potential radiopharmaceutical for the in vivo detection of apoptosis, *Eur J Nucl Med.*, 26,1251–8.

**Öniz H.,** 2004, Apoptoz: Ölmeye yatmak, *SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi*, 14(1).

**Perek,N. ,Sabido,O. et al.,** 2008, Could  $^{99m}\text{Tc}$ -glucarate be used to evaluate tumour necrosis?, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35:1290–1298 DOI 10.1007/s00259-007-0689-6.

**Pınarbaşı E.,** 2007, Apoptosis (Programlı Hücre Ölümü), *Moleküler Biyoloji, Nobel Yayın*, 423–468.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

**Piret J P, Arnould T, Fuks B, Chatelain P, Remacle J, Michiels C.,** 2004, Caspase activation precedes PTP opening in TNF-a-induced apoptosis in L929 cells, Mitochondrion3, 261-278.

**Schwartzman R A, Cidloski J.A.,** 1993, Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death, Endocrine Reviews, 14: 133–144.

**Tait JF, Gibson D.,** 1994, Measurement of membrane phospholipid asymmetry in normal and sickle-cell erythrocytes by means of annexin V binding, J Lab Clin Med., 123:741–8.

**Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C.,** 1998, Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure, Mol. Hum. Reprod., 4: 757.

**Uludağ Üniversitesi Sağlık Kuruluşları,** 2007, Çocuk Sağlığı ABD, FR-HYE-04-416-07.

**Ünlü, M., Akdemir, Ü.Ö.,** 2003, Akciğer Kanserlerinin Moleküler Biyolojisi Ve Nükleer Tıp Görüntüleme Yöntemleri, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Solunum, 5:153-166.

**Vorne M., Sakki S., Jarvi K., and Vahatalo S.,** 1982, Tc-99m Glucoheptonate in Detection of Lung Tumors, J Nucl Med., 23: 250–254.

**Yalınay M.A., İmir T. ,**1995, Apoptosis, T. Klin.Tıp Bilimleri, 15: 319-326

**Zhao M.,Li Z.,Bugenhagen S.,** 2008, <sup>99m</sup>Tc-Duramycin as a Novel Phosphatidylethanolamine-Binding Molecular Probe, The Journal Of Nuclear Medicine 49,8 pg:1345.

**Zhu X, Wu H, Xia J, Zhao M, Xianyu Z.,** 2002, The relationship between (99m)Tc-MIBI uptakes and tumor cell death/proliferation state under irradiation, Cancer Lett, 182:217–222.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)**

**Biyologlar forumu**, [www.biyologlar.com](http://www.biyologlar.com). (erişim tarihi:05.05.2010).

**İnönü Üniversitesi**, 'Radyofarmasinin Prensipleri', <http://web.inonu.edu.tr/~ekaraca/Rad.farma.not.htm> (Erişim tarihi: 22 Nisan 2010).

**MONROL**, [www.monrol.com.tr](http://www.monrol.com.tr) (erişim tarihi:05.05.2010).

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gamze KOCAGÖZOĞLU

Doğum Yeri: İzmir

Doğum Yılı: 26.02.1983

### Öğrenim Durumu:

Lisans: 2001–2005 Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya  
Bölümü

Tezsiz Yüksek Lisans: 2007–2008 Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Fen-Matematik  
Alanlar Eğitimi, Kimya Öğretmenliği

Yüksek Lisans: 2008- Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer  
Uygulamalar ABD

### Mesleki Durum:

2007–2008: Ecelak Boya ve Organik Kaplamalar, Laboratuar Sorumlusu,  
Kimyager.

2009- : İzmir Büyükşehir Belediyesi, İZSU, Laboratuar Sorumlusu, Kimyager.