

Ellajik Asidin C6 Hücrelerinde Canlılık, DNA Hasarı,

Apoptoz ve Nekroz Üzerine Etkileri

Aboubacar DIOP

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Eylül 2013

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAY

Aboubacar DIOP’un “Ellajik asitin C6 hücrelerinde canlılık, DNA hasarı, apoptoz ve nekroz etkileri ”başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 20.09.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	:Prof.Dr.Hatice Mehtap KUTLU	
Üye	:Doç. Dr. Filiz SUSUZ	
Üye	:Doç.Dr. Adnan AYHanci	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim kurulu’nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ELLAJİK ASİDİN C6 HÜCRELERİNDE CANLILIK, DNA HASARI, APOPTOZ VE NEKROZ ÜZERİNE ETKİLERİ

Aboubacar DIOP

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr.H. Mehtap KUTLU

2013, 85 Sayfa

Epidemiyolojik araştırmalar sebze ve meyvelerden zengin diyet ile beslenme ve hastalıklar, özellikle kanser ve kardiyovasküler bozukluklar arasında ciddi bir bağlantı olduğunu belirtmektedir. Bitkisel ağırlıklı beslenmede sağlıklı hücrelerin yaşamını devam ettiren en önemli maddeler sebze ve meyvelerin içerdikleri fitokimyasallar ve biyoaktif maddelerdir. Özellikle çilekçiller gibi koyu renkli meyvelerde bolca bulunan ellajik asit ve flavanoidlerden antosiyanin, kateşin, quersetin ve kampferol bunlardan en önemlileridir. Çilekçillerde bulunan bileşikler potansiyel, çok güçlü antioksidan güce sahiptirler. Antioksidanlar LDL-kolesterol oksidasyonunu inhibe ederek kardiyovasküler hastalık riskini ve tromboz riskini azaltmaktadırlar. Buna ilave olarak bu aktif maddelerin COX (siklooksijenaz) enzim sistemlerini in vitroda inhibe ettikleri, karsinogenezin başlangıcını, ilerlemesini durdurduğu ve tümör hücrelerinin çoğalmasını engellediği belirtilmiştir.

Bizim çalışmayı planladığımız C6 beyin glioma hücre hattında ellajik asidin canlılık, DNA hasarı, apoptotik ve biyokimyasal olarak, özellikle hücre ince yapısı üzerine çok az çalışıldığı gözlenmiştir. Bunun nedenle C6 glioma hücrelerinde ellajik asidi öncelikle hücre proliferasyonuna, hücresel ince yapı değişikliklerine, organel yapıları ve hücrelere olan sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırdık.

Anahtar Kelimeler: Ellajik asit, Kanser, Apoptoz, MTT, TEM, Konfokal Mikroskop.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

EFFECTS OF ELLAGIC ACID ON VIABILITY, DNA DAMAGE, APOPTOSIS AND NECROSIS ON C6 CELLS

Aboubacar DIOP

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Supervisor: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

2013, 85 Pages

Epidemiological researches stated that there is a compact relation between a diet rich in fruits and vegetables and diseases, in particular cancer and cardiovascular abnormalities. In plant-based diet main substances which make healthy cells keep living are phytochemicals and bioactive contents of vegetables and fruits. The most of all are ellagic acid specially in dark fruits as berries and flavanoids as anthocyanin, catechin, guercetin and camphenylol. These compounds arrest strong potent of antioxidant function. Antioxidants inhibiting LDL-cholesterol oxidation decrase the risk of cardiovascular diseases and thrombosis. In addition, it is stated that these compounds inhibiting COX enzyme systems in vitro, interrupt the onset and progression of the carcinogenesis and prevent tumor cell proliferation. Since time, it is known that there is a relation between nutrition and diseases. In the present on believe that food play big role on health. It is observed that the number of researches on apoptotic and biochemical effects of ellagic acid on C6 glioma cell present study too low. To this respect, we planned to research cytotoxic and apoptotic effects of ellagic acid, initially on cell proliferation, fine structural differentiation of cells, organel structures and on whole cells.

Keywords: Ellagic acid, Cancer, Apoptosis, MTT, TEM, Confocal Microscope.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. APOPTOSİS	2
1.1.1. Apoptozun Temel İşlevi ve Amaçları.....	3
1.1.2. Apoptozun Biyokimyası.....	5
1.1.3. Hücre Ölümünün Sınıflandırılması	6
1.1.4. Hücre Siklusu ve Apoptozis	8
1.1.5. p53 Aracılı Apoptosis.....	10
1.1.6. Apoptozis Kontrol Noktaları.....	11
1.1.7. Apoptozise Karşı Mekanizmalar.....	12
1.1.8. Kanser ve Apoptoz İlişkisi.....	13
1.1.9. Apoptosis ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	14
1.1.10. Apoptozisin Saptamasında Kullanılan Yöntemler.....	18
a. KANSER	19
1.2.1. Kanser Hücrelerinin Genel Özellikleri.....	20
1.2.2. Kanserin Oluşum Mekanizmaları.....	22
1.2.3. Kanser ve Beslenme.....	24

1.2.4. Kanseri Tedavisi ve Kullanılan Yöntemler.....	25
1.2.5. Kanseri Tipleri.....	26
1.2.6. Hücre Siklusu ve Kanseri	27
1.2.7. Hücre Siklus Kinazları.....	28
1.2.8. Normal Hücrelerde G ₁ -S Geçiş'i.....	30
1.2.9. Normal Hücrelerde G ₂ -M Geçiş'i	34
1.2.10. DNA'sı Hasarlı Hücrelerin G ₂ -M Geçiş'i.....	34
1.2.11. Normal Hücrelerde Mitoz İplikçik Kontrol Noktası.....	35
1.2.12. Kanseri ve Kontrol Noktası İnaktivasyonu.....	36
1.2.13. DNA'sı Hasarlı Kanseri Hücrelerinde G ₁ -S Geçiş'i	36
1.2.14. Kanseri Hücrelerinde G ₂ -M Geçiş'i	38
1.2.15. Kanseri Hücrelerinde Mitoz İplikçik Kontrol Noktası	39
1.2.16. Türkiye'de Kanseri ile Savaş	40
b. ELLAJİK ASİT	42
1.3.1. Ellajik Asitin Kimyasal Özellikleri	42
1.3.2. Ellajik Asitin Kullanım Alanları	43
1.3.3. Ellajik Asitin Biyokimyasal Önemi	44
c. HÜCRE KÜLTÜRÜ	45
1.4.1. Hücre Kültürü Nedir?	45
1.4.2. Hücre Kültürü Tarihçesi	46
1.4.3. Hücrelerin İnkübasyonu ve Bakımı	46

1.4.4. Hücrelerin Çoğaltılması ve Stoklanması.....	47
1.4.5. C6 Hücrelerinin Özellikleri.....	48
1.5 SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ	49
1.5.1. MTT Testi.....	49
2. MATERYAL VE METOD	
2.1. MATERYAL	51
2.1.1. Hücre Serileri.....	51
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	51
2.1.3. Kullanılan SarfMalzemeleri.....	51
2.1.4. KullanılanCihazlar.....	51
2.2. METOD	52
2.2.1. Hücre Kültürü.....	52
2.2.1.1. Sterilizasyon.....	52
2.2.1.2. Kullanılan Besiyeri ve Hazırlanışı.....	52
2.2.1.3. Hücre Serilerinin Kültür Edilmesi.....	52
2.2.1.4. Hücre Serilerinin Pasajlanması.....	53
2.2.1.5. Hücre Serilerinin Stoklanması.....	53
2.2.1.6. Hücrelerin Sayımı.....	54
2.2.2. Ellajik Asit Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve Hücre Serileri ile Etkileşimi.....	54
2.2.3. MTT Sitotoksite Testi(3-[4,5- Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide).....	55
2.2.4. IC ₅₀ Değerinin Hesaplanması.....	56

2.2.5. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) İle İnce Yapısal Değişikliklerin İncelenmesi.....	56
2.2.6. Konfokal Mikroskop İle Hücresel Değişikliklerin İncelenmesi	58
2.2.7. İstatiksel Değerlendirme	59
2.2.8. Hücrelerin Parafin Takibi	59
2.2.9. Brdu ile İmmünohistokimyasal Boyama.....	59
3. BULGULAR	
3.1. MTT Sitotoksikite Bulguları.....	61
3.1.1. Ellajik Asitin C6 Hücrelerinde Doz ve Sitotoksik Etkisinin DeğerlendirmeBulguları.....	61
3.2. Konfokal Mikroskop ile Morfolojik İncelenme Bulguları.....	62
3.2.1. Ellajik Asitin EC50 Değerinin C6 Hücrelerindeki Yapısal Değişikliklerin Konfokal Mikroskobu İnceleme Bulguları.....	62
3.3. Geçirimli Elektron Mikroskop ile İnce Yapısal Değişiklik İnceleme Bulguları.....	65
3.4. BrdU Uygulanan Kesitlerin İncelenmesi.....	69
4 . TARTIŞMA VE SONUÇ	71
KAYNAKLAR	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Hücre Siklusu ve Apoptozis.....	10
Şekil 1.2: Apoptozis kontrol noktaları.....	12
Şekil 1.3: Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü mekanizmalarının karakteristik özellikleri	16
Şekil 1.4: Hücre siklusunda siklinler ve etkileşime girdikleri proteinler	30
Şekil 1.5: Hücre siklusu ve CDK (Siklin Bağımlı Kinazlar)	32
Şekil 1.6: Ellajik Asitin Kimyasal Yapısı.....	43
Şekil 3.1: C6 hücrelerinin 24 saatlik ellajik asit muamelesinden sonra konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği.....	62
Şekil 3.2: Ellajik asitin IC ₅₀ konsantrasyonunun 24 saatlik uygulamasından sonra Akridin oranj -Falloidin ile boyanmış C6 hücrelerinin konfokal mikroskop ile görüntülenmesi	63
Şekil 3.3: C6 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskoptaki Görüntüleri.....	64
Şekil 3.4: Ellajik asitin IC ₅₀ konsantrasyonunun 24 saatlik uygulamasından sonra akridin oranj ile boyanmış C6 hücrelerinin konfokal mikroskoptaki görüntüleri	64
Şekil 3.5: Kontrol grubu C6 hücrelerinin elektron mikroskobik yapıları.....	66
Şekil 3.6: Ellajik asitin IC ₅₀ değeri ile 24 saat muamele edilmiş C6 hücrelerinin elektron mikroskobundaki görüntüsü çekirdek membranında büzüşme.....	67
Şekil 3.7: Ellajik asitin IC ₅₀ değeri ile 24 saat muamele edilmiş C6 hücrelerinin Elektron mikroskobundaki görüntüsü mitokondrilerde krısta kaybı.....	68
Şekil 3.8: Ellajik asitin IC ₅₀ değeri ile 24 saat muamele edilmiş C6 hücrelerinin BrdU uygulamasından sonra görüntüsü (63 x)	69

Şekil 3.9: Ellajik asitin IC ₅₀ değeri ile 24 saat muamele edilmiş C6 hücrelerinin BrdU uygulamasından sonra görüntüsü, (A ;B ;C 40 x).....	70
Şekil 3.10: Ellajik asitin uygulanmamış C6 hücrelerinin BrdU uygulamasından sonra görüntüsü, (10 x)	71

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1: Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması. TNRF-1, (tümör nekrozufaktörü).....	16
Tablo 3.1: Ellajik asidin uygulandığı C6 hücrelerinin 24 saat için uygulanan konsantrasyonları ve canlılık yüzdeleri.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIF : Apoptoz indükleyici faktör

AO : Akridin oranj

Apaf-1: Apoptotic protease activating factor

CDK : Siklin bağımlı kinazlar

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

EA : Ellajik Asid

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

FBS : Fetal Bovine Serum

H₂O₂ : Hidrojen Peroksit

MTT : 3-(4,5-dimitiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrozolyum bromit

PBS : Phosphate buffered salina

RNA : Ribo nükleik asit

TEM : Geçirimli Elektron Mikroskop

TNF : Tumor necrosis factor

μM : Mikromol

1. GİRİŞ

Ellajik asit, kansere karşı güçlü savaşıma yeteneği olan önemli bir fitokimyasal olup kanser üzerindeki etkisi halen tartışılan bir konudur. Fitokimyasalların metabolik hastalıklara ve kansere karşı vücudu nasıl koruduklarının tam olarak anlaşılabilmesi için bu hastalıkların oluşum ve gelişim aşamalarının yanı sıra fitokimyasal etki mekanizmalarının da çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Hayvan çalışmalarında da oluşturulan kanser modellerinde ellajik asitin anti kanser etkisi çalışılmıştır. Örneğin yeni doğan farelere benzo (a) pyrene ve benzo (a) pyrene diol epoksid karsinogenleri uygulanmış ve ardından ellajik asit ile muamele edilerek %44-75 oranında akciğer tümörlerinin gerilediği gözlenmiştir. Yine başka bir çalışmada, topikal olarak kullanılan ellajik asidin fare deri kanserlerini % 59-66 azalttığı bulunmuştur (Chang ve ark., 1985). Bir başka çalışmada N-2 Fluorenylacetamide ile indüklenen ratlarda, diyetle 400 ppm ellajik asit verilmiş ve karaciğerde oluşan kanserin ilerleyişini durdurduğu gözlenmiştir (Tanaka ve ark. 1988). Ellajik asit in vitro da MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde kemopreventif olarak bulunmuştur (Smith ve ark. , 2001). Ellajik asitin aynı zamanda aflatoksin B mutajenitesini de rat ve insan dokularında inhibe edici özelliği bulunmuştur (Mandal ve ark., 1987).

Ellajik asidin çeşitli etkileri üzerinde dünyada birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri, ellajik asidin sıçan C6 glioma hücre dizisi üzerindeki etkileri, doz ve zamana bağlı olarak iki boyutlu hücre kültürü kullanılarak araştırılmıştır. İki boyutlu hücre kültürlerinde hücre yaşama yeteneği ve hücre çoğalması üzerinde ellajik asitin baskılayıcı etkisi olduğu görülmüştür (Ekinci ve ark., 2012). Hannum ve ark., (2004) epidemiyolojik araştırmalar yapmış ve daha çok meyve tüketen insanlarda kanserin tedavisinde ellajik asitin etkisini ortaya koymuşlardır. Bu meyvelerin genellikle zengin ellajik asit içerikli meyveler olup kanserin önlenmesi ve tedavisinde etkili oldukları görülmüştür (Hannum 2004). Yapılan diğer bir araştırmada, alkol tüketimine bağlı olarak gelişen oksidatif stresin ellajik asit tarafından azaltıldığı ve ellajik asidin antioksidan ve hücre koruyucu etkileri olduğu bulunmuştur (Devipriya ve ark., 2007).

Fenolik asitler, hidroksi benzoik asit ve hidroksi sinnamik asit olmak üzere iki büyük gruba ayrılırlar. Enzimsel aktivitelerin kontrolü, nitrozaminlerin oluşumlarının engellenmesi ve kan lipid düzeyi dengesizliklerinin giderilmesinde aktif rolü vardır. Karotenoidlerin, bir antioksidan gibi davranarak oksidatif kaynaklı hasarı önemli derecede azalttığı, DNA sarmal kırılmalarını önlediği ve kanser önleyici etkinliğinin de olduğu kabul edilmektedir. Polifenoller, izoflavonlar ve flavanoidler antioksidan etkinliği kanıtlanmış mikrobeyinlerdendir. Bu özellikleri nedeniyle fitokimyasallar oksidasyonun zararlı etkilerine karşı LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) oksidasyonunu inhibe ederek hücreleri korur. Aynı zamanda başta polifenoller olmak üzere, izoflavonlar ve flavonoidler gibi bazı fitokimyasallar maddelerin steroidlerin metabolik profilini ve p-450 substratlarını değişime uğraticı etki gösterdikleri belirlenmiştir (Devipriya ve ark. 2007).

Biz C6 glioma hücre hattında ellajik asidin canlılık, DNA hasarı, apoptotik ve biyokimyasal olarak, özellikle hücre kültürlerinde hücre ince yapısı üzerine çok az çalışıldığını gözlemledik. Bunun üzerine C6 glioma hücrelerinde ellajik asiti satın alarak öncelikle hücre proliferasyonuna, hücresel ince yapı değişikliklerine, organel yapıları ve hücrelere olan sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırdık. Ayrıca apoptotik olarak parafin bloklama ile BrdU işaretleme ile apoptozun tespitini amaçladık. Sonuç olarak C6 glioma kanser hücrelerinin 24 saatlik bir periyotta en uygun dozu saptadık, IC₅₀ değeri ile ellajik asit muamelesi sonucunda, hücrelerin canlılıkları, apoptotik hücrelerin belirlenmesi ve ince yapı organizasyonundaki değişiklikler belirlendi.

1.1. APOPTOZİS

Apoptozis, hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (Akşit ve Bildik 2008). Köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir ve eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına

gelmektedir. Apoptozis ve mitozis dokuda sürekli bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir. Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır (Yılmaz 2005).

1.1.1. Apoptozun Temel İşlevi ve Amaçları

Apoptoz komşu hücrelere hasar vermeden ve onları kötü yönde etkilemeden ve iz bırakmadan hedeflenen hücrenin yok edilmesidir. Bu şekilde:

- a. Embriyo gelişimi, başkalaşım (metamorfoz) ve doku atrofisi sırasında olduğu gibi, gelişimi sırasında da organizmaya, bir heyketrtaş titizliğinde ince bir mimariyle şekil verilir.
- b. Organizmanın toplam hücre sayısı düzenlenir.
- c. Tümör hücreleri, virüsle kontamine olmuş hücreler, kendi başına buyruk hale gelen ve kendine zarar veren immün hücreler (ki bunlar otoimmün hastalıklara yol açabilir) istenmeyen ve tehlike oluşturabilirler (Elmor 2007).

Her gün bir insanda mitozla oluşan on milyar hücreyi dengelemek için her gün on milyar hücre ölmelidir. Bu rakam organizmadaki hücrelerin %5'ini oluşturur. Hücreler apoptoz ile arkalarında iz bırakmadan 15-120 dakika içinde ölürlər (Gültekin ve ark. 2008). Apoptoz ve sağ kalım mekanizmalarının anlaşılması, biyolojik bilimler alanında, yeni bin yılın ilk yıllarından itibaren devrim niteliğinde gelişimlere yol açmıştır. Apoptoz organizmanın nükleuslu hücrelerinde genetik olarak programlanmış bir hücre ölümü şeklindedir. Bu hücre ölüm şekli, hücrenin nekroz ve kompleman lizisiyle yok oluşundan farklı mekanizmalarla oluşmaktadır. Apoptozda komşu hücreler hiçbir zarar görmez. Doğadaki birçok canlının embriyo döneminden yaşlanıp ölüncüye kadarki yaşam süreçlerinde görülen sayısız biyolojik olayların ve hastalıkların ortaya çıkma mekanizmalarında, herhangi bir nedenle stabilitesi bozularak, artık organizma için zararlı hale gelen hücrelerin yok oluş evrelerinde apoptoz ve sağ kalım mekanizmaları çok büyük önem taşır. Apoptoz ve hücre sağkalımının hücresel mekanizmalarının ortaya konması, kalp hastalıkları, kanser, nörodejeneratif

hastalıklar, AIDS ve birçok hastalığın tedavisinde yeni tedavi stratejilerinin ortaya atılmasına olanak sağlamıştır. Böylece, dejeneratif tıp olanakları, rejeneratif tıbbın getirdiği kök hücre ve somatik hücre nükleer transferi gibi yeni tedavi imkanlarıyla birlikte kullanıldığında, gelecekte rasyonel tedavi yöntem ve ufukları da yaratılabilecektir (Pınarbaşı 2007).

Kaspaz adı verilen intrasellüler proteazlar, apoptozisin morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerinden sorumludur. Kaspazlar yapılarına ve substrat spesifitelerine göre gruplandırılabilir. Bu proteazlardan oluşan hücre içi kaskadın çeşitli yollarla aktive edilmesinin ardından, yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır (Altunkaynak 2008).

Apoptotik ölüm sinyali alan hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar. Benzer şekilde sitoplazma da yoğunlaşmaya ve hücrenin boyutları küçülmeye başlamıştır. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik denilen daha küçük parçalara bölünür. Bu parçaçıkların en büyük özelliği, fragmente olmuş nükleusların ve parçalanmış hücreye ait tüm yapıların plazma membranı ile kaplanarak immün sistemi enflamasyon yönünde uyarılamamasıdır. Apoptotik cisimcikler, yüzeylerinde yeni sinyal yapıları ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile yandaki hücre tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır (Fischer 2005).

Apoptozis normal gelişimsel süreç içerisinde pek çok fizyolojik olayda görev alır. Embriyogenesis, normal menstruel döngüde endometriyum hücrelerinin yıkımı, barsak kripta epitelleri gibi sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi, timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması, bunlardan sadece birkaçıdır. Apoptotik hücre ölümü regülasyonundaki bozukluklar hücre birikiminin olduğu kanser, gibi hastalıklara yol açabildiği gibi, hücre yıkımının arttığı otoimmün rahatsızlıklar, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer gibi rahatsızlıklara da yol açabilmektedir (Ekshyvan 2004).

Son yıllarda yürütülen araştırmalar sonucunda, apoptozisten sorumlu moleküler mekanizmalar açıklığa kavuşmuştur. Bu çalışmalar sonucunda, kaspaz

adı verilen, hücre içi proteazların; apoptosisin gerek doğrudan, gerekse dolaylı olarak morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerinden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur (Fischer 2005).

Kaspazlar apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein proteaz grubu enzimlerdir. Kaspaz kelimesi “Cysteine Aspartate Specific Proteases” kelimelerinden türetilen bir terimdir. Öncelikle inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilmelerinin ardından hücresel hedeflerdeki tetrapeptit motifleri tanır ve substratı, bir aspartat rezidüsünün karboksil tarafından ayırır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücresel ve morfolojik değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı bir takım süreçler neticesinde gelişir. Kaspaz-1, kaspaz ailesinin prototipidir ve önceleri prointerlökin-1-beta'nin biyolojik aktif formuna dönüşümünden sorumlu, ICE (interlökin-1-beta dönüştürücü enzim) olarak da adlandırılan, bir sistein proteaz olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları ise ICE'nin diğer sistein-proteazlardan farklı olarak amid bağının N-terminalindeki p1 pozisyonu olarak bilinen ucunda aspartik asitin mutlak gerekliliğini gerektiren farklı bir sistein-proteaz olduğu keşfedilmiştir (Erenoğlu 2012). ICE'nin inflamasyondaki rolü geniş bir şekilde aydınlatılırken bir taraftan da hücre ölümünden sorumlu genetik yoldaki rolü ortaya konmuştur. Bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ın üzerinde yapılan bu çalışmada, hücre ölümü sırasında görev alan genetik yolda ced-3 isimli bir genin kodladığı protein hermafroditin gelişimi esnasında tüm programlı hücre ölümünden sorumlu olduğu gözlenmiştir (Kandaş 2004). Filogenetik analiz sonucunda gen ailesinin ICE (kaspaz1) ile ilişkili ve ced-3 benzeri olmak üzere iki sub grubu olduğu görülür. Proenzimlerin kısa (kaspaz 3, 6, 7) veya uzun prodomain barındırmalarına göre de kaspazları daha alt gruplara ayırmak mümkündür. Alternatif olarak bu proteazlar, substrat spesifitelerine göre de gruplandırılabilir modern yaklaşım ise proteazları üç gruba ayırmaktadırlar (Beril ve ark. 2013).

1.1.2. Apoptozun Biyokimyası

Tanımlandığı günlerden bu yana geçen yaklaşık 40 yıl içinde apoptozun canlılarda önemli ölçüde korunan ve hem temel adımlar, hem de uygulayıcı

proteinlerdeki özdeş yapılar açısından birbirine benzeyen genetik bir yolla belirlendiği saptanmıştır. Apoptoz temel olarak iki yolla başlatılır:

1. Hücre dışından tetiklenen pozitif (TNF varlığı) ya da negatif (büyüme faktörü yokluğu) ekstresek yol.
2. Hücre içinde DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi ya da mitokondriden tetiklenen intrinsik yol. Mitokondri aracılığıyla düzenlenen hücre içi yol aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortaklaştığı bir mekanizma oluşturur. İster hücre içi, isterse hücre dışı mekanizmayla başlamış olsun, apoptotik süreç kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Kaspazlar, bugüne dek bir düzine farklı türü tanımlanan, sitoplazmada inaktif proenzimler halinde bulunan, aktif katalitik bölgesinde sistein içeren ve substratlarını aspartat içeren özgül bir bölgeden kesen proteaz enzimlerdir (Solakoğlu 2009).

Apoptozis, hücre zarındaki bileşiklerin azalmasıdır. Kromatin yoğunlaşması, mitokondriyal şişme ve makrofajlar ya da organın komşu hücreleri tarafından hücrenin fagositik olarak ortadan kaldırılmasıyla morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptozisin, hem embriyonel gelişimde hem de olgun dokuların bütünlüğünün sağlanmasında önemi büyüktür. Romaoid artrit, kanser viral enfeksiyonları gibi hastalıklarda hasarlı enfekte ya da neoplastik hücrelerin ortadan kaldırılması için apoptozis, organizmanın savunma sistemi olarak rol oynamaktadır. Diğer yandan apoptozisin meydana gelmesi sonucu kalp hastalığı, AIDS ve nörodejeneratif (Alzheimer, Parkinson vb.) hastalıklar da oluşabilmektedir (Özçimen 2005).

1.1.3. Hücre Ölümlerinin Sınıflandırılması

Apoptozun sınıflandırılması hücre organelleri ve hücrenin fonksiyonuna göre yapılır. Schweichel ve Merker, sıçanlardan aldıkları çeşitli fetal ve

embriyonik dokularda yaptıkları çalışmalardan sonra 3 ana tip ve 2 alt tip içeren bir sınıflandırma yapmışlardır. Bu sınıflandırmaya göre,

Tip.1 Hücre Ölümü (heterofaji):

Hem çekirdek hem de sitoplâzmanın yoğunlaşmasıyla başlar. Nükleus yoğun kromatin kitlesi içerir ve bu yoğunlaşma çekirdek yarı piknotik olana kadar artar. Yüksek büyütmede DNA iplikçiklerinden oluşan paketlerin yoğun kromatin alanına daha yakın oldukları görülür. Nükleustan sonraki en önemli değişiklik hücre zarının katlanmasıdır.

Tip-2 Hücre Ölümü (otofaji):

Bu tip hücre ölümünde, hücrenin sindirimi büyük ölçüde hücrenin kendi lizozomlarıyla olur. Belirgin olarak geniş miktarda otofajik vakuollerle karakterizedir ve bazen bu vakuoller mitokondri ve endoplazmik retikulumu da içerebilir. Golgi organeli de sıklıkla genişler ve bu genişleme nükleosit disfosfataz aktivitesini artırır.

Tip-3 Hücre ölümü:

Bu tip hücre ölümü de kendi içinde 2 alt tipe ayrılır:

a) Non-lizozomal vezikül parçalanması:

Bu tipte hücre içi organellerin şişmesini takiben sitoplazmik alanların hücre dışı boşluklarla birleşmesi olayı gerçekleşir.

b) Sitoplazmik tip parçalanma:

Bu tip hücre ölümü Schwechel ve Merker'in tanımladığı tip-3 a'da tarif edilen hücre ölümüne organellerin genişlemesi ve sitoplazmanın vakuolleşmesi yönüyle benzer fakat çekirdek dejenerasyonu anlamında farklıdır (Altunkaynak ve Özbek 2008) veya apoptozis mekanizlara göre de:

1) Ölüm reseptörleri yolu

a) Doğrudan yol

b) Dolaylı yol

2) Mitokondriyal yol

a) Apoptozom oluşmasıyla

b) Direkt mitokondriyal yol (primer ve sekonder).

Ölüm reseptörleri aracılığıyla apoptoz genetik olabilir.

Apoptoz ancak hücrenin geleceğine karar veren bir programla gerçekleşebilir. Genetiğin bu etkisi bir hermafrodit solucan olan *Caenorhabditis elegans* ile örneklendirilebilir. Gelişimi boyunca bu solucanın ürettiği 1090 hücrenin 131'i ölmeye adaydır. Organizmanın bu şekilde gelişimini kodlayan genler saptanmıştır. Bu genler dört gruba ayrılır.

- Hücre ölümüne karar verenler,
- Ölüm uygulayıcıları,
- Ölen hücrelerin yutulmasıyla ilgili olanlar,
- Yutulmuş hücrelerin parçalanmasıyla ilgili olanlar.

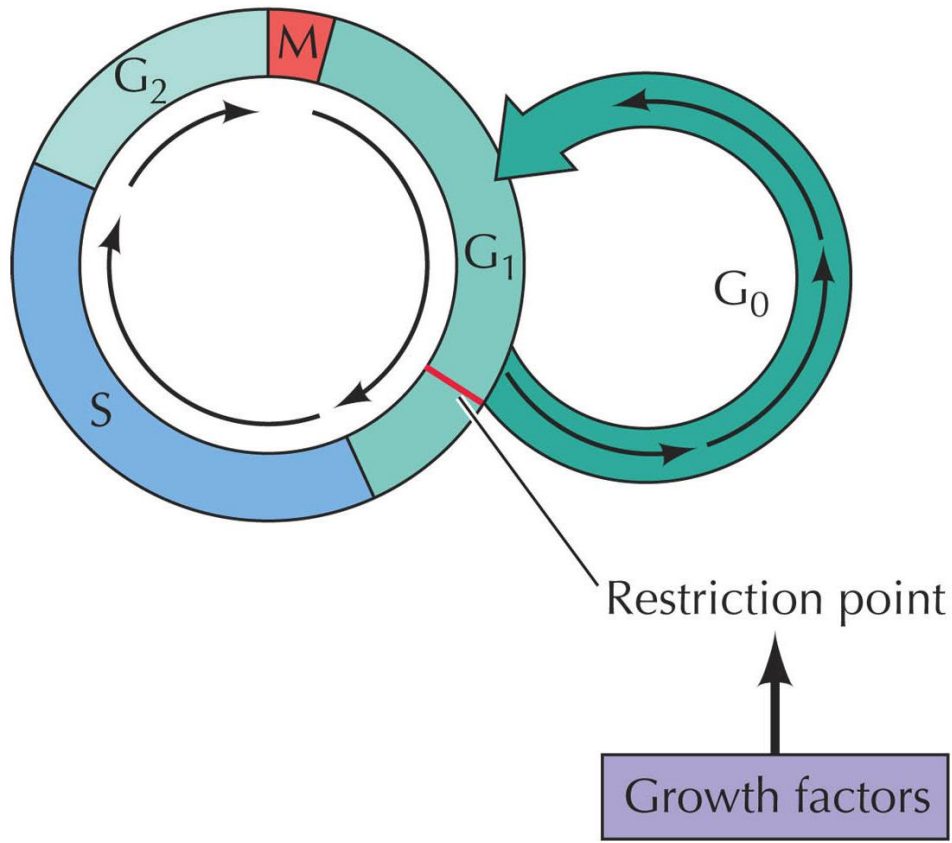
Ölüm programını *C. elegans*'da yerine getirenler Ced-3 geni olarak adlandırılır. Ced-3 geni hücre ölüm programının yerine getirilmesinde kritik rol oynayan çok sayıda sistein proteazlarını içeren interlökin-1 beta dönüştürücü enzim (ICE) ailesini üretir. Diğer gen Ced-9 ise programlanmış hücre ölümüne giden hücrenin korunmasında rol alır. Ced-9 geninin insanlardaki karşılığı Bcl-2'dir. Bcl-2'nin memeli apoptozunda koruyucu rolü vardır. Son raporlara göre apoptoza neden olan 30'dan fazla belirleyici ortaya konmuştur. Bunlar tümör nekroz faktörden (TNF), beta-amiloid peptidlere kadar geniş bir yelpazeyi içerir (Willingham 1999).

1.1.4. Hücre Siklusu ve Apoptozis

Hücre siklusu, çoğalmak (prolifere olmak) üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir (Altunkaynak 2008). Bir sıklusa giren hücre,

morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar. Bir hücrenin canlılığının göstergesi olan en anahtar noktalardan biri onun birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücreye bölünmesidir. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunu G_0 aktif (G_1 , G_2 , S, G_0 , M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı denilen G_0 fazında beklerler. Hücrelerin ikiye bölünmesi mitozis (veya gonadlarda mayozis) ile gerçekleşir. Hücreyi bölünmeye sevkeden sinyaller (örneğin, büyüme faktörleri, sitokinler veya mitojenler) çok çeşitlidir. Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazlardan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler hücre siklusu boyunca senkronize bir şekilde aktifleştirilir ve ardından inaktifleştirilirler (Altunkaynak, 2008).

- A. G_0 fazında (istirahat fazı), hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar.
- B. G_1 fazında (ara faz/interfaz) spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Geç G_1 fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Ayrıca, DNA sentezi için gereken birçok enzim üretilir.
- C. S fazında (DNA sentezi fazı) hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır.
- D. G_2 fazında DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder. Mitotik "spindle"ların (kromozonların bağlandığı lifler) mikrotübüler prekürsörleri üretilir.
- E. M fazında (mitozis) protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Mitozisi takiben oluşan yeni hücreler ya G_0 ya da G_1 fazına girerler (Cabadak, 2008).



Şekil. 1.1: Hücre siklusu ve apoptosis (Cabadak 2013).

1.1.5. p53 Aracılı Apoptosis

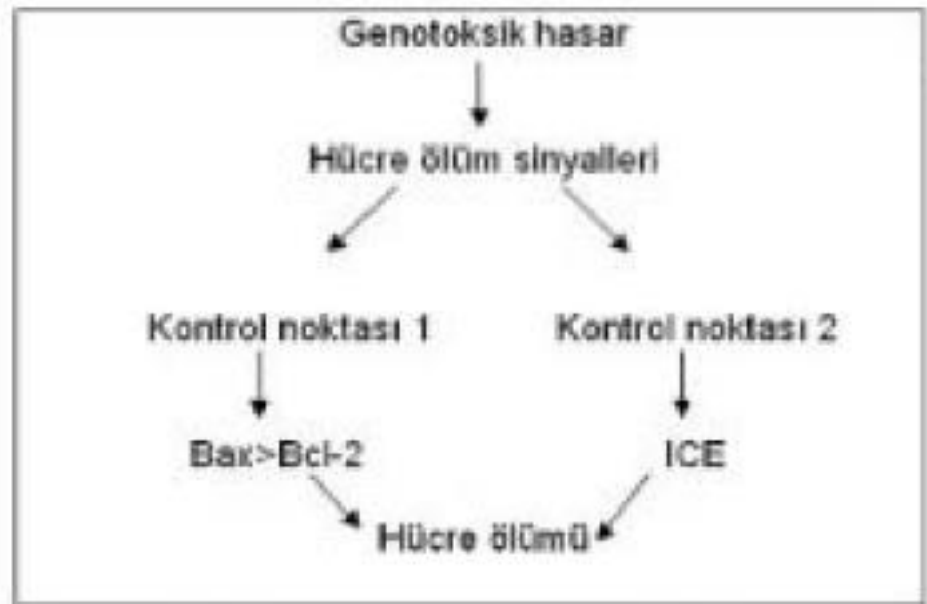
p53 ve Bcl 2, programlı hücre ölümünde anahtar rol oynayan genlerdir. Normalde p53 hücre akibetini belirleyen moleküler ağı düzenler. cMyc (nükleer fosfoprotein) p53'ü seçici olarak aktive eder ve p53 apoptozisi başlatır. Nükleer fosfo protein cMyc, Fas ligand ve Fas reseptörle birleşir. Bu proteinin p53 bağımlı ve bağımsız yollar ile sitokrom c salınımını indükleyen bax'ın transkripsiyonunu düzenlediği de düşünülmektedir. Hasarlı hücrelerde fonksiyonel p53 yoksa, hücre siklusu kontrol noktaları tarafından kontrol edilmeden siklus ilerler. p53'ün düzenleyici aktivitesini geçtiğini gösteren alternatif yol ise p53'un negatif düzenleyicisi Mdm 2 (murine double minute 2) dir. Mdm2 proteini, p53'ü kontrol altında tutar ve p53'ün G₁/S geçişinde siklusu durdurmasını ve apoptozisi engeller. Radyasyon ve benzeri etkenlerle hücre

etkilendiğinde Mdm2 proteininin p53 bağlanma bölgesinde yapısal değişiklikler meydana gelir (Solakoğlu 2008).

Bu nedenle Mdm2 p53'ü bağlayamaz ve serbest p53 transkripsiyonel aktivitesi ile G₁ ve G₂ kontrol noktalarında siklusu durdurur ve bax genini aktive ederek apoptozise neden olur. Mdm2, p53'ün transkripsiyonunu azaltır ya da p53'e bağlanarak aktivitesini inhibe edebilir. Lösemi, lenfoma, sarkoma glioma ve meme kanserinde Mdm2 gen amplifikasyonu gösterilmiştir. Çok organize bir işlem olan apoptozis zararlı ve anormal hücrelerin yıkımını sağlamaktadır. Apoptozis yolunda iki düzeyde mekanizma bozuklukları görülür: Apoptozisi düzenleyen genlerde mutasyon ve bu nedenle apoptozise gitmeyen hücrelerin yaşamasıdır. (Berger ve ark. 1998).

1.1.6. Apoptozis Kontrol Noktaları

Apoptozisin olup olmayacağını Bax ve Bcl-2 dengesinin doğruluğu belirler. Hücrelerin apoptozise gitmesi için Bax düzeyinin Bcl-2'den fazla olması gerekir. Bu mekanizma apoptoziste kontrol noktası 1 olarak önerilmiştir. Yaban tip p53 varlığında Bcl-2 ekspresyonu az olan hücreler apoptozise gider. Tersine olursa yaban tip p53 az, Bcl-2 fazla ise çok mutasyon olabilir. Bunun nedeni hücre proliferasyonunun aktive olmasıdır. Bcl 2 ailesinin en büyük proteini Bcl-XL, Bcl-2'ye benzer yolda hareket eder ve Bcl-2 aktivitesini baskılayan Bak apoptozise neden olur. Apoptozis yolağında ikinci kontrol noktası çok iyi belirlenememiştir. Interlökin converting enzim (ICE) prokaspaz 1 olarak bilinmektedir. ICE DNA onarım enzimleri ile etkileşmektedir. Polyadenosin difosfat-riboz polimeraz DNA kırıklarını tanır ve DNA onarımına katılır. Nükleer membran proteini lamin A, PARP'ı parçalar ve apoptotik hücre morfolojisi meydana gelir. ICE ile PARP inaktif olursa, apoptozis başlar (Karabulut ve ark. 2003).



Şekil.1.2 Apoptozis kontrol noktaları

1.1.7. Apoptozise Karşı Mekanizmalar

Bcl 2, hücre ölümünü inhibe ederek hücreyi apoptozise karşı korumaktadır. Bu ailenin diğer üyelerinden Bcl-xL, mcl ve bag 1 hücre ölümünün inhibitörleri iken bad, bax ve bik apoptozisi ilerletirler (Wang ve ark. 1999).

GADD45 (a growth arrest and DNA damage (gadd)-induced gene) hücre siklusunun G₂-M kontrol noktasında önemli rolü olan nükleer proteindir. Bu protein cdc2 proteini ile etkileşerek cdc2 kinaz aktivitesini inhibe etmektedir. CMyc, GADD45 ve cki genleri p15, p21, p27'yi baskılayarak hücre büyümesini sağlar. Yaşam faktörleri olmadığında c-Myc onkogeni hücreleri apoptozise götürür. Apoptozis öncesi ve sonrası olaylar tamamen açık değildir. Bcl-2 mitokondrinin dış zarında bulunur ve mitokondriden sitokrom c salınımını bloke eder. Sitokrom c kaspazları aktive ederek apoptozisi indüklemektedir. Bcl-2'nin ekspresyon düzeyi apoptozisi belirleyen faktörlerden birisidir. Bcl-2 ekspresyonu fazla olan hücreler hücre ölümünden kaçabilir. Antiapoptotik Bcl-2 üyeleri kaspaz aktivasyonunu önleyerek antiapoptotik etki gösterirler. Bazı çalışmalarda Bcl-2 çok yüksek bulunmasına rağmen hücre ölümünün arttığı da gösterilmiştir. NF-kB transkripsiyon faktörünün Bcl-2 ailesini up-regule ettiği bilinmektedir. Bcl-2 aynı zamanda Ras2'nin antiapoptotik aktivitesini de düzenler. Bcl-2'nin diğer

düzenleyici mekanizması, bax gibi büyüme düzenleyicilerinin aktivitesini inhibe ederek apoptozisi engellemektedir. Apoptozisin olup olmayacağını Bax ve Bcl-2 dengesinin doğruluğu tayin eder (Cabadak 2013).

1.1.8. Kanser ve Apoptoz İlişkisi

Hücrelerin normal apoptotik süreçten kaçmalarını sağlayan bir özellik kazanmaları hemen bütün kanser hücrelerinde gözlenen bir özelliktir. Tümör hücreleri ya antiapoptotik proteinlerin aşırı yapımıyla ya da proapoptotik proteinlerin yapımlarının ya da etkilerinin azalmasıyla apoptoza dirençli bir nitelik kazanırlar. Örneğin; foliküler B hücreli lenfomada kromozomal bir yer değiştirme sonucu Bcl-2 proteininin yapımı artmaktadır. p53 yoluyla başlatılan apoptoz yolundaki proteinlerin yapımları ya da işlevlerindeki bozuklukların insanlardaki kanserlerin neredeyse yarısında etkili olduğu gösterilmiştir. Apaf-1 in metastatik melanom hücrelerinde yapımının olmadığı gösterilmiştir (Güleş ve Eren 2008).

Bazı kanser türlerinde (hepatosellüler karsinom, melanomlar) ölüm reseptörlerinden biri olan CD95 in yapımının azaldığı bulunmuştur. Kanserleşme ve apoptoz düzenlemesinin bozulması arasındaki ilişki kemoterapötiklere ya da radyasyona direnç oluşurarak da klinik tıbbi ilgilendiren sonuçlara yol açabilmektedir (Solakoğlu 2009). Hücre akümülyasyonuna yol açan normal hücre siklus mekanizmasının disfonksiyonu olarak da tanımlanabilir. Hücreler ya aşırı proliferasyona uğrayarak ya da apoptotik yolların malfonksiyonu nedeniyle kanserli hücrelerin yok edilmelerinin yetersizliğine bağlı olarak yığılım gösterirler. İnsan organizmasında günde iki bin adet tümör hücresi oluşmaktadır. Apoptoz veya yetersiz mutasyon nedeniyle hücrelerin patlaması sonucunda bu tümör hücreleri yok edilirler (Gültekin ve Yılmaz 2008).

Malign hastalıklar, klasik olarak kontrolsüz ve aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa proliferasyonun yanında, apoptotik hücre ölümü hızında azalmanın da malignite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen, dolayısıyla beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında

biriktirdikleri mutasyonların etkisi ile malign hücelere dönüşme potansiyeli taşırlar. Hücrelerin ölümü ya nekroz ya da apoptozis şeklinde gerçekleşebilir (Taneja ve ark. 2001). Nekroz ile apoptozis arasında belirgin farklar olduğu ilk kez Kerr ve arkadaşları (1972) tarafından anlaşılmıştır. Nekroz patolojik bir olay sonucunda görülür hücre şişmesi sitoplazma organüllerinin dağılması ve sonucu olarak hücre membranının bozulması ve patlaması şeklinde olur, dokunun nekroza verdiği yanıt genellikle inflamasyon şeklindedir. Apoptozis ise patolojik olarak görülebilir. Ancak esas olarak normal fizyolojik durumlarda çok yaygındır. Apoptotik hücreler morfolojik inceleme sonucunda hücre büzülmesi, girintili çıkıntılı “blebbing” görüntüsü, stoplazma organelleri bozulmamış ama DNA’sı parçalanmış görülmektedir (Lozano ve ark. 2000). Sonuç olarak doku inflamasyon cevabı vermeden hücre parçalanır ve makrofajlar gibi fagositoz özelliği olan hücreler tarafından fagosit edilir (Wolf ve Gren 2002).

1.1.9. Apoptosis ve Nekroz Arasındaki Farklar

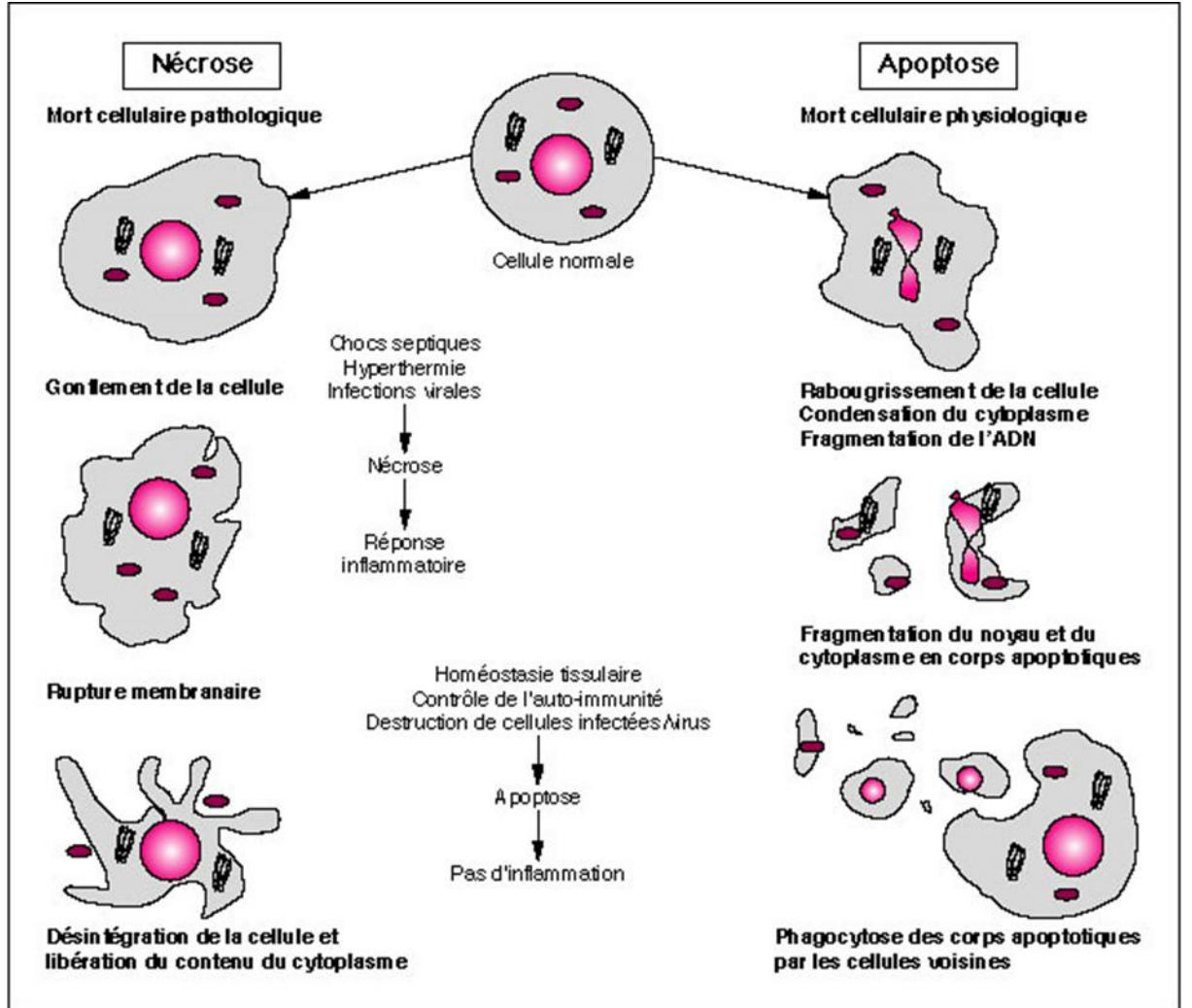
Apoptozis, hücrede yarattığı bu değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılanabilir. Ancak nekrozdan farkları şunlardır:

Fiziksel Farklılıklar:

- a. Nekroz bileşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptoziste tek tek hücreler etkilenir (Robertson ve Orenius 2000).
- b. Nekroz fizyolojik olmayan uyarılarla başlar, apoptozis fizyolojik uyarılarla da başlayabilir (örnek: hormonal dengenin bozulması) (Potten ve Wilson 2004).
- c. Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosit edilir. Apoptozise uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz. Yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar. Nekrozda inflamatuvar cevap vardır, apoptoziste ise yoktur (Güleş ve Eren 2008; Solakoğlu 2009).

Morfolojik Farklılıklar:

- a. Nekrozda zar bütünlüğü bozulur, apoptoziste zarda kabarcıklar görülür fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz.
- b. Nekroz sitoplazma ve mitokondride şişme ile başlar, apoptoziste ise sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür.
- c. Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptozis hücrenin daha ufak fragmanlara dönüşmesi ile sonlanır (apoptotik cisimler).
- d. Nekrozda hücre zarında vezikül formasyonu yoktur, total parçalanma olur; oysa apoptoziste zara bağlı veziküller oluşur.
- e. Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptoziste; apoptozisi başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur (Ratogi 2009; Coşkun 2012).



şekil.1.3. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü mekanizmalarının karakteristik özellikleri (Gougeon, 2001).

Tablo.1.1. Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması. TNRF-1, tumor nekrozis factor reseptörü-1

Özellik	Nekrozis	Apoptozis
Yol açan nedenler	Iskemi Hipertemi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması (senescence) HIV Kanseri ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1reseptörlerinin Aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress

Morfolojik özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün Kaybı Kromatin flocculation ‘u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı fakat membranda (bleb) lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücresinin intact mitokondri, ribozom, nükleüs parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP geremez (pasif süreç) +4 c de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde smear görüntüsü) Postlilik DNA fragmentasyonu (ölümünün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 c de gerçekleşmez DNA intenukleozomal alanlarda 180kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomalara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patemi=apoptozisin en önemli belirtici) Prelitik DNA fragmentasyonunu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücre gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır Inflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaç birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafında fagosite edilirler inflamasyon görülmez

1.1.10. Apoptozisizin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. Aktif kaspaz-3 tayini) molekür düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir (Gewies 2003).

İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis: 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlanmıştır. 90'ların ortalarında ise apoptozis hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulunmuştur. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidil serin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlanmıştır. Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları, 2000'li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etmiştir (Yılmaz, 2005).

Günümüzde apoptozisin belirlenmesinde şu yöntemler kullanılmaktadır:

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. İmmünohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmünolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri

Fakat bu sınıflama çeşitli şekillerde yapılabilir. Yani, yöntem türünden ziyade apoptozise herhangi bir hücreyel olayın/aktivitenin belirlenmesi esas alınarak değerlendirme yapılabilir. Örneğin, apoptozis DNA framentasyonu esas alınarak saptanacaksa o zaman yukarıda sıralanan bir veya birden fazlası kullanılabilir. Çünkü, DNA fragmentasyonu histokimyasal olarak gösterilebileceği gibi, biyokimyasal olarak da gösterilebilir.

Bu ayrımda önemli olan çalışılacak numunenin cinsidir. Hücre kültürü yapılarak elde edilen bir numune ise, biyokimyasal bir yöntem olan agaroz jel elektroforezi yapılabilir. Eğer bir dokudaki DNA fragmentasyonları (apoptatik hücreler) araştırılıyorsa o zamanda histokimyasal bir yöntem olan TUNEL yöntemi kullanılabilir (Ulukaya 2003).

Apoptozis herhangi bir metodla tespit edildikten sonra bir başka metodla da doğrulanmalıdır. Klinik bilim dergilerinde bu şans daha fazla olabilir.

Morfolojik görüntüleme yöntemleri:

1. Işık Mikroskobu ile kullanılarak

- Hematoksilen Boyama
- Giemsa Boyama

2. Floresan Mikroskobu/Lazerli Konfokal Mikroskobu ile

- Propidium İyodür (PI)
- Hoechst Dye

3. Elektron Mikroskobu

4. Faz Kontrast Mikroskobu

1.2. KANSER

Kanser nedir: Kanser, Latince yengeç anlamına gelen "crab" sözcüğünden türetilmiştir. Yunanlı hekim Hipokrat, hastalığın başladığı bölgeden diğer organlara yayılmasını gözlemleyerek bu tanımlamayı yapmıştır. Kanser vücuttaki bir hücre grubunun farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz şekilde çoğalması sonucu meydana gelmektedir. Normalde hücrelerin büyümesi ve çoğalması bir düzen içerisinde olmaktadır. Buna paralel olarak doku ve organlar da görevlerini normal olarak yapabilmektedirler. Ancak bu hücreler anormal şekil ve hızda büyümeye ve çoğalmaya başlarsa, tümör adı verilen kitle oluşumuna yol

açarlar. Bu anormal hücrelerin köken aldığı organa göre hastalık adlandırılır (Akciğer kanseri, meme kanseri, prostat kanseri vs.). Genelde tümör tespit edilmeden önce milyonlarca anormal hücre sayısına ulaşması gerekir. Bir cm büyüklüğündeki bir tümör kitlesi, yaklaşık 10¹² (1 trilyon) hücreden meydana gelmektedir (Hanahan ve Weinberg 2000).

1.2.1. Kanser Hücrelerinin Genel Özellikleri

Kanser hücreleri, komşuları olan normal hücrelere göre daha hızlı çoğalırlar. Normal hücrelerin büyüme evreleri vardır ve hücreler, yetişkinliğe ulaştınca büyümeleri durur. Kanser hücreleri ise besin kaynağı buldukları sürece, hiçbir zaman bölünmeyi durdurmazlar (Tolnay 2002).

Kanserli hücrelerin etraflarındaki hücrelerle her zamanki ilişkilerinde bir değişiklik olur. Eskisinden daha bağımsız, asi ve diğer hücrelerle uyumlu olmaktan çıkıp kendi başlarına hareket etmeye yani “bencil”, hatta “kötü komşu” davranışı sergilemeye başlarlar. Örneğin; hücre yapışkanlığını yitirirler. Bu yapışkanlık, gelişmenin en önemli faktörlerinden biridir; bölünen hücreler yüzeylerindeki özel proteinler sayesinde komşularıyla birbirlerine yapışma eğilimi gösterirler. Normal hücrelerin bu temel niteliğinin kaybolması, habis büyümeye diğer bir deyişle kansere yol açan önemli bir unsurdur (Ahışhalı ve Bilir 2002; Yaylacı ve ark. 2009; Başay 2006).

Yukarıdaki iki özelliğin birleşmesi; yani hücre bölünmesinin artan hızı ile birlikte, hücre yapışkanlığının kaybolması öldürücüdür. Bu durum, yeni ve uyumsuz, garip bir dokunun, doğduğu noktadan hızla yayılarak büyümesi demektir. Normal hücrelerde bölünme programını durduran sınırlamalar ve yasaklar vardır. Hücre bölünmesinin yasaklanması, hücreler belli bir boşluğu doldurduklarında veya önceden belirlenmiş bir toplam kütleye eriştiklerinde ortaya çıkar. Kanserli hücreler besin buldukça, sınır tanımaz çoğalmalarını sürdürürler. Besinlerinin kaynağını da içinde yaşadıkları beden oluşturur. Vücutta 100 trilyon hücreyi besleyen dolaşım sistemi, yani kan, kanserli hücrelere de ihtiyaçları olan besini götürür (Yaylacı ve ark. 2009).

Kanserli hücrelerin hızla çoğalmasıyla, mevcut damarlar, bu durmaksızın besin isteyen hücreleri beslemek konusunda yetersiz kalırlar. Ama kanser hücreleri bu engeli de aşarlar. Yakınlarındaki damar hücrelerini yeni kan damarları üretmeye zorlarlar. Kan damarları böylece kanser kütesinin içine kadar uzar ve kanser hücreleri yeniden bölünmeye başlar (Kemerli ve ark 2003; Ahışhalı ve Bilir 2002). Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden modifikasyonlar sonucu ortaya çıkar. Kansere yol açan modifikasyonlar arasında DNA dizilimini modifiye eden genetik değişiklikler de bulunmaktadır.

Hücrelerin programını değiştirmenin bir başka yolu ise, DNA'yı saran ve DNA okuma, kopyalama ve onarma sistemlerinin DNA'ya erişimini düzenleyen yapı olan kromatinin konformasyonunu değiştirmektir. Böylesi değişiklikler "epigenetik" değişiklikler olarak adlandırılır. Epigenetik ya da genetik değişimler genelde insan genomunu oluşturan 23 000 kadar genin birkaç yüz kadarını hedefler. Bu genler, hücre bölünmesini, farklılaşmasını ve ömrünü düzenleyen ağların kısımlarıdır. Genetik ve epigenetik değişikliklerin tüm genomda analizine yönelik teknolojilerin ortaya çıkması, her kanser çeşidine özgü değişimlerin örüntülerini haritalandırabilme olanaklarımızı ilerleterek, moleküler tanı temelinde kişiselleştirilmiş tıbbın yolunu açmaktadır (Ahışhalı ve Bilir 2002).

Kanserin moleküler biyolojisindeki ilerlemeler, aynı zamanda, kanserin büyümesini inhibe etmenin yeni yollarını da göstererek, yeni, daha seçici ve daha az toksik kanser kemoterapilerini de getirmektedir (Boyle ve Levin 2008).

Kanser hücrelerinin malignitesini belirleyici üç temel özelliği bulunmaktadır:

- 1) Büyüme kontrolünün kaybolması
- 2) Lokal dokulara invazyonu
- 3) Vücudun diğer kısımlarına yayılma veya metastaz.

İyi huylu tümör hücrelerinde büyümede azalmış olan bir kontrol gözlenmektedir, fakat bunlar lokal dokuları istila etmemekte veya vücudun diğer

kısımlarına yayılarak metastaz yapmamaktadır. Bir hücre tümör hücresi haline dönüşümün bu hücreye ait kuşakların yukarıdaki üç özellikle tanımlanan davranışı sabit kalmamaktadır, aksine malignitenin daha da artması yönünde bir eğilim vardır. Bu da giderek artan anormal karyotipler, artmış büyüme hızları ve artan yayılma ve metastaz bulguları ile kendini belli etmektedir. Henüz yeni transforme olmuş hücrelerin biyokimyasal profillerini, ileri derece malign hızlı büyüyen tümör hücrelerinkinden ayırt etmek çok önemlidir. Baştaki hücreler, kansere yönelten ana değişiklikler dışında normal hücrelerden farklı olan çok az sayıda değişiklikler gösterirler ve bu değişikliklerde genelde transformasyon ile ilişkili olanlardır. İleri derecede malign olan hücrelerin biyokimyasal profili normal hücrelerinkinden çok farklı olabilir; enzim profilinde ve diğer biyokimyasal parametrelerde pek çok değişiklik gözlenebilir, diğer bir deyişle kanser hücresi hemen hemen tamamen çoğalma üzerinde yoğunlaşmaktadır. Değişen biyokimyasal profil nedeniyle klinikte tümör işaretleyicileri olarak kullanılan bazı fetal proteinlerin sentezi artarken, büyüme faktörleri veya hormonların uygunsuz üretimi gibi gen düzenlenişini yansıtan biyokimyasal değişiklikleri de oluşmaktadır (Croce 2008).

1.2.2. Kanserın Oluşum Mekanizmaları

Vücudumuz milyarlarca hücreyi içeren canlı ve büyüyen bir sistemdir. Bu hücreler metabolizma, taşıma, salgı, üreme ve hareket edebilme gücü gibi tüm vücut fonksiyonlarını yerine getirirler. Büyüme ve gelişme yeni hücrelerin sayısındaki artmanın ve bunların değişik türden dokulara dönüşmesinin sonucu olarak ortaya çıkar. Yeni hücreler hücre bölünmesi (mitoz) süreci sırasında meydana gelirler. Değişik hücre çeşitleri, buna eşlik eden ve hücre farklılaşması denilen bir süreç ile meydana gelirler (farklılaşma hücrelerin özel işlevler kazandığı bir süreçtir). Hücre bölünmesi insanların normal büyüme olayı ile ortaya çıkar; hücre farklılaşması normal gelişim olayını olası kılar. Ancak kanser ve kanser hücrelerinin biyolojisi farklıdır ve bu farklar kanserin anlaşılması açısından önemlidir (Muray 2001).

Temelde vücudumuzda üç değişik hücre çeşidi vardır: Statik hücreler (farklılaşmış hücreler), büyüyen hücreler (farklılaşmamış hücreler) ve yenileyen

hücreler (bunlara kaynak veya destek görevi gören hücreler de denir ve diğer türden hücreleri ortaya çıkarırlar). Örneğin kas ve sinir dokusu hücreleri statiktir, çünkü bunlar belli bir boyuta ulaştıktan sonra bölünme ve yeni hücreleri üretme yeteneklerini kaybederler. Bu hücreler oldukça farklılaşmıştır ve zarar görmesi veya kaybolması durumunda yerine yenisinin gelmesi mümkün olmaz. Çünkü yeniden üretilemezler (Issa 2004). Vücudun büyüyen hücreleri de, organ veya doku, normal yetişkin boyutuna ulaştığı zaman büyümeyi durdururlar. Ancak statik ve büyüyen hücreler arasında temel fark şudur: Eğer doku zarar görmüşse veya bir kısmı alınmışsa, büyüyen hücre yeniden harekete geçebilir ve büyüyebilir. Karaciğer, böbrek ve hormon salgılayan bezler bu türden hücreleri içeren organlardır. Eğer herhangi bir hastalık nedeniyle bu organların herhangi bir parçası zarar görecektse olursa veya ameliyatla alınırsa, organ yeniden depolanmayı yapıp normal veya normale yakın fonksiyonuna kavuşana kadar geriye kalan hücreler bölünmeye ve büyümeye devam edebilirler (Merlo ve Pepper 2006).

Yenileyen hücreler ölür ve düzenli aralıklarla yenilenirler. Örneğin cilt, saç ve sindirim sistemi yolunun etrafını saran tabakayı yapan hücreler ile kan eskidikçe ve öldükçe yenilenen hücrelerdir. Bu eskime ve ölme normal süreç sırasında olabildiği gibi herhangi bir yaralanma veya hastalık ile de meydana gelebilir. Bu türde yenileyen hücreler ölen ve ölenlerin yerini almak için gelişen yeni hücreler arasında bir dengeyi korumak için bir iç mekanizma tarafından kontrol edilirler. Yenileyen hücrelerin büyümenin durması sinyallerine uyma yetenekleri, bu hücrelerin büyümelerini, kanser hücrelerinin kontrol altına alınmamış büyümelerinden farklı kılar. Diğer hücre türlerinin aksine, kanser hücrelerinde normal hücrelerde görülen büyümeyi durdurucu kontrol mekanizması yoktur (Hanahan ve Weinberg 2000).

Kanser hücreleri bir ölçüde kontrol altına alınmamış yenileyen hücrelere benzer. Bunlar farklılaşmış veya farklılaşmamış olabilir ancak herhangi bir sınırlama olmaksızın bölünmeye devam ederler. Çoğalarak komşu hücrelerin yerini alırlar. Kanser hücrelerinin büyümesi besin maddelerini alarak, normal hücrelerin fonksiyonlarını ve büyümesini de etkiler. Kanser hücreleri normal hücrelerden daha hızlı büyümeyi durdurmazlar. Ancak daha uzun süre yaşarlar ve daha hızlı

bölünürler. Böylelikle büyüme sürecinde daha büyük kanser hücreleri oranını oluştururlar. Büyümelerini ve olgunlaşmalarını düzenleyemeyen hücrelerin hepsi kanser hücresi değildir. Bazı hücreler hızla bölünür ve tümör denilen kütleleri oluştururlar. Ancak bunlar iyi huyludur. Çünkü bunlarda kötü huylu tümöre dönüşme eğiliminin diğer özellikleri yoktur (Issa, 2004).

1.2.3. Kanser ve Beslenme

Günlük beslenmemizde diyetimizle aldığımız katkı maddelerinin miktarları ve türleri kanserin oluşumunda önemli bir etkidir. Etlerin korunmasında kullanılan nitrit ve nitrat tuzları, doğal veya sentetik antioksidantlar, renk vericiler, zayıflama ve diyabet diyetlerinde kullanılan yapay tatlandırıcılar, dikkatli kullanılması gereken katkı maddeleridir. Özellikle bulgur, mısır, yer fıstığı ve diğer yağlı tohumlarda üreyen küfler ve onların toksinleri kansere neden olabilmektedir. Bu besinlerin üretiminde nem ve sıcaklığa dikkat edilmelidir. Tahılların yıkanması, havalandırılması, güneşletilmesi bir dereceye kadar toksini azaltmaktadır (Yılmaz, 2008).

Kızartma, kavurma, tüksüleme gibi bazı pişirme yöntemleri kanser oluşumuna neden olabilmektedir. Özellikle protein içeriği yüksek besinlerin kızartılması veya tüksülenmesi kanserin öncüsü olan kimyasal bileşiklerin oluşumuna neden olur. Bu sebeple yiyeceklerimizi hazırlarken en sağlıklı pişirme yöntemleri olan haşlama, fırında pişirme veya ızgara tercih edilmelidir. Alkol ve sigara kanserin oluşumunda önemli iki etkidir. Bu ürünlerin kullanımları mümkün olduğunca azaltılmalıdır. Şişmanlık kanserin ortaya çıkmasını kolaylaştıran etkenlerden birisidir. Şişmanlık ile özellikle meme ve endometrial kanseri riski artmaktadır, var olan kolon, prostat, rektum, böbrek ve serviks kanser türleri daha hızlı gelişmektedir. Bu sebeple vücut ağırlığının korunması şarttır.

Antioksidan vitaminler olarak bilinen A, C ve E vitaminlerinin yetersiz miktarlarda alınması, kanserin nedenlerinden birisidir. Çünkü bu vitaminler kansere neden olan bileşiklerin oluşumunu engelleyebilmektedir. Bunun yanında riboflavin, kolin, pantotenik asit, tiamin vitaminleri ile çinko, selenyum, nikel,

iyot, molibden, demir ve magnezyum minerallerini yeterli miktarlarda alınması kanserin önlenmesi için gereklidir (Aliustaoğlu 2009).

Tüm bu bilgiler ışığında kanser riskini azaltmak için beslenmemizde dikkat etmemiz gereken noktaları şu şekilde özetleyebiliriz:

- İdeal vücut ağırlığınızı koruyunuz.
- Diyetinizle aldığınız hayvansal kaynaklı yağı ve proteini azaltınız. Et yemeklerini hazırlarken yağsız sığır, dana ve kuzu etini tercih edin ve görünür yağı temizleyin; tavuk ve hindiyi derisiz tüketin; az yağlı et ürünlerini kullanın; balık ve kabuklu deniz ürünlerini daha sık tüketiniz.
- Yiyeceklerinizi hazırlarken kızartma, kavurma veya tüksüleme yerine ızgara, fırında pişirme veya haşlama gibi yöntemleri kullanınız.
- Günde 5 porsiyon taze sebze ve meyve tüketiniz. Antioksidant vitamin ve minerallerin kaynağı olan ıspanak, karnabahar, lahana, brocolli, brüksel lahanası, havuç, domates, kırmızı-yeşil biber ve turunçgilleri bol miktarda tüketiniz.
- Kuru baklagilleri ve yağlı tohumları daha sık tüketiniz.
- Yemekleriniz hazırlarken sarımsak, soğan, arpacık soğanı, nane, maydanoz gibi besinleri eklemeyi ihmal etmeyin.
- Süt ve süt ürünlerini satın alırken daha düşük yağlı ürünleri tercih ediniz; yoğurt tercihinizi probiyotik yoğurt olan LC1'den yana kullanırsanız kolon kanseri riskini azaltmış olursunuz (Boyle ve Levin 2008).

1.2.4. Kanser Tedavisi ve Kullanılan Yöntemler

Kişiye özel kanser tedavisi bazı türler için kullanılıyor ama genele yayılması için biraz daha zaman gerekiyor. Operasyon, radyoterapi ve kemoterapi ise kanserle mücadele için uygulanan geleneksel tedavi çeşitleridir. Kanser tedavisinde son gelişmeler, moleküler ve genetik düzeydeki incelemeler, her hastanın ayrı bir tedavi protokolüne alınması fikrinde buluşuyor. Bu ideal tedavi,

artık birçok kanser türünde etkili oluyor. Her kanser uygulanması içinse en az 10 yıl gerekecek gibi görünüyor. Burada sizlere, kansere karşı uygulanan temel tedavi yöntemleri hakkında bilgi veriliyor (Tavassoli 2003).

Radyoterapi:

Son yıllarda, radyoterapi tedavisinin ekipman ve tekniklerinde yeni gelişmeler; doktorların radyasyonu daha sınırlı alanlara vererek sağlıklı dokuda daha az hasar oluşmasını sağlamalarını mümkün kılmaktadır. Sintigrafilerde ve radyasyon teknolojisindeki ilerlemeler, doktorların daha önce ulaşılmayan kesinlik derecesinde tedavi planlama ve uygulamalarını mümkün kılmıştır. Böylece etkinlik artarken yan etkiler en aza indirilmiştir. Ancak, bu cihazları yaygın değil. Bu nedenle bu tedavileri isteyen hastaların en güncel cihazları içeren ama kendilerine uzak olan sağlık merkezlerine gitmeleri gerekebilmektedir (Marie ve Valerie 2010).

Kemoterapi:

Kemoterapi belki de hakkında en fazla soru sorulan ve hastaların endişe duyduğu kanser tedavisidir. Bu tedavinin muhalifleri de var ve onlar sıklıkla kemoterapiyi bedenimize pompa edilen toksik atık olarak tanımlamaktadır (Marie ve Valerie 2010).

Küçük tümöre cerrahi:

Cerrahi uygulama; genellikle birçok kanser çeşidinin tedavisinde kullanılan ilk yaklaşımdır. Tümörün cerrahi olarak çıkarılması, özellikle tümör küçük ve lokalize ise genellikle şifa ile sonuçlanır. Biyopsiler ise hastalığın ne kadar uzağa yayıldığını belirlemek için cerrahi işlem sırasında doktorların bir veya iki lenf nodülünü analiz etmesine olarak sağlamaktadır (Marie ve Valerie 2010).

1.2.5. Kanser Tipleri

Hücre çeşitliğine bağlı olarak gerek davranış gerekse tedaviye cevap verme yönünden önemli ölçüde değişiklik gösteren yüzden fazla değişik kanser

türü vardır. Kanser tek bir hastalık değildir. Daha çok kitle ya da tümör oluşumuna yol açan kontrolsüz hücre artışı ile karakterize olan doku üremesidir. Bununla birlikte doku çoğalmasının kanser olabilmesi için kötü huylu özellik göstermesi gerekir (Catherine 2009).

Hücrelerin anormal çoğalması sonucunda ortaya çıkan tümör iyi huylu veya kötü huylu olabilir. İyi huylu olan benign tümörler; çevredeki dokuya ya da farklı vücut bölgelerine yayılmadan oluştukları yerde kalırlar. Malign yani kötü huylu tümörler ise hem çevredeki normal dokuya hem de kan ve lenfatik sistem aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine sıçrayarak yavrulama (metastaz) yaparlar.

Kanserin esas olarak üç tipi vardır:

1. Bronşlar: Bağırsak mukozası veya memedeki süt kanalları gibi epitel hücrelerinden kaynaklanırlar ve insan kanserlerinin yaklaşık % 90'ını oluştururlar.
2. Sarkomalar: Kemik, kas ya da bağ doku gibi dokularda oluşurlar. İnsan kanserlerinin yaklaşık % 1'ini oluştururlar.
3. Hematopoetik: Kemik iliği ya da lenfatik sistemi tutan ve damarlar yoluyla yayılan lösemi ve lenfomalardır. İnsan kanserlerinin yaklaşık % 8-9'unu oluştururlar.

Bu tümörlerin her biri yerleşim yeri, doku tipi, gelişimi ve kötücüllük derecelerine göre de sınıflandırılmaktadır (Kutluk ve Kars 1992).

1.2.6. Hücre Siklusu ve Kanser

Hücre çoğalması ve hücre siklusunun ilerlemesi büyümenin kontrolünde rolü olan genlerin ekspresyonu ile bağlantılıdır. Ökaryot hücre siklusu M (mitoz) G₁, S ve G₂ fazlarından oluşmaktadır. Bu süreçte hücre uyarımı ve büyüme meydana gelir veya hücre G₀ fazında durmaktadır. Hücre siklusunda G₁-S geçişinde, G₂-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları bulunmaktadır. Hücre siklusu siklin bağımlı kinazlar (cdk, katalitik altbirim) ve siklin (cyc, düzenleyici altbirim) tarafından kontrol edilmektedir. Hücre homeostazisi hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptozis (programlı

hücre ölümü) ile sürdürülmektedir. Hücre siklusu içindeki olayları düzenleyen ve kontrol eden etkileşimler çok sayıda ve komplekstir. Hücre siklusunun düzenlenmesindeki hatalar hücre bölünmesinin kontrolünün bozulmasına neden olur. Hücre siklusu kontrol noktalarında değişimler kanser gelişimine neden olabilir. Kanser gelişiminde tümör baskılayıcı fonksiyon, DNA onarımı ve apoptozis kritik yolaklardır (Yılmaz 2008).

1.2.7. Hücre Siklus Kinazları

Hücre siklusu siklinler (cyc=cln), siklin bağımlı kinazlar (cdk) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından kontrol edilir. Bu proteinlerin düzeyleri hücre siklusunun farklı fazlarında farklılıklar gösterir. Siklin bağımlı kinazlar G_1 -S- G_2 ve mitoz geçişi kontrol eder. Memeli hücrelerinde hücre siklusunun düzenlenmesinde işlevleri en iyi bilinen on bir tane siklin bağımlı kinaz (cdk 1-11) ve 16 siklin (siklin D (D_1 , D_2 ve D_3); siklin E (E_1 , E_2), siklin A (A_1 , A_2) ve B (B_1 , B_2) rol oynamaktadır. Siklin D, E, G_1 /S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiğinde hızla yıkılır, Siklin A ve B, S/ G_2 /M faz geçişlerinde sentezlenir, siklin A_1 mayoz ve embriyogenesis de, siklin A_2 çoğalan vücut hücrelerinde bulunur. Siklin B_1 'in siklin B_2 'nin fonksiyonlarını kontrol ettiği düşünülmektedir. Cdk'lar protein fosforilasyonu yapan enzimlerdir. Cdk aktivitesi DNA sarmalının açılması içinde gereklidir. Replikasyon öncesi kompleks'in (PRC: Prereplicative kompleks) birkaç bileşeni fosforile olur. Yeni replikasyon orijinleri mitozun sonunda cdk aktivitesi düşene kadar yeni PRC kompleksleri oluşturamaz. Bundan dolayı her hücre siklusunda DNA bir kez replike olur (Ulukaya 2003).

Cdk'lar siklin'e bağlandığında aktifleşerek aktif siklin-cdk komplekslerini oluştururlar. Siklinler bu komplekslerin düzenleyici alt birimleri, cdk'lar ise katalitik alt birimleridir. Cdk, siklin (yapısal proteini) ve kinaz (enzim) inden oluşmaktadır. Her bir cdk katalitik altbirimi farklı düzenleyici altbirimle bir araya gelebilir. Hücre siklusu boyunca kinaz komplekslerinin aktivite düzeyi değişir. Bu nedenle hücreler DNA'larını bir kez replike eder ve kromozomların yavru hücrelere uygun dağılımı sağlanır. Siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerinin

(cyc-cdk) düzenlenmesi, cyc altbiriminin hücredeki konsantrasyonuna, fosforillenme durumuna ve inhibitör moleküllere bağlıdır. Siklinler hücre siklusunun farklı fazlarında bir taraftan sentezlenirken diğer taraftanda yıkılırlar. Memelilerde Cdk 2, Cdk 4 ve Cdk1 (cdc 2)'in, siklin D, E, A ve B ile birlikte ekspresyonu olmaktadır. Siklin E ekspresyonu E2F transkripsiyon faktörlerine bağlıdır. Herbir siklin özgün olarak belirli bir fazda en yüksek değere ulaşır, sonraki faza girerken hızla yıkılır. Siklinlerin düzeyleri transkripsiyon düzeyinde düzenlenir. Yıkımları ise 'ubiquitin'' yolağı ile sağlanır Aktif cyc-cdk komplekslerinde cdk altbirimi Thr 161 amino asidinden fosforillenmiştir. Bu fosforilasyon cdk'yı aktive eden kompleks (cak)'ın aktivitesi ile meydana gelir. Bir kez aktive olan cyc-cdk kompleksi, DNA replikasyonu ve mitozdaki birçok işlemin kontrolünde rolü olan proteinleri fosforiller. Protein kinazlarla cyc-cdk altbirimlerinin fosforilasyonu ile kinaz kompleksi inaktive olur. Cdk'ların aktiviteleri sadece siklinlerle düzenlenmez ayrıca fosforilasyon ve defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenir (İnanç 1997).

- b) S fazındaki siklinler ve etkileşime girdikleri proteinler
- c) G₂ fazındaki siklinler ve etkileşime girdikleri proteinler

Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI): Hücre siklus inhibitör proteinleri (CKI) cdk aktivitesini kontrol eder. Bu proteinler cyc-cdk kompleksi oluşumunu ve DNA replikasyonunu inhibe eder. CKI'lar hücre siklusunu frenlediklerinden tümör baskılayıcı genlere de adaydır. Etkiledikleri cdk ve inhibisyon mekanizmalarına göre iki farklı CKI ailesi vardır. Bunlardan ink 4 ailesinde p15, p16, p18, p19' G₁ fazındaki cdk4 ve cdk6'yı bağlayarak cyc-cdk kompleks oluşumunu inhibe eder. Cip/Kip ailesinde ise p21, p27, p57 bulunmaktadır. Cip/Kip ailesi cyc-cdk kompleksini inhibe etmektedir. G₂ fazında siklin B cdk1 (cdc-2)' in tam aktivasyonunu sağlayarak mitozu girişi tetiklemektedir (Buyru ve ark. 2003).

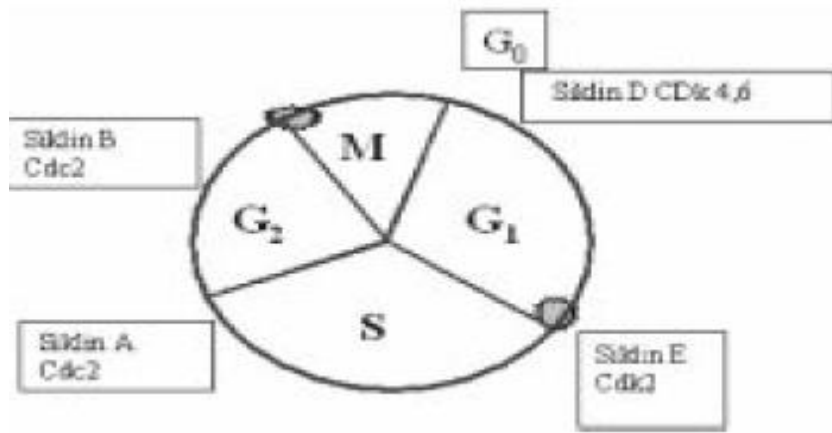
Genellikle, farklı kanser hücrelerinde hücre siklusunun G₁-S fazını kontrol eden proteinlerin inaktif olduğu, G₂-M fazlarını kontrol eden proteinlerde ise değişimin daha az olduğu belirtilmektedir (Berger ve ark. 1998).

1.2.8. Normal Hücrelerde G₁-S Geçişi

Büyümeyi uyaran sinyaller G₁ fazı başlangıcında siklin D düzeyini sonraki evrede ise siklin E artışına neden olur. Kısıtlayıcı noktada (R point) büyüme inhibitör faktör (Rb, Retinoblastoma) hücrenin S fazına girip girmeyeceğini belirleyen anahtar gibi rol oynar. Kısıtlayıcı nokta geçilirse hücre DNA sentezinin olduğu S fazına girer. DNA sentezi sırasında iplikçiklerin birbirinden ayrılması ile DNA hasara çok duyarlı hale gelir ve bu nedenle S fazı hızlı geçilir. Hücre siklusunun ilerlemesi Rb proteininin fosforillenmesi ile belirlenmektedir (Teich 1996).

Az fosforillenmiş (Hipofosforile) Rb E2F transkripsiyon faktörünü bağlayarak inaktifleştirir. E2F'nin inaktifleşmesi sonucu hücre S fazına ilerleyemediğinden siklus durur. İstirahat halindeki (G₀ fazında) hücre bölünme sinyali aldığında hipofosforile Rb G₁ fazının sonuna doğru cyc'nin cdk ile birleşmesi ile cyc-cdk kompleksini oluşturur ve bu kompleks Rb

proteinini fosforiller. Fosforillenen Rb proteininden E2F salınır, E2F'nin siklus ilerletici etkisi ile S fazına giriş için gerekli genlerin transkripsiyonu aktive olur ve hücre S fazına girer (Puri ve ark. 1999).



Şekil. 1.5. Hücre siklusu siklin ve CDK (Siklin Bağımlı Kinazlar) tarafından düzenlenir.

Hücre siklusunun S fazına geçişini G₁ fazında aktive olan siklinler sağlar. G₀ fazında bu siklinlerin çoğunun ekspresyonu olmaz. G₁ cyc-cdk kompleksleri transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir. Büyüme faktörleri, otokrin uyarım, lektinlerle mitojenik uyarım veya Ras yolağı gibi hücre içi sinyal yollarında mutasyon, hücrelerin tekrar G₁ fazından sıklusa girmelerini uyarabilir. İstirahat halindeki hücrelerde, başlangıçta mRNA'sı stabil olmayan siklin D az miktarda bulunur. G₀'da büyüme faktörleri ile uyarım, siklin D sentezini ardından siklin E'nin birikimini uyarır. Büyüme faktörleri olmadığında siklin D düzeyi hemen düşer. Embriyonik hücrelerde siklin E düzeyleri devamlı yüksektir (Hamzaoglu ve Özcan 2006).

Hücre siklusunda Rb aktivitesi ICBP90 transkripsiyon faktörü ile protein düzeyinde düzenlenebilir. G₁-S geçişinde, büyüme faktörlerine cevap olarak siklin D düzeyi artar. Siklin D artışı ile siklin D-cdk 4(cdk 6) kompleksi oluşur. Siklin D ve cdk 4'ün ve de onların aktif komplekslerinin birikimi p16'nın inhibitör rolünü ortadan kaldırır ve Rb (retinoblastoma gen) fosforillenir. Az fosforillenen Rb, E2F transkripsiyon faktörün inaktivasyonuna neden olan histon deasetilaz (HDAC) enzimine bağlanır. Rb'nin fosforillenmesi S fazının başlaması ve ilerlemesi için gereken genlerin geçici olarak aktivasyonunda rolü olan E2F transkripsiyon faktörün baskılanmasını kaldırır. G₁ de siklin E -cdk2 kompleksi (MTOC) mikrotübülleri organize eden merkezin iki sentromere dublikasyonunu aktive eder (Haris 1996).

Siklinlerin uyarıcı etkileri CDK inhibitörleri CKI tarafından önlenmektedir. G₁/S fazı geçişi için önkoşul CKI ların baskılanmasıdır. Örneğin hücre siklusuna giriş için siklin D₁ düzeyinin yükselmesi yeterli değildir. ERK (extracellllular signal regulated kinase) aktivasyonu da geç G₁'de cdk'ların aktivitesini artırmak için birkaç aşamada rol oynar. ERK aynı zamanda CKI'ların inhibisyonunda da rol oynamaktadır. G₁ fazı boyunca hücre çoğalmasını engelleyen birçok genin baskılanması için ERK'in sürekli aktivitesi gereklidir. Tek başına ERK aktivasyonu hücre siklusuna girişi sağlamaya yetmez. Vücut hücrelerinde ERK, hücre siklusunun G₂/M fazında aktive olur. Metafazda tutulan hücrelerde ERK fosforillenmemiş durumdadır. Eş zamanlı çoğalan (senkronize) HeLA ve NIH 3T3 hücrelerinde ERK'in aktivasyonunun S fazının sonuna doğru meydana geldiği ve mitoz sonuna kadar aktif halde kaldığı belirlenmiştir. MEK (MAPK kinaz) inhibitörleri ile ERK aktivasyonu bloke edildiğinde mitoz girişin geciktiği ardından metafazdan anafaza gecikmeli geçişin mitoz süresinin uzamasına neden olduğu belirtilmektedir. G₂/M geçişinde ERK inhibe edildiğinde M faz süresi iki kat artar. ERK aktivasyon yolları henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Karabulut ve ark. 2003).

Genellikle normal hücrelerde p53, MDM2 proteinine bağlı olarak inaktiftir. p53 ubiquitin ligazla yıkıma uğradıktan sonra aktive olur. Aktive olan p53, p21 ekspresyonunu aktive eder. p21 G₁-S (cdk) ve S (cdk) komplekslerine

bağlanarak onları inhibe eder ve hücre siklusu durur. Siklusun durması hücreye tamir için zaman kazandırır (Altunkaynak 2008).

Radyasyon ve ilaç gibi hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda DNA hasarı olursa, hücre bu uyarıya p53 düzeyini artırarak yanıt verir. p21'in aktivasyonu sağlanarak G₁ kontrol noktasında Rb proteinin daha fazla fosforlanması önlenerek hücre siklusu durdurulur. p21 siklin-cdk kompleksini inhibe etmesi yanında "proliferating cell nuclear antijen (PCNA)"i de inhibe eder. Timidin ve metotoksat (methotrexate) gibi ilaçlar hücre siklusunun ilerlemesini engeller (Üniver 1998).

1.2.9. Normal Hücrelerde G₂-M Geçisi

Hücreler DNA sentezinden sonra G₂ fazına girer. Siklin B-cdk1 kompleksinin aktivitesi artar, mitoz giriş uyarılır. Siklin B-cdk1 kompleksi mitozu ilerleten faktör (MPF) olarak da isimlendirilmektedir. Geç S fazında siklin B sentezlenmeye başlar ve sentez mitoz boyunca devam eder, mitoz tamamlandığında siklin B düzeyi hızla düşer. Bu düşüş aktif MPF kompleksinin oluşmasını ve ikinci hücre bölünmesini engeller. Siklin B düzeyi sitoplazma ve çekirdek arasında aktif taşınila düzenlenir. İnterfaz (G₁, S, G₂) aşamasında siklin B sitoplazmadadır. Mitoz başlangıcında siklin B cdk 1'e bağlanarak aktif MPF kompleksini oluşturur. İnhibe edici fosforillenme aynı zamanda MPF aktivitesini düzenleyebilir. cdk1 altbiriminin ikinci kez fosfofosforilenmesi siklin B-cdk1 kompleksini inaktive eder. Wee 1, nükleer protein kinaz, çekirdekte MPF kompleksini inaktive ederek erken mitozu engeller. Wee1'in cdk1 altbiriminin ATP bağlama bölgesini fosforillemesi ile MPF kompleksi inaktive olur (Altınışık 2002).

1.2.10. DNA'sı Hasarlı Hücrelerin G₂-M Geçisi

DNA hasarından sonra, G₂ bloğunun olması için cdk 1 defosforillenmesinin inhibisyonu gereklidir. DNA hasarı, cdc-25c'yi fosforilleyen chks1 ve 2 protein kinazların aktivasyonunu sağlar. Fosforillenen cdc-25c, 14-3-3 proteinlerine bağlanarak çekirdekten sitoplazmaya taşınır. cdc25c çekirdek içinde

bulunursa, siklin B-cdk1 kompleksini aktive eder. Bunun yanı sıra siklinB-cdk1 kompleksin aktivitesine gereken çekirdek içindeki cdc25c miktarının yetersiz olmasından dolayı G₂ blok aktive olur. Aynı zamanda p53 de G₂-M geçişinde rol oynayabilir. DNA hasarında p53 stabil kalmakta ve 14-3-3 trans-kripsiyonel olarak aktive olmaktadır. Aktive olan 14-3-3 fosforillenmiş cdc 25c'e bağlanır ve kompleksi sitoplazma içinde tutar, böylece mitoz geçişe uygun aktif siklin B-cdk1 kompleksi azalır; p21 ve p53 ikinci tur DNA sentezi yapmış fazla DNA'lı hücreleri G₂ ve M fazında engeller. p53, G₂'ye girişi inhibe eden 14-3-3 gen transkripsiyonunu artırarak bu geçişi önlemektedir. 14-3-3 cdc25c fosfatazla birleşir ve bu kompleks cdc25c'nin çekirdeğe girişini inhibe ederek DNA 'yı bloke eder (Malumbres ve Barbacid 2007).

1.2.11. Normal Hücrelerde Mitoz İplikçik Kontrol Noktası

Mitoz iplikçik kontrol noktası metafazdan anafaza geçişi düzenler. Bu kontrol noktası bütün kinetokorlara uygun mikrotübül bağlanmasını kontrol eder ve kinetokor gözetiminde uygun kromozom ayrılmasını sağlar. Mitotik siklinlerin yıkımından sonra anafaz başlar. Mitotik siklinler ubiquitinlendikten sonra proteozomal yıkım olur. Mitotik siklinlerin yıkımı siklinB-cdk1 kompleksini inaktive eder ve bu inaktivasyon mitozun normal bitmesini sağlar. Mitoz iplikçik kontrol noktası olgunlaşmamış kardeş kromatidlerin ayrılmasını engeller. Bu kontrol noktasında rolü olan genler, MAD1L1, MAD2, MAD2L1, MAD2B, BUB1, BUBR1, BUB3, TTK, MPS ve CDC20' dir. Bu genler hücre siklusunun kontroluna katılır. Mayadan insana kadar MAD ve BUB proteinleri korunmuştur. BUB ve MAD gen ürünleri kinetokor gözetimi ve anafaz düzenlenmesi için gereklidir. MAD proteinleri doğru kromozom ayrılmasını, BUB gen ürünleri ise mitozun ilerlemesini düzenler. Drosophila Melonogaster, C.elegans ve farede mitoz iplikçik kontrol noktasının tamamen kaybolmasının embriyon ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. DNA sentezinden sonra kohesin protein kompleksleri kardeş kromatidleri birarada tutar ve kromozomlar oluşur. Mitoz iplikçik kontrol noktası anafaz promoting kompleksi (APC) düzenler. CDC20p APC'yi aktive eder ve pds1p ubiquitinlenme ile yıkılır. Pds1p'nin yıkılması ile separin Esp 1 aktive olur ve kohesin salınır, böylece anafazda kardeş kromatidler ayrılır.

CDC20p'nin APC'yi aktive etmediği durumlarda kohesin salınmaz, kardeş kromatidler ayrılmaz ve anafazda inhibisyon meydana gelir. CDC20'nin MAD2, BUBR1, BUB3 ile kompleks oluşturması anafaza girişi beklemeye alır (Berger ve ark 1998; Anonim 2012).

1.2.12. Kanser ve Kontrol Noktası İnaktivasyonu

Gen mutasyonlarından dolayı G₁-S geçişindeki değişimler kansere neden olabilir. Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri büyüme uyarımından bağımsız olarak G₁ fazına tekrar girebilmeleridir. Rb fosforillenme/defosforillenme dengesizliği olduğunda, G₁-S fazları arası geçişlerde olan değişiklikler hücrelerin çoğalmasını değiştirebilir. Rb gen mutasyonları insan kanserlerinden bazılarında (glioblastoma ve Retino-blastoma vb) tanımlanmıştır. Tümör virüsleri HDAC ile Rb'nin bağlanmasını inhibe edebilir. Siklin D'nin fazla eksprese olduğu bazı durumlarda ise E2F aktifleşmesinden sonra Rb inhibisyonunu sağlayan defosforillenme olmadığında S fazına hatalı ilerleme olabilir. Kusurlu G1 siklin E-cdk2 kompleksi sentriollerin hatalı replikasyonunu uyarmaktadır. Hücrede iki veya daha fazla sentriolün varlığı anafazda hatalı kromozom ayrılmasına neden olur. Bazı insan kanserlerinde sentriollerin fazla dublikasyonu da belirlenmiştir (Ulukaya 2001).

1.2.13. DNA'sı Hasarlı kanser Hücrelerinde G₁-S Geçiş

Radyasyon vb. etkenlere maruz kalan hücrelerde hücre siklusunda hatalar olmaktadır. Örneğin Gama radyasyonuna maruz kalan hücrelerde fonksiyonel p53 geninin yetersiz olmasından dolayı bu hücreler G₁'de tutulamaz ve S fazında hasarlı DNA'yı dublike ederek gen mutasyonuna ve/veya hatalı kromozom dizilimine neden olur. Hücre çoğalmasını gen delesyonu, fazla gen ekspresyonu ve nokta mutasyonlar etkilemektedir. İnsan kanserlerinde farklı genlerde nokta mutasyonlar ve delesyonlar vardır. İnsan kanserlerinde en sık görülen mutant gen p53'tür. Normal bir hücrede DNA hasarı olduğunda, p53 düzeyi artar ve hücre siklusunu G₁ fazında inhibe ederek DNA onarımı için hücreye zaman kazandırır. Hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptozise gider. Hasarlı hücrenin ölümü veya hücre siklusunda kalmasının nasıl sağlandığı tam olarak bilinmemektedir. p53

mutasyonlarında hücreler bölünmeye devam eder. Bu mutasyonlar sonucunda tümör baskılayıcı fonksiyonlarında kayıp olurken diğer yandan onkojenik fonksiyon ortaya çıkabilir. Muskarinik reseptör agonist ve antagonistler varlığında çoğaltılan K562 hücrelerinde siklin D₁ transkripsiyon seviyelerinin değiştiği belirlenmiştir (Yaylacı ve ark. 2006).

ATM (Ataxia Telangiectasia Mutant kinaz) tarafından p53'ün aktivasyonu DNA onarımı ve apoptozisi koordine eden DNA hasar sinyal yollarına aracılık eder. ATM çift iplik kırıklarına cevapta ve ATR (ATM ve Rad3 related) olarak adlandırılan kinaz diğer tip DNA hasarlarına cevapta önerilmektedir (Weinberg 2007).

Hücre siklusunda ATM ve CHK2 ekspresyonu nispeten devamlı olmasına rağmen ATR ve CHK1 G₁ fazının başında ve ortasında düşüktür. ATR ve CHK1 G₁/S geçişine yaklaştıkça önem kazanır. ATM/ATR p53 transkripsiyon faktörünü fosforiller, ubiquitin kinaz, MDM2 p53'ün hızlı sirkülasyonunu sağlamaktadır. Ayırıcı hedef mekanizmalar hala açıklanamamıştır. p53'le uyarılan G₁ fazında duraklamada p21Cip1/Waf 1'in rolü vardır. Aynı zamanda PCNA (proliferating cell nuclear antigen) inaktive olmaktadır. PCNA, DNA sentezini katalize eden, DNA tamirinde yer alan DNA polimeraz delta'nın kofaktörüdür. Sentezi hücre siklusunun geç G₁fazında başlayarak orta-geç S fazında en yüksek değere ulaşmaktadır. p21, cyc-cdk kompleksini inhibe etmesi yanında PCNA'ı de inhibe eder. Hücre siklusunun G₁/S fazında durdurulmasında yeni belirlenen nükleer protein ICBP90'un p53/p21Cip1/WAF 1 aracılı yollarda hedeflerden biri olarak önerilmektedir. İnsan Rad 9 ve Rad 17 proteinlerinin S fazı başlangıcındaki kontrol noktasında ve kromozom kararlılığının sürdürülmesinde önemli olduğu belirlenmiştir. Rad 9'un ATR kinazla büyük protein kompleksinin fosforillenmesine aracılık ettiği de önerilmektedir. p53 ve Rb protein fonksiyon kaybının nedenleri mutasyon, delesyon veya diğer proteinlerle bağlanma olabilir. Rb kontrolü kanser hücrelerinin bir çok tipinde bozulmaktadır. Rb kontrolünün bozulma nedeni Rb fosforillenmesinde rolü olan siklin ve cdk'larda onkojenik mutasyonlardır. p53 fonksiyonu cdk 4 ve cdk 6 supressorlerinin fazla ekspresyonu ile baskılanır. Genomda onkogenik lezyonlara p53 fonksiyonunun bozulması

neden olur. Bunun nedeni p53'ün apoptozis öncesi düzenlenmesinin gerçekleşmemesidir. Hücre siklusunda kontrolün kalkması p21, p27, p57 gibi p53'ün downstream genlerinde kusurlara neden olabilir. Cdk'ların ve siklin-cdk komplekslerinin aktivitelerini Cdk (p21, p27, p57)'nin inhibitörleri inhibe eder ve hücrenin S fazına girişini engeller. Bazı tümörlerde cdk4 ve cdk 6'nın negatif düzenleyicileri olan p15 ve p16'nın mutant olduğu da rapor edilmiştir. Tümör hücrelerinin bir kısmında cdc4 de kusurlar veya cdc4'ün ekspresyonunun fazla olmasından dolayı siklin E düzeyi normal değildir. Bazı tümör hücrelerinde siklin E-cdk2'nin negatif düzenleyicisi olan cdk inhibitörü, p27'nin kaybolduğu da belirlenmiştir (Angle 2011).

1.2.14. Kanser Hücrelerinde G₂-M Geçiş

Kanser gelişiminde ve/veya hastalığın ilerlemesinde G₂-M geçişinde değişimlerin rol oynadığı belirlenmiştir. İyonize edici radyasyon Ku homoloğu olan protein kinazları, ataxia telegiectasia mutant (ATM) ve ATM ilişkili (ATR) genleri aktive eder. Mayada yapılan çalışmalarda telomer idamesi ve DNA onarımı arasındaki bağlantı gösterilmiştir. Ku, DNA kırıklarının onarımında homolog olmayan uçlar için gereklidir. Ku telomerik DNA'ya bağlanır ve G zengin dizilerin işlenmesine katılır. Telomer idamesinde rolü olan Ku, DNA'larında çift iplik kırığı olan hücrelerin G₂-M geçişinde aktive olmaktadır. Chk1 ve Chk2 protein kinazlar ilk olarak mayada gösterilmiştir. Bu kinazlar, DNA hasarı sonucu aktive olan hücre siklus kontrol noktalarında önemli rol oynamaktadır. Mutant Chk2 Li-Fraumeni sendromlu hastalarda bulunmuştur. Chk2 tümör baskılayıcı gen olmaya adaydır. DNA hasarının ardından, Chk1 ve Chk2 yalnız G₂ bloğunu uyaran cdc25c'yi fosforillemez; aynı zamanda stabilizasyon için p53 fosforilasyonunu da uyarır. Mikrotübül inhibitörlerinin yaban (wild) tip p53'lü fare embriyo fibroblastlarına verilmesi ile G₂-M geçiş bloğu aktive olmaktadır, bunun yanı sıra mutant p53'lü hücrelerde hücre siklusu durdurulamamıştır. Bu blok kromozomların ayrılması ve mitoz tamamlanmadan önce diğer S fazına geçişi önleyerek aneuploidiyi engellemektedir. Böylece mutant p53 uygun kromozom ayrılması olmaksızın tekrar tekrar döngüye neden olarak genomik dengesizliğe neden olmaktadır (örneğin aneuploidi). Bu cdk'ların

aktivitelerinin inhibisyonu ile gerçekleşir. Bu geçişin inhibisyonu p53'ün G₂'ye girişi inhibe eden 14-3-3 geninin transkripsiyonunu artırmasıyla sağlanmaktadır. 14-3-3 cdc25c kompleksi, cdc 25c'nin çekirdeğe girişini engeller. Memelilerde DNA hasarı sonucunda tetiklenen sinyal ileti kaskadında ATM ve ATR protein kinazların önemli rolleri vardır. Chk1 ve chk2 bu kinazların kontrol noktası fonksiyonlarına aracılık etmektedir. ATM ve ATR stress olmadığında aktive olmazlar, strese maruz kalınca aktive olmaktadır. ATM kinaz normal hücre siklusu ilerlemesinde veya hücre farklılaşmasında gerekli değildir (Yılmaz 2008).

1.2.15. Kanser Hücrelerinde Mitoz İplikçik Kontrol Noktası

Bazı araştırmacılara göre kanser gelişimini ve genomik dengesizliği mutasyon oranları ile açıklamak mümkün değildir. Genomik dengesizlik somatik hücre gen mutasyonu veya aneuploidi gibi kromozom anomalileri içerebilir. Aneuploidi tümör baskılanmasında, hücre siklusunun düzenlenmesinde, sentrozom oluşumu ve fonksiyonunda, hücre büyümesi, metastaz ve metabolizmada bulunan çok sayıda genin dengesizliği olarak tanımlanabilir. Kanser gelişimi ve ilerlemesinde aneuploidilerde mitotik kontrol noktası içindeki MAD veya BUB genlerindeki mutasyonların rol oynayabileceği önerilmektedir. Bu mutasyonlar mitotik kontrol noktası değişimine, metafazdan anafaza geçiş sırasında kromozomların yanlış ayrılmasına ve aneuploidiye neden olur. Bu tip mutasyonlar ilk olarak aneuploidi fenotipli olarak sınıflandırılan 19 kolorektum kanser hücre soyunda çalışılmıştır. On dokuz hücre soyundan ikisinde BUB1 geninde farklı mutasyonlar belirlenmiştir. Aneuploidili bireylerde hBUB1 geninde kalıtsal mutasyonlar bulunmuştur. BUB1 üç fonksiyonel domain içerir: Bunlar CD1, nükleer lokalize edici domain (NLS) ve kinaz domain (CD2)'lerdir. CD1 içinde çerçeve kayması ve anlamsız mutasyonlar bulunmuş, NLS veya CD2 domainlerinde ise mutasyon bulunamamıştır. Farklı araştırmacılar aneuploidi belirlenen kanserlerde BUB ve MAD genlerinde mutasyonlar bulmuştur. Fakat bu mutasyonlar ile ilgili çalışmalar hala yetersizdir. İnsan kanserlerinde mitoz iplikçik kontrol noktaları hakkında bilinenler çok azdır. İnsan kanserlerinin çoğunda mutant MAD1'in kromozom instabilitesine neden olduğu belirlenmiştir (Haris 1996).

Aurora kinaz ailesi hücre siklusunu G₂/M kontrol noktasından sonra mitoz kontrol noktasında veya mitozun sonuna doğru rol oynar. Aurora kinazlar hatasız hücre bölünmesi için gereklidir. Aurora kinazların kromozom dizilimi, kromozom ayırımında ve sitokinesisde önemli rolleri vardır. Aneuploidi olan tümörlerde Aurora kinaz'ın fazla ekspresyonu ve sentrozom amplifikasyonu belirlenmiştir.

Aurora A kinaz p53 gibi tümör baskılayıcı proteinleri fosforilleyerek onların aktivitelerini de düzenlemektedir. Aurora A ve B'nin ras yolağı aracılığı ile hücre transformasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle Aurora kinaz inhibitörleri ile hücre siklusu bloke edilerek kanser tedavisine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Aurora B kinaz inhibitörü AZD1152 lösemi tedavisine yeni etken madde olarak önerilmektedir (Yılmaz 2008).

1.2.16. Türkiye’de Kanser ile Savaş

Türkiye’de kanserle savaş faaliyetleri 1947’de Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu’nun kurulması ile başladı. Ahmet Andiçen Onkoloji Hastanesi Ankara’da 1955’te faaliyete girdi ve 1970’te Sağlık Bakanlığında Kanserle Savaş Dairesi haline gelecek olan Birincil Sağlık Hizmetlerinde Kanserle Savaş Dairesi 1962’de kuruldu. Bu Daire kanserle savaşla ilgili önleyici hizmetlerin ve tedavi hizmetlerinin düzenlenmesinden ve kanser tedavisi kaynaklarının uygulanması, yürütülmesi ve denetlenmesinden sorumludur. 1970’te 1-7 Nisan haftası Ulusal Kanser Haftası olarak belirlenmiş olup bugün de bu uygulamaya devam edilmektedir. 2008’de Türkiye nüfusunun 73,2 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Her 1000 kişiye 1,4 doktor ve 2,6 hastane yatağı düşmektedir. 2008 yılında Gayri Safi Yurt içi Hasılanın (GSYİH) tahmini %7,7’si sağlık hizmetlerine harcanmıştır. Türkiye’de her yıl 150.000 yeni vakanın ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. Erkeklerde en sık rastlanan kanserler nefes borusu, bronş ve akciğer (%33), mide (%9), idrar torbası (%9), kalın bağırsak ve rektum (%8), prostat (%6), ve larinks kanserleridir. Kadınlarda en sık rastlanan kanserler meme (%24), kalın bağırsak ve rektum (%9), mide (%7), yumurtalık (%6), nefes borusu, bronş ve akciğer (%6), lösemi (%5) ile serviks (%5) ve korpus (%5) kanserleridir (Boyle ve Levin 2008).

Kanser Tedavi Tesisleri:

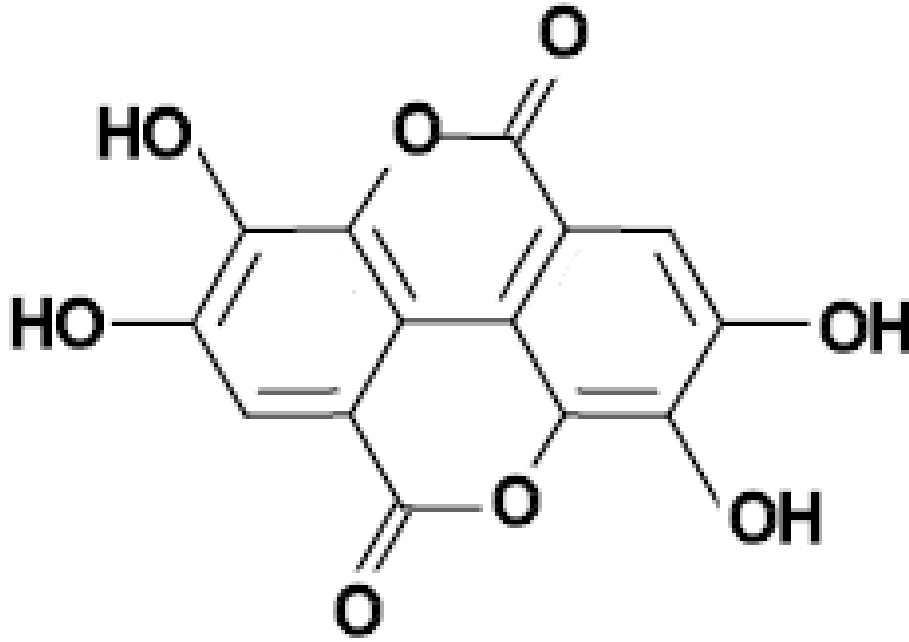
Türkiye’de kanser tedavisi devlet hastanelerinde, üniversite hastanelerinde ve özel hastanelerde yapılmaktadır. Onkologların büyük çoğunluğu genellikle yüksek standartlara sahip büyük merkezlerde çalışmaktadır. Türkiye’de üç onkoloji enstitüsü (Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü ve Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü) ile 44 kanser teşhis ve tedavi merkezi bulunmaktadır. 2007 başında Türkiye’de 170 tıbbi onkoloji mütehassısı bulunmaktaydı; bu rakam idealin altındadır ve kanser tedavi hizmetlerinin geliştirilmesindeki kilit darboğazlardan biri olarak kabul edilmektedir. Yakın gelecekte bu durumu düzeltmeye yönelik olarak yürürlüğe girecek çeşitli adımlar atılmıştır. Ancak birçok kemoterapi ilacının yüksek maliyetinin ülkenin sağlık bütçesini zorlayacak düzeyde olması sorunu bakidir. Kanserle Savaşın basitçe Tedavi Hizmetleri olarak yorumlanması dünya çapında bir sorundur. “Kanserin önlenabilir ve kontrol edilebilir bir hastalık olduğu bilinci ancak çok yakın bir zamanda yerleşmeye başlamıştır”. Türkiye’nin yaklaşık 300 faal radyasyon onkoloğu ve halen eğitimlerine devam eden artan sayıda radyasyon onkologları ile faal bir radyasyon onkolojisi programı mevcuttur. Radyoterapi teçhizatı üreticisinin bulunmayışı ihale açılması ile yeni ve modern teçhizatın kurulup çalışmaya başlaması arasında önemli gecikmeler içeren bir dizi probleme yol açmıştır. Ayrıca tıbbi fizikçilerin sayısı da kısıtlı durumdadır. Kanserlin önlenmesi ve erken teşhis. Kanser kayıt merkezlerinin kurulmasına yönelik bir proje 1992’de başlatılmıştır. Bugün ulusal politika olarak kabul edilen kanserle savaş planının asli önceliği kanser insidansına dair güvenilir ve doğru verilerin toplanmasıdır. 2006’de Ankara, Antalya, Samsun, Erzurum, Trabzon, İzmir, Edirne ve Eskişehir’de kanser kayıt merkezlerinin oluşturulması ve geliştirilmesine öncelik verilmiştir. Ayrıca her ilde bir Kanser Erken Teşhis ve Tarama Merkezi (KETEM) kurulmasına yönelik adım atılmaktadır (2008 sonu itibariyle bu merkezlerden 83 adet olacaktır). KETEM projesi Avrupa Birliği ve Türk Sağlık Bakanlığı tarafından müştereken 1996’da başlatılmış ve 2004’te uygulamaya konmuştur. Dahası, serviks ve meme kanserleri için oturmuş AB kalite kontrol kriterlerine uygun olarak tasarlanmış nüfus tabanlı tarama programları yurt çapında hızla ilerlemektedir. Tütün Türkiye’de kanserlin altında

yatan en önemli neden addedilmektedir ve (5727 sayı ve 3 Ocak 2008 tarihli) Tütün Ürünlerinin Zararlarının Önlenmesi ve Kontrolü Hakkında Kanun kabul edilmiştir. Bu kanun bar, restoran ve kamuya açık alanlarda sigara içmeyi yasaklamaktadır. Bu kanun Türkiye’de kanserle savaşın geleceğine yapılmış önemli bir yatırımı temsil etmektedir (Boyle ve Levin 2008).

1.3.Ellajik Asit

1.3.1. Ellajik Asitin Kimyasal Özellikleri

Ellajik asit (EA), doğada birçok bitkide serbest ve ellajitanen glikozitleri halinde bulunan polifenolik bir bileşiktir. Ellajik asit 338.2 moleküler ağırlığı ile heksahidroksidifenik asidin dilaktonudur. Ellajik asit, doğada zayıf bir asit olup, 360°C üzerindeki yüksek erime noktası ile çok kararlı bir bileşiktir. Ellajik asit, hidrofilik kısmı temsil eden dört Fenolik ve iki lakton grupları (sırasıyla hidrojen bağvericisi ve alıcısı olarak rol oynayabilir) ve lipofilik alanı temsil eden dört halka ile termodinamik olarak oldukça kararlı bir moleküldür. Lipofilik üstünlük gösteren molekülün dört halkası nedeniyle ellajik asit ısıya oldukça dayanıklıdır. Dört fenolik grup, ellajik aside kalsiyum ve magnezyum gibi metal iyonları ile kompleks form oluşturmasını sağlamaktadır. Ellajik asit; suda az çözündüğü halde metanolde, etanolde ve dimetil sülfoksitte iyi çözünmektedir (Hannum 2010).Aşağıda asidin kimyasal yapısı gösterilmiştir (Muthukumar ve ark. 2011).



Şekil.1.6 Ellajik Asit Kimyasal Yapısı

1.3.2. Ellajik Asitin Kullanım Alanları

Ellajik asit serbest radikallerin yıkıcı etkilerini bloke edici özelliği olan bir antioksidandır. Ellajik asit antioksidan, antimutajen ve antikanser bileşenlerine sahiptir. Çalışmalar; göğüs, özefagus, deri, kolon, prostat ve pankreas kanserli hücreler üzerindeki, anti kanser aktivitelerini göstermiştir. Daha spesifik anlamda ellajik asit P53 geninin, kanser hücreleri tarafından yok edilmesini önler. Ellajik asit kansere sebep olan moleküllere bağlanarak onları etkisiz hale getirir. Araştırma, ellajik asitin P53 genini koruduğunu göstermiştir. Bu gen normal koşullar altında hasar görmüş DNA'yı yeniden yapılandırma yeteneğine sahiptir. Ama kanserin gelişmesinin bir parçası olarak kapanır. Göğüs, prostat, deri, serviks ve kolon kanserlerinin oluşmasında bunun bir faktör olduğuna dair kanıtlar vardır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ellajik asitin kanserli hücrelerin büyümesini engelleyici ve oksidatif hasara karşı korunmada yararlı olabileceğini göstermiştir. Ellajik asit kansere yol açan maddeleri (mutagen) inaktif duruma getirir (Aguilera ve ark. 2007).

Hücrel DNA da kanserojenlerin bağlanmasını engeller. Kanser hücrelerin yaşaması için gerekli olan NFkB'yi engeller ve kanserli hücrelerin intihar etmesi anlamına gelen apoptosis sürecini başlatır. Güney Carolina Tıp Üniversitesi Holings kanser merkezinde DR NIXON 'un laboratuvarı, ellajik asitin, kolon ve serviks kanser hücrelerinin gelişmelerini engellemesi yeteneği üzerine bir çalışma yaptı. Araştırma ekibi tarafından ulaşılan kanıt insan vücudu dışından yayılan deneysel sistemde, ellajik asidin, her iki kolon ve serviks kanserli hücrelerinin yayılmasını yavaşlattığı yönündeydi (Wen ve ark. 2007).

1.3.3. Ellajik Asitin Biyokimyasal Önemi

Kanserojen maddelerin DNA'ya bağlanmasına engel olur. Bu şekilde, DNA'da mutasyonu engelleyerek, kanserli hücrelerin oluşumunu durdurur. Kanserli hücrelerin üremesini G fazında durdurur. Apoptosisle de normal hücrelere zarar vermeden oluşan kanserli hücreleri öldürür (Pinto ve Lajolo 2011).

Diyetlerinde % 5-10 oranında ahududu olan tavşanlarda, tümör öncü lezyonlarında belirgin küçülme görülmüştür. Mevcut tümörün büyümesi de yavaşlamıştır. Kalın bağırsak kanseri, diyetten en çok etkilenen kanser türlerinden biri olup, ahududu yiyen tavşanlarda, kalın bağırsak kanserinin ilerlemesinin % 80 oranında azaldığı rapor edilmiştir. Güney Carolina Üniversitesi'nde, Hollings Kanser İnstitüsü'nde yapılan bir araştırmada, rahim ağzı kanserli hastalarda, ellajik asitin kanser hücrelerinin üremesini durdurduğu gözlenmiştir. Üstelik de 2 gün gibi çok kısa bir sürede hücre üremesi durmakta, 3 gün içinde de apoptosisle hücre ölümü gerçekleşmektedir. Meme, prostat, kalın bağırsak, pankreas, yemek borusu ve cilt kanserlerinde de aynı etki görülmüştür (Yu ve ark. 2005).

Kanser hücreleri, normal hücrelerden 10-15 kat daha fazla glikoz (şeker molekülü) açlığı çeker. Ellajik asit, glikoz molekülüyle bileşik halde bulunur. Böylece kanserli hücreler glikozu kandan iştahla çekerken, ellajik asiti de çeker ve ellajik asit, kanserli hücrelerde daha yoğun ve etkili bir hâle gelir. Bitkilerdeki ellajik asit, saf şekilde bulunmaz. Glikoz ve galiik asit, HHDP'den oluşan bir bileşik halde bulunur. Bu bileşiğe ellajitannin denir. Ağız yoluyla ellajik asit içeren bitki alındığında, ellajitannin şekliyle emilir. Diyetle düşük dozda

ellajitannin bulunması, ilaç olarak yüksek dozda ellajik asit verilmesinden daha etkilidir. Çünkü ellajik asitin emilimi azdır. Zaten ellajik asit içeren ilaçlar hakkında da çelişkili açıklamalar var. Kimi tazesini daha faydalı diyor, kimi pişirmekle etkisi geçmez diyor, kimi toz halinde, kimi 50 mg, kimi de 900 mg gibi yüksek dozlarda tavsiye ediyor. En iyisi, günde 1 bardak ahududu yemek. Ahududu yerine onun yerini tutacak diğer kırmızı küçük meyvelerden (çilek, karadut, böğürtlen) de iki katı olmak şartıyla yenebilir. Ahududu, şekerli marmelatı yapılarak diğer mevsimlerde de tüketilebilir (Loo ve ark. 2010).

1.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ

1.4.1. Hücre Kültürü Nedir?

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Pratikte hücre kültürü terimi, çok hücreli ökaryotlardan özellikle hayvan hücrelerinden kaynaklanan hücrelerin kültürlenmesi için kullanılmaktadır. Hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar günümüzde popüler araştırma konularında önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Örneğin, kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkilerini ya da bir hücre veya dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla hücre kültürleri yapılabilmektedir. Hücre kültüründe belirli bir hücre hattından çoğaltılan hücrelerde çeşitli çalışmalar yapılarak canlı ortamında (in vivo) yapılamayan deneyler yapılabilir ve buradan yola

hayvansal hücre kültürü teknikleri 1900'lerin ortalarında laboratuvarlarda rutin olarak uygulanmaya başlanmış ancak asıl doku kaynaklarından ayrılan sürdürülebilir yaşayan hücre hatları kavramı 19. yüzyılda ortaya konmuştur. Hücreler dokulardan ex vivo olarak birkaç günde saflaştırılabilir, ayrıştırılabilir. Hücreler kandan kolayca elde edilebilir; ancak sadece beyaz kan hücreleri kültürde üreme yeteneğine sahiptirler. Tek çekirdekli hücreler, hücre dışı maddeyi bozan kollajenaz, tripsin ya da pronaz gibi enzimatik sindirim yapan enzimler tarafından yumuşak dokulardan alınabilirler. Farklı olarak, doku parçaları büyüme ortamına (besiyeri ya da medyum) konulabilir ve hücreler bu

şekilde "kültüre edilmiş" olur. Hücreler, "birincil kültür" olarak adlandırılan yöntemle doğrudan kültüre edilebilmektedir. Tümörlerden kaynaklanan bazı istisnalar hariç, çoğu birincil hücre kültürünün sınırlı yaşam süresi vardır. Çoğalan hücrelerin önemli bir miktarı (özellikle kanser kökenli olmayanlar), kültürün ilerleyen zamanlarında yaşlanma ve bölünmenin durması gibi süreçlere girer; bu hücreyi canlılıktan alıkoyar. Belirlenmiş ya da ölümsüzleştirilmiş bir hücre hattı, rasgele bir mutasyonla ya da telomeraz geninin yapay ifadesi gibi bilinçli değişimlerle süresiz çoğalma yeteneğine kavuşabilir. Özel hücre tiplerinin iyi belirlenmiş hücre hattı örnekleri oldukça çeşitlidir. Hücreler uygun bir sıcaklık ve gaz karışımıyla (hayvan hücreleri için 37°C ve %5 CO₂ içeren) inkübatörde geliştirilebilir ve sürdürülebilir.

1.4.2. Hücre Kültürü Tarihçesi

Hücre kültürü, hücrelerin belirli bir besin ortamında çoğaltılmasıdır. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarının günümüzde önemli bir yeri vardır. Çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkilerini, bir hücre ya da dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla belli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak in vitro sonuçlar elde edilebilir. Hücre kültürü çalışmalarının geçmişine bakacak olursak ilk olarak 1885'te Roux embriyonik tavuk hücrelerinin hayvanın vücudunun dışında tuz çözeltisinde canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir. Harrison (1907), kurbağa embriyonik dokusundan kültür yaparak aksonların gelişimini göstermiş, daha sonra da (1910) yılında Burrows, tavuk embriyonik dokularını geliştirmek üzere tavuk plazması kullanmıştır.

1.4.3. Hücrelerin İnkübasyonu ve Bakımı

Hücreler karanlıkta inkübe edilmelidirler. Çünkü ışık besiyerindeki ve hücre yapısındaki bazı organik yapıları bozarak hücre için toksik hale getirebilir. Hücre kültürleri günlük olarak kontrol edilir. Morfolojik görünüm, mediumun rengi ve hücrelerin rengi incelenir. Günlük olarak sonuçlar laboratuvar defterine kayıt edilir. Deftere kültürün adı, hücre serisi adı, besiyeri bileşimi, standart mediyuma modifikasyon yapıp yapılmadığı ve gözlemler yazılır. Büyüme

kontrolü invert mikroskopla yapılır; canlılık testleri, trypan blue ile yapılırsa ışık mikroskopunda, etidyum bromür akridin oranj ile yapılırsa floresan mikroskopunda kontrol edilir. Kùltürler günlük olarak kontrol edilmelidir. Besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu gözlemlenmelidir. Kùltürde hücreler; hücre tipine, ekilme yoğunluğuna, ortamın yoğunluğuna ve daha önceki işlemlere bağlı olarak önce sessiz (inaktif) ya da gecikme fazı denilen bir döneme girerler. Bunu en yüksek metabolik aktivitenin gözlemlendiği logaritmik artış (üreme) dönemi izler. Bundan sonra da hücreler hücre sayısının sabit kaldığı bir durağan evreye girer (tüm üreme yüzeyleri kaplanmıştır). Hücrelerin nüfus yoğunluğu üremeyi baskıladığı zaman besiyerinden alınırlar. İdeal olanı hücrelerin durağan evreye girmeden önce kùltürden alınmalarıdır. Hücrelerin kùltür kabından alınmaları için değişik yöntemler kullanılabilir.

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

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

EDTA: Tek başına EDTA kullanılarak da hücreler yüzeyden ayrılabilir. Kùltür kapları CO₂ etüvüne (37⁰C;%5 CO₂) konduğu zaman gaz giriş-çıkış için kapları ağzı hafif açık olmalıdır. Ayrıca ortamın nemli olması ve görünür ışıktan sakınılması da gereklidir. Hücre kùltürü çalışmalarında da tüm laboratuvar çalışmalarında olduğu gibi güvenlik önlemlerine dikkat edilmelidir.

1.4.4. Hücrelerin çoğaltılması ve stoklanması

Hücreler 25 cm²'lik flasklarda 5ml, 75cm²'lik flasklarda ise 10ml %10 ve 100 IU/ml penisillin streptomisin içeren DMEM-F12 medyumunu icerisinde %80-90 yoğunluğu geldiklerinde pasajlanmak suretiyle üretilebilir.

Hücreler %0.05'lik tripsin uygulanması ile yapıştıkları yüzeyden kaldırılır. Kalktıkları gözlenen hücrelere tripsinin etkisini bloke etmek için medyum eklenir ve süspansiyon santrifüj tüpünde toplanarak 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır. Pellete tekrarmedyum eklenir ve tripsinin etkisinden kurtarmak için tekrar santrifüj edilir. Bu işlem sonrası pellete tekrar medyum ilave edilir ve pipetajla tek hücre süspansiyon denen tek hücre süspansiyon elde edilir.

1.4.5. C6 Hücrelerinin Özellikleri

Kanser, kalp hastalıklarından sonra tüm ölümlerin ikinci en sık sebebidir (Salomon ve Sartorelli 2001). Kanser tipine ve gelişim evresine bağlı olarak cerrahi çıkarım, radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin ya tek başlarına ya da kombine kullanımıyla tedavi edilmektedir (Rang ve Dale 1993). Ancak hastaların bir kısmı hastalıklarının tedavisi süresince çeşitli destekleyici ve alternatif tedavi yöntemlerini kullanmaktadırlar. Bunlar arasında enerji tedavileri, bitkisel tedaviler, akupunktur, meditasyon gibi değişik yöntemler vardır. Bu yaklaşımlardan bitkisel tedavilere gerek ülkemizde gerekse dünyada oldukça sık başvurulmaktadır (Algier ve ark. 2005; Molassiotis ve Fernandes 2005).

Diğer yandan doğal yollarla elde edilen ilaçların yan etkilerinin az olduğu düşünülmeyle birlikte bu ilaçların klinik kullanıma geçirilmeden önce yararları olduğu kadar zararlı etkileri bulunabileceği gerçeğinden hareketle, etkilerinin çok dikkatle araştırılmasının gerekliliği ortadadır. Tedavi seçiminde yararı bilinen ve yan etkisi olmayan uygulamaların tercih edilmesi gerektiği de açıktır. Malign beyin tümörlerinin oluşumunun ve gelişmesinin anlaşılmasında ve buna dayalı tedavilerin saptanmasında, in vivo çalışmalarda hayvan tümör modelleri vazgeçilmez kaynaklardır. Hayvan beyin tümörlerinin, insan beyin tümör modelleri ile olan benzerlikleri, klinikte parametrelerin tanımlanması ve doğru tedavinin uygulanması açısından oldukça yol göstericidir (Grobbs ve ark. 2002). Primer beyin tümörlerinin %60 kadarını gliomalar oluştururlar (Graham ve Cloughesy 2004). Glioblastoma multiforme (GBM) neoplastik hücrelerin merkezi sinir sistemine infiltrasyonu sonucu nörolojik fonksiyon kaybına ve sonunda da ölüme yol açan bir kanserdir. C6 glioma hücreleri yüksek mitotik aktivite, nükleer

pleomorfizm, tümör nekroz odakları, tümör içi kanama gibi çeşitli malign glioblastoma karakteristiklerine sahip hücreler olarak GBM araştırmalarında kullanılmaktadır. Wistar-Furth sıçanların N-N' nitrozometilüre uygulanmasıyla oluşturulan C6 glioma tümör hattı ilaç etkili flimi çalışmaları için tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır (Grobben ve ark. 2002). C6 glioma hücreleri ile yapılan bir in vitro çalışmada ellajik asitin apoptozis, otofaji ve astrositik farklılaşmaya yol açarak antitümör etki gösterdiği belirtilmektedir (Mijatovic ve ark. 2005).

1.5. Sitotoksite Testleri

1.5.1. MTT Analizi

Kültürdeki hücre sayısını belirlemek için direk ve indirek olmak üzere iki yöntem vardır. Direk yöntemde tüm hücreler sayılırken indirek yöntem ise yaşayan hücrelerin kültür parametrelerindeki değişikliğe dayanır. Tetrazolyum boyasının (MTT) sayısını belirleyen bir indikatör olarak kullanımı ilk olarak 1980 li yılların başında rapor edilmiştir. MTT deneyi sık sık hücre poliferasyonunu ölçen indirek indikatör olarak kullanılmasına rağmen aslında MTT mitokondriyal aktivasyonu ölçen bir indikatördür.

MTT testi hücre kültürü esasına dayanan indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan bir ilaç duyarlılığı testidir. Birçok araştırmacı tarafından sitotoksite araştırmalarında kullanılmaktadır. Kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Hızlı ve doğrudan dehidrogenaz aktivitesini ölçer. Tetrazolyum tuzlarının formazan ürünlere dönüşümü, NADH veya NADPH'in azalmasıyla meydana gelir. NADH dehidrogenazları ise biyosentetik üretim reaksiyonlarında görev alır. Bu dehidrogenazlar genelde mitokondrilerde yer alırlar. Bu nedenle MTT tekniği mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolyum tuzlarının indirgenmesine dayanır. Kolorimetrik ölçümlerde tercih edilen renksiz substrat kullanılarak yaşayan hücrelerde renkli ürünler elde etmektir. Tetrazolyum tuzları bu amaçla kullanılan substrat olarak kullanılan renksiz, yaşayan hücrelerin sağlam

mitokondirilerinde renkli ürünler veren maddelerdir. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolyum bromür) bu amaçla kullanılan sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olup sağlam mitokondrilerde süksinatde-hidrojenaz enzime spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur. Dehidrogenazlar NADH ya da NADPH kullanarak sarı renkteki MTT tuzlarını mor formazan kristallerine dönüştürür. Formazan kristalleri DMSO, izoprpanol ya da formazan ürünlerin çözülebildiği ve rapor edilen diğer uygun çözücülerde çözüldükten sonra çözünen boyanın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Oluşan formazan tuzlarının miktarı direk olarak hücre sayısının oranını gösterir. Bu teknik, düşük maliyetli, hızlı, hassas, güvenilir ve çok sayıda örnekle çalışılma imkanı sağladığından tercih edilmektedir (Erenoğlu 2012).

2. MATERİYAL VE METOD

2.1. MATERİYAL

2.1.1. Hücre Serileri

Çalışmamızda ATCC'den sağlanan C6 glioma hücre serileri kullanıldı.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Ellajik Asit (Fluka), Acridin Orange, Phosphate Buffered Saline (PBS), Tripsine –Etilendiamin tetraasetik asit (Tripsine-EDTA), Osmium tetraoksit, Gluteraldehit, Araldit, Propilen oksit, Uranil asetat, Kurşun sitrat (Electron Microscopy Sciences); diğer bütün kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Penisilin-streptomisin, 3-(4,5 dimethyl-2-thiazolyl) -2,5- diphenyl-2H-teyrazolium bromide (MTT), Dimethylsulfoxide (DMSO) Sigma'dan satın alınmıştır.

2.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 ve 75 cm² lik flasklar (TPP), 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP), cam pipetler (1, 2, 5 ve 10ml hacimlerinde), Duran şişeleri; steril santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml) (TPP), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı (Marienfeld), 10, 100 ve 1000 µL 'lik pipet takımı ve uçları (Eppendorf), Steril cam petri kapları, Lamel 15 X15, Rodajlı lam, Kryotüp, Grid.

2.1.4. Kullanılan Cihazlar

Biyogüvenlik Kabini (Holten Lamın Air Hv 2448), Sterilizatör (Heraeus), Mikroplate Okuyucu (Bio-Tek Elx808), Inverted Mikroskobu (Olympus CKX41), Inverted Mikroskop, Santrifüj (Heraeus Biofuge 17RS), Hassas Terazî (AndGR-200), CO₂ inkübatörü (Heracell 150i), Su Banyosu (Nüve BM 402), Otoklav (Nüve), Çeker Ocak (İnterlab), Buzdolabı (Arçelik), Derin Dondurucu (-20) (Bosch), sıvı azot tankı (Taylor-Wharton), otomatik pipetler (eppendorf). Elisa okuyucu (El x 808), Leica TCS-SP5 II konfokal, Geçirimli elektron mikroskobu

(TEM FEI Tecnai Bio Twin), Ultramikrotom (Leica EM UC6), BD FACS Aria cell sorter flow cytometry cihazı.

2.2. METOD

Çalışmamızda C6 insan beyin kanser hücre dizileri kullanıldı. Deneylere ATCC'den gelen hücrelerin kültüre edilmesi ile başlandı. Deneylerde kullanılacak yeterli hücre miktarlarına ulaşıldıktan sonra pasajlama işlemi yapıldı. C6 hücrelerinden yeterli sayıda flask ve stok elde edildikten sonra deneylere başlandı.

2.2.1. Hücre Kültürü

2.2.1.1. Sterilizasyon

Çalışmalarda kullanılan cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C de 2 saat, yine bazı cam ve plastik malzemeler ve sıvı solüsyonlar da alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C, 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika süre ile steril edilerek, kullanılan bazı sıvı kimyasallar ise 0,2 mm aralıklı sellüloz nitrat filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

2.2.1.2. Kullanılan Besiyeri ve Hazırlanışı

Kültürde kullanılan hücre tipine özel besiyeri DMEM hazırlandı. Besiyeri için kullanılan tüm malzemeler, steril bir şişede ve por büyüklüğü 0.22 µm olan filtreden geçilerek hazırlandı.

2.2.1.3. Hücre Serilerinin Kültür Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan C6 hücre serileri ATCC'den sağlandı. Hazırlanan besiyeri (%10 FBS , %1 Penicillin-streptomycine, %89 DMEM) su banyosu ya da inkübatörde 37 °C 'ye kadar ısıtıldı. -196 °C 'de sıvı azot tankında bulunan hücreler tanktan çıkarılıp 37 °C su banyosunda kapak kısmından tutarak ve su içerisinde hafifçe sallayarak içeriğinin tamamen erimesi sağlandı. Açmadan önce kriyotüp %70 alkol ile ıslatılmış kağıt mendil ile silindi. Laminar hava akışlı kabin içerisinde, tüp içerisindeki hücreler 10 ml besiyeri içeren steril santrifüj tüpüne yavaşça transfer edildi. 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant kısım döküldükten sonra, hücre peleti uygun miktarda besiyeri ile homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler kültür flaskına alınıp 37 °C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültür edildi.

2.2.1.4 . Hücre Serilerinin Pasajlanması

Hücre kültüründeki kullanılmış besiyeri pipet yardımıyla boşaltıldı. Kültür kabının hücre bulunmayan yüzeyine doğru PBS ilave edilerek hücrelerin yüzeyi PBS ile bir kez yıkandı. Daha sonra 1X tripsin –EDTA solüsyonu konularak yapışan hücre hatlarının flasktan kalkması sağlandı. Kültür kabına eklenen tripsin-EDTA hücreler yuvarlaşınca kadar (yaklaşık 3-5 dakika) 37 °C’de inkübatörde bekletildi. Bu süre içerisinde hücrelerde değişim olup olmadığı inverted mikroskopta kontrol edildi. Tripsinin hücrelere zarar vermesini engellemek için hücreler kalktıktan sonra besiyeri ilave edilerek hücreler pipet yardımıyla homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler 1200 rpm’de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atılıp hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenip, hücreler pipet yardımıyla homojenize edildi ve flasklara bölünerek tekrar inkübatörde kültüre alındı.

2.2.1.5. Hücre Serilerinin Stoklanması

Yeterli hücre sayısı yoğunluğuna ulaşan flasklar üzerlerinden besiyeri alınıp PBS ile yıkandıktan sonra 1X tripsin –EDTA yardımıyla kaldırıldı. Besiyeri eklenip, 1200 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve taze besiyeri yardımıyla hücre süspansiyonu hazırlandı. Süspanse hücre kültürürlerinin canlılık oranları ve hücre yoğunluğu belirlendi. Her bir kriyotüp için 1800µl hücre besiyeri konuldu, kriyotüplere 200µl DMSO çözeltisi ilave edilip kriyotüpler -20 °C ‘ye kaldırıldı. 3-4 saat sonrasında etiketlenmiş ve donmuş tüpler sıvı azot tankına yerleştirilerek stoklama işlemi tamamlandı.

2.2.1.6. Hücre Sayımı

Süspanse edilen hücrelerden mikropipet yardımıyla 10µl alındı. Hemositometrenin lam ve lameli alkol ile temizlendi. Lam üzerine lamel hafifçe bastırarak yerleştirildi. Hemositometrenin lamı ile lameli arasına yavaşça hücre süspansiyonu akıtıldı. 30-60 sn hücrelerin hareketsizleşmesi için beklenildi. Mikroskop yardımıyla 10X veya 20X objektif kullanarak, hemosimetrenin tüm karelerindeki canlı hücreler sayıldı.

Sayım sırasında en sağdaki üçlü çizgiden başlanarak küçük karelerin içindeki tüm hücreleri, sağ çizgi üzerindeki ve en üst çizgi üzerindeki sayarak yukarı, daha sonra sağdaki küçük kareden aynı prensiple aşağıya doğru inildi, alt çizgidekileri saydıktan sonra yandaki küçük karelere geçildi. Tüm alan sayılınca kadar işleme devam edildi.

Milimetredeki canlı ve ölü hücre sayılarını belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

$$\text{Sayılan hücre miktarı} \times 10^4 = \text{Bir ml'deki hücre sayısı}$$

Bir ml'deki hücre sayısı belirlendikten sonra istenilen hücre miktarı (10.000)'nin bulunduğu hacim hesaplanarak deneyde kullanıldı.

2.2.2. Ellajik Asit Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve Hücre Serileri ile Etkileşimi

Ellajik asitin stok çözeltisi 0.03M olarak hazırlandı. Stok çözelti dimetil sülfoksit (DMSO) içinde hazırlanarak uygun pH ayarlamasından sonra kullanıma hazır hale getirildi. Hazırlanan stok solüsyon +4⁰ C' de saklandı. Deneye alınacak hücreler stoktan çıkarılan C6 hücre serileri gerekli sayıya ulaştıktan sonra ellajik asitin bu hücreler üzerinde sitotoksik etkisini ve doz aralığını belirlemek için MTT sitotoksikite testi uygulandı. Hazırlanan stok solüsyonundan taze besiyeri ile seyreltmeler yapılarak ellajik asitin 50 µM, 100 µM, 150 µM, ve 200 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Çalışılan konsantrasyon aralığında çıkan sonuçlardan hesaplanan IC₅₀ değeri konfokal mikroskop ve Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) için kullanıldı.

2.2.3. MTT Sitotoksite Testi (3-[4,5- Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

MTT kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar. En sık kullanım alanları: Sitokinlerin, büyüme faktörlerinin besiyeri komponentlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesidir. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen besiyeri veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur.

Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli insolubl formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile olur. Oluşan bu formazan izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile solubl hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Mosmann 1983).

C6 hücre serilerinden 1×10^4 hücre/ml yoğunluğunda olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre süspansiyonunu test edilecek konsantrasyon sayısına yetecek oranda 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına her konsantrasyon için üçer tekrarlı olmak üzere 100 µl / kuyu olacak şekilde otomatik pipet yardımı ile taksim edildi. Hazırlanan her ellajik asit konsantrasyonundan uygun kuyulara 100 µl olacak şekilde ilave edildi ve %5 CO₂ 'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kullanılan her kuyuya 20 µl MTT solüsyonu eklenildi ve plakalar tekrar inkübatörde 3 saat boyunca bekletildi. Bekleme süresinin sonunda plakaların kuyucukları boşaltılarak her kuyuya 100 µl DMSO ilave edilerek oda ısısında 10 dakika bekletildi ve formazan kristallerinin böylece çözülmesi sağlandı. Bu işlem sonunda plakaların 540 nm dalga boyunda absorbansı okutulup değerlendirildi.

Sitotoksitenin yüzde canlılık üzerinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılır;

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örneğin optik yoğunluğu}}{\text{Kontrolün optik yoğunluğu}} \times 100$$

Bu test her C6 hücre serisinde 3'er defa olmak üzere tekrar edilmiştir

2.2.4. IC₅₀ Değerinin Hesaplanması

MTT sitotoksosite testi sonuçlarına göre C6 hücrelerinin 24 saat IC₅₀ değerleri Excell üzerindeki grafikten tespit edilmiştir.

2.2.5. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) İle İnce Yapısal Değişikliklerin İncelenmesi

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptoziste en değerli yöntem ('gold standart') olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği bir yöntemdir. Üstelik subselüler detaylar da incelenebilir (örn. Mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi). Elektron mikroskobu çalışmalarında, nukleus fragmentasyonu net olarak izlenebilir, apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir.

Ellajik asitin C6 hücre serileri üzerine olan ince yapısal değişikliklerini incelemek için C6 hücreleri etkin doz olan IC₅₀ (150 µl) ellajik asit ile 24 saat muamele edildikten sonra TEM'de incelemek için doku takibi protokolü uygulandı. Takip için aşağıda verilen basamaklar uygulandı.

- **Fiksatif Hazırlama:** ilk fiksatif tamponlanmış glutaraldehittir.
Fosfat Tamponu; Na₂HPO₄ ve KH₂PO₄ karıştırılarak, tampon solüsyonu hazırlanmıştır. İncelenecek hücrelerin yapısı ve büyüklüğüne göre, hücreler tespit içersinde 4 -24 saat arasında +4 °C ' de fiksede edilmiştir.
- **Yıkama:** Fiksede olmuş hücrelerden fiksatif uzaklaştırmak için hücreler tampon çözeltisi ile yıkanır (3X15 dk).
- **İkinci tespit** (Osmium Tetraoksit): Yıkanan hücreler % 1'lik OSO₄ içersine alınıp, 2 saat süreyle rotatorda döndürülerek, fiske edilmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda tampon ile 3X15 dk yıkanır.
- **Dehidratasyon:** Etil alkol ile yapılır.

%50 alkol 15 dk. X2+4 °C

%70 alkol 15 dk. X2+4 °C

%90 alkol 15 dk. X2+4 °C

%96 alkol 15 dk. X2+4 °C

Absolu Alkol 30 dk. X1+4 °C

Absolu Alkol 30 dk. X1+25 °C

- **Şeffaflandırma:**

Propilenoksit 30 dk. X2

Resin+ propilenoksit (1/11)

Hücreler bu karışımda 2 saat süreyle rottorda döndürülür.

- **Bloklama:** Taze hazırlanmış resinle bloklama işlemi yapılır.

Ploimerizasyon işlemi 48 saat boyunca 60 °C 'de yapılır.

Resin Solüsyonunun Hazırlanması:

Araldit CY212 20 ml,

DDSA 20 ml,

BDMA 0,6 ml,

Dibütilfitalat 1 ml,

- **Kesitlerin Boyanması:** Uranil asetat boyasının hazırlanması:

Metil Alkol 80 ml,

Uranil asetat 2 gr,

Distile su 20 ml,

Bu boya içersinde gridler 45-60 dk bekletilip, distile suyla yıkanır (boya kullanılmadan önce süzölmelidir).

- **Kurşun Sitrata Boyasının Hazırlanması:**

A Karışımı:

10 N NaOH 2 gr,

Distile su 5 ml

B Karışımı:

Kurşun sitrat 200 mgr,

Distile su 50 ml,

B karışımı üzerine 0,5ml A karışımı katılıp, kuvvetlice çalkalanarak karıştırılmıştır. (pH 12-13 arasında olmalıdır). Temiz bir falkona konup, karanlıkta ve +4 ° C de saklanır. Boyanan kesitler elektron mikroskopunda incelenip, fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.6. Konfokal Mikroskop İle Hücresel Değişikliklerin İncelenmesi

Akridin oranj (AO) çift veya tek zincirli nükleik asitlere bağlanabilen, hücrenin çekirdeğine DNA ve RNA'yı seçici bir şekilde boyayabilen, hücrenin çekirdeği hakkında bilgi almamızı sağlayan floresan özellikte metakromik bir boyadır. Maksimum absorpsiyonu yaklaşık 455-490 nm'dir. AO, hücre içindeki tek zincirli nükleik asitleri kırmızıya, çift zincirli nükleik asitleride yeşile boyamaktadır (Kapuscinski, 1990; Kapuscinski ve ark. 1982).

Ellajik asit uygulanan C6 hücre serilerindeki morfolojik değişiklikleri belirlemek için; 1×10^4 hücre/ml steril lamellerin yerleştirildiği cam petri kaplarına toplam miktar 3 ml olacak şekilde aktarılmıştır. MTT deney sonuçlarına göre hesaplanan IC₅₀ değeri C6 hücrelerine 24 saat için 150 µM ellajik asit eklenerek 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. Bu sürenin bitiminde hücreler 3 defa 1 X PBS solüsyonu ile yıkanıp HCl'de 15 dk boyunca fiks edilmiştir. Lameller üzerine Propidyum iyodit ve akridin oranj damlatılarak bekletildikten sonra konfokal mikroskopta incelenmek üzere preparat haline getirilip fotoğrafları çekildi. Fotoğraflar incelenerek değerlendirildi.

2.2.7. İstatiksel Değerlendirme

MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 15.0 programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile Posthoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak pH 0.05 kabul edilmiştir.

2.2.8. Hücrelerin Parafin Takibi

Ellajik asitin IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat boyunca uygulandığı C6 hücreleri tripsin ile kaldırılarak 1200 devirde 5 dakika santrifüjlenmiş ve pelet haline getirilmiştir. Pelletler %10'luk gluteraldehitte fikse edildikten sonra örnekler bir gece boyunca akarsuda bekletilmiş ve dehidratasyon işlemine geçilmiştir. Dehidratasyon işleminde örnekler %60, %70, %80 ve %90 etil alkolde 30'ar, %96 ve %100'lük alkolde ise 60'ar dakika bekletildikten sonra şeffaflaştırmak üzere ksilen-alkol karışımında 30 dakika ve saf ksilende iki kez 60'ar dakika bekletilmiştir. Bu işlemden sonra örnekler infiltrasyon için 60 derecelik etüvde ksilen-parafin karışımında 30 dakika, parafinde ise iki kez 60'ar dakika bekletilmiştir. Bloklama işlemi için +4 derecede soğutulan blok kaplarına 1'er mL erimiş parafin dökülerek pelletler bu parafinli kısma pens ile yerleştirilmiş ve blok kabının tamamı erimiş parafinle doldurulup etiketlenmiştir. Parafin donuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilen bloklar iyice sertleştikten sonra oluşan bloklar kaplardan çıkarılarak kesit alımına hazır hale getirilmiştir.

2.2.9. BrdU ile İmmunohistokimyasal Boyama

Parafin bloklardan alınan kesitler lamlara alınarak deparafinizasyona tabi tutulmuştur. Bu amaçla kesitler iki kez 5'er dakika ksilende yıkanır. Lamlar saf alkole alınarak iki kez 3'er dakika yıkanır ve bir kez %95'lik alkolden 3 dakika geçirilir. Daha sonra lamlar PBS ile hazırlanmış %3'lük H₂O₂'de 10 dakika inkübe edilerek endojen peroksidaz aktivitesi ortadan kaldırılır. Lamlar 3 kere 5'er dakika PBS'de yıkandıktan sonra A solusyonu hazırlanır (9mL solusyon 1 + 41 mL solusyon 2 + 450 mL distile su). Bu solusyona konulan lamlar 89°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 20 dakika boyunca oda sıcaklığına gelene dek kendi kendine soğutulur. Soğuyan lamlar 3 kere 5'er dakika PBS de yıkanarak

sulandırma solusyonu ile sulandırılmış anti-Brdu (1:10)'dan her lama 100 mikrolitre damlatılarak nemli ortamda 1 saat inkübe edilir. Her lam yeniden 3'er kez ikişer dakika PBS'den geçirilerek Streptavidin-HRP damlatıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir. Tekrar 3 kez ikişer dakika PBS'de yıkanan lamalar DAB substrat solusyonundan (1 damla DAB kromojen+ 1 mL DAB tamponu) kesit kaplanıncaya kadar ilave edildikten sonra 1 dakika inkübe edilir. Amaçlanan renk görüldüğünde lamalar 3 kez 2'şer dakika suda yıkanır. Boyanan kesitler mikroskopta incelenilerek fotoğrafları çekilir ve değerlendirilir.

3. Bulgular

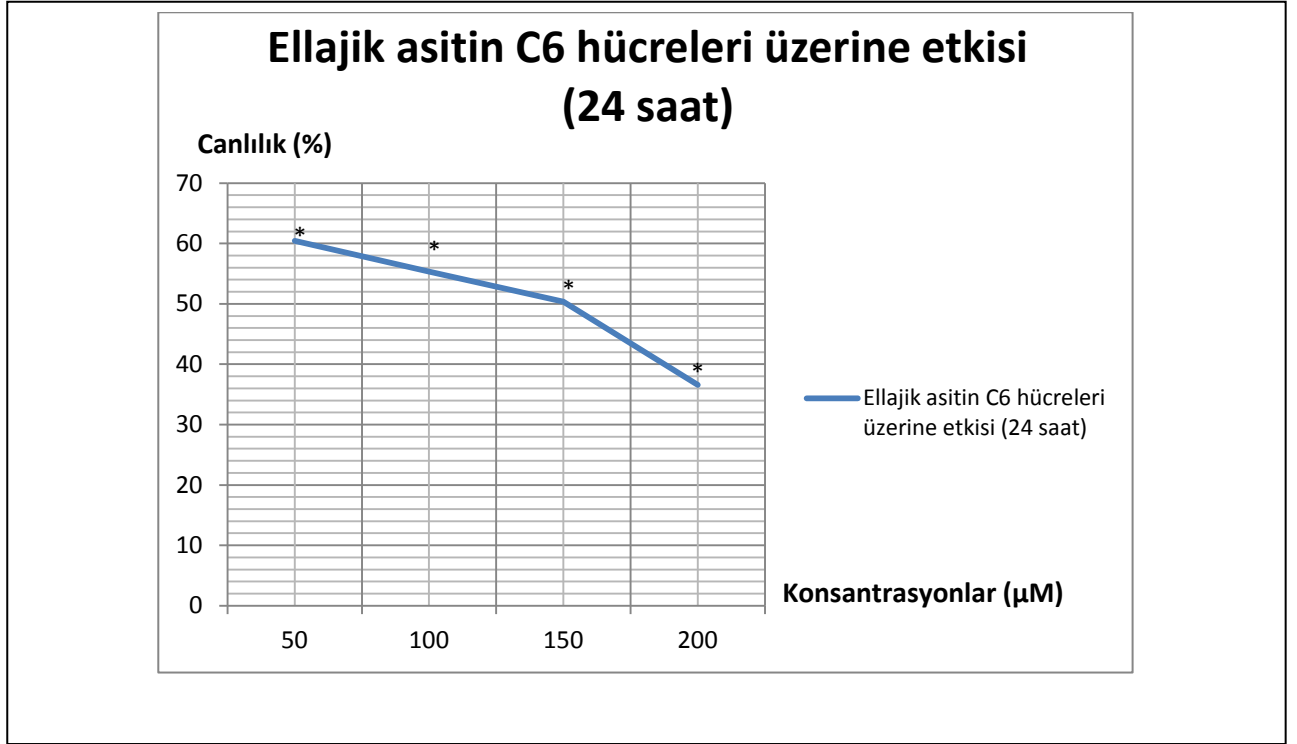
3.1. MTT Sitotoksisite Bulguları

3.1.1. Ellajik Asitin C6 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisi

Ellajik asidin ilgili konsantrasyonlarının (50,100,150,200 μ M) uygulandığı C6 hücrelerine uygulanan MTT testi sonucunda, 24 saatlik inkübasyon sonrası ellajik asitin tüm konsantrasyonlarında (50, 100, 150 ve 200 μ M) mitokondriyal aktivite konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin canlılık yüzdesinde bir azalma gözlenmiştir. Ellajik asitin uygulanan düşük konsantrasyonlarından itibaren hücre canlılığı üzerinde de azalma gözlenmiştir. Uygulanan ellajik asit konsantrasyonunun 24 saatlik inkübasyonu sonrasında sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Bu hücre hattına uygulanan ellajik asitin en düşük dozu olan 50 μ M da ölüm yüzdesi 24 saatte % 60,46 olarak bulunmuştur. Diğer konsantrasyonlarda bulunan canlılık değerleri ise sırasıyla % 55,33 ; % 50,34 ve % 36,57' dir. 24 saatin sonunda ellajik asidin C6 hücreleri üzerindeki IC₅₀ konsantrasyonu 150 μ M olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.1. Ellajik asidin uygulandığı C6 hücrelerinin 24 saat için uygulanan konsantrasyonları ve canlılık yüzdeleri

Uygulanan konsantrasyon (μ M)	Canlılık yüzdeleri (%)	Standart sapma
50	60,46	0,000
100	55,33	0,007
150	50,34	0,007
200	36,57	0,007

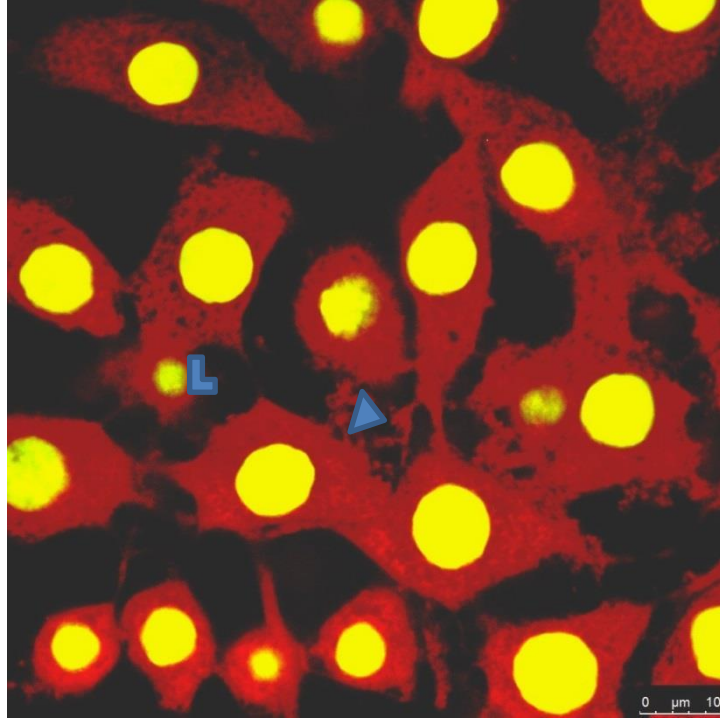


Şekil.3.1.C6 hücrelerinin 24 saatlik ellajik asit muamelesinden sonra konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği. SPSS anlamlılıkları $p < 0.05$ 'e göre * simgesi ile grafikte gösterilmiştir.

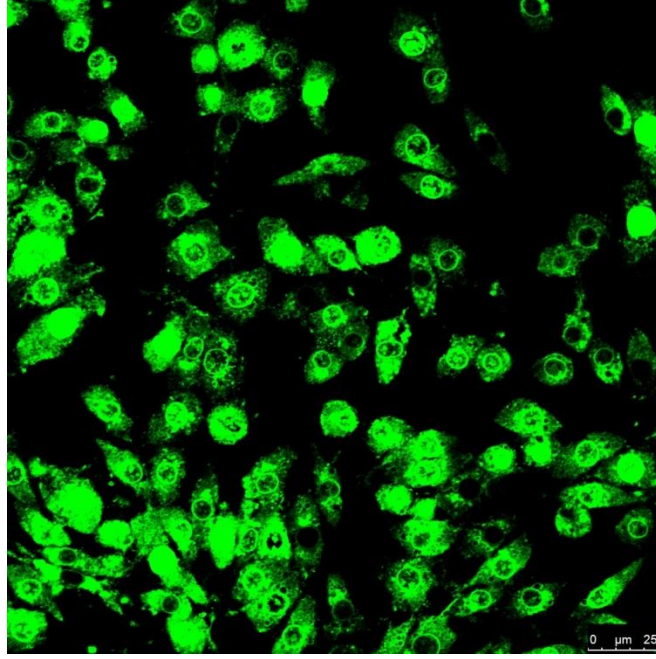
3.2. Konfokal Mikroskop ile Morfolojik İncelenme Bulguları

3.2.1. Ellajik Asitin IC_{50} Değerinin C6 Hücrelerindeki Yapısal Değişiklerin Konfokal Mikroskobu ile İncelenmesi

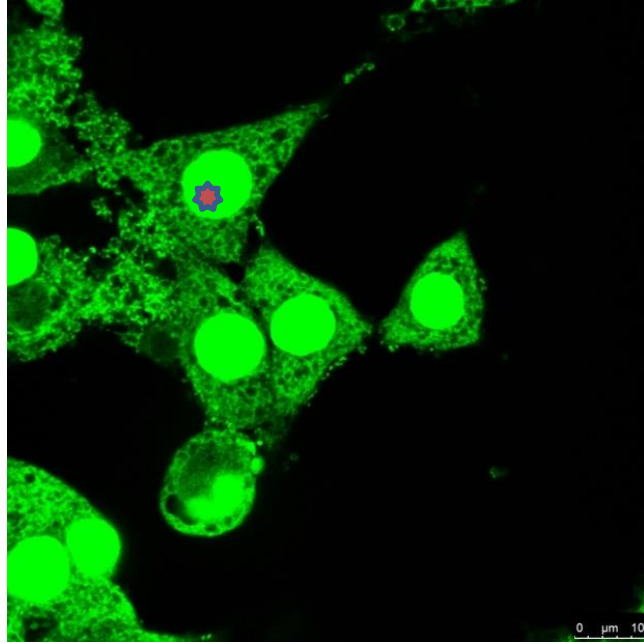
C6 hücrelerinin 24 saat (şekil 3.2) genel morfolojik yapısına konfokal mikroskop ile bakıldığında, hücrelerin, hücreler arası bağlantılan ve çekirdeğin düzgün morfolojik yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Ellajik asit uygulanan C6 hücrelerinin 24 saatlik (şekil 3.3), (şekil 3.4), genel morfolojik yapısı MTT sitotoksiste testi sonuçlarını doğrulamaktadır. Apoptotik hücreler tipik morfolojik değişimler ile çevre hücrelerden ve diğer hücre ölüm tiplerinden ayırt edilebilmektedirler. Ellajik asitin genel olarak hücre serilerinde belirgin şekilde boşluklar, hücre şeklinin yuvarlaklaşması, hücreler arası bağlantılarda kopmalar, çekirdekte deformasyon ile hücre hacminde azalma ve apoptotik cisimciklerin oluşumları görülmüştür. Ellajik asitin, genel olarak hücrenin sitoplazmasına yayılarak hücrelerde belirgin bir hasar verdiği gözlemlenmiştir.



Şekil .3.2. Ellajik asitin IC_{50} konsantrasyonunun 24 saatlik uygulamasından sonra Akridin oranj - Falloidin ile boyanmış C6 hücrelerinin konfokal mikroskopi ile görüntülenmesi ;  ; hücre çekirdeğinde küçülme ;  ; Hücre içeriğinde parçalanmalar.



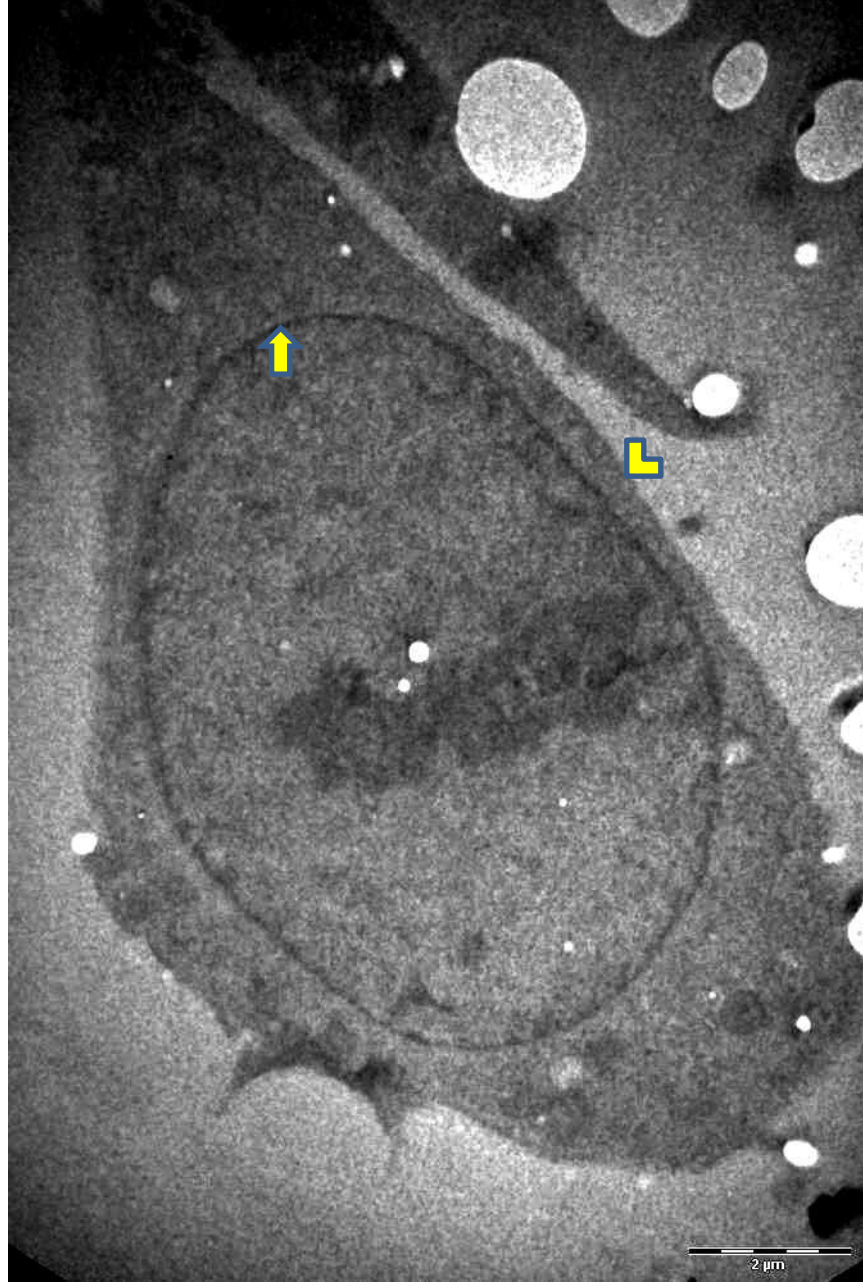
Şekil .3.3. Muamele edilmemiş C6 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskoptaki görüntüleri



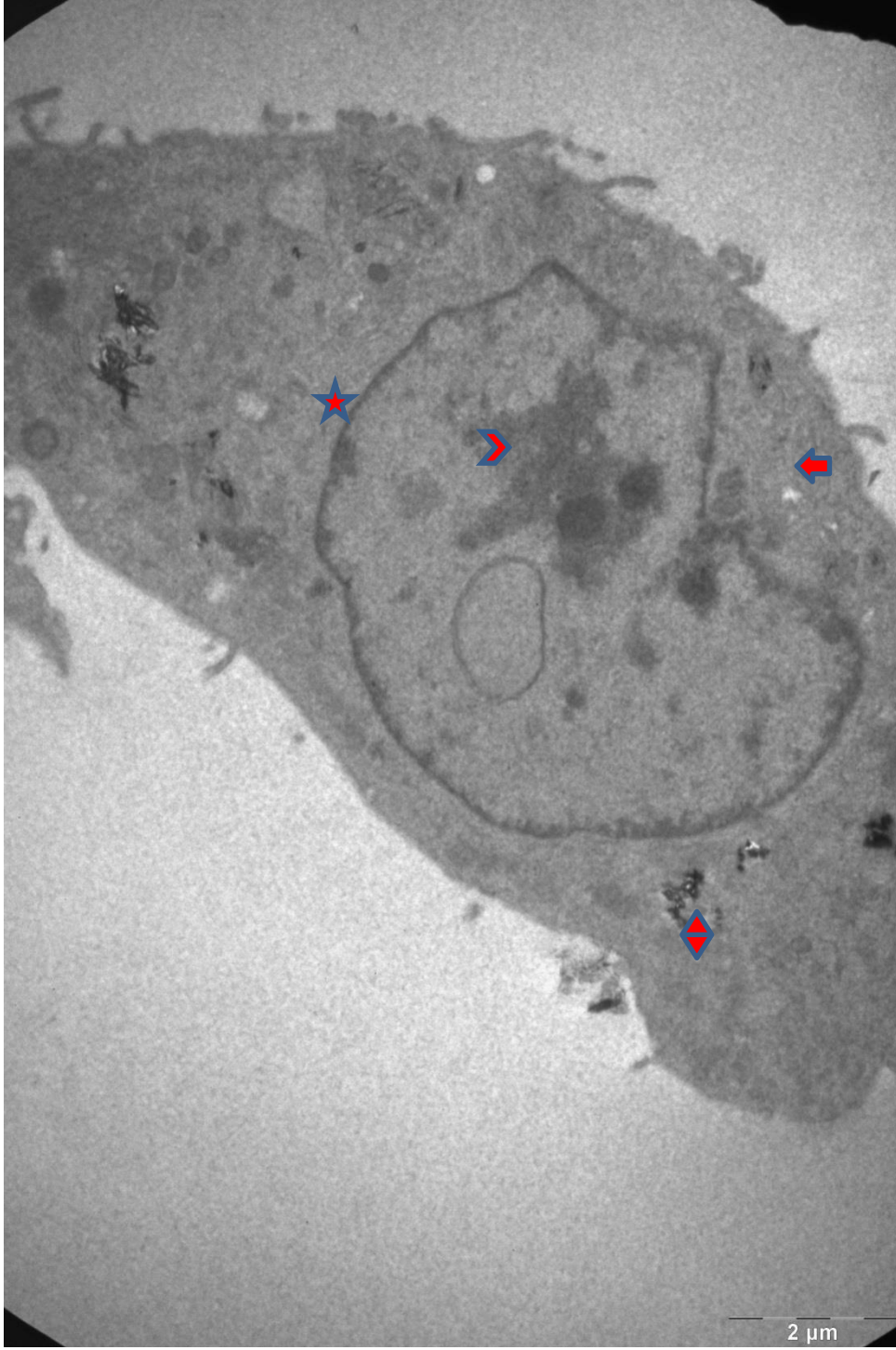
Şekil .3.4. Ellajik asitin IC_{50} konsantrasyonunun 24 saatlik uygulamasından sonra akridin oranj ile boyanmış C6 hücrelerinin konfokal mikroskoptaki görüntüleri ;  ; Hücre içeriğinde parçalanmalar.

3.3. Geçirimli Elektron Mikroskop ile İnce Yapısal Değişikliklerinin İncelenmesi

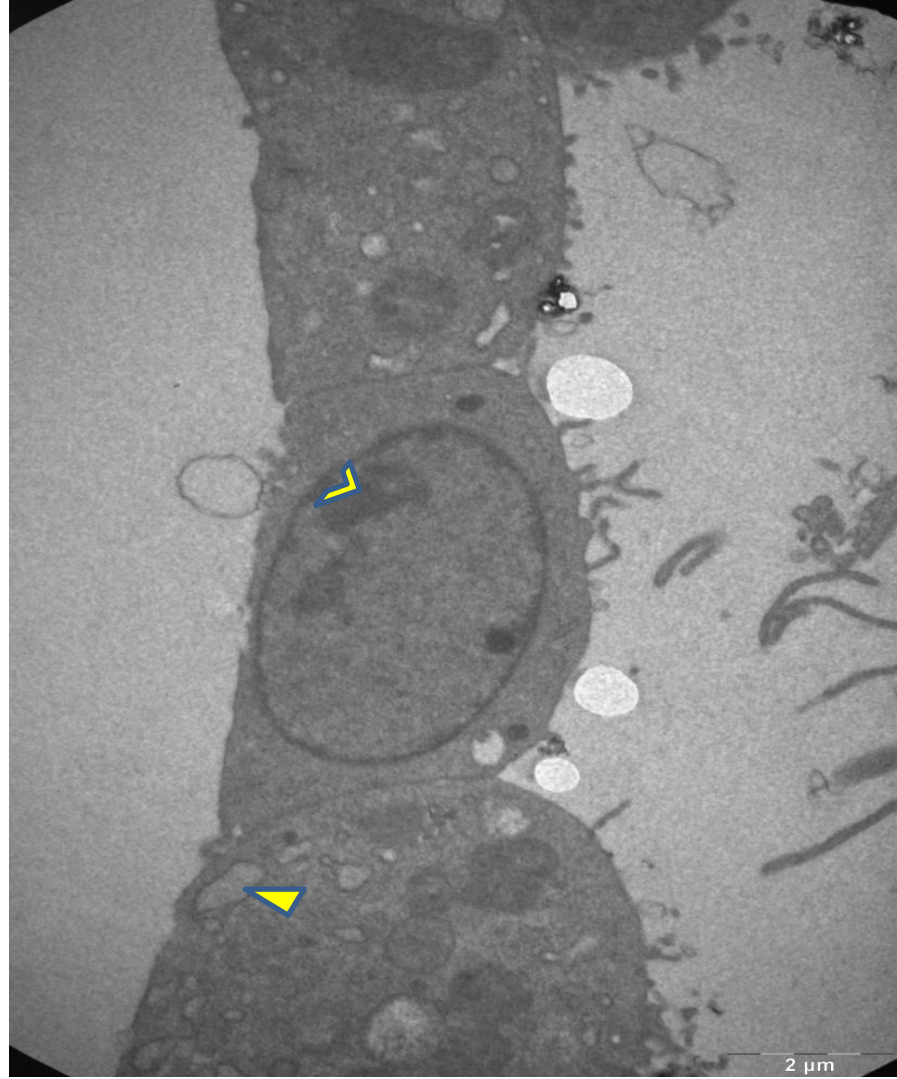
Ellajik asitin IC_{50} değeri uygulanan C6 hücrelerinin, elektron mikroskopunda incelediğimizde hücrelerin morfolojisinin yuvarlak bir hal aldığı gözlenmiştir. Apoptozun morfolojik özelliklerinden biri olan apoptotik cisimciklerin oluşumları tespit edilmiştir, ayrıca otofajik vakuol miktarında da artış gözlenmiştir. Hücre içerisinde yer yer boşluklar oluşmuştur. Hücre organellerinde yapısal hasarlar (şekil.3.5) ve hücre çekirdeğinin yuvarlaklaşması gözlenmiştir. (şekil.3.6),(şekil 3.7)'de ellajik asitin hücre içerisinde dağılırarak hücrede çok belirgin hasar oluşturduğu gözlenmiştir.



Şekil .3.5 Muamele edilmemiş (Kontrol) C6 hücresinin elektron mikroskopundaki görüntüsü x 8200: ↑ ;Normal çekirdek membranı; L ; Normal hücre membranı



Şekil .3.6. Ellajik asitin IC_{50} değeri ile 24 saat muamele edilmiş C6 hücresinin elektron mikroskopundaki görüntüsü x 8200: ↔; Çekirdek membranında büzüşme; ↔; Kromatin yoğunlaşması; ◆; Hücre membranında ondulasyon ★; Mitokondilerin kristalarında kayıplar

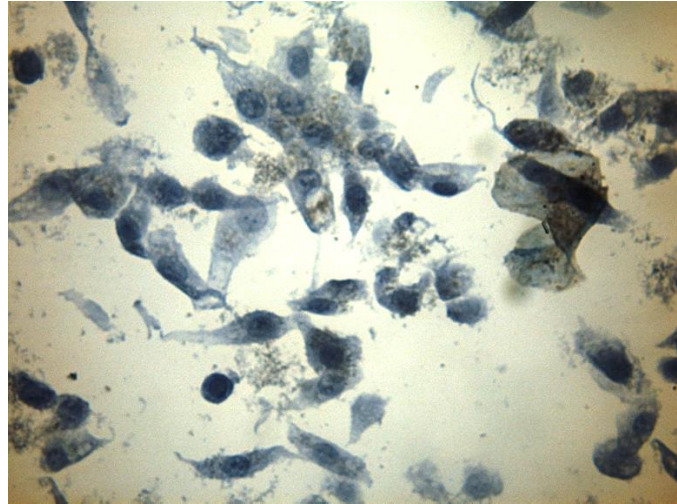


Şekil .3.7. Ellajik asitin IC_{50} değeri ile 24 saat muamele edilmiş C6 hüresinin elektron mikroskopundaki görüntüsü x 8200; ; Mitokondrilerde krista kaybı; ; Kromatin yoğunlaşması;

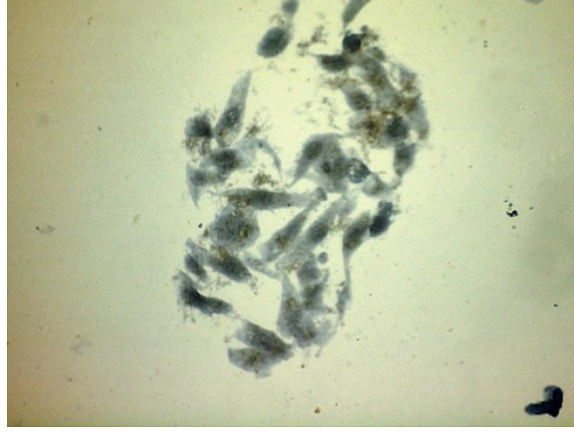
3.4. BrdU Uygulanan Kesitlerin İncelenmesi

Kanserli hücrede BrdU inkorporasyon yöntemi S-faz proliferasyon oranının belirlenmesinde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Bir timidin analogu olan BrdU, hücre bölünmesinin S fazında DNA'ya bağlanarak işaretlenmesini sağlar. BrdU-S-faz belirteci olarak BrdU inkübasyonu sonrası uygun antikor kullanılarak yapılan immünohistokimyasal işaretleme hücre proliferasyonu tayinininde yaygın olarak kullanılmaktadır (Karan 2006).

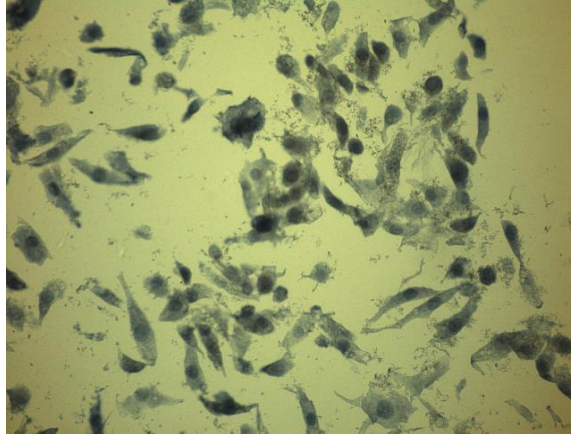
Bu boyamayı değerlendirirken nukleusları bütün olarak görülen boyanmış ve boyanmamış tümör hücreleri dikkate alınmıştır. Bu hücreler sayılarak kırmızı-kahve renkte boyananlar BrdU (+) olarak kabul edilmiştir. Nukleusları kırmızı-kahverengi boyanmayan hücreler BrdU negatif (-) olarak kabul edilmiştir.



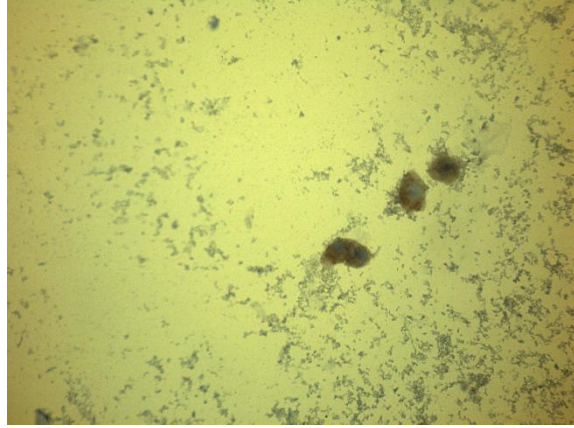
Şekil .3.8. Ellajik asitin IC₅₀ değeri ile 24 saat muamele edilmiş C6 hücrelerinin BrdU uygulamasından sonra görüntüsü (63 x)



A

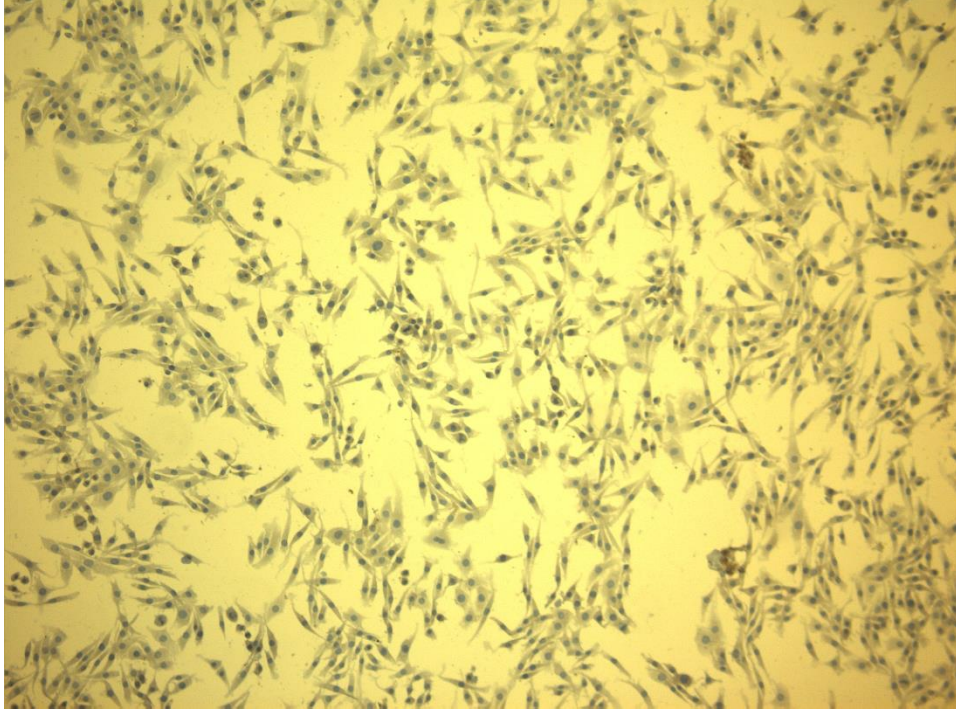


B



C

Şekil .3.9. Ellajik asitin IC_{50} değeri ile 24 saat muamele edilmiş C6 hücrelerinin BrdU uygulamasından sonra görüntüsü, (A ;B ;C 40 x)



Şekil .3.10. Ellajik asitin uygulanmamış C6 hücrelerinin BrdU uygulamasından sonra görüntüsü, (10 x)

4. TARTIŞMA

Hastalığa yol açan yanıtın apoptoz azlığı ya da fazlalığı olmasına bağlı olarak özetlenen biyokimyasal yollarda yer alan her bir etken tedavi hedefi olabilmektedir. Dejeneratif hastalıklarda apoptozun önlenmesi, kanserde ise mitokondriyal, p53 ya da ölüm reseptörleri yoluyla apoptozun indüklenmesi için yeni tedavi yaklaşımları bulunmaktadır (Solakoğlu, 2009). İster tek hücreli ister çok hücreli canlılarda olsun, yaşamın başlıca kısımları doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümdür. Organizmaların temel canlılık birimi olan hücrelerin gereksinimleri karşılanmadığında ölüm olarak adlandırılan ve hayati olayların geri dönüşsüz olarak durması anlamına gelen olay gerçekleşir. Yaşamın düzenli bir şekilde sürdürülebilmesi için canlıyı oluşturan hücrelerin sayısal dengesi de önemlidir. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında sabit bir oran bulunması gerekmektedir (Altunkaynak 2008). Bizim çalışmamızda, ellajik asitin

IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saatlik uygulamasından sonra akridin oranj ve falloidin ile boyadığımız C6 hücrelerinin konfokal mikroskopi ile görüntülenmesi sonucunda, hücre çekirdeklerinde küçülmeler ve hücre içeriğinde parçalanmalar gözlemlenmiştir. Solakoğlu (2009)'un çalışmasında gösterilmiş olan apoptotik belirtiler ile çalışmamızda bulduğumuz konfokal mikroskopi sonuçlarımız uyumluluk göstermektedir.

Apoptoz, embriyonik gelişim ve doku homeostazının düzenlenmesi esnasında oluşan normal fizyolojik bir olaydır. Günümüzde bazı kemoterapötik ilaçların hücre içersinde apoptoz yollarını stimüle edebilme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Akalın ve İncesu. (2005), yaptıkları çalışmada anti-tümör etkiye sahip olabilecek ilaç adayı 1,3-bis-(heteroaril sübstitü) benzeri türevlerin (MBİS1, MBİS2 ve MBİS8) sıçan embriyo fibroblast F2408 (Normal hücre hattı) ve 5RP7 (H-ras transforme hücre hattı) üzerindeki sitotoksikite ve apoptotik etkilerinin araştırılmasının önemini vurgulamışlardır. Apoptozun önemi, çeşitli biyolojik olaylarda gereksiz hasarlı ya da zararlı hücrelerin inflamatuvar yanıt olmaksızın yok edilmesinin sağlanmasından ve organizmanın iç dengesinin devamlılığına katkıda bulunmasından ileri gelmektedir. Canlı doku ortamında hücrelerin tek tek iz bırakmazsızın silindiği fizyolojik bir ölüm şekli olan apoptoz, ilgi çekici olduğu kadar insanlardaki önemli patojenlerin tedavisi açısından da umut verici bir mekanizmadır (Ahışhalı ve Bilir 2008). Apoptozun pek çok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte önemli görevler üstlendiği açıktır. Histolojik olarak, apoptotik indekste apoptotik hücre sayısının canlı hücrelere oranı bulunmaktadır ve bu indeks, apoptozun şiddetini ya da oranını belirtmektedir (Güleş ve Eren 2008).

Yapılan epidemiyolojik araştırmalar daha çok meyve tüketen insanlarda kanserin tedavisine ellajik asitin etkilerini ortaya koymuştur. Bu meyveler genellikle zengin ellajik asit içerikli meyveler olup kanserin önlenmesi ve tedavisinde etkili oldukları görülmüştür (Hannum, 2004). Örneğin bir çalışmada oluşturulan tümör modelinde iki hafta gibi kısa sürede tüm sıçanlarda tümör tespit edilmiştir. Tümör indüksiyon zamanı kısadır; kullanılan hücre kültürü hacmi literütürde en küçük hacim olan 10 mikrolitredir. Küçük hacimle implante edilen

hücrelerin tümörojeniteleri daha yüksektir. Wistar sıçanlarda oluşturulan beyin tümörünün nekrozu, neovaskülaritesi ile insan beyin tümörüyle tamamen kolerasyon gösterdiği tespit edilmiştir. C6 sıçan glioma hücreleri laboratuvar şartlarında kolay çoğaltılabilmektedir (Kemerli ve ark 2003). Sonuç olarak sıvı üst tabaka yöntemine göre üretilen MCF7, CC531s ve C6 sferoitleri gerek invert hücre kültür mikroskobu ve gerekse ışık mikroskobu düzeyinde gerçekleştirilen gözlem koşullarında farklı gelişim özellikleri göstermesine karşın, üç boyutlu genel sferoid morfolojisini tam olarak yansıttığı gözlenmiştir. Bu haliyle çeşitli ilaçların ve ilaç kombinasyonlarının antineoplastik özelliklerinin değerlendirilmesinde in vivo yanıtları daha gerçekçi bir şekilde yansıtması açısından tek tabakalı kültürlerle birlikte değerlendirmeye alınması gerekmektedir (Ahışhalı ve Bilir 2002). Bizim çalışmamızda da in vitro olarak gerçekleştirilen ellajik asitin IC_{50} değeri ile 24 saat muamele edilmiş C6 hücresinin elektron mikrobunda görüntülenmesi işlemleri sonucunda çekirdek membranında büzüşmeyi kromatin yoğunlaşmasını, hücre membranında ondulasyonu, mitokondrilerin kristalarında kayıpları gözlemledik. Kontrol hücrelerinin elektron mikrobunda görüntülenmesinde ise normal çekirdek membranını ve normal hücre membranını gözlemlenmiştir.

Ellajik asitin farklı etkileri üzerine dünyada birçok farklı çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri, ellajik asitin sıçan C6 glioma hücre dizisi üzerine etkileri doz ve zamana bağlı olarak iki boyutlu tümör hücre kültürü kullanılarak araştırılmasıdır. İki boyutlu hücre kültürlerinde hücre yaşama yeteneği ve hücre çoğalması üzerinde ellajik asitin baskılayıcı etkisi olduğu görülmüştür (Ekinci ve ark. 2012). Yapılan bu çalışmalara uyumlu olarak bizim çalışmamızda ellajik asitin genel olarak C6 hücrelerinde belirgin şekilde boşluklar oluşturduğu, hücre şeklinde yuvarlaklaşmaya, hücreler arası bağlantılarda kopmalara, çekirdekte deformasyon ve hücre hacminde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Ellajik asitin, genel olarak hücrenin sitoplazmasına yayılarak belirgin bir hasar oluşturduğu gözlemlenmiştir. C6 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskoptaki görüntülerinin incelenmesiyle normal hücresel yapılar bulunmuş ve resimlerde gösterilmiştir. Çilek ve üzümde doğal olarak bulunan ellajik asitin potansiyel sitotoksik ve anti-proliferatif aktiviteleri gösterilmiştir. Bu etkiler insan umbilikal

ve endotel hücreleri (HUVEC), normal insan akciğer fibroblast hücreleri, HEL 299 caco-2 kolon, MCF7 meme, Hs 578T meme ve DU 145 insan prostat kanserleri üzerinde denenmiş ve etkili bulunmuştur (Losso ve Bansode 2004).

Yapılan bir çalışmada, aloe emodin ve cisplatinin C6 glioma hücrelerinde hücre ölümü ile tümör hücre çoğalmasını azalttığı; ancak cisplatinin etkisinin aloe emodinden daha kuvvetli olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarda olduğu gibi yapılan çalışmaların çoğunda da kemoterapi sonrası apoptozistede artış gözlenmiştir. Apoptozisteki artış tüm çalışmalarda olmasa da bazılarında kemoterapiye yanıtla ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle kemoterapiye yanıtı değerlendirmede kullanılan parametrelerden biri olabilir. Proliferasyon/apoptozis oranının prostat büyümesi gibi bazı proliferatif hastalıklı dokularda doku büyümesinde etkili faktör olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Yani çoğalmanın bu orandaki bir azalma ile ilişkili olduğu geniş bir çalışma grubunda gösterilmiştir (Gazi ve Tapul 2006). Bizim çalışmamızda da ellajik asitin IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saatlik uygulamasından sonra akridin oranj ile boyanmış C6 hücrelerinin konfokal mikroskoptaki görüntülenmesi sonucunda hücre içeriğindeki parçalanmaların yanı sıra çekirdek membranında düzensizlikler ve ondulasyonlar görülmüştür. Yani C6 hücreleri üzerine ellajik asit apoptoz belirtileri oluşturacak şekilde etki etmiştir. Buna paralel olarak konfokal mikroskop kullanarak incelediğimiz ellajik asit ile 24 saat muamele görmüş C6 hücrelerindeki hücre iskelet yapısının bozulduğu ve hücre membranında delikler meydana gelerek hücrenin apoptoza götürüldüğü bulunmuştur.

Çalışmamızın elektron mikroskopi kısmında, ellajik asitin IC₅₀ değeri ile 24 saat muamele edilmiş C6 hücrelerinin elektron mikroskobunda görüntülenmesi sonucunda mitokondrilerle krista kaybı ve kromatin yoğunlaşması gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, hücrelerin morfolojisinin yuvarlak bir hal aldığı gözlenmiş ve apoptozun morfolojik özelliklerinden biri olan apoptotik cisimciklerin oluşumları tespit edilmiştir. Ayrıca otofajik vakuol miktarında da artış gözlemlenmiş ve hücre içerisinde yer yer boşluklar oluşmuştuğu elektron mikroskobu sonuçlarımızda açıkça gösterilmiştir. Bunların yanı sıra hücre organellerinde yapısal hasarlar, hücre çekirdeğinin yuvarlaklaşması da ellajik

asitin hücre içerisinde dağılarak hücrede çok belirgin olarak hasar oluşturduğunun göstergeleri olarak gözlenmiştir.

Sonuç olarak ellajik asitin MTT, TEM ve konfokal mikroskopta görüntüleme yöntemleri ile elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, ellajik asitin C6 glioma hücreleri üzerinde zaman ve doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle güçlü bir antioksidan olan doğal meyve bileşeni-ellajik asitin aynı zamanda ticari şeklinin de bulunması sebebiyle anti-kanser ilaç çalışmalarında tedavi yönünden ümit verici bir madde olabileceği düşünülmektedir. Bulgularımız doğrultusunda ellajik asitin kanser hücre hatlarına koruyucu olarak verilmesi veya klasik kanser tedavisinde kullanılan ajanlarla kombinasyonlu olarak etkinliğinin zamana ve doza bağlı olarak araştırılması çalışmanın devamı niteliği taşıyan bir araştırma olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Aguilera-Corbo, A., Augur, C. ve Prado, K.A. (2007), “*Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins*,” *Applied microbiologbiotechnology*, 78(2) 189-199.
- Ahışhalı, B. ve Ayhan, B., (2002), “*Tümör hücrelerinin mutiselüler tümör sferoid modelinde üretilmesi.*” İstanbul Üniversitesi, Tıp fakültesi, Türkiye, 65:1.
- Akşit, H. ve Aseygül, B. (2008), “*Apoptozis mekanizmları*”, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Aydın/Türkiye, 19(1):55-63.
- Akalın, G., Incesu, Z. (2006), “*H-RAS aktif fibroblast hücre apoptozun bazı 1,3 bis (heteroaril substitüe) benzer türevleri ile uyarılması*”, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eskişehir, Türkiye, 31(1):27-35.
- Algier, L.A., Hanoğlu Z. ve Özden G. (2005), “*The use of complementary and alternative (non-conventional) medicine in cancer patient in Turkey* ‘’, *Euro, J., Oncol. Nurs.* 3(2), 63-68
- Altınışik, M. (2002), “*Kanserin moleküler temeli Onkogenler*”,
<http://mustafaaltinisik.org.uk/34-1-4-18.ppt>
- Altunkaynak, B.Z. (2008), “*Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir?*” Tıp Araştırma Dergisi, 6 (2), 93-104.
- Anonim (2012), “*xcelligence systeme*” <http://www.roche-applied science. com/ sis/ xcelligence/html>.
- Başay, S. (2006), “*Testis kanseri yaşayanların yaşam kalitesi ve sosyodemografik özellikler, kanser bağlı değişkenler ve yaşam olayları ile ilişkisi*”, Ankara onkoloji Eğitim-Araştırma Hastanesi, *Supportive care in cancer*, Türkiye. 14;251-259.
- Berger, M.S., Locher G.W., Sourers., Gullick, W.J., Waterfield, M.D., Groner, B., Hynes, N.E. (1998), “*Correlation of C-erb-B-2 Gene amplification and*

- protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading''*, *Cancer. Res journal of biochemistry*, 48, 1238-1243,
- Beril Y., Sevtap H. (2013), “*System of the Apoptosis and caspase*” Sağlık, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara, Türkiye.,19(1),55-63
- Burcu, N. ve Aswood R.e. (2003), “*Ras oncogenes mutation in urine sediments of patients with bladder cancer*”, *Journal of biochemistry and molecular biology*.36(4),399-402
- Cabadak, H. (2008), “*Hücre siklusu ve kanser*”, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3) 51-61.
- Cabadak, H. (2013), “*Hücre siklusu ve kanser*”, Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Üroloji Kliniği, İstanbul/Türkiye.9(3),51-61
- Catherine, N. (2009), “*Les types de cancer: Kanser Tipleri*”, Centre rene huguenin Saint Cloud, France.3(5)1222-1300
- Gazi, C. and Tapul, L. (2006), “*C6 Sıçan glioma hücreleri üzerine aloe emodin ve cisplatinin etkilerinin iki ve üç boyutlu hücre kültüre modellerinde incelenmesi*”, *İst tıp fak. Derg.* 69:110-116.
- Chang, R.L., Huang, M.T., Wood, A.W., Wong, C.Q., Newmark, H.L., Yagi, H., Sayer, J.M., Jerina. D.M. and Conney, A.H. (1985), “*Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoidis on the tumorigenicity of benzo[a]pyrene and on mouse skin and in the newborn mouse*”, *Carcinogenesis*, 6:1127-1133.
- Coşkun, M.D. (2012), “*Yeni sentez edilen polladyum(II) bileşiğinin transforme fibroblastlar üzerindeki etkilerinin incelenmesi*”, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir/Türkiye.63-70
- Croce, C.M. (2008), “*Oncogenes and Cancer*”, *The New England Journal of Medicine*, 358,502-511.

- Devipriya, N., Srinivasan, M., Sudheer, A.R., Menon, V.P. (2007), ‘*Effect of ellagic acid. A natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose dependent study*’, *Singapore Med J*, 48(4) : 311.
- Duman, İ., Serdar, A., Damla B. (2004), ‘*Apoptosis detection by tunel assay in BPH patients*’, Şişli etfal research and training hospital, *Journal of cell and molecular biology*, 3:103-107.
- Ekinci, C., Aysun, E., Bülent, A., Ayhan, B. (2012), ‘*Ellajik asidin sıçan C6 glioma hücre kültürlerinde sitotoksikite ve proliferasyon üzerine in vitro etkileri*’, *Journal clinical and experimental investigations*, 3(3):350-356.
- Ekshyvan, O. (2004), ‘*Apoptosis in acute and chronic neurological disorders,*’ *Frontiers in bioscience*, 10; 1564-1570.
- Elmore, S. (2007), ‘*Apoptosis a review of programmed cell death and toxicol pathology*’, 35,495-616.
- Yıldız, E., (2006), ‘*Kanser ve Beslenme*’, Hacettepe Üniversitesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye.5(3)106-180
- Erenoğlu, N. (2012), ‘*İnsan meme kanseri hücre serilerinde ellajik asitin sitotoksik etkisi*’, *Yüksek lisans tezi*, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir-Türkiye.21-45
- Fatma, T. (2007), ‘*Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı*’, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye.,30,315-321
- Fischer, U., Ostoff, S. (2005), ‘*Apoptosis-based therapies and drugn targets*’*Cell death and differentiation*, 12, 944-962.

Gewies, A. (2003), ‘‘Introduction to apoptozis’’, Aporeview.http://www.cell death.de/encyclo/aporer/apointo.pdf. J. Agric.food Chem, 48(10), 4581-4589.

Gougeon, M.L. (2001), ‘‘Apoptose et virus: les voies de signalisations de la mort cellulaires et les strategies virales mises en jeu pour moduler ces voies’’, L’essentiel de l’information scientifique et medical John Libbey Eurotext.,305(5684),626-629

Graham, AC. ve Cloughesy, TF. (2004), ‘‘Brain tumor treatmen chemotherapy and other new development’’, Semin oncol nurs., 54(18)4855-4878

Grobbs, B., De Deyn, P.P., Slegers, H. (2002), ‘‘Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion cell, Tissue Res. Critical Reviews in Science 44.(1)1-17

Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008), ‘‘Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler’’, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Dergisi, Türkiye, (2) 73-78.

Gültekin, N. ve Kamil, K. (2008), ‘‘Hücrede apoptozis ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri’’, İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü, Türk kardiyoloji Dern Araştırma., Türkiye, 36(2): 120-130.

Hamzaoglu, O. ve Özcan, U. (2006), ‘‘Türkiye sağlık istatistikleri’’, Türk Tabipler Birliği Yayınları, Ankara/Türkiye.12(5)73-80

Hanahan, D. ve Weinberg R.A. (2000), ‘‘The hallmarks of the cancer cell’’, 100, 57-70.

Haris, C.C. (1996), ‘‘Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues rational cancer therapeutic strategies’’, Journal of the national cancer institut., 88(20) 1442-55.

- Hannum, MS. (2010), “*Potential impact of strawberries on human health: A review of the science*”, Nutritional sciences, Universty of Illinois / USA 44:1-17.
- İnanç, S. (1997), “*Meme kanserinin doğal seyri ve prognostik faktörler, Meme kanseri: Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi*”, (Ed: Topuz. E), İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 72-101.
- Issa, J.P. (2004), “*CPG. Island methylator Phenotype cancer*”.
- Br J Cancer , 26, 239-245
- Ji, Y.B. ve Jung, S. (2009), “*Dietary compound elleagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation of induced by U.V-B irradiation*”, Department of Food and Nutrition Hallyum University Bioindustry Foundation, Korea.,56(2)1556-1587
- Kandaş, N.Ö. (2004), “*Apoptosis, Programlı hücre ölümü*”, Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri, Meslek Yüksekokulu Dergisi, Turkey, 5(1) 7-10.
- Kapucuoğlu, N; Esin, C.B; Ersoy, E. (2000), “*Lokal ileri meme karsinomunda kemoterapiye yanıtın apoptosis ile ilişkisi*”, SB Ankara onkoloji hastanesi patoloji bölümü, 17(1):14-17.
- Kapuscinski, J. (1990), “*Interaction of nucleic acid with fluonescent dyes: spectral properties of condensed complexes*”, Journal. Histochem. Cytochem, 38, 1323-1329.
- Kapuscinski, J., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R. (1982), “*Luminescence of the solid complexes of acridine orange with RNA*”. Cytometry, 2, 201-211.
- Karabulut, B. ve Göker, E. (2003), “*Meme kanserinde c-erb-2 ekspresyonu ile diğer prognostik faktörler arasında ilişki var mı?*”, Ege Üniversitesi İzmir Tıp Dergisi, Türkiye, 42(3), 161-165.

Karan, A. (2006),'' *Meme kanseri hücre soylarında beta katenin ve proliferasyon ilişkisi''* Yüksek lisans tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü, İstanbul.,45-74

Kemerli, Ç., Taşkın, M. ve Yalçın, G. (2003), ''*Deneysel C6 glioma modelinde teknik ve migrasyon yönünden bir inceleme''*, Bakırköy ruh sağlığı ve sınır hastalıkları eğitim ve araştırma hastanesi, İstanbul, Türkiye.33,133-1399

Kutluk, T. ve Kars, A. (1992), '' *Kanser konusunda genel bilgiler''*, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, Ankara, Türkiye.25-40

Losso, J.N. ve Bansode, R.R. (2004), ''*İn vitro anti-proliferative activities of ellagic acid''*, *Journal of Nutrition Biochemistry*, 15, 672-678.

Loo, L.J., Jin, M., Cheung, N.B. ve Louis, W.C. (2010), ''*Evaluation of Ellagic acidon the activities of oral bacteria with the use of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay''*, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9(25), pp. 3938-3943.

Lozano, G. ve Elledge, S.J. (2000), ''*p53 sends nucleotiden to repair DNA''*, *Sciences in nature*, 404, 24-25.

Macey, M.G. (2007), ''*Flow cytometry principle an application, human''*, A press inc, Totawa, New Jersey. USA.,11,68-75

Malumbres, M. ve Barbacid, M. (2007), ''*Cell cycle kinase in cancer''*current opinion in genetics and development, 17, 60-65.

Mandal, S., Ahuja, A., Shivapurkar, N.M., Cheng, S.J., Groopman, J.D., and stoner, G.D. (1987), ''*Inhibition of aflatoxin B1 mutagenesis in Salmonella typhimurium and DNA damage in cultured rat and human tracheobronchial tissues by ellagic acid''*, *Carcinogenesis*, 8:1651-1656.

Marie, D. ve Valerie, D. (2010), '' *Les tumeurs du cerveau; Beyin Tümörleri''*, Institut National du Cancer, France.11(4),99-120

- Merlo, L.M. ve Pepper, J.W. (2006), “*Cancer as an evolutionary and ecological process*”, , 6, 924-935.
- Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D. ve Radovic, J. (2005), “*Antiglioma action of aloe emodin the role of erkinhibition*”, Cell Mol. Life Science.59-89
- Molassiotis A. ve Fernandez-Ortega P. (2005), “*Use of complementary and alternative medicine in cancer patients*”, Europeans survey annals of oncology.60,70-93
- Mosmann, T.R. (1983), “*Rapid colorimetric essay for cellular growth and suruvvual application to prolifiration cytotoxicity assys*”, Journal Immunology Methods, 65, 55-63.
- Murray, T., Thun, M., Greenle, R.T., Hill, H. (2001), “*Cancer statistic*” Cancer journal for clinical.,CA, USA.1200-1225
- Muthukumar, M., Gavindaraj, A. ve Bhaskar R., (2011), “*Comparitive study of electroagulation and electrooxidation processes for the degradaddion of ellagic acid from aqurous solution*”, Environmental engineering and tecnology lab., Depertmant of Environmental Sciences, Bharathiar Universty, Coimbatore, İndia.86(11)2493-2501
- Ormerod, M.G., Paul, F., Cheethan, M., Sun, X.M. (1995), “*Discriminitation of apoptotic by forward light scatler*”.(1-2)51-57
- Özçimen, A. (2005), “*Steroidin H1-60 (İnsan Akud Miyeloid Losemi) hücre hattında, apoptoz ve farklılaşma üzerindeki etkisi*”, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.103-115
- Boyle, P. ve Levin, B. (2008), “*Dünya Kanser Raporu*”, Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu.3(11)697-707

- Pinto, M.S., Lajolo, F.M. and Genovese, M.I. (2008), “*Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries*”, (*Fragaria x ananassa*), *Duch. Food Chemistry*, 107:1629–1635.
- Pınarbaşı, E. (2007), “*Apoptozis (programlı hücre ölümü)*”, *Moleküler Biyoloji*, (ed: Yıldırım, A ., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyola,B.), *Nobel yayın dağıtım*, Ankara, 423-467-Türkiye.
- Potten, C. ve Wilson, J. (2004), “*Apoptosis the life and death of cells*”, Cambridge University of press, A.B.D.12(1)56-78
- Puri, P.L., Maclachlan, T.K. ve Levvero, M. (1999), “*The intrinsic cell cycle: from yeast to mammals*”, The molecular basic of cell cycle and growth control, (Ed:stein,G.S., Baserga, R. Giordano. A ve Denhardt, D.T.), *A John Wiley and Sons, Inc United States of America*, 15-80.
- Rang, H.P. ve Dale, M.M. (1993), “*Cancer chemotherapy in pharmacology*”, *HEIBS, Hong Kong*,23(3)406-420
- Rastogi, R.P. ve Sinha, R.P. (2009), “*Apoptosis molecular mechanism and pathogenicity*”, *Exch Journal*, 8, 155-181.
- Raúl, R., Leonardo, S., Alberto. A. (2011), “*Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes*”, *African Journal of Biotechnology*, Vol.10 (22), pp.4518-4523.
- Robertson, J.D. ve Qrenius, S. (2000), “*Molecular mecanismos of apoptozis induced by cytotoxis chemicals*”, *Critical Reviews in Toxicology*, 30, (5) 609-627.
- Salomon, S.E. ve Sartorelli, A.C. (2001), “*Basic and clinical pharmacology*”, San Francisco, USA.,17(2)501-510
- Sibel, Ö., Mustafa, H., Özhan, D. (2001), “*Apoptozisin önemi*”, *Ege Üniversitesi tıp fak göğüs hastanesi dergisi*, 2(1):91-95.

- Sebojka, K. ve İvana, N. (2011), ‘‘ *Determination of ellagic acid in strawberries raspberries and blackberries by square-wave voltammetry*’’, *International Journal of Electrochemical Sciences*, 6(11) 4638-4647.
- Smith, W.A., Freeman, J.W., ve Gupta, R.C. (2001), ‘ *Effect of chemopreventive agents on DNA adduction induced by the potent mammary carcinogen dibenzo[a,l]pyrene in the human breast cells mcf-7*’’, *Mutat. Res.*, 480(SI):97-108.
- Solakoğlu, Z. (2009), ‘‘ *Apoptoz varlığı veya yokluğu bir hastalık sebebi midir?*’’, İstanbul Üniversitesi / Tıp Fakültesi, Türkiye.35-40
- Tanaka, T., Iwata, H., Niwa, K., Mori, Y., and Mori, H. (1988), ‘ *Inhibitory effect of ellagic acid on N-2-fluorenylacetamide-induced liver carcinogenesis in male ACI/N rats*’’, *Jpn. J. Cancer Res.*, 79:1297-1303.
- Taneja, N., Tjalken, R., Philbert, M.A. (2001), ‘‘ *Irradiation of mitochondria initales apoptosis in a cell free system*’’, *Oncogene International Journal*, London, England, 20(2)167-77.
- Tavassol, F.A. ve Devilee, P. (2003), ‘‘ *World heath organisation classification of tumours, pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*’’, Lyon IARC Press. France, 227-228.
- Teich, M.N. (1996), ‘‘ *Oncogenes and cancer*’’, Cellular and molecular biology of cancer, (Ed: Franks, LM., Teich, N.M.), Oxford University Press INC., New York, 233-260.
- Tolnay, M. (2002), ‘‘ *Neuropathologie des tumeurs cerehales gliales*’’, Université Atsklinken Schönbeinstrasse, Geneve/Suisse.640-648
- Uçar, F. (2003), ‘‘ *Hücre kültüründe temel ilkeler*’’, Hematolojide uygulamalı hücre kültür teknikleri, (ed. Ovalı, E.), 7-16.
- Ulukaya, E. (2001), ‘‘ *Hücre siklusu ve Apoptosis*’’akciğer kanserleri tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar’’, (ed: Engin, K.ve Özyardımcı, N), Avrupa Tıp kitapçılık LTD.ŞTİ. Bursa-Türkiye.25-40

- Ulukaya, E. (2003), “*Apoptozis ders notları*”, Biyokimya Anabilim Dalı, <http://www20.uludağ.edu.tr/~eulukaya> <http://www20.uludağ.edu.tr/~biokimya>.30-35
- Üniver, S. (1998), “*Meme kanserinde doku ferritin düzeyinin standart prognostik parametrelerle korelasyonu ve prognostik önemi*”, *Uzmanlık Tezi*; Genel kurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi, İstanbul-Türkiye.46-50
- Wang, X., Christani, D.C., Mark, E.J., Nelson, H. (1999), “*Carcinogen exposure, p53 alteration, and k-ras mutation in synchronous multiple primary lung carcinoma*”, *Cancer International Journal*, California, ABD, 85(8) 1734-1739.
- Weinberg, R.A. (2007), “*The nature of cancer*” The biology of cancer, garland sciences, taylor and Francis Group, LLC United States of America, 97, 1661-1662.
- Wen, H., Hai, N., Zhenshan, L., Lulu, L., Wang, W. (2007), “*Ellagic acid from acorn fringe by enzymatic hydrolysis and combined effects of operational variables and enzymes on yield of the production*”, Institute for nanobiomedical technology and membrane biology, State key laboratory of biotherapy of diseases cancer center. China.15(4)495-502
- Willingham, M.C. (1999), “*Cytochemical methods for the detection of apoptosis*”, *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 48-1102-1110.
- Wolf, B., Green, D.R. (2002), “*Apoptosis: Letting slip the dogs of war*”.
- Yaylacı, S., Topuzoğlu, A., Karcıoğlu, Ö. (2009), “*Acil servise başvuran kanser hastalarının klinik karakteristikleri ve bir yıllık sağkalımları*”, *International Journal of hematology and oncology*. 15-23
- Yılmaz, İ. (2005), “*Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi; ve*

yükselmiş olan apoptozisin variokoselktomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi'', Türkiye.56-70

Yu, Y.M., Chang, W.C. and Wu, C.H. (2005), “*Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid*”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 675–681.