T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLURBİPROFENİN SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Elçin BAKIR

Farmasötik Toksikoloji Programı

Doktora Tezi

ANKARA

2018

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLURBİPROFENİN SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Elçin BAKIR

Farmasötik Toksikoloji Programı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT

İkinci Danışman

Doç. Dr. Ayşe EKEN

ANKARA

2018

ONAY SAYFASI

FLURBİPROFENİN SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE APOP TOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Elçin BAKIR

Danışman: Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT

İkinci Danışman: Doç. Dr. Ayşe EKEN

Bu çalışma 31/10/2018 tarihinde, jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji" programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN *(Hacettepe Üniversitesi)*
Tez Danışmanı:	Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT *(Hacettepe Üniversitesi)*
İkinci Danışman:	Doç. Dr. Ayşe EKEN *(Erciyes Üniversitesi)*
Üye:	Prof. Dr. Onur ERDEM *(Sağlık Bilimleri Üniversitesi)*
Üye:	Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ *(Ankara Üniversitesi)*
Üye:	Doç. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ *(Hacettepe Üniversitesi)*
Üye:	Doç. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU *(Hacettepe Üniversitesi)*

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

01 Kasım 2018

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLANMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- ○ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. [1]
- ○ Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. [2]
- ○ Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

31/10/2018

Elçin BAKIR

---

[1] *"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"*

1) *Madde 6. 1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*

2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*

3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.*

**Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT danışmanlığında ve Doç. Dr. Ayşe EKEN eş danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Elçin BAKIR

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana her zaman destek olup yol gösteren, her anlamda yanımda olan, akademik yaşamım boyunca örnek alacağım çok değerli danışman hocam *Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT'a,*

Beni akademik hayata teşvik eden, bu süreçte tecrübe ve bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda desteğini her zaman hissettiğim ve kendisinden çok şey öğrendiğim kıymetli eş danışman hocam *Doç. Dr. Ayşe EKEN'e,*

Bu süreçte desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı *Prof. Dr. İbrahim NARİN'e* ve dekan yardımcıları *Doç. Dr. M.Orhan PÜSKÜLLÜ* ve *Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem YÜCEL'e* ve yardımlarından dolayı değerli hocam *Prof. Dr. N. Nalan İmamoğlu ŞİRVANLI'ya,*

Bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren saygıdeğer hocam *Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN'a,* tez sürecinde bana destek olan *Doç. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ'e* ve bu süreçte emeği geçen *Hacettepe Üniversitesi F. Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,*

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, akademik hayatımda önemli yerleri olan Erciyes Üniversitesi F. Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri değerli hocalarım *Dr. Öğr. Üyesi İ.İpek BOŞGELMEZ* ve *Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK'e,*

Bu süreçte bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi *Dr. Hande CANPINAR'a,*

Bu süreçte bana herzaman yardımcı ve destek olan başta *Uzm. Ecz. Tuğbagül ÇAL* ve *Uzm. Ecz. Aysun ÖKÇESİZ* olmak üzere *tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,*

Varlıklarıyla bana herzaman güç veren, her koşulda yanımda olan, başarılarımın en büyük mimarları sevgili *annem, babam ve kardeşime,*

Bana herzaman destek olan, her koşulda yanımda olan değerli eşim *Altuğ BAKIR'a,*

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının bir kısmı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (TDK-2017-7376).

ÖZET

Bakır, E., Flurbiprofenin Sitotoksik, Genotoksik Ve Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018. Flurbiprofen, propiyonik asit türevi bir *non steroidal antiinflamatuvar* (NSAİ) ilaçtır. NSAİ ilaçların antikanser etkileri ile ilgili birçok çalışma mevcut olmasının yanı sıra flurbiprofen ile yapılmış çalışma sayısı azdır ve flurbiprofenin antikanser etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bu amaçla flurbiprofenin sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkileri insan serviks kanser (HeLa) ve insan karaciğer kanser (HepG2) hücre hatlarında araştırılmıştır. Sitotoksisite ölçümü geniş doz aralığında çalışılmış ve 24, 48, 72 saatlik maruziyet süreleri değerlendirilmiştir. Sonuçta sitotoksisitenin her iki hücre hattında da doza ve zamana bağımlı olarak arttığı gözlenmiştir. Genotoksisite çalışması 48 saatlik maruziyet süresi ve belirlenmiş dozlar ile yapılmıştır. DNA kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerlendirmelerinde hücrelerde DNA hasarında doza bağımlı bir artış gözlenmiştir. Erken apoptoz, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak gen düzeyinde değerlendirilmiştir. 48 saatlik maruziyet sonucunda; apoptotik genler olan p53, Bax, kaspaz-3 ve kaspaz-9 gen düzeylerinde artma ve antiapoptotik genler olan BcL-2 ve survivin gen düzeylerinde azalma gözlenmiştir. Geç apoptoz ve hücre döngüsü analizleri ise akım sitometri kullanılarak değerlendirilmiştir. Her iki hücrede de geç apoptoz bulgusuna rastlanmamış ve hücre döngüsünde belirgin bir yığılma gözlenmemiştir. Hücrelerin genel olarak prolifere hücre özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak belirlenen dozlarda ve belirlenen maruziyet süresi sonunda flurbiprofenin her iki hücre hattında da apoptotik etki gösterdiği, fakat apoptoz sürecinin henüz tamamlanmadığı gözlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular, flurbiprofenin gen düzeyinde etkili olduğunu ve hücre içi yolak ile apoptozu indüklediğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Flurbiprofen, apoptoz, antikanser, sitotoksisite, genotoksisite

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (TDK-2017-7376)

ABSTRACT

B Bakir, E., Evaluation of Cytotoxic, Genotoxic and Apoptotic Effect of Flurbiprofen, Hacettepe Unversity Graduate School Health Sciences Pharmacy Department of Pharmaceutical Toxicology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2018. Flurbiprofen is a propionic acid-derived non steroid anti-inflammatory drug. Although there are many studies of the anticancer effects of NSAI drugs, there are few studies of flurbiprofen and the anticancer activity of flurbiprofen is not fully understood. In this study, cytotoxic, genotoxic and apoptotic effects of flurbiprofen were evaluated in human cervical cancer (HeLa) and human liver cancer (HepG2) cell lines. Cytotoxicity was measured at a wide dose range and exposure times with 24, 48 and 72 hours were evaluated. As a result, it was observed that cytotoxicity increased both dose and time dependent in both cell lines. Genotoxicity study was performed with 48 hours exposure time and determined doses. DNA tail length, tail density and tail moment evaluations revealed a dose-dependent increase in DNA damage in cells. Early apoptosis was evaluated at the gene level using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). After 48 hours exposure; increased levels of apoptotic genes p53, Bax, caspase-3 and caspase-9, and decreased levels of BcL-2 and survivin genes, which are antiapoptotic genes. Late apoptosis and cell cycle analyzes were evaluated using flow cytometry. No evidence of late apoptosis was observed in both cells and no significant arrest was observed in the cell cycle. It has been determined that the cells generally exhibit proliferating cell characteristics. As a result, it was observed that flurbiprofen had an apoptotic effect at both the determined doses and at the end of the determined exposure period, but the apoptosis process was not completed yet. Findings from the study indicate that flurbiprofen is effective at gene level and induces apoptosis with intracellular pathway.

Key words: Flurbiprofen, apoptosis, anticancer, cytotoxicity, genotoxicity

Erciyes University Scientific Research Unit (TDK-2017-7376)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKİR MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xix
TABLOLAR	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Non Steroidal Antiinflamatuvar (NSAİ) İlaçlar	4
2.2. Flurbiprofen	8
2.2.1. Yan Etkileri	9
2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri	10
2.2.3. Etkileşimleri ve Riskli Gruplar	11
2.3. Apoptoz	12
2.3.1. Apoptozun Morfolojisi	13
2.3.2. Apoptozun Mekanizması	14
2.3.3. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	21
2.3.4. Apoptoz ve Kanser	22
2.4. Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçların Antikanser Etkileri	23
2.4.1. Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar ve Apoptoz	24
2.5. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	25
2.5.1. Hücre Kültürü	26
2.5.2. Sitotoksisite Ölçümü	29
2.5.3. Genotoksisite Ölçümü	31
2.5.4. Gen İfadesi Ölçümü	34

2.5.5. Hücre Döngüsü Analizi ve Geç Apoptoz Ölçümü 38
3. GEREÇ VE YÖNTEM 43
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 43
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler 44
3.3. Kullanılan Çözeltiler 46
3.3.1. Çalışılan Etkin Madde Çözeltileri 46
3.3.2. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler 47
3.3.3. Tek Hücre Jel Elektroforez (*COMET*) Yöntemi ile Genotoksisite Tayininde Kullanılan Çözeltiler 47
3.3.4. Gen Ekspresyonu Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler 49
3.3.5. Akım Sitometri Yönteminde Kullanılan Çözeltiler 51
3.4. Yöntemler 51
3.4.1. HeLa ve HepG2 Hücrelerinde 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi 51
3.4.2. HeLa ve HepG2 Tek Hücre Jel Elektroforez (*COMET*) Yöntemi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi 54
3.4.3. HeLa ve HepG2 Hücrelerinde Hücre Döngüsünü Kontrol Eden Protein olan p53 proteini, Apoptotik Proteinler (Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9) ve Antiapoptotik Proteinler (BcL-2, survivin)'in Gerçek Zamanlı PCR Yöntemiyle Belirlenmesi 56
3.4.4. HeLa HepG2 Hücrelerinde Olası Geç Apoptotik Etkilerin ve Hücre Siklusunun Akım Sitometri Yöntemiyle Tayini 60
3.5. İstatistiksel Yöntem 61
4. BULGULAR 62
4.1. Flurbiprofen Sitotoksisitesinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi 62
4.1.1.Flurbiprofenin HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular 62

4.1.2. Flurbiprofenin HepG2 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular 64
4.2. Flurbiprofen Genotoksisitesinin Tek Hücre Jel Elektroforezi (*COMET*) Yöntemi ile Belirlenmesi 67
4.2.1. Flurbiprofenin HeLa Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Tek Hücre Jel Elektroforezi (*COMET*) Yöntemi ile Genotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular 67
4.2.2. Flurbiprofenin HepG2 Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Tek Hücre Jel Elektroforezi (*COMET*) Yöntemi ile Genotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular 73
4.3. Flurbiprofenin Gen Ekspresyonuna İlişkin Bulgular 78
4.3.1. Flurbiprofenin HeLa Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Gen Ekspresyon Analizlerine Ait Bulgular 78
4.3.2. Flurbiprofenin HepG2 Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Gen Ekspresyon Analizlerine Ait Bulgular 84
4.4. Flurbiprofenin Apoptotik Etkilerinin ve Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Akım Sitometri ile Belirlenmesi 90
4.4.1. Flurbiprofenin HeLa Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin ve Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular 90
4.4.2. Flurbiprofenin HepG2 Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin ve Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular 93
5. TARTIŞMA 97
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 105
7. KAYNAKLAR 106
8. EKLER
EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu 124
9. ÖZGEÇMİŞ 126

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg/mL	Mikrogram/mililitre
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre, mikron
8-OHdG	8-hidroksideoksiguanidin
A-431	İnsan epidermal kanser hücresi
A549	İnsan akciğer kanser hücresi
AA	Araşidonik asit
AİF	Apoptoz indükleyici faktör
ANOVA	Varyans analizi
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör
APO-1	Apoptoz antijeni-1 (FasR,CD95)
Apo2L/DR4	Apoptoz ile ilişkili ölüm ligandı/reseptörü
Apo2L/DR5	Apoptoz ile ilişkili ölüm ligandı/reseptörü
Apo3L/DR3	Apoptoz ile ilişkili ölüm ligandı/reseptörü
ATP	Adenozin trifosfat
Bad	BcL-2 antagonisti hücre ölüm proteini
Bak	BcL-2 antagonisti hücre ölüm proteini
Bax	BcL-2 ile ilişkili X proteini
BC4 RT	Ters transkriptaz mastermix
BcL-10	B hücre lenfoma-10
BcL-2	B hücre lenfoma-2
BcL-X	B hücre lenfoma-X
BcL-XL	B hücre lenfoma-XL
BcL-XS	B hücre lenfoma-XS
BIRC-5	Apoptoz inhibitörü (Survivin)
Bid	Bax benzeri BH3 proteini
Bim	BcL-2 benzeri protein
BrdU	Bromodeoksiüridin
CA	Kromozom aberasyonu

CAD	Kaspaz ile aktive deoksiribonükleaz
CBMN	Sitokinez bloklu mikroçekirdek
CD95	Fas ligand aracılı apoptoz hücre yüzey reseptörü (APO-1)
cDNA	Tamamlayıcı-komplementer deoksiribonükleik asit
Cl	Klor
cm^2	Santimetre kare
C_{max}	Maksimum konsantrasyon
CO_2	Karbondioksit
COMET	Tek hücre jel elektroforez yöntemi
COX	Siklooksijenaz
COX-1	Siklooksijenaz-1
COX-2	Siklooksijenaz-2
COX-3	Siklooksijenaz-3
Ct	Döngü eşik değeri
CTL	Sitotoksik T lenfositi
CYP2C9	Sitokrom P2C9
CYP450	Sitokrom P450
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksinükleozit trifosfat
E.coli	*Escherichia coli*
E-7869	*R*-flurbiprofen
EAA	Eğri altında kalan alan
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EET	Epoksiyelikasatrienoik asit
EGF	Endotelyal büyüme faktörü
ELISA	Enzim ilişkili immünosorbent yöntemi
ER	Endoplazmik retikulum

ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
EtBr	Etidyum bromür
FACS	Floresan aktive hücre ayırma
FADD	Fas ile bağlantılı ölüm alanı proteini
FAP	Familyal adenomatöz polipozis
Fas	First apoptosis signal
FasL	Fas ligandı
FB	Flurbiprofen
FBS	Fetal sığır serumu
FITC	Floresan izotiyosiyanat
Fpg	formamidopirimidin glikozilaz
FSC	İleri saçılım kanal dedektörü (*forward scatter channel*)
g/mol	Gram/mol
G2/M	Hücre döngüsünün deoksiribonükleik asit hasar tespit zamanı
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
gDNA	Genomik DNA
GH4C1	Rat hipofiz hücresi
GDO	Genetiği değiştirilmiş organizma
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HeLa	Henrietta Lacks-serviks kanser hücre hattı
HepG2	İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
HETE	Hidroksietilosatetraenoik asit
HtrA2/Omi	Mitokondriyal serin protez
IAP	Apoptoz inhibitör proteini
IC_{50}	İnhibitör konsantrasyon 50
IL-1α	İnterlökin 1α
IL-1β	İnterlökin 1β
ISEL	*in situ end labeling*
iCAD	Kaspaz ile aktive deoksiribonükleaz inhibitörü
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
K	Potasyum

KKD	Kardeş kromatit değişimi
KML	Kronik myeloid lösemi
L	Litre
L/kg	Litre/kilogram
LD_{50}	Letal doz 50
LDH	Laktat dehidrojenaz
LMPA	Düşük erime noktalı agar
LOX	Lipooksijenaz
LSD	En önemsiz fark
LT	Lökotrien
LX	Lipoksin
mA	Miliamper
MAPK	Mitojen ile aktive olmuş protein kinaz
MEK	Mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz kinaz
mg	Miligram
mg/kg	Miligram/kilogram
Mg^{2+}	Magnezyum iyonu
miRNA	Mikro RNA
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MM	Multipl myelom
MN	Mikroçekirdek
MPT	Mitokondriyal permeabilite geçiş poru
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MSTO-211H	İnsan mezotelyome hücresi
MTS	3-(4,5- dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
Myc	Protoonkogen
Na	Sodyum
Na_2EDTA	Disodyum etilen diamin tetra asetik asit
NaCl	Sodyum klorür

NaOH	Sodyum hidroksit
NCI-H2452	İnsan akciğer mezotelyoma hücresi
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
NK	Doğal öldürücü
nm	Nanometre
NMPA	Normal erime noktalı agar
Noxa	Proapoptotik BcL-2 ile ilişkili protein
NS-398	Selektif COX-2 inhibitörü
NSAİ	Nonsteroidal antiinflamatuvar
NTC	*No-template control*
One way ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
ORT	Ortalama
p38 MAPK	p38 mitojen ile aktive olmuş protein kinaz
p42/44	Erk1/2
p53	Tümör protein 53
PBS	Fosfat tamponu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PE	Fikoeritrin
PG	Prostaglandin
PGD_2	Prostaglandin D_2
PGE_2	Prostaglandin E_2
PGF_2	Prostaglandin F_2
PGF2a	Prostaglandin F2a
PGG_2	Prostaglandin G_2
PGH_2	Prostaglandin H_2
PGI	Prostaglandin I
PGI_2	Prostaglandin I_2
PI	Propidyum iyodür
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B
PKA	Protein kinaz A
PKB	Protein kinaz B

PKC	Protein kinaz C
PLA_2	Fosfolipaz A_2
PTGS1	Prostaglandin-endoperoksit sentaz-1
PTGS2	Prostaglandin-endoperoksit sentaz-2
Ras	Protoonkogen (p21)
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
RT	Revers transkriptaz
RTK	Reseptör tirozin kinaz
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SBMN	Sitokinezi blok mikroçekirdek
SCE	Kardeş kromatit değişimi
SCGE	Tek hücre jel elektroforez
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi
SPSS	Statistical Package for The Social Sciences-İstatistik yazılım programı
SSC	Yana saçılım kanal dedektörü (*side scatter channel)*
SEM	Standart hata
SSRI	Selektif seratonin geri alım inhibitörü
SYBR Green	Deoksiribo nükleik asit floresan işaretleyici siyanin boya
$t_{1/2}$	Yarılanma ömrü
Tag	*Thermus aquaticus*
t_{max}	Maksimum zaman
t_{max}	Maksimum süre
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNFRI	Tümör nekroz faktörü reseptörü-I
TNFRII	Tümör nekroz faktörü reseptörü-II
TNF-α	Tümör nekroz faktörü-alfa
TRAIL	Tümör nekroz faktör ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand
Tripsin-EDTA	Tripsin- Etilen diamin tetra asetik asit
Tris HCl	Trizma hidroklorik asit
TUNEL	*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*
TX	Tromboksan

TXA_2	Tromboksan A_2
TXB_2	Tromboksan B_2
V	Volt
Vd/F	Dağılım hacmi
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WST	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum
XTT	2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid
ΔCT	Delta döngü eşik değeri

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Enzimatik araşidonik asit (AA) metabolizması.	5
2.2.	Flurbiprofenin kimyasal yapısı.	8
2.3.	Apoptoz yolakların şematik gösterimi.	15
2.4.	Fas ölüm reseptörü ile aktive edilmiş apoptozda ekstrinsik yolak.	16
2.5.	İntrensek (mitokondriyal) yolak.	17
2.6.	Apoptozun intrinsik yolağında pro-apoptotik BcL-2 proteinlerinin mitokondriyal membranlar arası proteinlerin salınmasındaki rolü.	18
2.7.	Apoptoz sırasında DNA fragmentasyonu.	20
2.8.	HeLa hücrelerinin mikroskobik görünümleri.	27
2.9.	HepG2 hücrelerinin mikroskobik görünümleri.	29
2.10.	Hücre döngüsü basamakları.	39
4.1.	Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde 24 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.	62
4.2.	Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde 48 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.	63
4.3.	Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde 72 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.	64
4.4.	Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde 24 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.	65
4.5.	Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde 48 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.	66
4.6.	Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde 72 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.	67
4.7.	Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HeLa hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk uzunluğu.	69
4.8.	Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HeLa hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk yoğunluğu.	70

4.9. Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HeLa hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk momenti. 71

4.10. Flurbiprofenin 48 saat inkübasyon sonrası HeLa hücrelerindeki DNA hasarı görüntüleri: A) negatif kontrol B) 5 µM FB C) 50 µM FB D) 125 µM FB E) 250 µM FB F) 500 µM FB G) 50 µM H_2O_2. 72

4.11. Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HepG2 hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk uzunluğu. 74

4.12. Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HepG2 hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk yoğunluğu. 75

4.13. Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HepG2 hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk momenti. 76

4.14. Flurbiprofenin 48 saat inkübasyon sonrası HepG2 hücrelerindeki DNA hasarı görüntüleri: A) negatif kontrol B) 5 µM FB C) 50 µM FB D) 125 µM FB E) 250 µM FB F) 500 µM FB G) 50 µM H_2O_2. 77

4.15. Flurbiprofen dozlarının Hela hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla kat değişimi değerleri. 83

4.16 Flurbiprofen dozlarının HeLa hücrelerindeki Bax/BcL-2 ekspresyon oranları. 83

4.17. Flurbiprofen dozlarının HepG2 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla kat değişimi değerleri. 89

4.18 Flurbiprofen dozlarının HepG2 hücrelerindeki Bax/BcL-2 ekspresyon oranları. 89

4.19. HeLa hücresinde negatif kontrol (%1 etanol) grubundaki hücre döngüsü dağılımını gösteren histogram. 91

4.20. Fluriprofenin HeLa Hücrelerindeki Apoptotik Etkileri ve Hücre Döngüsü Analizleri. 93

4.21. HepG2 hücresinde negatif kontrol (%1 etanol) grubundaki hücre döngüsü dağılımını gösteren histogram. 94

4.22. Fluriprofenin HepG2 Hücrelerindeki Apoptotik Etkileri ve Hücre Döngüsü Analizleri. 96

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	NSAİ ilaçların kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.	8
2.2.	Çalışmada kullanılan HeLa hücre hattının özellikleri.	27
2.3.	Çalışmada kullanılan HepG2 hücre hattının özellikleri.	28
3.1.	Bir reaksiyon için PCR karışım bileşenleri.	59
4.1.	Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular.	68
4.2.	Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular.	73
4.3.	Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde ortalama Ct değerleri.	78
4.4.	Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde ortalama ΔCt değerleri.	79
4.5.	Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde ortalama $2^{-\Delta Ct}$ değerleri.	79
4.6.	Flurbiprofen dozlarının HeLa hücrelerinde kat değişimi değerleri.	80
4.7.	Flurbiprofen dozlarının HeLa hücrelerinde kat regülasyonu değerleri.	81
4.8.	Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde ortalama Ct değerleri.	84
4.9.	Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde ortalama ΔCt değerleri.	85
4.10.	Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde ortalama $2^{-\Delta Ct}$ değerleri.	85
4.11.	Flurbiprofen dozlarının HepG2 hücrelerinde kat değişimi değerleri.	86
4.12.	Flurbiprofen dozlarının HepG2 hücrelerinde kat regülasyonu değerleri.	87
4.13.	Flurbiprofenin HeLa Hücrelerinde Apoptotik Etkileri ve Hücre Döngüsü Analizleri.	92
4.14.	Flurbiprofenin HepG2 Hücrelerinde Apoptotik Etkileri ve Hücre Döngüsü Analizleri.	95

1. GİRİŞ

Non steroidal antiinflamatuvar (NSAİ) ilaçlar, dünyada en sık kullanılan ilaç sınıflarından biridir ve tüm reçete edilen ilaçların yaklaşık %5'ini oluştururlar (1). Hafif ve orta dereceli ağrıların, özellikle de inflamasyon kaynaklı ağrıların tedavisinde, romatoid artrit gibi dejeneratif hastalıkların tedavisinde ve kardiyovasküler hastalıkların profilaksisinde sıklıkla kullanılan ilaçlardır (2, 3). Ancak, gastrointestinal ve renal toksisiteleri, bu ilaçların kullanımını kısıtlayan yan etkilerini oluşturmaktadır (4). Ağrıyı, inflamasyonu ve ateşi tedavi edici özellikleri, siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe etmelerinden kaynaklanır (1).

Flurbiprofen; propiyonik asit türevi bir NSAİ ilaçtır. Ağrı kesici, ateş düşürücü ve antiinflamatuvar etkilidir. Romatoid artrit, osteoartrit ve ankilozan spondilit gibi hastalıklarda inflamasyon ve ağrı tedavisi için sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca dismenore, bursit, tendonit ve yumuşak doku zedelenmesi gibi hafif ve orta şiddetteki ağrıların tedavisinde de oral yolla yaygın olarak kullanılmaktadır. Flurbiprofen, selektif olmayan COX inhibitörü ilaçlardan biridir. Hem siklooksijenaz-1 (COX-1)'i hem de siklooksijenaz-2 (COX-2)'yi inhibe eder. En güçlü selektif olmayan COX inhibitörlerinden biri olduğu düşünülmektedir (5).

Apoptoz, doku homeostazının kontrolü için oldukça önemlidir ve apoptoza dirençte, onkogenez de hayati bir basamaktır. Apoptozun düzenlenmesinde birçok yolak bulunmaktadır. Birçok kemoterapötik tarafından oluşturulabilen deoksiribonükleikasit (DNA) hasarı gibi hücresel stres cevabında intrinsik apoptoz yolağı aktif olur. Genelde tümör protein 53 (p53) aktivasyonu sonucunda mitokondriyal membran geçirgenliğinin artmasıyla sitokrom c gibi mitokondriyal faktörler salınır ve hücre içinde artar, bu da başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonunu tetikler. Diğer taraftan; immün cevapta sitotoksik T lenfositleri (CTL) ve doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından indüklenen ölüm ligandı aracılıklı ekstrinsik yolak da apoptoziste oldukça önemlidir. Tümör nekroz faktör-α (TNF-α), Fas ligandı (CD95L/FasL) veya tümör nekroz faktör ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) gibi ölüm ligantlarının kendi reseptörlerine (TNFRI, CD95, TRAIL-R1/DR4 ve TRAIL-R2/DR5) bağlanması üzerine hücre içi protein kompleksleri oluşur. Burada kaspaz-8

ve kaspaz-10 aktive olur. Bu başlatıcı kaspazlar sinyal kaskadını başlatırlar ve kaspaz-3, 6 ve 7'yi yani efektör kaspazları aktive ederler. Antiapoptotik faktörlerin fazla eksprese edilmesi ve tümör hücrelerinin apoptotik eksikliği nükleer faktör kappa-B (NF-κB), mitojenle aktive protein kinazlar (MAPKs) ve fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B (PI3/Akt) gibi başka yolakların aktivasyonuyla sonuçlanabilir (6, 7).

NSAİ ilaçların kansere karşı koruyucu etkileri ve antikanser etkileri son zamanlarda dikkat çeken bir konu olmuştur. *İn vitro, in vivo* ve özellikle aspirin ile yapılmış epidemiyolojik çalışmalar, NSAİ ilaçların kolon-rektum, meme, prostat, pankreas, baş boyun, yumurtalık, akciğer gibi birçok kansere karşı koruyucu ve tedavi edici etkilerinin olduğunu göstermektedir (8). Prostaglandin (PG) üretiminin inhibe edilmesinin karsinojenezin durdurulmasında veya yavaşlatılmasında rolü olabileceği bildirilmiştir. Çünkü birçok kanser hücre hattında PG'lerin normal hücre hattındakinden daha fazla olduğu gösterilmiştir. PG'lerin aynı zamanda apoptozda rolü vardır, araştırmacılar kolon kanser hücre hattında prostaglandin E_2'nin (PGE_2) apoptozu inhibe ettiğini ve bir antiapoptotik gen olan B hücre lenfoma-2 (BcL-2) ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir (9). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile bu ilaçların apoptozu indükleyerek ve hücre döngüsünü bloke ederek antikanser etki gösterdikleri bildirilmiştir (10).

NSAİ ilaçların indüklediği apoptoz, bu ilaçların yol açtığı gastrik lezyonların ve antitümör aktivitelerinin anlaşılmasında önemlidir (1). Apoptozu indüklemelerinin dışında, platelet agregasyonunu inhibe etmeleri, anjiyogenezi ve hücre çoğalmasını baskılamaları da antitümör etkilerini arttıran faktörlerdendir (11, 12). COX-1 inhibisyonu yapan NSAİ ilaçların (aspirin gibi) gastrointestinal yan etkileri vardır. Selektif COX-2 inhibisyonu yapan NSAİ ilaçlarda ise bu yan etkiler maskelenmiştir ve COX-2 artışıyla spesifik bazı kanserlerde antikanser olarak kullanımlarının olabileceği gösterilmiştir (12). COX-2'nin tümör gelişimi ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (13). COX-2; inflamasyonda, vazodilatasyonda, kemik rezorpsiyonunda, kanser büyümesinde, anjiyogenezde, gastrik ülser onarımında ve granülasyonda rol oynar. Enflamatuvar hücrelerde ve immün sistem hücrelerinde eksprese edilir ve

COX-2 aracılığıyla PG üretimi, COX-1 aracılığıyla PG üretiminden daha fazladır. Dolayısıyla COX-2, patolojik malignitelere katılır ve COX-2'nin karsinojenezde rolü olabileceği düşünülmektedir (14, 15).

Son yıllarda flurbiprofenin antikanser etkilerinin olduğunu bildiren az sayıda çalışma vardır ve olası antikanser etkilerinin mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu nedenle bu konuda yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu tez kapsamında sitotoksisite, genotoksisite ve apoptotik etki belirleme çalışmaları ile flurbiprofenin olası antikanser etkilerinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu nedenle apoptoz yolağında önemli proteinler olan ve hücre döngüsünü kontrol eden p53 proteini, apoptotik proteinler ve antiapoptotik proteinlerin mesajcı ribonükleik asit (mRNA) düzeylerinin değerlendirilmesi ile flurbiprofenin olası antikanser etkisinin altında apoptoz yolağının bozulması, apoptoz genlerinin etkilenmesi şeklinde bir mekanizmanın olup olmadığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

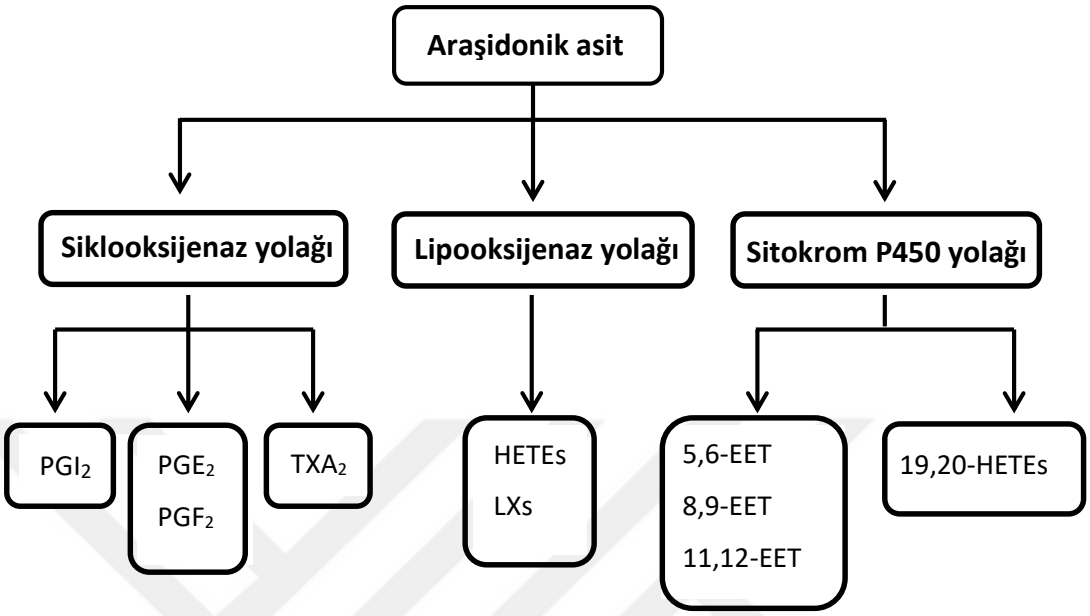
2.1. Non Steroidal Antiinflamatuvar (NSAİ) İlaçlar

Non steroidal antiinflamatuvar (NSAİ) ilaçlar başlıca analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar olarak kullanılır, dünyada en yaygın kullanılan ilaç gruplarından biridir ve reçete edilen ilaçların neredeyse %5'ini oluştururlar (1, 16-18). NSAİ ilaçlar, daha çok hafif-orta şiddetteki, özellikle de inflamasyon kaynaklı ağrıların tedavisinde hem insan hem de veteriner tıbbında kullanılır (2, 19). Bunlar opioid analjezikler dışında kalan analjeziklerdir ve narkoz hali oluşturmama, bağımlılık ve bilinç bulanıklığı yapmama gibi üstünlüklerinden dolayı daha çok tercih edilirler (20).

NSAİ ilaçlar; ufak yaralanmalar, baş ağrısı, romatoid artrit gibi dejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanıldığı gibi, epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, NSAİ ilaçların kardiyovasküler hastalıkların ve aynı zamanda özellikle de bazı kanserlerin gelişiminde profilaktik olarak da kullanılabileceğini göstermektedir (21, 22).

NSAİ ilaçlar etkilerini temel olarak PG sentezinde hız kısıtlayıcı bir enzim olan COX enzimini inhibe ederek gösterirler. (16, 20, 22). Prostanoidler (PG'ler ve tromboksanlar [TX]'ler), lökotrienler (LT), hidroksietilosatetraenoik asitleri (HETE'ler) ve epoksiyelikasatrienoik asitler (EET'ler), lipoksinler (LX) ve izoprostanlar "eikosanoidler" olarak adlandırılırlar ve araşidonik asitten (AA) türetilen, hemen hemen hepsi uzun zincirli oksijenlenmiş çoklu doymamış yağ asitlerini içeren geniş bir düzenleyici molekül ailesini oluştururlar (23, 24). Eikosanoidler; düz kas tonusunun düzenlenmesi, damar geçirgenliği, trombosit agregasyonu, taşıyıcı proteinler ve proliferasyon gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rol oynayan hücre içi ve hücreler arası sinyal moleküleridir (16). Fizyolojik ve patolojik bir uyarının ardından çoklu doymamış bir yağ yağ asidi olan AA, fosfolipaz A_2 (PLA_2) enzimi aracılığı ile membran fosfolipitlerinden salınır (16, 25). Serbest AA'nın sonraki enzimatik yolağı üçe ayrılır: COX yolağında AA'lar PG'lere, prostasiklinlere ve TX'lere dönüşür; lipooksijenaz (LOX) yolağında AA'lar HETE'lere, LX'lere ve LT'lere dönüşür; sitokrom P450 (CYP450) monooksijenaz yolağında ise AA'lar HETE ve EET'lere

dönüşür (Şekil 2.1). Bunların dışında enzimatik olmayan yol ile de izoprostan sentezi gerçekleşir (16).



Şekil 2.1. Enzimatik araşidonik asit (AA) metabolizması.

AA, hücre membranından fosfolipaz A_2 (PLA_2) enzimi ile salındıktan sonra "prostaglandin G/H sentaz" da denilen COX enzimleri ile prostaglandin G_2 (PGG_2) ve daha sonrasında prostaglandin H_2'ye (PGH_2) dönüşür. PGG_2 ve PGH_2, stabil olmayan yarı ömürleri çok kısa olan siklik endoperoksitlerdir, ara ürün olarak oluşurlar. PGH_2 de tamamı prostanoidler olarak adlandırılan, yapısında siklopentan halkası bulunduran prostaglandinlere ve prostaglandinlerden farklı olarak altı üyeli halka içeren TX'lere dönüşür. Esas olarak trombositler tarafından sentez edildikleri için de prostaglandinlerden ayrılan tromboksanlar, "tromboksan sentaz" enzimiyle tromboksan A_2'ye (TXA_2) ve daha sonra da tromboksan B_2'ye (TXB_2) dönüşürler. TXA_2; trombositleri aktive ederek agregasyona ve adezyona neden olur, ayrıca en güçlü doğal vazokonstrüktör ve bronkokonstrüktör maddelerden biridir. AA'dan TX oluşumu esas olarak COX-1 enzimi tarafından katalizlenir. Prostaglandin I'lar (PGI); diğer PG'lerden farklı olarak yapıca bisikliktirler ve esas olarak damar endotelinde oluşurlar. Prostasiklin olarak da adlandırılan PGI_2, trombositleri TX'larla zıt yönde etkilerler ve aynı zamanda gastrik mukozanın korunmasından sorumludur. PGI_2,

prostaglandin sentaz enzimi ile PGH_2'den sentezlenir. PGH_2'den sentezlenen diğer PG'ler ise PGE_2, prostaglandin D_2 (PGD_2) ve prostaglandin F_{2a} (PGF_{2a})'dır. Bunlara primer veya stabil PG'ler de denir. Doğrudan siklik endoperoksit ara ürünlerinden çeşitli izomeraz enzimleri ile oluşurlar. PGE_2; temel olarak tümör büyümesinden, inflamasyondan, PGD_2; inflamasyonun baskılanmasından sorumlu iken, PGF_{2a} ise; üreme sistemi üzerinde daha çok etkilidir (24, 26-28).

PG'ler ilk defa 1930'larda seminal sıvıdan izole edilmiş, güçlü vazodepresör ve düz kas uyarıcı aktiviteleri gözlenmiştir (23, 24). PG'ler; birçok fizyolojik ve inflamasyon, ağrı, ateş, kanser, osteoporoz, kardiyovasküler hastalıklar ve astım gibi patolojik bozuklukla ilişkilendirilmiştir. Bunlara ek olarak çalışmalar anjiyogenez, otoimmünite, alerjik hastalıklar ve kanser gibi durumlarda da PG'lerin rollerinin büyük önem taşıdığını göstermektedir (16).

NSAİ ilaçların temel mekanizmaları COX enzimini inhibe etmelerine dayanır. Eikozanoidlerin biyosentezinde ana basamak olan, AA'ten PGG_2 ve PGH_2 oluşumunu inhibe ederler (29). AA'ten prostaglangin G/H sentezinden sorumlu oldukları için "prostagandin G/H sentaz" enzimi olarak da adlandırılırlar (30). Vane ve arkadaşları (31), COX enzimini NSAİ ilaçların terapötik hedefi olarak tanımlamışlardır. Tanımlanmış en az iki ana COX enzimi bulunmaktadır: COX-1 ve COX-2. Yapısal olarak %60 oranında benzerlik gösteren bu iki enzimin kinetik özellikleri de hemen hemen aynıdır (25, 30). İki izomerin bu benzerliklerine rağmen ifade edilmeleri ve düzenlenmeleri farklıdır, farklı genler tarafından kodlanırlar. COX-1 enzimini kodlayan gen (*PTGS1*) 9. kromozomda bulunurken, COX-2 enzimini kodlayan gen (*PTGS2*) 1. kromozomda bulunur (23, 30). COX-1; birçok memeli dokusunda neredeyse sürekli olarak sabit bir şekilde ifade edilen yapısal bir enzimdir ve platelet agregasyonu, gastrik mukoza bütünlüğünün korunması gibi birçok fizyolojik süreçte düzenleyici olarak rol oynar (23, 25, 29, 30, 32). COX-2 izomeri ise COX-1'in aksine inflamatuvar ve kanser hücrelerinde; fibroblast büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü β, epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), TNF-α, interlökin 1α (IL-1α) ve interlökin 1β (IL-1β) gibi mitojenik ve inflamatuvar cevapta ifade edilen ve indüklenebilen bir enzimdir (16, 33). Normal

şartlarda birçok dokuda düşük olan COX-2 ekspresyonu, tek bir uyarıdan birkaç saat sonra COX-2 enziminin mRNA, protein ve enzimatik aktivitesi 10 kat kadar yükselir ve sonrasında bir anda bazal seviyesine düşer (23). COX-1 ve COX-2 dışında siklooksijenaz-3 (COX-3) olarak isimlendirilen enzim, bir COX-1 varyantıdır, başlıca beyin ve spinal kanalda ifade edilir ve bazı analjezik/antipiretik ilaçlarla (parasetamol, fenasetin, antipirin gibi) selektif olarak inhibe edilmekle birlikte fonksiyonu tam olarak anlaşılmamıştır (12, 16, 28). Yapılan bir çalışmada COX-3 enziminin parasetamol ile ilişkisi analiz edilmiş ve COX-3 inhibisyonunun bu ilacın ağrı kesici ateş düşürücü etkisinde önemli bir rolü olabileceği ileri sürülmüştür (34).

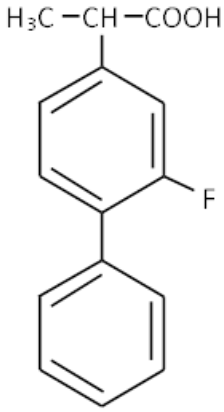
NSAİ ilaçlar; kimyasal yapılarına göre, plazma yarı ömürlerine göre veya COX enzimine ilgisine göre sınıflandırılabilir (35). Plazma yarı ömürlerine göre kısa ve uzun etkili olarak ayrılırlar; kısa etkili olanlar daha çok akut analjezi durumlarında, uzun etkili olanlar ise kronik iltihap durumlarında (romatoid artrit gibi) kullanılırlar (20). COX enzimlerine ilgilerine göre “COX-1 spesifik” (düşük doz aspirin gibi), “COX nonspesifik”, “COX-2 selektif” (meloksikam gibi) ve “COX-2 spesifik” (selekoksib gibi) ajanlar olarak ayrılırlar (25). Kimyasal yapılarına göre ise asidik, asidik olmayan ve koksib olmak üzere 3 gruba ayrılır (Tablo 2.1.) (20).

Tablo 2.1. NSAİ ilaçların kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.

I. Asidik Türevler	
1. Karboksilik asit türevleri	
1. Salisilik asit ve esterleri	Aspirin diflusinal, dolin salisilat, metil salisilat, magnezyum salisilat, salisil salisilat
2. Fenamik asitler	Flufenamik asit, metafenamik asit, meklofenamik asit, niflumik asit
3. Propiyonik asitler	İbuprofen, naproksen, flurbiprofen, fenbufen, benaksoprofen, fenoprofen, ketoprofen, tiaprofenik asit, soprofen, karprofen, oksaprozin, pirprofen
4. Asetik asitler	Diklofenak, indometazin, etodolak, sulindak, tolmetin
2. Enolik asitler	
1. Pirazolonlar	Fenilbutazon, oksifenbutazon
2. Oksikamlar	Azopropazon, piroksikam, pesoksikam, sudoksikam, tenoksikam, isoksikam
II. Asit Olmayan Türevler	
III. Koksibler	

2.2. Flurbiprofen

Flurbiprofen (2-[2-floro-4-bifenil]propiyonik asit), kimyasal yapısına göre propiyonik asit (fenilalkanoik asit) türevi bir NSAİ ilaçtır (Şekil 2.2). "$C_{15}H_{13}FO_2$" kapalı formülüne sahip olan bu bileşiğin molekül ağırlığı 244,265 g/mol'dür (36).



Şekil 2.2. Flurbiprofenin kimyasal yapısı.

Flurbiprofen antiinflamatuvar, antipiretik ve analjezik etkiye sahiptir (37). Romatoid artrit, ankilozan spondilit, osteoartrit gibi hastalıklarda ağrı ve inflamasyonun tedavisinde geniş ölçüde kullanımı mevcuttur, ayrıca oral olarak dismenore, bursit, tendonit ve yumuşak doku travmaları gibi hafif-orta şiddetli ağrıların tedavisinde kullanılmaktadır. Diğer NSAİ ilaçlar gibi AA'dan PG oluşumu basamağındaki inhibe edici rolü sayesinde bu etkileri göstermektedir. Ayrıca flurbiprofen "karbonik anhidraz" enzimini inhibe ederek hidrojen ve bikarbonat iyonlarının oluşumunu azaltır, topikal formda kullanıldığında bikarbonat iyon konsantrasyonunu azaltarak aköz sıvı miktarını azaltır ve göz içi basıncının düşmesine sebep olur (36). Katarakt ameliyatlarında ameliyat sırasında oluşabilecek miyozu önlemek amacıyla operasyon öncesinde kullanılması bu prensibe dayanmaktadır.

Flurbiprofen diğer bir sınıflandırmaya göre selektif olmayan COX inhibitörü NSAİ ilaçlardan bir tanesidir, hem COX-1'i, hem de COX-2'yi inhibe eder, bu inhibisyon geri dönüşümlüdür. Bilinen en güçlü selektif olmayan COX inhibitörlerinden biridir (5, 38).

Ticari olarak temin edilebilen flurbiprofen, (+) *S*- ve (-) *R*-enantiyomerlerin rasemik bir karışımıdır. *S*-enantiyomeri daha çok antiinflamatuvar etkinlikten sorumlu iken, her iki enantiyomer de analjezik etkinliğe sahiptir (36). *R*-flurbiprofen (E-7869, tarenflurbil, ansaid); COX-1 ve COX-2'yi inhibe etmeyen, dolayısıyla terapötik konsantrasyonlarda gastrointestinal kanalda veya böbreklerde toksik etki oluşturmayan bir enantiyomerdir. COX-1 ve COX-2 inhibisyonu sadece *S*-enantiyomerinde gözlenmektedir (9, 39).

2.2.1. Yan Etkileri

Karın ağrısı, mesane ağrısı, kabızlık, zor ve ağrılı idrara çıkma, bel ağrısı, mide ağrısı, şişkinlik, flurbiprofenin oldukça seyrek görülen yan etkileridir (40). Nadir görülen yan etkiler ise; sırt ve bacak ağrıları, diş eti kanaması, burun kanaması, bulanık görme, öksürük, deride çatlaklar, solunum ve yutma zorluğu, baş dönmesi, hızlı nabız, ateş veya titreme, genel yorgunluk, baş ağrısı, iştah kaybı, terleme, ciltte

tahriş ve renk değişikliği, görme bozuklukları, kan basıncında artma gibi etkilerdir. Doz aşımında ise; bilinç değişikliği, hızlı, yavaş veya sığ solunum, mide ekşimesi, bilinç kaybı, göğüs, üst bacaklar veya boğazdaki ağrı veya rahatsızlık, soluk veya mavi dudaklar, tırnaklar veya cilt, alışılmadık uykulu olma, donukluk veya halsizlik hissi oluşturabileceği gibi (41); kanama, ülserasyon, perforasyon gibi gastrointestinal bozukluklar, papiller nekroz gibi renal hasar da oluşturabilir (36).

Yapılan deney hayvan çalışmasında, LD_{50} (letal doz 50) değeri, köpeklerde oral uygulamada 10 mg/kg olarak bulunmuştur. Çalışmalar flurbiprofenin iyi tolere edilebilen bir ilaç olduğunu, yan etki potansiyelinin diğer NSAİ ilaçlara göre daha düşük olduğunu göstermektedir (37). Prospektif çalışmalar, flurbiprofen kullanan hastaların %15'inde serum aminotransferaz seviyelerinde hafif yükselmeler görülebileceğini; ancak bunların genellikle geçici, hafif ve asemptomatik olduğunu göstermektedir (36).

2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri

Flurbiprofen en çok oral olarak kullanılmakla beraber, ilacın topikal, intraoküler, intravenöz, intramusküler, bukkal ve rektal kullanımları da vardır. Hızlı salım ve sürekli salım tabletleri de bulunmaktadır. Hızlı salım bir tablet tek doz oral olarak alındıktan sonra hemen hemen tümüyle ve hızlı bir şekilde absorbe olur (37, 42, 43). Alımdan 0,5-3 saat sonra plazmada veya serumda maksimum konsantrasyona (C_{max}) ulaşır (42). Romatoid artritli hastalarla yapılan bir çalışmada plazmada kaydedilen maksimum konsantrasyon, 15-150 mg flurbiprofen alımında gözlenmiştir (44). Flurbiprofen absorbsiyonu birinci derece kinetiğine uygundur. Eğri altında kalan alan (EAA)-zaman grafiğinde eğri doza bağımlı olarak artış gösterir. Yemeklerle birlikte alımda serumdaki maksimum konsantrasyonu düşmekle beraber ilacın toplam absorbe edilen miktarı değişmez (42).

Flurbiprofenin insandaki oral dağılım hacmi (Vd/F), oral alımdan sonra 7 ila 14 L arasındadır (yaklaşık 0,1-0,2 L/kg) (42). Terapötik konsantrasyonlarda alındığında yaklaşık %99 oranında plazma albüminine bağlanır (37, 42, 43). Sinoviyal sıvıdaki dağılımı plazmadakine göre daha farklıdır; sinoviyal sıvıda plazmadakine

göre daha uzun t_{max}'a (maksimum süre), daha düşük C_{max}'a ve daha yüksek eliminasyon yarı ömrüne ($t_{1/2}$) sahiptir (42).

Flurbiprofen asıl olarak karaciğerde "CYP450 2C9" (CYP2C9) tarafından metabolize edilir, genel olarak hidroksilasyon ve metilasyon ürünlerine dönüşür. Ana metaboliti "4'-hidroksi-flurbiprofen" olmakla birlikte "3',4'-dihidroksi-flurbiprofen", "3'-hidroksi-4'-metoksiflurbiprofen" ile bunların konjugatları ve konjüge flurbiprofen de insan plazma ve idrarında saptanan metabolitler arasındadır. İbuprofen gibi diğer arilpropiyonik asit türevlerinin aksine enantiyomerik dönüşüm gerçekleşmez. Yavaş CYP2C9 metabolizörü olduğu bilinen ya da düşünülen hastalarda flurbiprofen, plazma seviyesinin yükselme durumuna karşı dikkatli kullanılmalıdır (42, 43, 45).

Flurbiprofen ve metabolitleri idrar ve feçes ile atılır, asıl atılım yolları idrardır. Günlük alınan dozun %70'ten fazlası 24 saat içinde glukronid ve sülfat konjugatları şeklinde, yaklaşık %20'si ise değişmeden idrar ile atılır (42, 43).

Günlük tavsiye edilen dozu 150-200 mg olmakla beraber günlük alınması gereken maksimum dozu 300 mg'dır. Mideye zarar vermemesi açısından yemeklerle birlikte alınması gerekir (43).

2.2.3. Etkileşimleri ve Riskli Gruplar

Flurbiprofenin; varfarin, aspirin, asetaminofen, beta-blokörler, furosemid gibi diüretikler, lityum, metotreksat, siklosporin, kortikosteroidler, selektif seratonin geri alım inhibitörleri (SSRI), simetidin, ranitidin, digoksin, oral hipoglisemik ajanlar, insülin, kinolon grubu antibiyotikler, takrolimus gibi ilaçlarla etkileşimi olduğu gibi, alkol, çay, kızılcık ve üzüm suyu ile de etkileştiği gösterilmiştir (43, 45-47).

Gebelik kategorisi gebeliğin 1. ve 2. trimesterinde C, son trimesterinde ise D'dir. Aktif peptik ülserli hastalarda veya daha önceden peptik ülser geçirmiş hastalarda, ağır böbrek, karaciğer veya kalp yetmezliği olan hastalarda kullanılmamalıdır (45).

2.3. Apoptoz

Apoptoz; fonksiyonları bozulmuş hücrelerin veya gereksinim duyulmayan hücrelerin çevresine zarar vermeden programlı olarak ölümleridir. Tek hücreli organizmalarda hücre ölümü yalnızca apoptoz ile gerçekleşirken (48), gelişmiş organizmalarda, hücreler arası ilişkide ve doku homeostazının kontrolünde oldukça önemli bir rol oynar ve apoptoz direnci onkogenezin çok önemli bir basamağını oluşturur (6, 49).

Programlı hücre ölümü kavramı 1965 yılında böceklerin başkalaşımları gözlemlenerek gündeme gelmiştir, fakat "apoptoz" terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 'fizyolojik hücre ölümü' olarak kullanılmıştır (50-52). Yine ilk olarak Kerr ve Wyllie, glukokortikoidlere maruz kalan timus hücreleri üzerinde yaptıkları deneysel çalışma ile fizyolojik hücre ölümünü göstermişlerdir. Fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde kromatin parçalarını ve diğer organellerin iyi korunduğunu gözlemleyerek bu olaya 'büzüşme nekrozu' demişlerdir (53).

Memeli hücrelerindeki apoptoz mekanizması, *Caenorhabditis elegans* nematodunun gelişim sürecindeki geçirdiği programlanmış hücre ölüm mekanizmalarını kapsamaktadır. Erişkin kurdun oluşabilmesi için gerekli hücrelerin bir kısmı farklı bölgelerde apoptoz geçirir, bu yüzden apoptoz hücrelerin genetik olarak belirlenmiş eliminasyonunu içerir ve hücre ölümünün ayırt edici bir şeklidir (51, 54). Apoptotik mekanizmalar embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca çalışmaktadır. Bazı hücreler uzun yıllarca yaşarken bazı hücreler çok kısa süre yaşayabilirler. Birçok dokuda (deri, gastrointestinal sistem gibi) devamlılık, apoptoz ve hücre yenilenmesi sayesinde sağlanır (49).

Apoptoz; Yunanca'da *apo* (ayrı) ve *ptozis* (düşen) kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur ve yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir (50, 53). Apoptozun hücrelerin gelişimi, yaşlanması veya devamlılığı için homeostatik bir mekanizma olmasının yanı sıra, apoptoz herhangi bir hastalık veya zararlı bir ksenobiyotik tarafından hücreler zarar gördüğünde veya immün bir reaksiyon sırasında bir savunma mekanizma şeklinde de ortaya çıkabilir. Hücrelerin apoptoza

gidip gitmeyeceği bir uyarana bağlıdır ve uyaranın tipi ile derecesi bu aşamada belirleyici faktörlerdir (54).

2.3.1. Apoptozun Morfolojisi

Apoptoz süresince hücrede ışık ve elektron mikroskobu ile çeşitli morfolojik değişiklikler saptanmıştır. Apoptozun ilk evrelerinde hücrede sodyum (Na), potasyum (K), klor (Cl) taşıyıcı sistemi durduğu için hücre içi ve dışı arasında hareket olmadığından hücre büzüşür ve piknoz oluşur. Çevre hücrelerle bağlantısını kaybeder. DNA'sı özgül olarak nükleozomlarından endonükleazlarla kesilir, 180-200 baz çiftinden oluşan parçalar elektroforezde ip merdiveni görüntüsü oluşturduğu için "*DNA ladder*" olarak adlandırılır. Hücrenin büzüşmesi ile birlikte hücre hacmi küçülür, sitoplazma yoğunlaşır ve organeller sıkışık bir hal alır. Piknoz, kromatin kondensasyonunun bir sonucudur ve apoptozun karakteristik bir özelliğidir. Kromatin kondensasyonunun erken fazında elektronca zengin nükleer materyal nükleer membran altında çevresel bir şekilde agregat oluşturur. Transglutaminaz enzimi ile plazma membranında "*zeiozis*" adı verilen tomurcuklanmalar oluşur, hücre sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Fosfotidil serin, hücre membranının iç tabakasından aminofosfolipid transferaz enzimi ile membranın dış tarafına göç eder, bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır ve bu cisimcikler daha sonra makrofaj, parenkimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagosite edilirler ve fagolizozomlar içinde parçalanırlar. (51, 53, 55, 56).

Apoptotik hücre ölümüne alternatif bir hücre ölüm şekli ise nekrozdur. Genel olarak benzer olmalarına rağmen apoptoz ve nekroz arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Apoptozda hücresel büzüşme olurken nekrozda hücresel şişme meydana gelir, apoptoz adenozintrifosfata (ATP) bağımlı iken nekroz bağımsızdır, apoptozda DNA kırıkları ip merdiveni görüntüsünde iken nekrozda düzensiz ve rastgeledir, apoptozda inflamasyon cevabı oluşmazken nekrozda oluşur, apoptozda sitoplazma içeriği apoptotik cisimler içinde kalırken nekrozda dışarı salınır, apoptozda hücre membranı bozulmazken nekrozda parçalanır ve apoptoz genelde

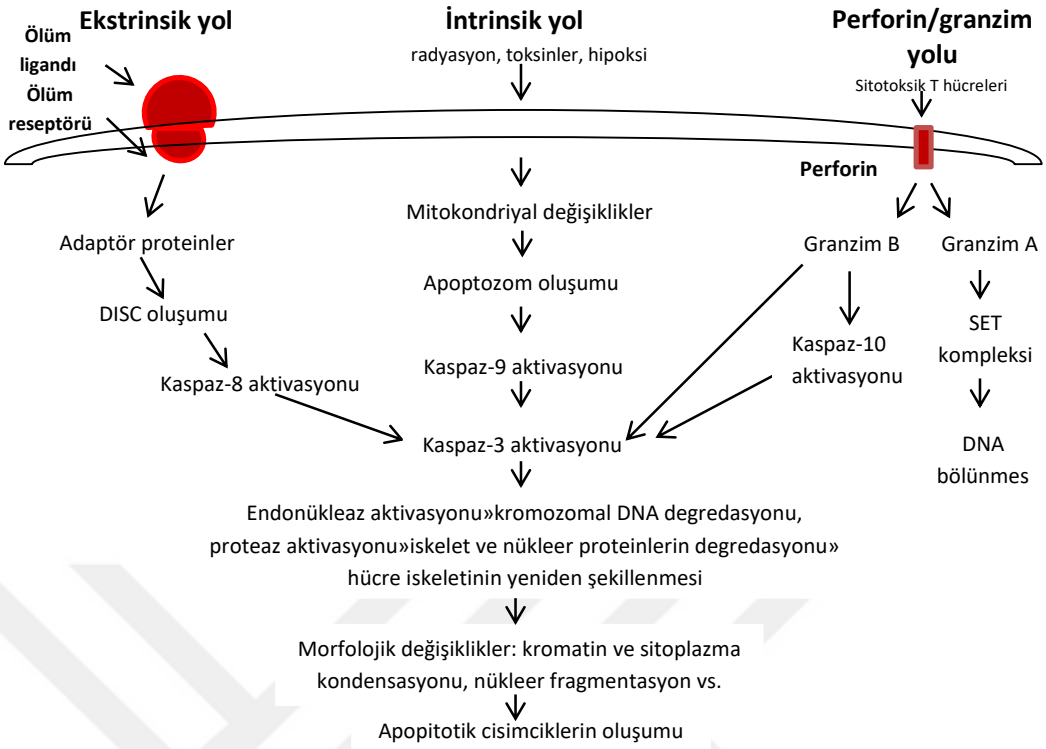
tek hücrede veya küçük hücre topluluklarında oluşurken nekroz hücre gruplarında meydana gelir (55, 56).

2.3.2. Apoptozun Mekanizması

Apoptozun mekanizması, enerji bağımlı kaskadları içerir (55). Apoptoz hücrelerde primer olarak başlatılabileceği gibi herhangi bir uyaran sayesinde hücrede sekonder olarak da gelişebilir (53). Apoptotik ölüm; başlama fazı, sinyal fazı, ölüm fazı ve ölü hücrelerin ortadan kaldırıldığı fazlardan oluşmaktadır.

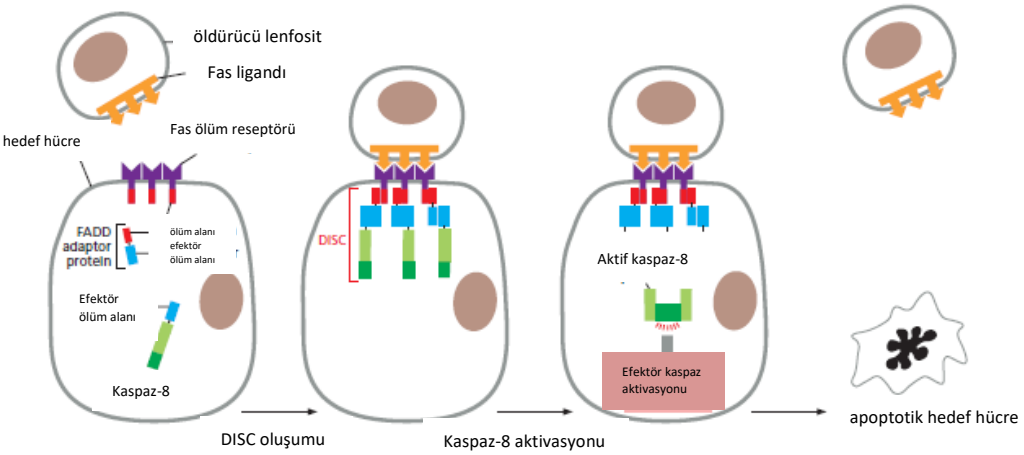
Başlama fazı; hücre ölümünün başlangıç fazıdır ve bu aşamada bazı moleküller rol alır. Bu indükleyici moleküllere FasL ve TNF-α örnek verilebilir. Bu ligantlar da belli reseptörleri (Fas, TNFRI, TNFRII gibi) etkilerler ve böylece sinyal iletim molekülleri aktif hale gelir. Sinyal fazı; çeşitli protein kinaz kaskatların rol aldığı önemli bir fazdır. Çoğu serin/treonin tipinde olan bu kinazlar apoptozda anahtar rol oynarlar. MAPK ailesinden p42/44 hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (*extracellular signal–regulated kinase*,ERK), p38 MAPK ile c-Jun N-terminal kinaz (JNK), siklik AMP-bağımlı protein kinaz A (PKA), protein kinaz B (PKB), Akt ve protein kinaz C (PKC) bu basamakta rol oynayan kinazlara örnek verilebilir. Ölüm fazı; hücrede ölüm kararının alındığı fazdır. Bu basamakta kaspazlar rol oynar. Başlangıçta inaktif formda sentezlenen kaspazlar birtakım proteolitik süreçlerden geçerek aktif hale gelirler ve bir kaskat oluştururlar. Ölü hücrelerin ortadan kaldırıldığı faz ise; apoptotik cisimciklerin çevre parenkimal hücreler veya fagositler tarafından fagosite edilmesi olaylarını kapsar (54).

Ekstrinsik (dış) ve intrinsik (iç/mitokondriyal) olmak üzere başlıca iki ana apoptotik yol bulunmaktadır. Bu iki yol birbiriyle bağlantılıdır ve bir yolda rol oynayan moleküller diğer yolu da etkilemektedir. Bu iki ana apoptotik yola ek olarak T-hücre aracılı sitotoksisiteyi ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren başka bir yol daha bulunmaktadır. Apoptotik yolaklar şekil 2.3.'te gösterilmiştir (51, 55). Bu 3 yol, farklı mekanizmalarla başlayıp asıl efektör olan apoptotik yolda (kaspaz 3 aktivasyonu) birleşir ve sonuçta apoptotik cisimler oluşur.



Şekil 2.3. Apoptoz yolaklarının şematik gösterimi (51).

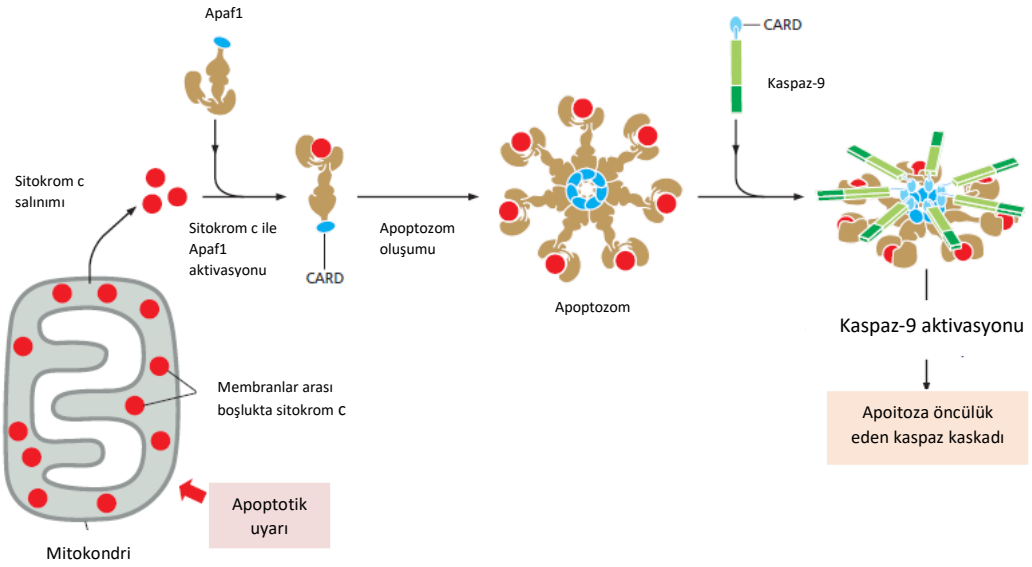
Ekstrinsik yol; apoptozun membranlar arası reseptör aracılı etkileşimlerle başladığı yoldur. Bu sinyal yolunda ölüm reseptörlerini de içeren TNF reseptör gen ailesinin üyeleri rol almaktadır (54). Hücre dışı sinyal proteinleri hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanır ve ekstrinsik yolağı başlatır (57). Ligand ve onların karşılığı olan öldürücü reseptörler şunlardır: FasL/FasR, TNF-α/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5. Ekstrinsik yolak en iyi şekilde Fas ligandı ve reseptörü ile karakterize edilmiştir (Şekil 2.4.) (54, 55, 57). FasL, özellikle sitotoksik T hücreleri ve NK hücrelerinin üzerinde bulunur. Apoptotik işlem bu FasL'nin Fas reseptörüne (CD95, APO-1) bağlanmasıyla başlar. Fas'ın sitoplazmik uzantısı, bir ölüm alanını içerir. Bu uzantı, Fas ile bağlantılı ölüm alanı proteini (*Fas associating protein with a death domain protein,* FADD) ve hücre içi adaptör protein (başlatıcı prokaspaz içerir) ile birleşerek ölüm indükleyici sinyal kompleksini (*death-inducing signaling complex,* DISC) oluşturur. Daha sonra başlatıcı prokaspaz (kaspaz-8), adaptör proteinden ayrılarak aktif hale gelir ve ortak apoptotik yolu başlatır (57).



Şekil 2.4. Fas ölüm reseptörü ile aktive edilmiş apoptozda ekstrinsik yolak (57).

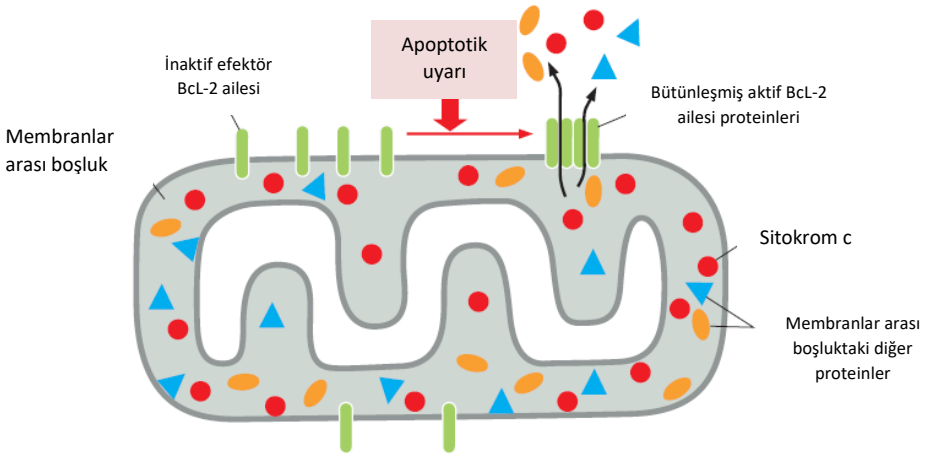
Bu ekstrinsik yoldaki mekanizma; bir immün tepki sonunda aktive olmuş T hücrelerinin uzaklaştırılması, virüs ile enfekte hedef hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrenin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar.

İntrinsik yol; doğrudan reseptörlere etki eden uyaranlardan farklı bir düzen içerir. Burada apoptozu başlatan mitokondriyal olaylardır. Radyasyon, toksinler, hipoksi, viral infeksiyonlar, hipertermi, serbest radikaller çeşitli uyaranlardır. Bu uyaranlar mitokondriyal permeabilite geçiş porunun (MPT) açılmasına yol açar. Normalde mitokondrinin iki (iç-dış) zarı arasında bulunan birtakım proteinler sitozole salınır. Salınan bu proteinlerden bazıları sitoplazmada apoptoza öncülük eden kaspaz proteolitik kaskadını aktive eder. Salınan proteinlerden en önemlisi "sitokrom c"dir. Bu protein sitozole salındığında yeni bir fonksiyon üstlenir; apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (*Apoptotic protease activating factor-1,* Apaf-1) denilen bir adaptör proteine bağlanır ve Apaf-1'in, tekerlek benzeri bir oligomer haline (heptamer) dönüşmesini sağlar, bu heptamerik yapıya "apoptozom" denir. Oluşan bu apoptozom, inaktif olan prokaspaz-9'un, aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Kaspaz-9 da efektör kaspaz olan kaspaz-3'ü aktive eder ve ortak efektör apoptotik yolu başlatır (Şekil 2.5.) (51, 54, 55, 57).



Şekil 2.5. İntrinsik (mitokondriyal) yolak (57).

BcL-2 protein ailesi üyeleri, apoptozun intrinsik yolağındaki gen regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu proteinler hücre içi apoptotik yolu başlıca; sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AİF), endonükleaz G, gibi diğer membranlar arası mitokondriyal proteinlerin sitozole salınmasını kontrol ederek düzenlerler (Şekil 2.6.). Bu proteinler mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol ederek apoptozu indükleyebilir veya inhibe edebilir, yani pro-apoptotik veya anti-apoptotik proteinler olabilir. Dolayısıyla BcL-2 protein ailesinin bu iki sınıfının aktivitesi arasındaki denge, memeli hücresinin hücre içi yolakla apoptoza uğrayıp uğramayacağını belirler (51, 53, 54, 57).



Şekil 2.6. Apoptozun intrinsik yolağında pro-apoptotik BcL-2 proteinlerinin mitokondriyal membranlar arası proteinlerin salınmasındaki rolü (57).

Apoptotik uyarı hücre içi yolağı tetiklediği zaman, pro-apoptotik efektör BcL-2 proteinleri aktif hale gelir, mitokondri dış membranında oligomer halinde birikir ve membranlar arası proteinlerin (sitokrom c gibi) sitoplazmaya salınmasını sağlar (57).

Pro-apoptotik BcL-2 proteinlerinden bazıları; B hücre lenfoma-10 (BcL-10), BcL-2 ile ilişkili X proteini (Bax), BcL-2 antagonisti hücre ölüm proteini (Bad, Bak), Bax benzeri BH3 proteini (Bid), BcL-2 benzeri protein (Bim) iken, anti-apoptotik BcL-2 proteinlerinden bazıları; BcL-2, B hücre lenfoma-X (BcL-X), B hücre lenfoma-XL (BcL-XL), B hücre lenfoma-XS (BcL-XS)'tir. Puma ve Noxa ise p53 aracılı apoptozda rol alırlar. Puma proteininin sentezinin Bax protein sentezini de beraberinde getirdiği, çalışmalarla gösterilmiştir (51, 54, 57).

p53, tümör baskılayıcı bir gendir. Hücrede bir gen hasarı oluştuğu zaman bir transkripsiyon düzenleyici gen olan p53 aktive olur. Bu protein ürünü doğrudan DNA'ya bağlanır ve hücre/dokuya özgül olmak üzere hücre siklusunu G1 fazında durdurarak tamir mekanizmalarını aktif hale getirmek için hücreye zaman kazandırır veya hücre hasarı onarılamayacak durumda ise hücreyi apoptoza yönlendirir. p53 geninin aktive olması, diğer apoptotik genlerin ve gen oranlarının ifadelerinde de değişikliklere yol açabilir (56, 58).

Perforin/granzim yolu; patojenle enfekte hücrelerin veya tümör hücrelerinin öldürülmesinde etkili olan bir yoldur. Salgısal apoptotik bir yoldur. Perforinler ve granzimler, CTL ve NK hücrelerinin sitoplazmik salgı granüllerinin içinde bulunurlar.

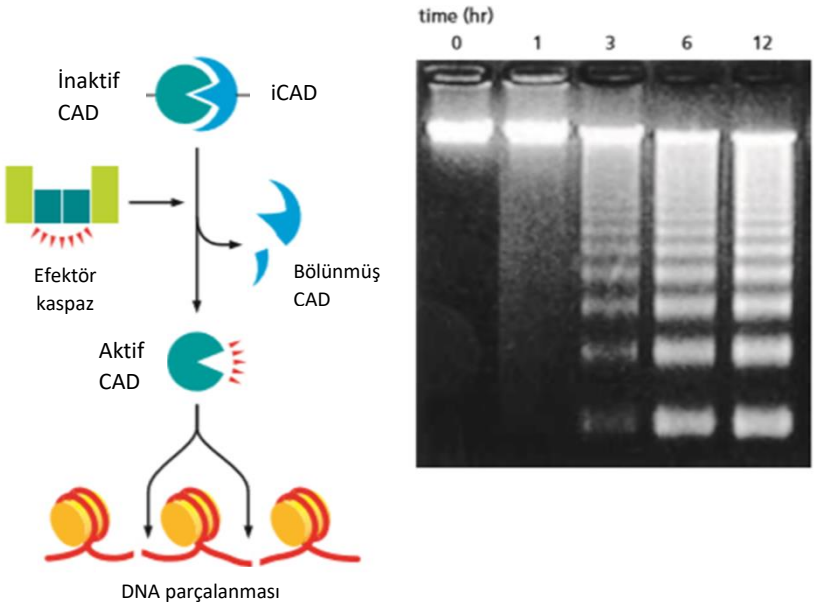
CTL reseptörü hedef hücreye bağlandığında perforinler salgılanır ve hedef hücre üzerinde dairesel bir por oluşturur, bundan dolayı hücre içi kalsiyumda hızlı bir artış meydana gelir. Hücre içine giren perforinler, granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Granzim B, kaspaz bağımlı yolakta (kaspaz 10 aktivasyonu) rol alırken (DNA fragmentasyonunu ve apoptoz ile birlikte prokaspaz aktivasyonunu başlatır), Granzim A perforinle sinerjik olarak kaspaz bağımsız yolakta rol alır (doğrudan DNA hasarına sebep olur (51, 56, 57) (Şekil 2.3).

Kaspazlar, proteolitik enzimlerdir ve apoptozun merkezi bileşenleridir. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür. Kaspazlar aktif katalitik bölgelerinde sistein içerirler ve proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgeden keserler, bu nedenle '*c-asp-ase*' adını almışlardır. Kaspazların bu kısıtlı proteolizisi nedeniyle hücrede lizis şekillenmez ve apoptotik cisimcikler oluşur (50, 56).

Kaspazlar sağlıklı hücrelerde temel olarak sentezlenirler ve sentezlendiklerinde inaktif haldedirler (prokaspaz). Normalde inaktif dimerler halinde bulunan efektör kaspazlar, başlatıcı kaspazlar tarafından aktif hale getirilirler ve proteolitik kaskad böylece başlamış olur (57, 59).

Üç apoptotik yolda rol oynayan kaspazlar başlatıcı kaspazlar olarak adlandırılırlar ve bunların en önemli rolleri, efektör kaspazları aktif hale getirmektir. Kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10 başlatıcı kaspazlardandır. Bu üç apoptotik yolun ulaştığı ortak yolda görev alan kaspazlar ise efektör kaspazlardır ve nükleer materyali parçalayan sitoplazmik endonükleazları ve aynı zamanda nükleer ve hücre iskelet proteinlerini parçalayan proteazları aktif hale getirirler. Kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 efektör kaspazlardandır (51, 54-57).

Kaspazlar inhibitör apoptoz proteinleri (IAP) denilen bir grup protein tarafından baskılanır (50). Kaspaz 3, özellikle endonükleaz kaspaz ile aktive deoksiribonükleaz (CAD)'ı aktive eder. Sağlıklı hücrelerde CAD, inaktif CAD (iCAD) ile birlikte bulunur. Efektör kaspazın aktivasyonu ile iCAD ayrışır ve CAD aktif hale gelir. Aktif hale gelen CAD, kromozomal DNA'yı nükleozomların aralarından keser (*linker*), bu da DNA'nın elektroforezde ip merdiven görünümlü parçalara ayrılmasına sebep olur (Şekil 2.7.) (57).



Şekil 2.7. Apoptoz sırasında DNA fragmentasyonu.

Aktif kaspazları inhibe eden proteinler, doğrudan kaspaz inhibisyonu yaparlar. Sağlıklı hücrelerde mitokondride bulunurlar. Smac/Diablo ve HtrA2/Omi bunlara örnek verilebilir (57, 60).

Survivin (BIRC-5); IAP ailesinin en küçük üyesidir (61), mitozun düzenlenmesinde ve apoptozun inhibisyonunda rol alır. Bu iki fonksiyonundan dolayı temel IAP'lerden ayrılır (62). Bu etkisini, apoptozun sondan bir önceki basamağında rol alan kaspazlarla etkileşerek ve onların etkilerini inhibe ederek göstermektedir (63, 64). Survivinin aşırı ekspresyonunun birçok tümör tipinde tümör oluşumunu teşvik ettiği gözlenmiştir. Survivinin tümörlerdeki aşırı ekspresyonu; mikroRNA'lar (miRNA'lar), reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler) ve bunun yanı sıra, aşağı akış sinyal dizileri olan PI3K/Akt, mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz kinaz/mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MEK/MAPK) gibi birçok faktör tarafından düzenlenir (61). p53 aracılıklı inhibisyonu da çalışmalarda gösterilmiştir (62). Survivin ayrıca fetal dokularda gelişim sürecinde genel olarak ekspre edilir. Survivin; hücre döngüsünde, G1 fazında baskılanırken G2/M fazında yüksek oranda ekspre edilir (63, 64). Survivinin tanı ve prognoz için önemli bir belirteç ve kanser tedavisi için moleküler hedef olabileceği çalışmalarda gösterilmiştir (62).

2.3.3. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Apoptoz belirlemede kullanılan yöntemler ve temel yaklaşımlar, apoptoz süreci boyunca gelişen yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ile ilişkilidir.

Apoptotik hücrelerde membran değişikliklerinin tayini; H3 timidin ve BrdU (bromodeoksiüridin) inkorporasyon testi gibi radyoaktif veya radyoaktif olmayan yöntemlerle yapılabilir. Annexin V canlılık testi, laktat dehidrogenaz (LDH) testi, geçirgen ve geçirgen olmayan boyalarla (floresan boya gibi) yapılan testler gibi kolorimetrik yöntemlerle yapılabilir. Apoptoz ve nekroz arasındaki morfolojik farklılıklar da membran değişikliklerini tayin etmede kullanılabilir.

Apoptotik hücrelerde DNA fragmentasyonu tayini; *in situ end labeling* (ISEL), *TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling* (TUNEL), *DNA laddering*, düşük molekül ağırlıklı DNA'nın immünolojik olarak tayin edilmesi gibi yöntemlerle yapılabilir.

Apoptotik hücrelerde mitokondriyal hasar; 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) ve 2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid (XTT) testleri kullanılarak tayin edilebilirken, sitokrom C salınımı; *Western blot*, sitokrom c enzim ilişkili immunosorbent (ELISA) gibi yöntemlerle, mitokondriyal membran potansiyeli ise; ATP enerji üretimi yöntemleriyle tayin edilebilir.

Akım ve lazer tarama sitometrisi ile apoptoz ile ilişkili proteinlerin tayini, floresan aktiveli hücre ayırma (FACS) analizleri ve hücre siklusu analizleri yapılabilir, ayrıca tek hücre jel elektroforezi (*COMET)* yöntemi de kullanılabilir.

p53 protein analizi, replikatif DNA sentezi ve DNA sentez onarımı gibi mekanizmaya dayalı yöntemler de bulunmaktadır. Apoptoz tayinini doğrulamak ve geliştirmek için ise akım sitometride ışık taraması, hücre yapışkanlığı testi, kromatin morfolojisi (genotoksik kromatin değişiklikleri) incelenmesi gibi yöntemler bulunmaktadır (65).

2.3.4. Apoptoz ve Kanser

Kanser; temel olarak bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyüp çoğalmasıdır. Kanser tek bir organda oluşabileceği gibi metastaz ile uzaktaki organları da kapsayabilir. 100'den fazla kanser türü bildirilmiştir (66).

Hücre bölünmesi, büyümesi, farklılaşması ve bunun kontrolü temel olarak genlerle sağlandığı için kanser bu genlerde ilişkili olarak meydana gelir. Onkogenler, DNA tamir genleri ve tümör baskılayıcı genler kanserde temel rolü olan gen gruplarıdır. Normalde hücre büyümesi ve farklılaşmasından sorumlu olan protoonkogenler mutasyon vs. ile onkogen haline dönüşebilirler. Ras, Erk, Myc genleri bilinen onkogenlerdendir. DNA tamir genlerindeki herhangi bir işlev kaybı da hücre onarılamayacağından o hücreyi ölüme (nekroz, apoptoz vs.) götürür. Tümör baskılayıcı genler ise herhangi bir şekilde (delesyon, mutasyon vs.) işlevlerini kaybederlerse hücre döngüsü bozulur ve kanser gelişebilir. p53 geni en iyi bilinen tümör baskılayıcı genlerdendir (66, 67).

Apoptoz; gelişim ve normal doku homeostazı ile yakından ilişkilidir. Dolayısıyla apoptotik yolaklardaki herhangi bir değişiklik, bir dizi anormalliği de beraberinde getirir ki bunlardan en önemlisi kanserdir (68). Apoptozda oldukça önemli rolü olan p53 tümör baskılayıcı genindeki mutasyonlar ve BcL-2 gen ailesi proteinlerinin ifadelerindeki değişiklikler kanser hücrelerindeki apoptoz mekanizmalarının bozulmasında temel rol oynar (54). Apoptotik gen ifadelerindeki azalma ve/veya antiapoptotik gen ifadelerinde artma apoptoza direnci artırarak tümör hücre proliferasyonunu uyarır (50, 54).

BcL-2 geni; ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır (69). Bu gen ailesi oldukça geniş olmakla beraber proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri bulunmaktadır. Antiapoptotik olan BcL-2 geninin birçok solid tümörde, lösemilerde, lenfomalarda aşırı bir şekilde ifade edildiği bilinmektedir (70, 71). Diğer bir antiapoptotik gen olan BcL-XL gen ifadesinin de kronik miyeloid lösemi (KML) ve multipl miyelom (MM) kanserlerinde arttığı bildirilmiştir (72). Tam tersine proapoptotik genlerin ifadelerinde ise kanser hücrelerinde azalma gözlenmektedir.

Örneğin Bax ve Bad gen ifadelerinin kolon kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde ifadelerinin azaldığı çalışmalarla gösterilmiştir (73).

p53 tümör baskılayıcı gen, kanser oluşumunda oldukça önemli role sahiptir. Bu gen kendisi kanser oluşumunda ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde etkili olduğu gibi apoptozun indüklenmesinde ve inhibisyonunda rol oynayan birçok genin de ifadesini düzenler. DNA'da herhangi bir hasar oluştuğu zaman p53 proteini sentezlenir ve hücre döngüsü durur. Bu aşamada eğer mümkünse DNA onarılır, değilse apoptoz başlatılır (74). p53 geni, insan kanserlerinde mutasyonun en sık görüldüğü genlerden biridir (75). Diğer bir deyişle p53 geninin mutasyona uğraması veya kaybı, kanserlerde en sık görülen genetik anomalidir (51, 54).

Bir apoptoz inhibitörü olan survivin geni de kanserlerde fazla miktarda ifade edilir. Hematopoetik neoplazmaları da içeren birçok tümör hücre hattında en çok ifade edilen genlerden birinin survivin geni olduğu bildirilmiştir (76). Survivin hücre döngüsünde G2/M evresinde apoptoza engel olarak birçok kanser türünde anormal mitoza sebep olur (51, 54). Ayrıca tüm bu hücre içi yolak mekanizmalarının dışında apoptozun hücre dışı yolağında rol oynayan ve hücre yüzeyinde bulunan Fas reseptör miktarının azalması da tümör gelişimi esnasında ortaya konmuş bir bulgudur (49).

2.4. Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçların Antikanser Etkileri

İn vitro, in vivo, klinik ve preklinik çalışmalar NSAİ ilaçların antineoplastik özellik taşıdığını göstermektedir. Popülasyon bazlı çalışmalarda da kronik NSAİ ilaç kullanımının kolorektal kanser insidansını %30-50 oranında azalttığı gösterilmiştir (29, 33, 77). Bunun dışında bazı NSAİ ilaçların kanser öncesi adenomaları azalttığı da klinik çalışmalarla belirlenmiştir. Örneğin selektif olmayan COX inhibitörü sulindak ve COX-2 selektif selekoksib ile yapılan çalışmalarda bu ilaçların hastalarda adenoma oluşumunu önlediği görülmüştür (78-82).

Birçok tümör tipinde COX enzim ifadesinin ve PG seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Bu da tümör oluşumunda inflamasyonun önemli bir rol oynadığı ve NSAİ ilaçların kansere karşı koruyucu etkileri olabileceği görüşünü desteklemektedir

(33, 83-85). Bunun yanı sıra COX bağımsız çeşitli mekanizmaların da NSAİ ilaçların antineoplastik etkilerine katkı sağladıkları bilinmektedir (86-89).

2.4.1. Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar ve Apoptoz

Apoptoz, NSAİ ilaçların antikanser etki mekanizmalarının en önemlilerinden biridir. Deneysel çalışma bulguları ve özellikle aspirin ile yapılan çalışmalar, bu ilaçların antikanser etkilerinin geri dönüşlü olduğunu, ilaç kullanımının bırakılması durumunda kısa süre içinde tümörün tekrarlayabileceğini göstermektedir (32, 77, 90). NSAİ ilaçların indüklediği apoptoz COX bağımlı veya COX bağımsız olabilir. NSAİ ilaçlardan bir ön ilaç olan sulindak metabolitleri ile yapılan çalışmalarda, COX-1 ve COX-2 inhibitörü olan sülfit ve COX-1 ve COX-2 inhibitörü olmayan sülfon metabolitlerinin her ikisinin de tümör oluşumunu ve kimyasal karsinojenezi birçok hücre hattında inhibe ettiği gözlenmiştir (91).

Siklooksijenaz Bağımlı Apoptoz

COX inhibisyonu, NSAİ ilaçların primer farmakolojik özelliğidir. Özellikle COX-2, kanser patogenezinden sorumlu olan izomerdir (77). FAP (familyal adenomatöz polipozis) hastalarının adenomalarında ve deneysel olarak tümör oluşturulmuş ratlarda COX-1 miktarında değişiklik olmazken COX-2 seviyesinin normalden yüksek çıktığı görülmüştür (92, 93). COX-2 seviyesinin artması; hücre proliferasyonunu artırır, apoptozu engeller, anjiyogenezi ve metastatik potansiyeli artırır, reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu artırır, VEGF'yi ve platelet kaynaklı büyüme faktörünü (PDGF) uyarır, B ve T lenfositlerinin çoğalmalarını engelleyerek immün yanıtı düşürür, bu şekilde karsinojeneze sebep olur. Bütün bu etkilerin de PGE_2 aracılığı ile olduğu düşünülmektedir (32, 77, 94).

COX-2'nin aşırı ifadesi hücredeki BcL-2 sentezini de artırmaktadır. Hücre içi BcL-2 düzeyinin artması ise öncü kötü huylu hücrelerin apoptoza direnç göstermesine sebep olur (32, 77). COX ifadesinin artışı aynı zamanda AA ifadesinin de artışı demektir. Konsantrasyonu artan hücre içi AA'in, mitokondriyal membran potansiyelini değiştirerek sitokrom c salınımını artırdığı ve dolayısıyla apoptotik bir

yolağı başlattığı düşünülmektedir. AA aynı zamanda güçlü bir apoptoz indükleyicisi olan seramid üretimini de artırmaktadır (32, 77, 95-97).

Siklooksijenaz Bağımsız Apoptoz

NSAİ ilaçların indüklediği apoptozun birçok COX bağımsız mekanizması da mevcuttur. Bunlar arasında; NF-κB reseptör sayısının azalması, pro- ve anti-apoptotik protein düzeylerinin değişmesi, intrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolaklarının aktivasyonu, proteazom fonksiyonlarının inhibisyonu, hücre döngüsünde bozulma ve stres kinazların aktivasyonu sayılabilir. Bu mekanizmaların bir kısmı COX bağımlı mekanizmalar arasında da yer alabilir (32).

NF-κB; immün ve enflamatuvar cevaplar gibi birçok genin transkripsiyonunu düzenleyen bir faktördür. Hücrelerin yaşam ve ölüm mekanizmalarında rol oynayan genler de bunlara dahildir (32). NF-κB aktivitesinin özellikle daha önceden tedavi edilip tekrar ilerleyen ciddi kanser olgularında yükseldiği gözlenmiştir (98). Aspirin ve diğer NSAİ ilaçların NF-κB aktivasyonunu inhibe ederek apoptoza yol açabileceği çalışmalarda belirtilmiştir (99, 100).

Aspirin ve diğer NSAİ ilaçların apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolaklarını etkilediği bilinmektedir. Sitokrom c salınımını artırarak ve kaspaz-9'u etkileyerek intrinsik yolu, kaspaz 8'i etkileyerek ise ekstrinsik yolağı aktif hale getirir (101-103). Ayrıca NSAİ ilaçlar antiapoptotik bir protein olan BcL-2 ifadesini azaltırken, apoptotik proteinler olan Bax, Bad ve p53 ifadelerinde artmaya yol açar (104-106).

NSAİ ilaçlar COX bağımsız olarak hücre döngüsünde duraklamaya ve proteazom fonksiyonlarını inhibe ederek apoptoza neden olur (106-108). Aynı zamanda NSAİ ilaçların endoplazmik retikulum (ER) ve oksidatif stresi indüklediği ve hücrelerde bu strese karşı apoptotik sinyallerin uyarabileceği gösterilmiştir (1, 32, 109, 110).

2.5. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

Canlıların bilimsel araştırmalarda kullanımının kısıtlanması gerekliliği, özellikle kanser çalışmaları gibi birçok alanda hücre kültürünün geliştirilmesine ve

kullanılmasına yol açmıştır (111). Dokudan, primer kültürden veya herhangi bir hücre hattından elde edilen hücreler ile oluşturulan kültürlere hücre kültürü denir (112). Tez çalışması süresince yürütülen hücre kültürü yöntemi, hücrelerin büyümesi ve vücut dışında muhafaza edilmesi tekniklerini kapsar. Kanser hücre hatları, orjinal kanserlerin özelliklerini taşımalıdır (113).

Hücre kültürü sıcaklık, pH, karbondioksit (CO_2) gibi çevresel etmenlerin kontrol edilebilmesi, hücre karakterizasyonu, maliyet, zaman gibi avantajlara sahipken; aseptik koşul şartı, pasajlar arası değişkenlik, farmakokinetik ve sistemik cevapların uyumsuzluğu gibi dezavantajları da vardır (112).

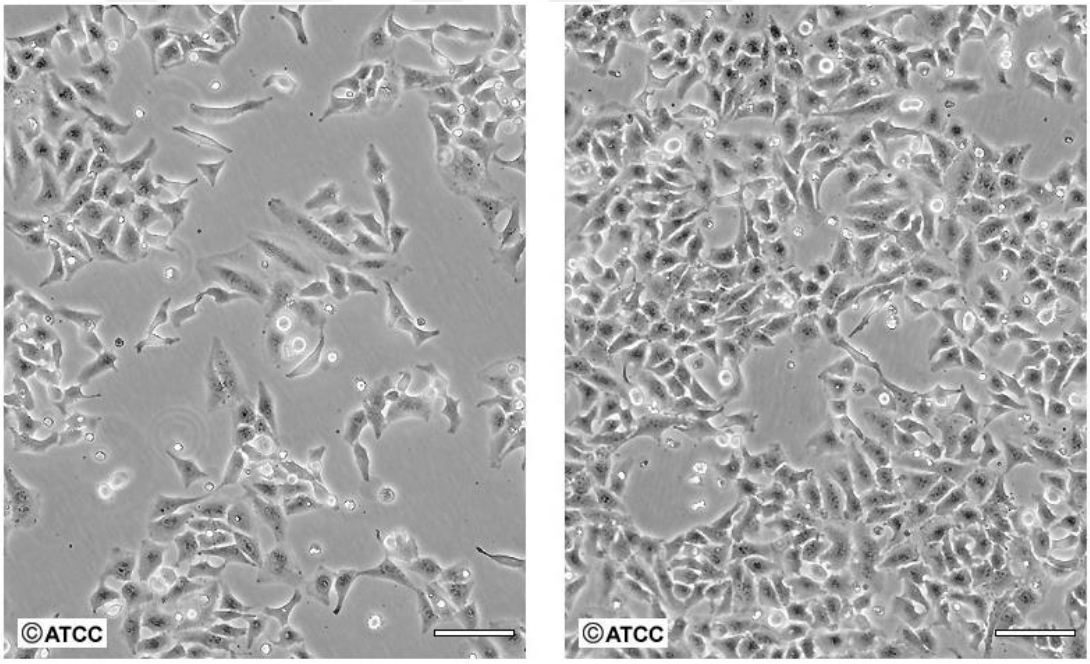
2.5.1. Hücre Hatları

İnsan Serviks (Rahim Ağzı) Kanseri Hücreleri (HeLa)

HeLa hücresi, en eski, en yaygın olarak kullanılan ve ilk ölümsüz insan hücre hattıdır. 1951 yılında Afrika kökenli Amerikalı genç bir kadının agresif glandüler serviks kanserinden izolasyonundan itibaren kanser araştırmalarının başlıca dayanağı olmuştur (114). “Henrietta Lacks” isimli bu kadından elde edilen hücrelere isminin ilk harflerine dayanarak “HeLa” hücreleri denilmiştir. Bu hücreleri keşfeden Gey ve arkadaşları, HeLa hücreleri ile ilgili yayın yapmışlardır (115). Henrietta Lacks kanserin vücuduna yayılması sonucu ölmüş fakat ölümsüz hücreleri yoğun talepler nedeniyle tüm dünyaya dağıtılmıştır (111). Bu hücreler diğer kanser hücrelerine göre çok daha hızlı çoğalırlar (114). HeLa hücresi kanser çalışmalarında sıklıkla kullanılmıştır ve günümüzde kullanımı hala aynı şekilde devam etmektedir. HeLa hücre hattının özellikleri Tablo 2.2.’de ve mikroskobik görünümleri Şekil 2.8.’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan HeLa hücre hattının özellikleri (116).

Elde edildiği organizma	İnsan
Kaynak doku	Serviks
Yaş/Cinsiyet/Irk	31 yaş/Kadın/Siyah
Tümör tipi	Adenokarsinom
Hücre tipi	Epitel
Hücre özelliği	Adheran
Saklama koşulları	Sıvı azot buharı



Şekil 2.8. HeLa hücrelerinin mikroskobik görünümleri (117).

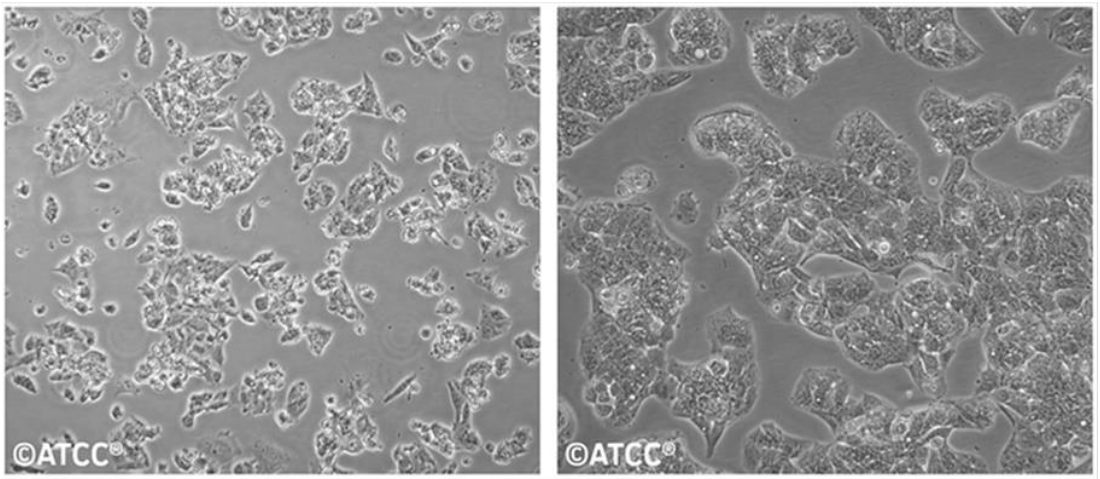
İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücreleri (HepG2)

HepG2, farklılaşmış hepatoselüler karsinomu olan, 15 yaşında beyaz ırktan bir erkek karaciğer dokusundan kültür edilmiştir. İnsan karaciğer karsinom hücrelerinden oluşan ve ölümsüzleştirilmiş bir hücre hattıdır ve epitel hücre morfolojisi gösterirler. HepG2 hücreleri yapışkandırlar ve küçük agregatlar halinde

büyürler. Bu hücreler; karaciğer metabolizması ve gelişimi, onkogenez (kemokarsinojenez ve mutajenez), hepatoksisite gibi birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır. İlaç metabolizması ve hepatotoksisite çalışmalarında en çok kullanılan insan hepatomu HepG2'dir (118). Birçok ilaç ve ksenobiyotiğin toksisite testlerinde HepG2 hücre hattı oldukça sık kullanılmaktadır. Ayrıca genotoksisite testlerinde de kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, *in vivo* karaciğer hücresi ile tutarlı olarak bu hücreler de hepatotoksikana cevap olarak DNA hasarını ve apoptozu açık bir şekilde göstermiştir (119-121) HepG2 hücre hattı oldukça iyi karakterize edilmiştir. Normal hepatositlere benzeyen bir biyosentez yetenekleri vardır, transferrin, fibrinojen, albümin ve plazminojen gibi plazma proteinlerinin çoğunu üretirler (122, 123). HepG2 hücreleri aynı zamanda CYP450 gibi birçok ilaç metabolizasyonunda rol oynayan enzimi ifade eder; ancak *in vivo* hepatositlere göre bu ifade oranı yaklaşık 50 kat düşüktür, bu da bu hücrelerin ana kısıtlamalarıdır (119). HepG2 hücre hattının özellikleri Tablo 2.3.'te ve mikroskobik görünümleri Şekil 2.9.'da gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan HepG2 hücre hattının özellikleri (124).

Elde edildiği organizma	İnsan
Kaynak doku	Karaciğer
Yaş/Cinsiyet/Irk	15 yaş/Erkek/Beyaz ırk
Tümör tipi	Hepatoselüler karsinom
Hücre tipi	Epitel
Hücre özelliği	Adheran
Saklama koşulları	Sıvı azot buharı



Şekil 2.9. HepG2 hücrelerinin mikroskobik görünümleri (125).

2.5.2. Sitotoksisite Ölçümü

Hücre canlılığının ölçülmesi ve dolayısıyla sitotoksisite çalışmaları; mutajenezin, malign transformasyonların, hücresel patolojinin, apoptozun ve farmasötik toksisitenin değerlendirmesinde oldukça büyük önem taşımaktadır. Ayrıca tümörler yalnızca canlı hücrelerden kaynaklanabileceği için önemli karsinojenez mekanizmalarının açıklanmasında da hücre canlılığının ölçülmesi değerlidir (126).

Geçmiş yıllarda hücre kültüründe, hücre canlılığı ve proliferasyonu çalışmaları için birçok yöntem geliştirilmiştir (127). Bu yöntemler arasında en yaygın olarak kullanılan ve uygulaması en kolay yöntemler mikro kuyucuklu plak kullanılarak yapılan sitotoksisite çalışmalarıdır. Bu yöntemlerin en önemli avantajları, hızlı ve kolay şekilde, aynı anda, aynı koşullar altında, birden fazla örneğin sitotoksisite analizinin yapılabilmesidir. Özellikle 96-kuyucuklu plaklar ile yapılan çalışmalar, analiz edilebilecek örnek sayısının çok olması sebebiyle oldukça önem kazanmıştır. Kolorimetrik ve lüminesans temelli analizler, bir mikroplak okuyucu sayesinde örneklerin doğrudan plak üzerinde analizlerinin yapılmasına olanak verir (128).

Araştırmalarda kullanılacak sitotoksisite yöntemi seçimi birçok faktöre bağlıdır. Bunlar arasında; hücre ölüm mekanizmaları, çalışmada kullanılacak olan maddenin cinsi, alınacak cevabın şekli, kullanılan hücre türü sayılabilir (112, 128).

Sitotoksisite genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerle belirlenir. Kolorimetrik yöntemlerde; MTT, XTT, 3-(4,5- dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4- sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST) gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliği ölçülebildiği gibi, kristal viyole, nötral kırmızısı gibi boyalar kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayalı ölçümler de yapılabilir. Lüminometrik yöntemler; floresans ve biyolüminesans olarak ayrılır, floresans yöntemlerde bu özellikte olan maddeler kullanılırken biyolüminesans yöntemlerde lusiferaz gibi özel enzimler ve bunların substratları kullanılarak ölçüm yapılır (örneğin; alamar mavisi). Enzimatik yöntemler ise LDH gibi hücre hasarı veya ölümü sonrası açığa çıkan enzimlerin ölçümüne dayanır (129-132). Ayrıca hücre sayısı ölçümleri arasında da tripan mavisi yöntemi gibi mikroskobik işlemler veya otomatik sayım teknikleri bulunmaktadır, fakat bu yöntemler zaman ve az örnekle çalışılabilme açısından çok fazla kullanılan yöntemler değildir (132).

MTT Testi

MTT yöntemi, ilk olarak 1983 yılında Mosmann tarafından memeli hücrelerinin canlılıklarının ve çoğalmalarının ölçülmesinde kullanılan kesin, hızlı, kantitatif kolorimetrik bir yöntem olarak ifade edilmiştir (133).

Canlı hücrelerde bulunan bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz, bir monotetrazolyum tuzu olan sarı renkli MTT'yi tetrazolyum halkasının açılmasına sebep olarak mor-menekşe renkli, suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürür. Yöntemin temeli de bu şekilde tetrazolyum tuzlarının indirgenerek renkli ve çözünmeyen formazan kristallerini oluşturmasına dayanır (134, 135). Formazan kristalleri hücre membranından geçemez ve dolayısıyla hücre içinde birikir (136). Tetrazolyum halkası yalnızca metabolik olarak aktif olan hücrelerde enzim aktivitesi sonucu açıldığı için MTT yöntemi ile sadece canlı hücreler tanımlanır. MTT hücre içine alındıktan sonra mitokondri bağımlı bir reaksiyon ile formazan kristallerine dönüştürülür. Bu formazan ürünleri sağlam, hasar görmemiş bir hücre membranından geçemez ve dolayısıyla hücre içinde

birikir. Suda çözünmeyen formazan ürünleri dimetil sülfoksit (DMSO) gibi organik çözücülerde çözünebilir; bu şekilde organik bir çözücü eklendiğinde bu maddeler çözünerek hücre içinden salınır ve oluşan renk kolaylıkla spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Yöntemin esası, yalnızca canlı hücrelerin ölçümüne izin verdiği için oluşan ve ölçülen mor-menekşe renk, hücre canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir (137-140).

2.5.3. Genotoksisite Ölçümü

Genetik toksikoloji, genotoksik ajanların indüklediği kromozomlarda veya DNA'da oluşan hasarı inceleyen toksikolojinin bir alt dalıdır. Genotoksik ajanlar mitotik ağda, hücre döngüsü kontrol noktalarında veya doğrudan ya da dolaylı bir şekilde DNA'da hasara sebep olur, bunlar da DNA tamir mekanizmalarını bozabilir, mutasyona sebep olabilir veya hücreyi apoptoza götürebilir. Sonuç olarak DNA'da oluşan değişiklikler birçok genetik ve multifaktöriyel hastalığa, kansere, yaşlanmaya, kısırlığa vs. sebep olur (141, 142).

DNA hasarı doğrudan olabileceği gibi genotoksik maddenin DNA bütünlüğünü koruyan proteinlere bağlanmasıyla dolaylı bir şekilde de meydana gelebilir. Örneğin iyonize radyasyon DNA'yı doğrudan hedef alır ve kırıklara sebep olur. İyonize radyasyonun dolaylı yoldan DNA hasarı yapması ise fotonun su molekülüyle etkileşip serbest radikal oluşturması esasına dayanır (142).

Mutajen maddeler hedef ile etkileştiğinde farklı hasarlar oluşturabilir. DNA'da tek zincir/çift zincir kırıkları, nokta mutasyonlar, çerçeve kayması, DNA katımı gibi hasarlar meydana gelebilirken aynı zamanda yapısal ve sayısal kromozomal değişiklikler de oluşabilir. Sonuç olarak o hücre ya hasar onarım mekanizmalarıyla tamir edilir ya da tamir edilemediği taktirde apoptoza gider (142, 143).

Genotoksisite testleri uzun yıllardan beri kullanılmaktadır ve toksik maddelerin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerini değerlendirmek için birçok genotoksisite testi vardır (144). Bu yöntemler *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar

ve çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde oluşan hasarları tespit etmek için geliştirilmiştir (145-147).

En yaygın kullanılan genotoksisite testleri; *Ames* testi, *COMET* testi, kromozom aberasyonu *(CA)*, kardeş kromatit değişimi *(SCE)* ve mikroçekirdek *(MN)* testidir.

Tek Hücre Jel Elektroforez (*COMET*) Testi

Tek hücre jel elektroforez (*single-cell gel electrophoresis-SCGE*) veya *COMET* yöntemi; *in vivo*/*in vitro*/*ex vivo* olarak uygulanabilen bir genotoksisite testidir. Tek hücredeki DNA hasarını belirlemede kullanılır. Duyarlı, basit, hızlı ve düşük maliyetli bir test olması, farklı hücre tipleri ve farklı DNA hasar tipleri için uygulanabilir olması, az miktardaki DNA hasarlarını ve birden fazla DNA hasar sınıfını tespit edebilmesi, en önemlisi de ölçüm için radroaktif işaretleme gerektirmemesi *COMET* yönteminin üstünlükleridir ve bu üstünlüklerden dolayı DNA hasar tespitinde oldukça sık kullanılan bir yöntemdir (148-153). Tekniğin bu avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları da vardır; tekniğin uygulama aşamasındaki elektroforez süresi, voltajı, hücre miktarı vs. gibi farklılıklar, sayım yapan kişinin tek olması gerekliliği, hasar belirlemede kullanılan parametrelerin çeşitliliği ve doğru seçim yapılması gerekliliği bu dezavantajlar arasında sayılabilir (152).

İlk olarak DNA hasarını spesifik hücrelerde 1978 yılında Rydberg ve Johanson, insan lenfositlerini agaroz jel içinde hazırlayarak ve akridin oranj ile değerlendirme yaparak belirlemişlerdir (154). 1984 yılında Ostling ve Johanson jel elektroforez tekniği-mikroelektroforetik teknik geliştirerek ve yönteme etidiyum bromür ile boyama aşamalarını ekleyerek yöntemi bir basamak daha geliştirmişlerdir. Bu yöntemde elektroforez nötral koşullarda uygulandığı için kullanımı kısıtlıdır, çünkü nötral koşullarda çift sarmal kırıkları tespit edilebilirken tek sarmal kırıkları tespit edilememektedir (155). Singh ve arkadaşları 1988 yılında alkali ortamda (pH>13) uyguladıkları elektroforez tekniği ile bu problemi ortadan kaldırmışlardır ve günümüzde kullanılan *COMET* tekniği, Singh ve arkadaşlarının geliştirdiği tek ve çift zincir kırıklarının her ikisini de tanımlamaya olanak sağlayan bu tekniktir (156).

Tek hücre jel elektroforez yönteminde; agaroz jel içerisinde mikroskop lamına yayılan hücrelere hücre membranını parçalayan lizis işlemi uygulanır ve süperkoil DNA moleküllerini içeren nükleoidler oluşur (157, 158). Süperkoil DNA moleküllerinin taşıdıkları zincir kırıklarından dolayı alkali elektroforez sonrasında DNA sarmalı gevşer ve serbest kalan DNA kırıkları anoda doğru göç eder ve kuyruklu yıldız görünümü oluşur. Bu kuyruklu yıldız görünümünden dolayı yöntem *"COMET"* adını almıştır (159). Hasarsız DNA ise büyük olduğundan, elektroforezde akım uygulaması ile kuyruk bırakmadan göç eder (160). Elektroforez sonrasında propidyum iyodür (PI), etidyum bromür (EtBr), akridin oranj, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) gibi DNA bağlayıcı floresan verme özelliği olan bir boya kullanılarak floresan mikroskop altında değerlendirme yapılır (158, 161). Pirimidin dimerleri, oksitlenmiş pirimidin/pürinler ve alkillenmiş bazlar gibi DNA hasarları böylelikle tespit edilebilir (157).

Elde edilen *COMET* görüntüsü görsel olarak veya hücredeki DNA hasarını belli parametreler ile ölçen görüntü analiz sistemleri ile değerlendirilir. Görsel olarak değerlendirmede hücreler hasarlı ve hasarsız olarak ayırt edilebilir, hasarlı olanlar ise hasar seviyelerine göre farklı kategorilere ayrılır; hiç kuyruk taşımayan (az hasarlı-0) gruptan DNA'nın çoğunlukla kuyruk kısmında yer aldığı yani çok kuyruklu (çok hasarlı-4) gruba kadar 0-4 arasında değişen bir derecelendirme yapılabilir (148). Görüntü analiz programları ile ise daha çok parametre değerlendirilebilir. Bunlar arasında DNA kuyruk uzunluğu, toplam uzunluk, DNA kuyruk yoğunluğu (kuyruktaki DNA yüzdesi), DNA kuyruk momenti, baş kısmındaki yüzde DNA gibi parametreler sayılabilir (159, 162, 163).

Çeşitli enzimlerle yapılan *COMET* yöntemleri de kullanılmaktadır. Özel glikozilaz aktivitesi gösteren bu enzimler hasarlı olan bazı uzaklaştırır, orada apürinik/apirimidinik bölgeler oluşturur ve bu bölgelerde zincir kırıkları meydana gelebilir ve böylelikle DNA hasarı belirlenebilir (164). Oksidatif DNA baz hasarlarının belirlenmesi için de yöntemde lizis işleminden sonra nükleotitler birtakım tamir enzimleriyle inkübasyona bırakılır ve inkübasyondan sonra önceki değerlerle karşılaştırılır, *COMET* parametrelerinde artış olması durumunda okside bazların

varlığından söz edilebilir. İnsanlardaki hücrelerde DNA hasarının tipini belirlemek için kullanılacak bu enzimlere Endonükleaz III enzimi ve *Escherichia coli*'den elde edilen bir DNA onarım enzimi olan formamidopirimidin glikozilaz (Fpg) örnek verilebilir. Bu enzimler okside pirimidinleri belirler (165-167). FPG, özellikle bir pürin oksidasyon ürünü olan 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG)'i tayin eden bir endonükleazdır. Bu enzim; 8-OHdG ve diğer okside pürinleri yüksek bir hassasiyetle tayin etmesinin yanı sıra, açık zincir N-7 guanin katım ürünlerini ve abazik bölgeleri de tayin edebilmektedir (168). Bu şekilde tamir endonükleaz enzimi bulunan her türlü hasarlı hücre *COMET* yöntemiyle tanımlanabilmektedir.

COMET yöntemi ile hücrenin ölüm mekanizması hakkında da fikir sahibi olunabilmektedir. Özellikle apoptoza uğrayan hücreler bu yöntem ile tayin edilebilir. Bu hücrelerde DNA'nın baş kısmı hemen hemen tamamen parçalanır ve toz bulutu halini alır, bu şekilde apoptotik hücreler tanımlanabilir (169).

DNA kırık tayini prensibine dayanan *COMET* tekniği birçok alanda kullanılmaktadır. Birçok tipte DNA hasarı ölçümünün yanı sıra DNA onarım araştırmaları, genotoksisite çalışmaları, apoptoz çalışmaları, biyolojik izleme, antioksidan çalışmaları ve klinik araştırmalar bu tekniğin uygulama alanına girmektedir. Sonuç olarak *COMET* yöntemi, moleküler epidemiyolojide ksenobiyotiklere çevresel ve mesleki maruziyetlerin ve bunların genetik düzeyde sonuçlarının araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (152).

2.5.4. Gen İfadesi Ölçümü

Gen ifadesi veya gen ekspresyonu terimleri, her biri birer DNA dizisi olan genlerin gen düzeyinden fonksiyonel olan protein yapısına dönüştürülmesi süreci için kullanılır. Bu süreç aslında temel iki basamaktan oluşmaktadır: Birinci basamak transkripsiyon basamağıdır. Bu basamakta DNA'da bulunan genetik bilgi bir RNA (mRNA) molekülü sentezi suretiyle kopyalanır. İkinci basamak ise translasyon basamağıdır. Bu basamakta ise kopyalanan genetik bilgi bir protein haline getirilir (170). DNA'daki baz diziliminin o bölgeden sentezlenen proteinin aminoasit dizisini

nasıl belirlediği, yani şifreleme işlemi biyokimyasal ve genetik yöntemlerle belirlenir (171).

Gen ifadesi ölçümü asıl olarak farklı hücrelerdeki genlerin veya aynı hücredeki farklı genlerin mRNA düzeylerini karşılaştırmak amacıyla yapılır. Örneğin sağlıklı ve tümör hücre karşılaştırılması, ilaç uygulaması, toksik maddelere maruziyet sonucu gen ifadelerindeki değişimler vs. bu ölçümlerle kıyaslanabilir (172). İfade edilen genler hücresel fenotipin ve fonksiyonların anlaşılmasında oldukça önemli bir faktördür. Genomik DNA'dan mRNA üretilmesi protein sentezinin ilk basamağı olduğu için gen ifadesindeki her değişiklik hem fenotipik hem de morfolojik farklılaşmalardan sorumludur (173).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

Gen ekspresyon analizleri, çeşitli uyarılara karşı biyolojik cevabın görüntülenmesi için oldukça sık kullanılır. Kantitatif nükleik asit sekans analizi için birçok yöntem geliştirilmiştir. Son zamanlarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin kantitatif nüklek asit analizi için güçlü bir araç olabileceği kanıtlanmıştır (174).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); nükleik asitlerle ilgili çalışmalarda oldukça sık kullanılan özgül ve duyarlı bir moleküler yöntemdir. 1980'li yıllarda Karry Mullis tarafından geliştirilmiştir ve 1993 yılında Nobel bilim insanı ödülüne layık görülmüştür. PCR tekniğinde reaksiyonlar katlanarak DNA kalıpları oluştururlar. Böylece başlangıç hedef sekansı ve oluşan PCR ürünü arasında miktarlar kıyaslanarak kantitatif bir ilişki elde edilir (175).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), PCR yönteminin geliştirilmiş önemli bir uygulamasıdır (176). Yöntemin gidişatını görünür hale getirir ve monitörize eder. Boyalar veya floresan işaretli problar kullanılır ve floresan ışıma oluşan DNA ile doğru orantılı olarak artar (177). Bu sistemde amplifikasyonunun ve amplifiye olmuş, çoğaltılmış ürünün (amplikon) kontrolü aynı kapalı sistem içerisinde gerçekleşir (178). Yöntem farklı kaynaklarda "kinetik PCR", "homojen PCR", "kantitatif RT-PCR" gibi farklı tanımlar ile de kullanılmaktadır (179).

RT-PCR, 3 temel basamaktan oluşur. İlk basamakta RNA revers transkriptaz (RT) enzimi ile komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürülür. İkinci basamakta PCR kullanılarak cDNA'nın amplifikasyonu sağlanır. Üçüncü basamakta ise amplifikasyon miktarı ve derecesi gerçek zamanlı olarak tayin edilir (180).

PCR reaksiyonunda çift zincirli DNA, DNA sekansına bağlanacak oligonükleotid primer, nükleotit trifosfat (dNTP), ısıya dayanıklı polimeraz ve tampon magnezyum (Mg^{2+}) iyonları kofaktör olarak bulunmalıdır ve reaksiyon ısıl işlem gerekmektedir. Reaksiyondaki ısı döngüleri uygun şekilde ayarlanır. Tek bir döngü göz önüne alındığında; öncelikle çift zincirli DNA'nın zincirlerini ayırmak için yüksek sıcaklık uygulanır, bu aşama denatürasyon (*denaturation*) aşaması olarak bilinir. Birleşme (*annealing*) aşamasında ise tek zincirli kalıp DNA ve ortamda bulunan primerlerin bağlanması için sıcaklık düşürülür, bu aşamada birleşme için gerekli sıcaklık yaklaşık 50-60°C'dir. Son olarak uzama (*extension*) aşamasında polimeraz için uygun olan 72°C sıcaklık sağlanır ve DNA polimeraz dNTP'leri kullanarak hedef zincirin uzamasına sebep olur. İşlem genel olarak 20-40 döngü sonrasında tamamlanır (181).

PCR sonuç ürünlerini belirlemede özgül olan veya olmayan yöntemler bulunmaktadır. Özgül yöntemler arasında TagMan prob, moleküler boncuk, hibridizasyon prob gibi yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise kullanılır. Özgül olmayan yöntemler arasında ise en çok "SYBR Green I" boya çeşidinin kullanıldığı yöntem bulunmaktadır. Burada kullanılan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlanır ve DNA miktarındaki artışa paralel olarak cihazda okunan floresan miktarında da artışa sebep olur. SYBR Green I, 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 dalga boyunda indirgenir. Primerler DNA molekülüne bağlanıp uzama başladığında boya molekülleri çift zincirli DNA arasına girer ve ışıma yapar. Ürün miktarı arttıkça floresan miktarı artar ve eş zamanlı görüntülenebilir. Floresan işaretli problara ihtiyaç olmadığı için yöntem daha az maliyetlidir ve çok fazla genin çoğaltılmasına olanak verir. Bu avantajlarının yanı sıra bölgeye özgül olmadığı için istenmeyen PCR ürünlerinin açığa

çıkması sonucu da boya floresan ışıma yapacağı için yanlış sonuç almak da mümkündür dolayısıyla uygun primer seçimi önem kazanmaktadır (181-183).

Orijinal PCR yönteminde kullanılan DNA polimeraz, *Escherichia coli*'den elde edilmiştir. *E.coli* DNA polimeraz I'inin *Klenow* parçasından elde edilen bu enzim, çift zincirli DNA'yı denatüre etmek için gerekli olan sıcaklıkta bozulduğundan her döngüden sonra reaksiyona yeni enzim eklemeyi gerektirmiştir (184). Sıcağa dayanıklı DNA polimeraz kullanımı, bu durumu gerektirmediği için büyük kolaylık sağlamıştır. Kullanılan yüksek sıcaklığa dayanaklı ilk DNA polimeraz, *Thermus aquaticus*'tan elde edilen "Taq DNA polimeraz"dır. Bu enzim PCR uygulamalarında en sık kullanılan enzimdir (185).

Eşik döngü değeri (*threshold cycle*, Ct), RT-PCR yönteminde önemli bir değişkendir. Üründeki artışın anlamlı olduğu ilk noktadır. Başka bir deyişle Ct değeri, amplifikasyon sırasında saptanan floresan ışımanın eşik değerinin aşıldığı döngü sayısını ifade eder, sistemin floresan ışımayı farkettiği nokta da denilebilir. PCR reaksiyonlarında yer alan farklı kalıp örneklerin miktarı Ct değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir (186).

RT-PCR'da önemli noktalardan bir tanesi de referans gen (*housekeeping* gen, kontrol geni) seçimidir. Kararlı ifadeye sahip olan genler PCR analizlerinde referans gen olarak kullanılmaktadır ve sonuçlar bu gen ifadesi baz alınarak hesaplanmaktadır. Normalizasyon için doğru referans gen seçimi gereklidir. En sık kullanılan referans genler gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve β-aktin genleridir (186).

RT-PCR, son zamanlarda kullanımı oldukça geniş alana sahip bir yöntemdir. Kullanıldığı alanlar arasında; patojen tespiti, onkolojik çalışmalar, prenatal tanı çalışmaları, adli tıp, genotipleme, genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO), metilasyon tespiti, DNA hasarı, ilaç endüstrisi, gen anlatımının analizi, kromozom anomalileri, tek nükleotit polimorfizmi (SNP) varlığının belirlenmesi, RNA çalışmaları vs. sayılabilir (182).

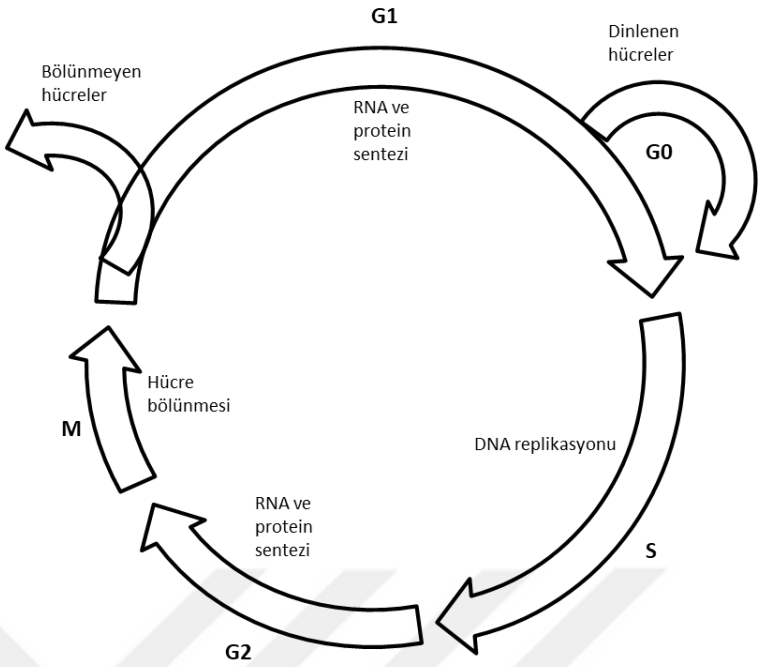
2.5.5. Hücre Döngüsü Analizi ve Geç Apoptoz Ölçümü

Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü; hücrenin büyüme ve çoğalmasını, organizma gelişimini, DNA hasar onarım regülasyonunu, hasara karşı cevap olarak doku hiperplazisini ve kanser gibi hastalıkları kapsayan karmaşık bir süreçtir. Hücre döngüsü çeşitli düzenleyici proteinler içerir, bu proteinler de hücreyi mitoz ve iki yavru hücre şeklinde sonuç veren spesifik sekanslara yönlendirir.

Hücre döngüsü sürecindeki merkezi bileşenler siklin bağımlı kinazlardır (cdks). Bu siklin proteinleri, hücrenin G1, S, G2 ve M (mitoz evresi) olarak adlandırılan hücre döngüsü basamaklarına ilerlemesini düzenler. Hücre döngüsü morfolojik olarak 2 evreye ayrılabilir; bunlar G1, S, G2 fazlarını kapsayan "interfaz" ve profaz, metafaz, anafaz, telofaz fazlarını kapsayan "M" evresidir.

G1 ve G2 evreleri, hücre döngüsünde mitoz ve DNA replikasyonu arasında kalan boşlukları oluşturur. G1 evresinde hücre DNA sentezi için hazırlanır. S evresindeki hücrelerde DNA sentezi gerçekleşir ve bundan dolayı anöploid DNA içerirler. G2 evresi ikinci boşluğu oluşturur ve hücre mitoza, yani M evresine hazırlanır. G0 evresi de interfazın bir evresidir ve dinlenme fazı olarak adlandırılır. Bu evrede hücre döngüsü aktif değildir fakat bölünme için de potansiyel teşkil eder. Özellikle farklılaşmalarını bitiren hücreler, bölünme sinyali almayan hücreler, büyümeyen hücreler veya besin yetersizliği gibi durumlarda hücreler bu fazda seyreder. Uyarı alan hücre dinlenme evresinden G1 evresine geçerek aktif döngüye girmiş olur (187-189). Hücre döngüsü basamakları Şekil 2.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Hücre döngüsü basamakları (187, 189).

Birçok toksin veya ksenobiyotik hücre döngüsünü spesifik bölgelerde etkileyebilir. Bunlara en iyi örnek kemoterapötik ilaçlardır. Hücre döngüsünün farklı bölgelerinde etki gösterdikleri için bu ajanların etki mekanizmalarının anlaşılmasında hücre döngüsü analizleri önemli rol oynar. Ksenobiyotiklerin etki mekanizmasının anlaşılmasında hücre döngüsü önemli bir araçtır. Örneğin bir toksin S fazının başlangıcında yığılmaya sebep oluyorsa DNA sentez mekanizmasının bir şekilde inhibisyonundan söz edilebilir.

DNA içeriği, BrdU ve H3-timidin inkorporasyonları, siklin ve cdk ifadeleri gibi hücre döngüsü durumlarını belirlemek için belirli belirteçler kullanılmaktadır. DNA içeriği, akım sitometri ile belirlenebilen en kolay ve en sık kullanılan ölçümdür. Bu ölçümde hücre döngüsünün G1, S ve G2/M (bu iki fazı birbirinden ayıramadığı için birlikte ölçüm verir) evrelerindeki yığılmalar gözlenir (187).

p53 tümör baskılayıcı gen, hücre döngüsünde önemli bir role sahiptir. Hücre proliferasyonu ile ve apoptoz ile direkt olarak bağlantılıdır. Malignitelerin yaklaşık %50'sinde p53 mutasyonları tanımlanmaktadır. p53, DNA hasarı kontrol noktasında önemli bir role sahiptir. Bir DNA hasarını takiben post-transkripsiyonel mekanizmalar ile p53 miktarı artar. Bu durum da hücre siklusunun G1 evresinde

yığılmaya sebep olur. p53 mutasyonlu hücrelerde bu kontrol noktası ortadan kalkmıştır. Böylece mitoz öncesi DNA hasar tamir mekanizması kısıtlanmış olur ve mitoz sonrası hasar genoma sabitlenmiş olur (187, 190, 191).

Akım Sitometri

Akım sitometri, biyolojik partiküllerin karakteristik özelliklerini ölçen lazer tabanlı bir teknolojidir. Hücrelerin ve çekirdek, organeller gibi hücre içi komponentlerin de ölçümünü gerçekleştirebilir. Akım sitometreleri tek bir partikülü veya hücreleri, sıvı ortamda akarak bir uyarım ışık kaynağından geçerken tarar (192). Temel olarak akım sitometri; tek bir hücrenin çoklu fiziksel özelliklerinin ölçüm cihazı içinden geçerken eş zamanlı olarak ölçülmesi olarak tanımlanabilir (193). Akım sitometri, biyolojik araştırmalar için oldukça önemlidir, çünkü hücrenin bütününün veya boya ve monoklonal antikor gibi ticari olarak temin edilebilen ajanlarla etiketlenmiş hücre içeriklerinin kalitatif ve kantitaif olarak ölçümlerine izin verir (192).

Birçok farklı disiplin akım sitometrinin gelişiminde rol oynamıştır. Bunlar arasında biyoloji, biyoteknoloji, bilgisayar bilimi, elektrik mühendisliği, lazer teknolojisi, matematik, tıp, ilaç, moleküler biyoloji, organik kimya ve fizik sayılabilir. Sitoloji otomasyonları ile başlayan çalışmaların süreci, 1950'li yıllarda *Wallace Coulter*'ın ilk akım sitometri cihazını bulması ve patent almasıyla ivme ve önem kazanmıştır (192, 193). Daha sonra hücre alt gruplarının ayrımlarının da sağlanabilmesi (*cell sorting*), antikor teknolojisi gibi çalışmalarla akım sitometri tekniği daha da ilerlemiştir (192).

Akım sitometri cihazında sıvı akış kısmı, cihazın en önemli kısımlarından biridir ve hücrelerin veya partiküllerin hazırlanan örnekten cihaza akışını sağlar. Örneği içeren sıvı ve bunu çevreleyen sıvı birbirine karışmadan akmakta, çevreleyen sıvı hidrodinamik bir odaklama sağlamaktadır ve böylece hücreler veya partiküller lazer ışının önünden tek sıra halinde geçmiş olurlar (192). Optik kısmında lazer ışını çoğu akım sitometride floresanlı etiketi uyaran ışık kaynağı olarak kullanılır. Mavi ışık üreten argon lazeri en sık kullanılan sistemdir. Bunun dışında helyum, civa lambaları

da kullanılmaktadır. Optik sistem ışık sinyallerini oluşturup bunların bir araya toplanmasından sorumludur (193). Elektronik sistem ise hücrelerden gelen ışık saçılımı ve floresans emisyonu, filtre ve dedektörlerde elektronik sinyallere dönüşür. Temel olarak iki tip dedektör bulunmaktadır. İleri saçılım kanal dedektörü (*forward scatter channel*, FSC); hücre yüzeyinden yansır ve hücrenin boyutu hakkında bilgi verir. Yana saçılım kanal dedektörü (*side scatter channel,* SSC) ise; hücre içinden kırılıp yansır ve partiküllerin veya hücrelerin granüler içerikleri, iç yapıları hakkında bilgi verir. Bunlar dışında bir de floresan filtreler ve dedektörler bulunur, değişik dalga boylarındaki floresan ölçümler, hücrelere floresan problar eklenir ve hücre yüzey molekülleri ve hücre içi moleküller hakkında bilgi verir. Bunlar hücre yüzey reseptörleri, sitokinler, DNA vs. olabilir. Bu yöntemin asıl amacı hedefe doğrudan yönelerek biyolojik veya biyokimyasal özelliklerin daha kolay saptanabilmesidir. İşaretlenmiş hücreler ışık kaynağından geçirildiğinde floresans moleküller bir üst enerji düzeylerine geçerler ve tekrar normal enerji düzeylerine dönerken florokromlar yüksek dalga boyuna sahip ışık saçarlar.

Tek floresan kullanılarak yapılan analizler olduğu gibi daha ileri çalışmalar için iki veya daha fazla floresan boya kullanılarak analizler de yapılmaktadır. Akım sitometride çoklu florokrom kullanımı (eksitasyon dalga boyu aynı, emisyon dalga boyu farklı), hücrede aynı anda birçok özelliğin ölçümüne izin verir. Kullanılan florokromlara ve bunların emisyon dalga boylarına göre dedektör tipi/floresan kanal belirlenir. Örneğin florokrom olarak floresan izotiyosiyanat (FITC) kullanılıyorsa yeşil kanal (FL1), PI veya fikoeritrin (PE) kullanılıyorsa turuncu-kırmızı kanal (FL2) göz önünde bulundurulur. Kırmızı kanalda ise kırmızı floresan veren florokromlar gözlenir (192-194).

Akım sitometri ile hücresel DNA içeriği analizi, DNA sarmal yapısına eklenen PI gibi floresan boyalar kullanılarak yapılabilir (194). Floresan sinyali ile hücre çekirdeğindeki DNA miktarı doğru orantılıdır. Bu yöntem ile bir tümörlü hücre topluluğunda anormal DNA içeriği/anöploid DNA analiz edilebilir. DNA içeriği analizi ve hücre döngüsü analizi, akım sitometrinin en yaygın kullanılan iki uygulamasıdır (195). Akım sitometri ile hücre döngüsünde her bir evrede bulunan hücre sayısı

belirlenebilir. Normal bir DNA histogramında en yüksek dağılım G0/G1 evresindeki hücreler en yüksek dağılıma sahiptir ve bu evredeki hücrelerin DNA'sı diploid (2n)'dir. G2/M evresinde ise DNA tetraploid (4n) olarak bulunur. Hücrelerin G2 ve M evrelerindeki DNA içerikleri eşdeğerdir, bu nedenle bu yöntem ile bu iki fazı birbirinden ayırt etmek mümkün değildir (195). Apoptotik bir hücre PI ile boyanıp akım sitometrisi ile analiz edildiğinde hipodiploid pik (subG1) gözlenir ve bu pik normal DNA içerikli pikin hemen yanında kolayca ayırt edilebilir (196).

Akım sitometrinin günümüzde kullanım alanı oldukça genişlemiştir. İmmünolojide; immün fenotipleme, antijene özgü cevap, hücre içi sitokin analizi, proliferasyon analizi, apoptoz analizi, moleküler biyolojide; hücre döngüsü analizi, floresan protein analizi, RNA analizi, sinyal transdüksiyon analizi, hücre ayrıştırma gibi analizler akım sitometri ile yapılabilmektedir. Bunlar dışında absolü hücre sayımı, kantitatif akım sitometri, çoklu boncuk dizi analizleri, fagositoz analizleri, küçük partikül analizleri ve ayrımları gibi çalışmalar da akım sitometrinin kullanım alanlarına girmektedir (197).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

β-merkaptoetanol	Amresco
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Erime Noktalı Agar (DMEM)	Sigma
Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA)	Boehringer Mannheim
Etidyum bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich
Etil Alkol	Sigma-Aldrich
Etilen Diamin Tetraasetik Asit, Disodyum Tuzu (Na_2EDTA)	Merck
Flurbiprofen	Sigma
Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum, FBS)	Sigma
Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS)	Sigma
HeLa (İnsan Serviks Adenokarsinom) Hücre Hattı, CCL-2	Americal Type Culture Collection
HepG2 (İnsan Hepatosellüler Karsinom) Hücre Hattı, HB-8065	Americal Type Culture Collection
Hidrojen Peroksit (H_2O_2) (%30)	Merck
Hidroklorik Asit (HCl) (%37)	Sigma
L-Glutamin	
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Sigma
N-Lauril Sarkosinat Sodyum Tuzu	Sigma
Normal Erime Noktalı Agar (NMPA)	Sigma
Penisilin-Streptomisin	PAA
Propidyum İyodür (PI)	Sigma-Aldrich
RNaz	Sigma-Aldrich
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen

RT² First Strand Kit	Qiagen
RT² SYBR Green qPCR Mastermix	Qiagen
RT² qPCR Primer Assay	Qiagen
Sisplatin	Koçak
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma
Tripan Mavisi	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
Tris	Sigma
Triton x-100	Sigma

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Akım Sitometri Cihazı	Beckman Coulter EPICS XLMCL
Akım Sitometri Yazılım Programı	Phoenix System
Biyogüvenlik Kabini	Holten
Buzdolabı	Hotpoint
Cam pastör pipeti	Interlab
Comet Bilgisayarlı Görüntüleme Sistemi	Comet Analysis Software, version 3.0 Kinetic Imaging
Derin Dondurucu (-20˚C)	Ariston
Derin Dondurucu (-80˚C)	Revco
Distile Su Cihazı	MES ultrapure
Elektroforez	Biometra Analitik
Elektroforez Güç Kaynağı	Power Pack P 25
Etüv	Dedeoğlu
Floresan Mikroskop	Leica
Hücre Kültürü Uyumlu Flask (25/75 cm2)	Corning
Pipet (1- 25 ml)	Corning

Santrifüj Tüpü (15, 50 ml)	Corning
Hücre Kültür Plağı (6/12/96-kuyucuklu)	Corning
Isıtıcı	Multi-Blok, Lab-Line
Inverted Mikroskop	Leica
İnkübatör (CO_2'li)	Heraeus Instruments
Karıştırıcı-Isıtıcı	Jankel&Kunkel, Ikamag
Kırık Buz Makinası	Scotsman AF100
Lam (26x76mm)	Marienfeld
Lamel (24x60mm)	Marienfeld
Laminar Flow	Heraeus
Manyetik Karıştırıcı	Heraeus
Membran Filtre (0,2 µm por çaplı)	Brand
Mikrodalga Fırın	Vestel
Mikrofiltre	Millipore® Merck
Mikropipet (8 kanallı)	Eppendorf, Capp
Mikropipetler (0,5-1µL, 1-5 µL, 5-10 µL, 10-200 µL, 200-1000 µL, 1-5mL)	Finnpipette, Discovery Confort
Mikrosantrifüj	Hettich Micro 12-24
Mikrosantrifüj tüpü (1,5mL)	Eppendorf
Nanodrop Cihazı	Maestrogen Spectrophotometer
Neubauer Camı (Hücre sayım camı)	Marienfeld
Otoklav	Rodwell Monarch MP 24
PCR Tüpleri (0,2 mL)	Qiagen
PCR Veri Analiz Programı	QIAGEN Analytics Software
pH metre	Cyberscan
Pipet ucu, 0,5-10, 10-200, 100-1000 µL'lik	Eppendorf, HTL
Real Time PCR Cihazı	Corbett
Santrifüj	Heraeus, Hettich

Spektrofotometre	SpektraMax M2
Steril enjektör (2 mL)	Beybi
Strip Tüpler (0,1 mL)	Qiagen
Su Banyosu	Termal® Laboratory Tools
Terazi	Schimadzu Libror
Ultrasonik Banyo	Transsonic 460/H
Vakum Pompası	Welch Vacuum
Vorteks	Heidolph Reax 2000
Yatay çalkalayıcı	Edmund Bühler

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Çalışılan Etkin Madde Çözeltileri

10 mM Flurbiprofen Çözeltisi:

Flurbiprofen belirli miktarda tartılarak etanolde çözülüp besiyeri ile son hacme tamamlandı. %3,3 etanol içeren, konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde flurbiprofen ana stok çözeltisi hazırlandı ve membran filtreden geçirildi (çalışılan en yüksek dozun son etanol konsantrasyonu %1 olacak şekilde ayarlandı). Ana stok çözeltisi analiz günü taze olarak hazırlandı ve bu stok çözeltiden 3000-1500 µM arası derişimler plağa uygulandı.

1 mM Flurbiprofen Çözeltisi

10 mM ana stok kullanılarak hazırlandı. Ana stoktan 300 µL alınıp kültür vasatı ile 3 mL'ye tamamlandı. Analiz günü taze olarak hazırlandı ve bu ara stok çözeltiden 1000-100 µM arası derişimler plağa uygulandı.

0,1 mM Flurbiprofen Çözeltisi

1 mM ara stok çözelti kullanılarak hazırlandı. 1 mM'lık çözeltiden 200 µL alınıp kültür vasatı ile 2 mL'ye tamamlandı. Analiz günü taze olarak hazırlandı ve bu ara stok çözeltiden 100-5 µM arası derişimler plağa uygulandı.

3.3.2. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

HeLa ve HepG2 Besi Ortamları

500 mL DMEM içerisine 50 mL FBS (%10) ve 5 mL penisilin/streptomisin (% 1) eklendi. L-Glutamin içermeyen besiyeri kullanıldığında ise aynı işlemlere ek olarak 5 mL L-Glutamin (%1) besiyerine eklendi. +4°C'de saklandı.

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Çözeltisi

MTT gerektiği kadar tartılarak PBS içerisinde derişimi 5 mg/mL olacak şekilde çözüldü. Hazırlanan çözelti membran filtreden geçirilerek elde edilen süzüntü steril bir tüpe aktarıldı. Çözelti ışıktan korunarak kullanıldı. Analiz günü taze olarak hazırlandı.

Sisplatin Çözeltisi

10 mg/20 mL konsantrasyonundaki enjeksiyonluk sisplatin preparatından 600 µL alındı, son hacim kültür vasatı ile 1 mL'ye tamamlandı. Elde edilen 1 mM'lık çözeltiden son konsantrasyon 25, 50 ve 100 µM olacak şekilde yöntem kontrolü olarak plağa uygulandı.

3.3.3. Tek Hücre Jel Elektroforez (*COMET*) Yöntemi ile Genotoksisite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

200 mM Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (Na_2EDTA) Çözeltisi

14,89 g Na_2EDTA 200 mL distile suda çözüldü, pH 10'a ayarlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Düşük Erime Noktalı Agar (LMPA) Çözeltisi

312,5 mg LMPA sıcak su banyosu kullanılarak 25 mL PBS içerisinde çözüldü ve kaynamamasına dikkat edildi. Küçük hacimler halinde +4°C'de saklandı.

Etanol Çözeltisi (%50)

%99,8'lik mutlak etanol çözeltisinden 150,3 mL alındı, son hacim distile suyla 300 mL'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

Etanol Çözeltisi (%75)

%99,8'lik mutlak etanol çözeltisinden 225,5 mL alındı, son hacim distile suyla 300 mL'ye tamamlandı.

Etidiyum Bromür (EtBr) Çözeltisi

10 mg EtBr 50 mL distile suda çözülerek 200 µg/mL'lik stok EtBr çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden boyama sırasında 1 mL alınıp, distile suyla 10 mL'ye tamamlanarak 20 µg/mL'lik EtBr çözeltisi hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS)

1 PBS tableti 200 mL distile suda çözüldü. 4˚C'de saklandı.

10 N NaOH

200 g NaOH 500 mL distile suda çözüldü. Oda sıcaklığında saklandı.

Normal Erime Noktalı Agar (NMPA) Çözeltisi

500 mg NMPA sıcak su banyosu kullanılarak 50 mL PBS içerisinde tamamen berrak oluncaya kadar karıştırılarak beherde çözüldü ve kaynamamasına dikkat edildi.

Stok Lizis Çözeltisi

146,1 g NaCl, 37,2 g Na_2EDTA, 1,2 g Tris 500 mL distile suda çözüldü. 10 g NaOH eklenip çözelti pH'sı 10'a ayarlandı. 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklendi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 890 mL'ye tamamlanıp maddeler

çözününceye kadar karıştırılarak stok lizis çözeltisi hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Nötralizasyon Tampon Çözeltisi

48,5 mg Tris 750 mL distile suda çözülüp çözelti pH'sı 7,5'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi distile su ile 750 mL'ye tamamlandı. 4°C'de saklandı.

Elektroforez Tampon Çözeltisi

1705 mL soğuk distile su, 52,8 mL 10 N NaOH ve 8,8 mL 200 mM EDTA çözeltisi karıştırıldı. Deney günü taze olarak hazırlandı.

Lizis Çözeltisi

178 mL stok lizis çözeltisi, 2 mL Triton X-100 ve 20 mL DMSO karıştırıldı. Çözelti deney günü taze olarak hazırlandı, kullanılacağı zamana kadar 4°C'de bekletildi ve deney sırasında soğuk çözelti şeklinde kullanıldı.

0,1 M H_2O_2 Çözeltisi

% 35'lik H_2O_2 çözeltisinden 9,7 µL alındı, 4°C'de 990,3 µL distile su ile 1 mL'ye tamamlandı.

1 mM H_2O_2 Çözeltisi

Deney günü 0,1 M H_2O_2 çözeltisinden 20 µL alınıp 4°C'de 1980 µL PBS ilave edilerek 1 mM H_2O_2 çözeltisi hazırlandı.

50 µM H_2O_2 Çözeltisi

50 µL H_2O_2 (1 mM) çözeltisi üzerine 950 µL 4°C'deki PBS çözeltisi ilave edildi.

3.3.4. Gen Ekspresyonu Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

RNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Etanol Çözeltisi (% 70)

%99,8'lik mutlak etanol çözeltisinden 4375 µL alındı, 6 mL'ye DNaz/RNaz içermeyen suyla tamamlandı. Deney günü taze olarak hazırlandı.

RPE Tampon Çözeltisi

Kit içerisinde hazır bulunan RPE ve %70'lik etanol kullanılarak hazırlandı. 3 mL RPE üzerine 12 mL etanol çözeltisi eklendi. Deney günü taze olarak hazırlandı.

RLT+β-merkaptoetanol Tampon Çözeltisi

Kit içerisinde hazır bulunan RLT çözeltisi ve β-merkaptoetanol kullanılarak hazırlandı. 6 mL RLT çözeltisine 60 µL β-merkaptoetanol eklendi. Deney günü taze olarak hazırlandı.

RW1 Yıkama Çözeltisi

Kit içerisinde hazır halde bulunmaktadır.

cDNA Çevrilmesi İşleminde Kullanılan Çözeltiler

GE2 Tampon Çözeltisi

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

BC4 RT (Ters Transkripsiyon Karışım) Çözeltisi

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Gen Ekspresyonunda Kullanılan Çözeltiler

SYBR Green Master Mix Çözeltisi

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

β-aktin, p53, Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, BcL-2, Survivin (Birc5) Primerleri

Kit içerisinde hazır olarak bulunmaktadır.

Gen Ekspresyon Karışım Çözeltisi

RNA'dan cDNA'ya çevrilen her bir örnek için 12,5 µL SYBR Green Master Mix, 1 µL çalışılacak primer, 1 µL örnek cDNA, 10,5 µL DNaz/RNaz içermeyen su eklenerek 25 µL karışım taze olarak hazırlandı.

3.3.5. Akım Sitometri Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Propidyum İyodür Çözeltisi (0,1 mg/mL)

10 mg PI'nın 100 mL distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Çözelti 0,22 µm por açıklığına sahip filtreden süzüldü ve +4°C'de karanlık ortamda saklandı.

RNaz Çözeltisi

0,1 mg RNaz, 100 mL 2 mM $MgCl_2$ içeren PBS içinde çözüldü ve 1 mL'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

Fosfat Tamponu

1 adet PBS tabletinin 200 mL distile suda çözülmesiyle hazırlandı.

Alkol Çözeltisi

%99'luk saf alkol çözeltisi doğrudan kullanıldı.

3.4. Yöntemler

3.4.1. HeLa ve HepG2 Hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

1. %10 DMSO içeren besiyerinde ve -80°C'de saklanan HepG2 ve HeLa hücreleri 37°C'lik su banyosunda 1 dakika bekletilerek oda sıcaklığına getirildi. Hücre kültürü süresince yapılan tüm işlemlerin hücre kültür kabini içerisinde ve steril koşullarda olmasına dikkat edildi.

2. Çözdürülen 1 mL hacmindeki hücreler steril bir tüp içerisinde besiyeri ile karıştırıldıktan sonra 1200 devir/dk hızda 5 dakika santrifüjleme yapılarak üst faz atıldı, böylece hücre dondurma karışımında yer alan DMSO uzaklaştırılmış oldu.
3. Tüpte kalan hücre pelletleri, uygun hacimdeki besiyeri ile karıştırılarak kültür flasklarına aktarıldı, kültür ortamındaki hücrelerin inkübatör içerisinde uygun aralıklarla hücre besiyeri değiştirilerek yeterli doygunluğa ulaşmaları sağlandı.
4. Yeterli doygunluğa ulaşan hücreler, zemine tutunarak tüm kültür ortamını kapladıklarında 2-3 kez 5 mL 37°C'lik PBS ile yıkandı.
5. Kültür kaplarındaki hücrelerin üzerine 3 mL Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 3-5 dakika süreyle inkübatörde bekletildi, hücrelerin tutundukları kültür kabının zemininden uzaklaşmaları sağlandıktan sonra ortama 5-6 mL besiyeri ilave edilip hücre süspansiyonu steril bir tüpe aktarıldı.
6. Hücre süspansiyonu 25°C'de 1200 devir/dakika hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırıldı ve tüpün dibinde toplanan hücre pelleti 1 veya 2 mL (hücre miktarına göre) besiyeri ile süspande edildi.
7. Elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak steril bir ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 90 µL tripan mavisi çözeltisi (%0,4) eklenerek süspande edildi.
8. Hücre süspansiyonu (10 µL) Neubauer hücre sayım lamı (hemasitometre) üzerinde ışık mikroskobu altında incelendi. Neubauer sayım lamını oluşturan dört karenin kenar çizgileri hariç üzerlerindeki parlak ve renksiz olarak görülen canlı hücreler soldan sağa ve yukarıdan aşağıya gidilerek sayıldı. Canlı hücrelerin derişimini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$mL'deki\ canlı\ hücre\ sayısı = Toplam\ hücre\ sayısı\ /\ 4 \times 10^4 \times 10$$

9. Canlı hücre derişimi hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu, yeterli miktarda besiyeri ile seyreltildi ve her bir kuyucukta 10000 hücre olacak

şekilde 200 µL hacim içerisinde 96 kuyucuklu 3 ayrı plağa (3 farklı maruziyet süresi için) hücre ekimi yapıldı.

10. Hücrelerin yaklaşık 24 saat inkübasyon süresince kuyucuklar içinde tutunarak ortama alışmaları ve çoğalmaları sağlandı.
11. Steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler flurbiprofenin 5-3000 µM aralığındaki derişimleri ile dozlandı ve 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi.
12. Negatif kontrol olarak, hücreler saf besiyeri ve %1 etanol içeren besiyeri ile pozitif kontrol olarak da 25, 50 ve 100 µM sisplatin içeren besiyeri ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi.
13. İnkübasyon süresi sonunda madde çözeltileri atılarak her bir kuyucuğa 90 µL besiyeri ve hazırlanan 5 mg/mL MTT çözeltisinden 10 µL eklendi ve 3-4 saat inkübe edildi.
14. İnkübasyon süresinin sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırıldı. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek üzere her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklendi ve plak yatay çalkalayıcıda 15 dakika süreyle çalkalandı.
15. Spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda örneklerin absorbans değerleri ölçüldü.
16. Boya ışıktan etkilendiği için, deneyin her aşaması mümkün olduğunca karanlıkta çalışıldı.
17. Flurbiprofenin her bir konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı ve hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon (IC_{50}) değerleri hesaplandı.
18. 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetler ile ve plakta dörtlü olarak çalışıldı. Tüm çalışmalar üç kez tekrarlandı, sonuçlar bu çalışmaların ortalaması olarak hesaplandı.

3.4.2. HeLa ve HepG2 Tek Hücre Jel Elektroforez (*COMET*) Yöntemi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi

1. HeLa ve HepG2 hücreleri genotoksisite çalışması için sitotoksisite çalışmasında olduğu gibi büyütülüp çoğaltıldı.
2. Hücre süspansiyonları aynı şekilde hemasitometre üzerinde ışık mikroskobu altında sayıldı.
3. Canlı hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra hücre süspansiyonu, yeterli miktarda besiyeri ile seyreltildi ve her bir kuyucukta 30000 hücre olacak şekilde 1 mL hacim içerisinde 12 kuyucuklu plaklara hücre ekimi yapıldı.
4. Hücrelerin yaklaşık 24 saat inkübasyon süresince kuyucuklar içinde tutunarak ortama alışmaları ve çoğalmaları sağlandı.
5. Steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 5-500 µM konsantrasyon aralığında (sitotoksisite sonuçları ve ilacın farmakokinetik özellikleri göz önüne alınarak seçilen dozlar) flurbiprofen içeren besiyeri ile, negatif kontrol için saf besiyeri ve %1 etanol içeren besiyeri ile, pozitif kontrol için sonradan H_2O_2 ile muamele edilmek suretiyle saf besiyeri ile 48 saat inkübe edildi ve ikili olarak çalışıldı.
6. Maruziyet süresi sonrasında plaktaki besiyeri atıldı (pozitif kontrol kuyucukları hariç), 500 µL PBS ile yıkama işleminden geçirilip 400 µL tripsin eklenerek 3-5 dakika süreyle inkübatörde bekletildi, hücrelerin tutundukları plak zemininden uzaklaşmaları sağlandıktan sonra her bir kuyucuğa 600 µL besiyeri ilave edilip hücre süspansiyonu plak tabanı yıkanarak steril ependorflara aktarıldı.
7. Pozitif kontrol dozlaması için; hücreler besiyerleri atılarak son konsantrasyon 50 µM olacak şekilde H_2O_2 ile muamele edildi. Bunun için kuyucuklara 950 µL PBS ve 50 µL H_2O_2 (1mM) ilave edildi ve -20°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonu biten pozitif kontrol grupları da diğer gruplar gibi aynı işlemlerden geçirilerek steril ependorflara aktarıldı.

8. Ependorflar 1200 devir/dk hızda 5 dk santrifüj edildi ve dipte yaklaşık 50 µL besiyeri bırakacak şekilde üst fazlar dikkatlice aspire edildi.
9. 37±0,5°C'de eritilmiş yaklaşık 100 µL LMPA (%1,25'lik), 50 µL hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra, önceden NMPA (%1,25'lik) çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerlerine lamel kapatıldı.
10. Lamlar buzlu yüzey üzerinde 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Agarın katılaşmasının ardından lam üzerindeki lamel zedelenmeden alındı.
11. Lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisine daldırılıp en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi. H_2O_2 uygulanan gruplar ve normal doz grupları ayrı ayrı şalelerde en az 1 saat süreyle lizise bırakıldı.
12. Lizis işleminin ardından lamelleri alınmış lamlar aralık kalmayacak, agar yayılan kısımları üste gelecek ve hepsi aynı yöne bakacak şekilde elektroforez tankının içinden çıkarılan tepsiye yerleştirildi.
13. Elektroforez işlemi için tank soğuk elektroforez çözeltisi ile dolduruldu.
14. Lizis işleminin ardından lamelleri alınmış lamlar aralık kalmayacak ve agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi.
15. Elektroforez tankının içerisinde lamlar akım uygulamadan 20 dakika bekletildi.
16. Ardından 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dakika elektroforez uygulandı.
17. Elektroforez işlemi bittikten sonra lamlar tanktan çıkarılıp 5 dakika distile suda, daha sonra 15 dakika nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletildi.
18. 15 dakika sonunda lamlar sırasıyla 5'er dakika %50'lik, %75'lik ve %99'luk etanol çözeltisinde bekletildi ve okuma öncesinde kurumaları için en az 1 gün bekletildi.
19. Okuma sırasında lamların üzerine 60 µL EtBr çözeltisi (20 µg/mL) ilave edildi ve lamel ile kapatıldı.

20. Her lamda 100 hücre, floresan mikroskobunda bilgisayar programı yardımıyla değerlendirilerek DNA hasar derecesi kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak değerlendirildi.
21. Tüm bu işlemler ek bir DNA hasarını önlemek üzere karanlıkta yapıldı.
22. 48 saatlik maruziyet belirlendi. Her bir tekrar ikili olarak çalışıldı ve deney üç kez tekrarlandı.

3.4.3. HeLa ve HepG2 Hücrelerinde Hücre Döngüsünü Kontrol Eden Protein Olan p53 proteini, Apoptotik Proteinler (Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-9) ve Antiapoptotik Proteinler (BcL-2, survivin)'in Gerçek Zamanlı PCR Yöntemiyle Belirlenmesi

1. 6'lı plaklarda kuyucuk başına 1 milyon hücre olacak şekilde ekilip flurbiprofen ile 5-500 µM derişimlerinde dozlanan hücreler 48 saatlik maruziyetin sonunda inkübatörden çıkarıldı.
2. Besiyerleri RNaz içermeyen pipet ucu kullanılarak aspire edildi.
3. 1 mL PBS ile 2 kere yıkandı.
4. 0,5 mL tripsin ilave edilerek hücreler tutundukları yüzeyden kaldırıldı.
5. Tripsin aktivitesini durdurmak için 1 mL besiyeri ilave edildi.
6. Örnek sayısı kadar 2 mL'lik steril ependorflar numaralandırılarak hazır hale getirildi.
7. Hücreler 3'er kere süspande edilerek ependorflara aktarıldı ve 1500 devir/dakika hızda 5 dk santrifüj edildi. Üst fazlar dikkatlice aspire edildi.
8. Besiyerini daha iyi uzaklaştırmak için 1 mL PBS ile 2 kere yıkama işlemi yapıldı (PBS ilave edildikten sonra sert bir yüzeye vurularak veya tırnakla hafifçe vurularak hücreler dağıtıldı).
9. mRNA izolasyonu aşamasına geçildi.
10. mRNA izolasyonu için RNeasy Plus Mini Kit© kullanıldı.
11. Deneyden önce gerekli çözeltiler hazırlandı:
    - %70'lik etanol (RNaz içermeyen su içinde hazırlanan)
    - RPE Çalışma Çözeltisi

- RLT-β-merkaptoetanol Tampon Çözeltisi

12. Çöken hücrelerin üzerine 350'şer µL RLT-β-merkaptoetanol çözeltisi köpürmemesi için dikkatlice eklendi. Pipet ile dikkatlice pipetaj yapıldı. 30 saniye vortekslendi ve *gDNA eliminator spin kolonundan* geçirilmeye hazır hale getirildi.
13. Vorteksten alınan lizatın tamamı (350 µL) 3 kere süspande edilerek *gDNA eliminator spin kolonuna* (2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş) dikkatlice köpürtmeden ilave edildi. Her seferinde pipet ucu değiştirildi.
14. *gDNA eliminator spin kolonlu* ependorflar 30 saniye 11 bin devir/dk hızda santrifüj edildi ve kolonlar atıldı.
15. Kolon membranlarında sıvı veya köpük kalıp kalmadığı kontrol edildi, varsa santrifüj tekrarlandı.
16. Toplama tüpünün içerisindeki elüat üzerine 1:1 (350 µL) %70'lik etanol eklendi (son hacim 700 µL oldu). Köpük oluşmamasına dikkat edilerek pipetaj yapıldı.
17. *RNeasy spin kolonlar* (2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş) standa yerleştirildi.
18. Hücreler dikkatlice pipetajdan sonra *RNeasy spin kolonlarına* yavaşça tüp cidarlarından aktarıldı. Kolonların kapakları kapatıldı.
19. Kolonun başında köpük kalmayacak ve kolonun sonunda da damla kalmayacak şekilde 20 saniye, 11 bin devir/dk hızda santrifüj edildi.
20. Köpük veya damla kalan kolonlar tekrar 30 saniye santrifüj edildi.
21. Bu aşamalar ile birlikte RNA kolonlara tutulmuş oldu, altta kalan sıvı içeren toplama tüpleri atıldı.
22. Kolonlar, numaralandırılmış steril toplama ependorflarına (2 mL'lik) aktarıldı.
23. Kolonlara 700 µL RW1 yıkama çözeltisi ilave edildi. Kapaklar kapatıldı, 20 saniye 11 bin devir/dk hızda santrifüj edildi, dipte kalan yıkama suları atıldı.
24. Kolonlar temiz toplama tüplerine yerleştirildi.

25. Önceden hazırlanmış olan RPE Tampon çözeltisinden 500 µL *RNeasy spin kolonlarına* eklendi ve 20 saniye 11 bin devir/dk hızda santrifüj edildi, sıvı kısımlar atıldı.
26. 500 µL RPE tampon ile bir kere daha yıkanarak 3 dk 10 bin devir/dk hızda santrifüj edildi ve etanolün kolondan uzaklaşması için kolonlar 2 kere yıkandı.
27. Sıvı kalıntılarını uzaklaştırmak için steril yeni toplama ependorflarına kolonlar yerleştirildi ve 1 dk 10 bin devir/dk hızda santrifüj edildi.
28. *RNeasy spin kolonlar* yeni birer 1,5 mL'lik toplama tüplerine yerleştirildi.
29. Kolonlardan 30 µL RNaz içermeyen su geçirildi ve her seferinde pipet ucu değiştirildi.
30. Kolon kapakları kapatılarak 1 dk 11 bin devir/dk hızda satrifüj edildi, RNA elüe edildi, bu işlem 2 kere tekrar edildi.
31. Altta kalan sıvılar ile RNA izolasyonu tamamlanmış oldu, santrifüj sonrası pipetaj ile homojen hale getirildi.
32. Nanodrop cihazı ile RNA kalite ölçümleri yapıldı.
33. RNA kaliteleri ve miktarları uygun değerler arasında elde edildi. Buna göre;
    - A260/A280 = 1,9-2,1
    - RNA miktarı = 25 ng-5 µg
34. Sonuçlar ng/µL cinsindendi.
35. cDNA eldesi için RT2 First Strand Kit© kullanıldı.
36. Deney düzeneğinde çalışılacak örneklerden elde edilen RNA'ların miktarları en düşük sonuca göre eşitlendi.
37. cDNA sentezi için 500 ng RNA ile çalışıldı (8 µL toplam hacimde).
38. En düşük RNA miktarı bulunan örneğe göre hesaplamalar yapıldı.
39. 0,2 mL'lik steril tüpler etiketlendi, hesaplanan RNA ve su miktarları önce sular sonra RNA'lar olacak şekilde tüplere eklendi.
40. Birkaç defa pipetaj yapıldı.
41. Her bir tüpe 2'şer µL GE2 tampon eklendi, çok kısa süre vortekslendi.
42. 42°C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı.

43. Daha sonra tüpler aniden soğutulması için -20°C'de 1 dk bekletildi.
44. Tüplere 10'ar µL BC4 RT MIX (RT enzimi) eklendi ve yaklaşık 5 kere pipetaj yapıldı.
45. 42°C'de 5 dk, 95°C'de 5 dk termal döngü cihazında inkübasyona bırakıldı.
46. İnkübasyondan sonra 91'er µL RNaz içermeyen su eklenip pipetaj yapıldı ve bu şekilde cDNA'lar elde edildi.
47. RT PCR için "RT2 qPCR Primer Assay" ve "RT2 SYBR Green Mastermixes" kitleri kullanıldı.
48. 0,2 mL'lik tüplere her bir örnek ve primerler için mastermix karışımları ayrı ayrı hazırlandı.
49. HeLa ve HepG2 hücreleri ayrı ayrı çalışıldı.
50. 6 örnek + 1 (NTC) = 7 örnek olarak çalışıldı.
51. 7 gen (primer) +1 (negatif kontrol-su) = 8 gen (8 primer) olarak çalışıldı.
52. Gen sayısı kadar (8) mastermix hazırlandı. Toplam örnek sayısı 7 olduğu için "x7" şeklinde her bir mastermix miktarı Tablo 3.1.'e göre hesaplandı.

Tablo 3.1. Bir reaksiyon için PCR karışım bileşenleri

Bileşen	**Hacim**
RT^2 SYBR Green Mastermix	12,5 µL
cDNA sentez reaksiyonu	1 µL
RT^2 qPCR Primer Assay	1 µL
RNaz içermeyen su	10,5 µL
Toplam hacim	**25 µL**

53. Mastermix'ler 0,2 mL'lik tüplere hazırlandı.
54. Mastermix'ler hazırlandıktan sonra stripler bloğa dizildi (7x8=56 strip).
55. Önce hazırlanan mastermix'ler (24'er µL) daha sonra da her bir cDNA (1'er µL) striplere eklendi.
56. Striplerin kapakları kapatıldı ve 72'lik mavi rotora 1'den başlayarak dizildi ve rotordaki boş kısımlar boş striplerle doldurudu. Üzerine kelepçesi takıldı ve RT-PCR cihazına yerleştirildi.

57. RT-PCR cihazı 95°C'de 10 dakika, 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 30 saniye koşullarında ayarlandı ve 40 döngü olacak şekilde çalıştırıldı.
58. Tüm bu işlemler diğer hücre için aynı şekilde yapıldı.
59. PCR deneyleri 2 kere tekrarlandı.

3.4.4. HeLa ve HepG2 Hücrelerinde Olası Geç Apoptotik Etkilerin ve Hücre Siklusunun Akım Sitometri Yöntemiyle Tayini

1. 6'lı plak kullanıldı. Kuyucuk başına 2 milyon hücre sayılarak ekildi, sitotoksisite deneylerinde kullanılan dozlar ile çalışıldı.
2. Hücreler plağa tutunduktan sonra dozlamaları yapıldı ve 48 saat inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon süresi sonunda hücreler yıkama işlemleri ile akım sitometriye hazırlandı:
    - Hücreler 1 mL PBS ile dikkatlice yıkandı.
    - 0,5'er mL tripsin eklenerek kaldırıldı.
    - 1'er mL besiyeri eklenip etiketlenmiş falkon tüplerine aktarıldı.
    - 1200 devir/dk hızda 5 dk santrifüj edildi.
    - Üst faz dikkatlice aspire edildikten sonra hücre pelletleri 1'er mL PBS ile homojen olacak şekilde süspande edildi, +4°C'de tutuldu.
4. 2 mL %99'luk saf alkol ile fiske edildi.
5. En az bir gecelik inkübasyon sonrası hücreler iki kez PBS ile yıkandı, daha sonra hücrelerin üzerine 70µL RNaz ve 100 µL PI ilave edildi.
6. Hücreler 30 dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
7. Yarım saat karanlıkta inkübe edildikten sonra akım sitometri cihazında (Beckman Coulter EPICS XLMCL, USA) boyanan hücrelerin geç apoptoz ve hücre döngüsü analizi yapıldı. Geç apoptoz için DNA fragmantasyonunu gösteren subG1 piki değerlendirildi.
8. Hücre döngüsü analizi ise G0/G1, Sentez ve G2/M oranları iki değişkenli histogramlardan Multicycle yazılım programı (Phoenix system, USA) kullanılarak hesaplandı.

3.5. İstatistiksel Yöntem

"SPSS 18 for Windows" programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmorog-Smirnov testiyle değerlendirildi. Grup farklılıkları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve LSD testi ile belirlendi. Sitotoksisite ve genotoksisite değerlendirmelerinde sonuçlar ortalama (ORT)±standart hata (SEM) olarak verildi. Gen ekspresyon analizinde ise örneklerin Ct değerleri negatif kontrol grubu ile QIAGEN Analytics Software Online Yazılım Programında değerlendirildi. Ortalama Ct, ΔCt, $2^{-\Delta Ct}$, kat değişimi *(fold change)* ve kat regülasyonu *(fold regulation)* değerleri hesaplanarak karşılaştırıldı. $p<0,05$ ve $p\leq0,001$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

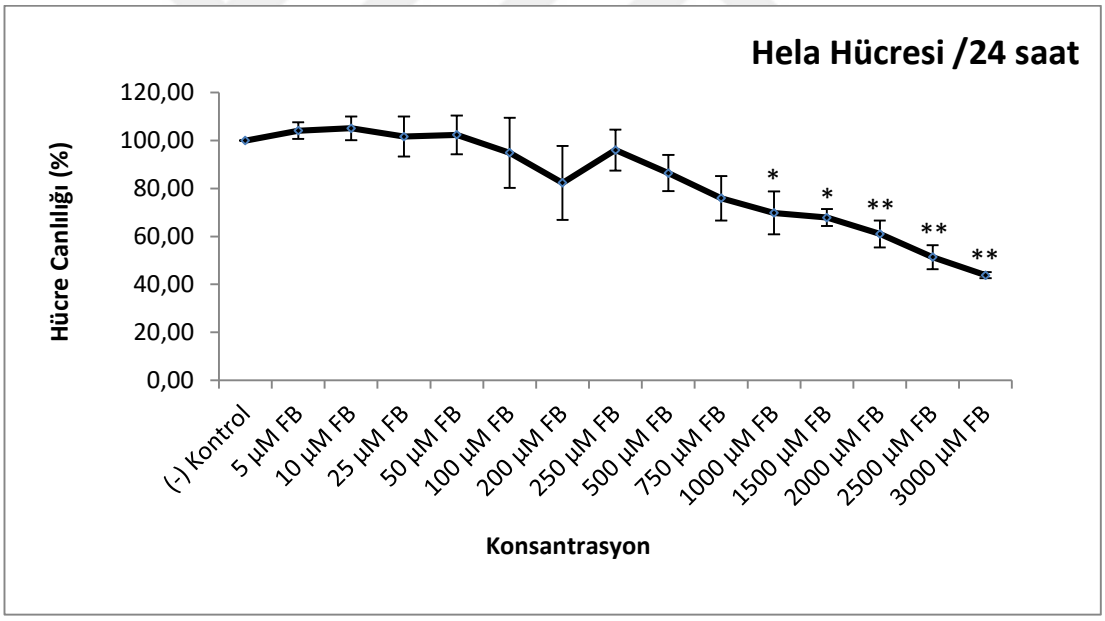
4. BULGULAR

4.1. Flurbiprofen Sitotoksisitesinin MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

4.1.1. Flurbiprofenin HeLa Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

HeLa hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde, 5-3000 µM doz aralığında sitotoksisite ölçümü yapılmıştır.

24 saatlik inkübasyon sonucunda negatif kontrol (%1 etanol) ile karşılaştırıldığında; 500 µM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. IC_{50} değeri ise 2594 µM olarak bulunmuştur. 24 saatlik inkübasyon sonrası HeLa hücrelerinde MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

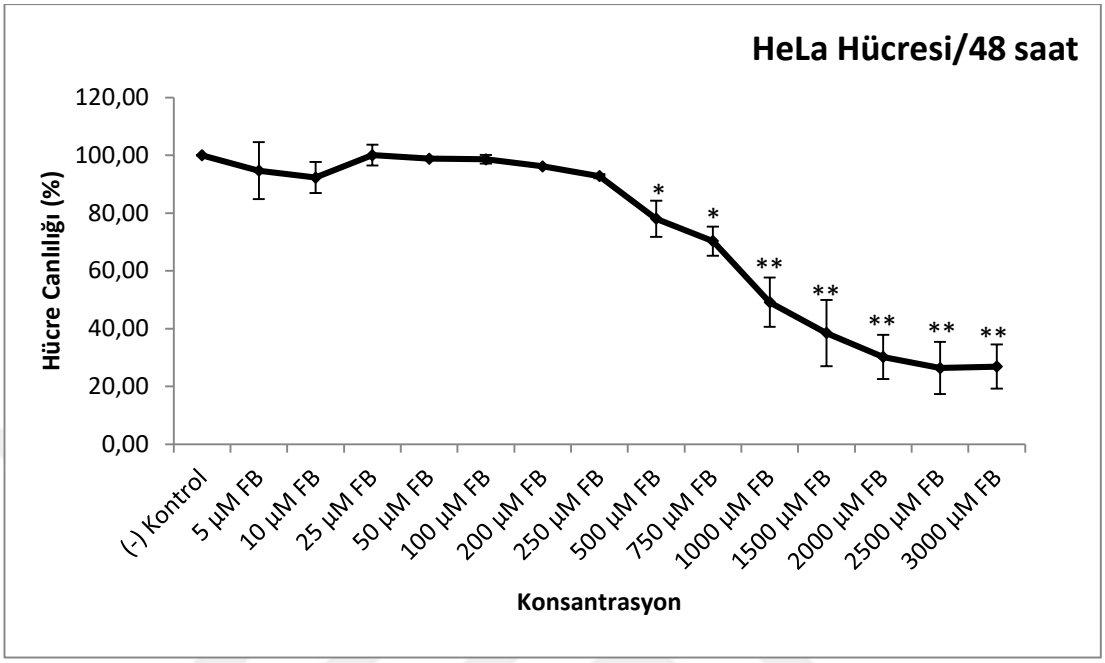


Şekil 4.1. Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde 24 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.

Sonuçlar 3 çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir. Anlamlılık *p<0,05 ve **p≤0,001 şeklinde hesaplanmıştır.

48 saatlik inkübasyon sonucunda negatif kontrol (%1 etanol) ile karşılaştırıldığında; 250 µM üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. IC_{50} değeri ise 990 µM olarak bulunmuştur. 48 saatlik inkübasyon

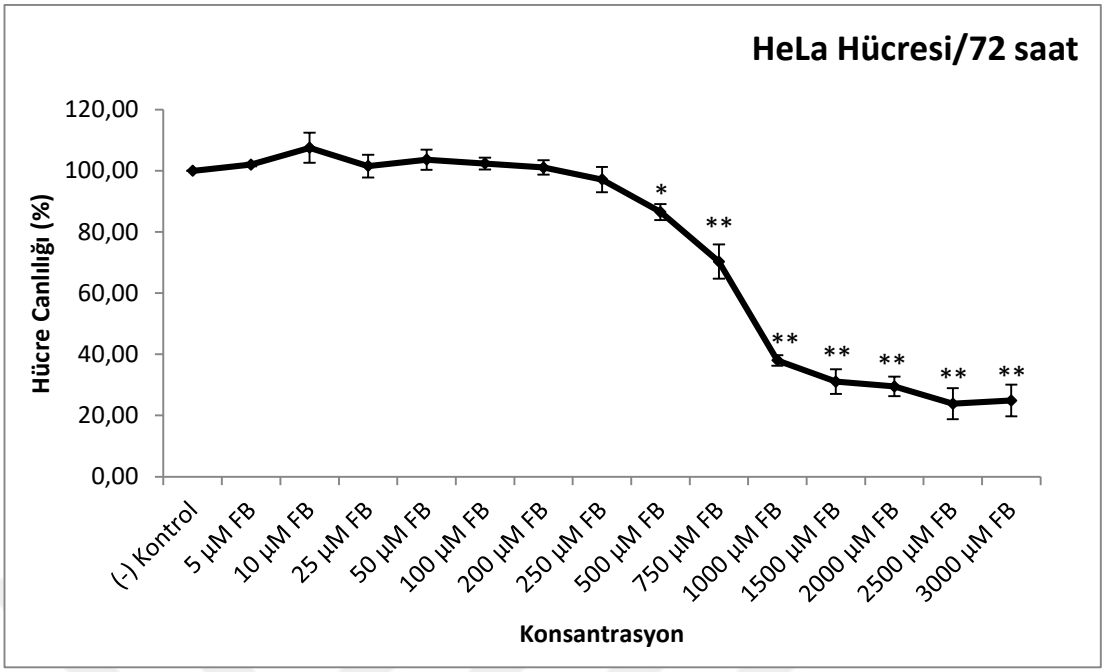
sonrası HeLa hücrelerinde MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde 48 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.

Sonuçlar 3 çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir. Anlamlılık *p<0,05 ve **p≤0,001 şeklinde hesaplanmıştır.

72 saatlik inkübasyon sonucunda negatif kontrol (%1 etanol) ile karşılaştırıldığında; 250 µM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. IC_{50} değeri ise 907 µM olarak bulunmuştur. 72 saatlik inkübasyon sonrası HeLa hücrelerinde MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



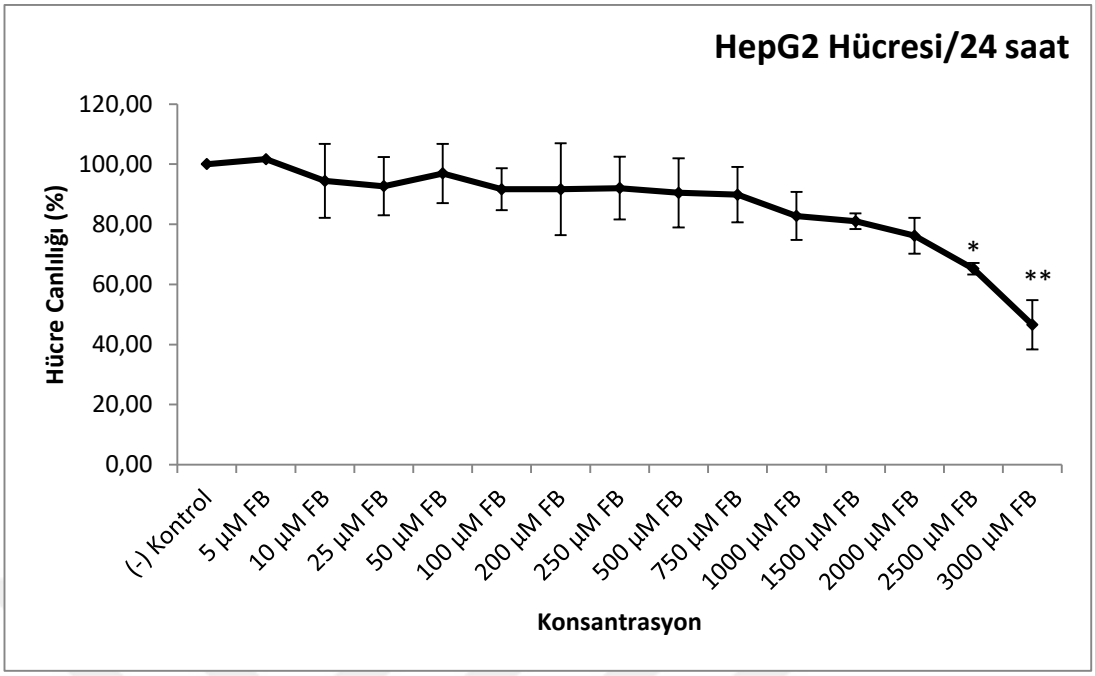
Şekil 4.3. Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde 72 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.

Sonuçlar 3 çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir. Anlamlılık *p<0,05 ve **p≤0,001 şeklinde hesaplanmıştır.

4.1.2. Flurbiprofenin HepG2 Hücrelerinde MTT Yöntemi ile Sitotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

HepG2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde, 5-3000 µM doz aralığında sitotoksisite ölçümü yapılmıştır.

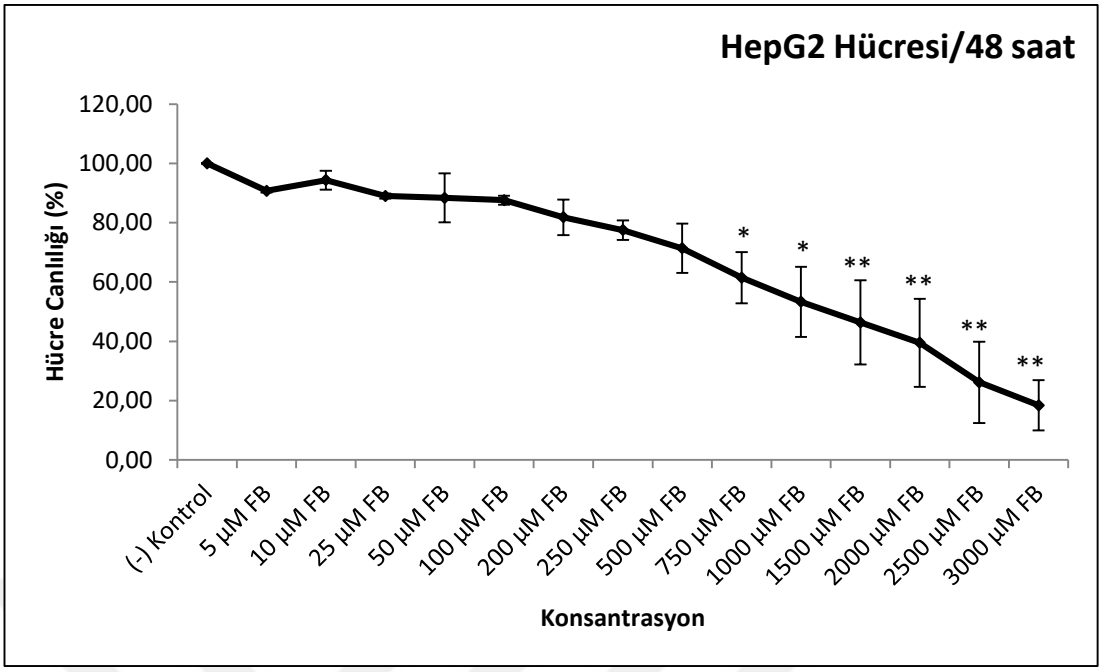
24 saatlik inkübasyon sonucunda negatif kontrol (% 1 etanol) ile karşılaştırıldığında; 1000 µM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. IC_{50} değeri ise 2904 µM olarak bulunmuştur. 24 saatlik inkübasyon sonrası HepG2 hücrelerinde MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde 24 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.

Sonuçlar 3 çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir. Anlamlılık *p<0,05 ve **p≤0,001 şeklinde hesaplanmıştır.

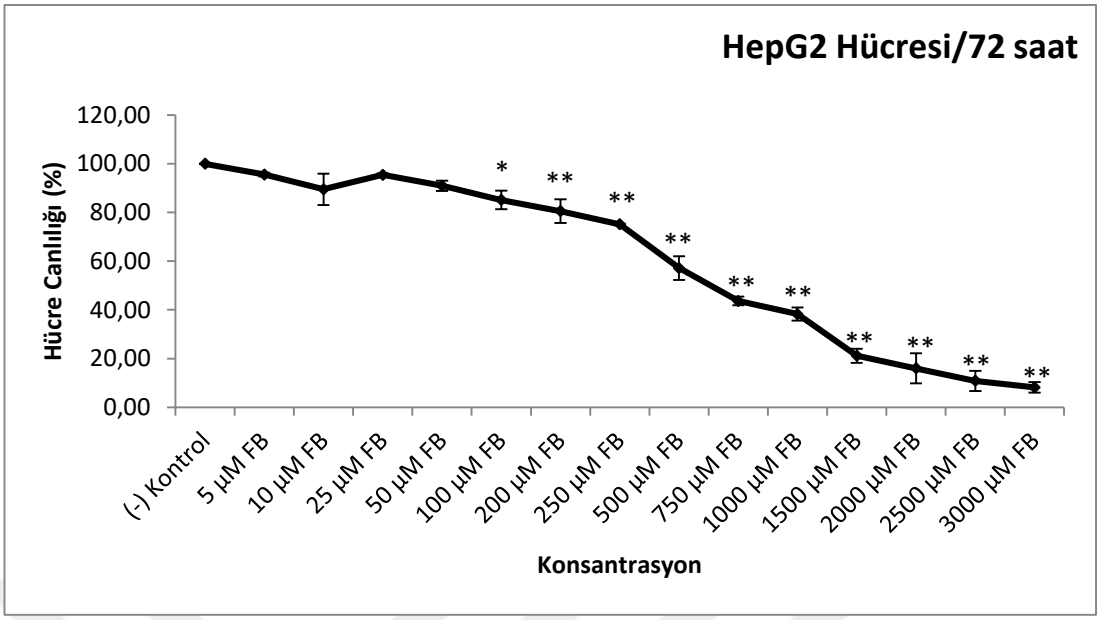
48 saatlik inkübasyon sonucunda negatif kontrol (% 1 etanol) ile karşılaştırıldığında; 200 µM üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. IC_{50} değeri ise 1234 µM olarak bulunmuştur. 48 saatlik inkübasyon sonrası HepG2 hücrelerinde MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı Şekil 4.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde 48 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.

Sonuçlar 3 çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir. Anlamlılık *p<0,05 ve **p≤0,001 şeklinde hesaplanmıştır.

72 saatlik inkübasyon sonucunda negatif kontrol (%1 etanol) ile karşılaştırıldığında; 100 µM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. IC_{50} değeri ise 633 µM olarak bulunmuştur. 72 saatlik inkübasyon sonrası HepG2 hücrelerinde MTT yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde 72 saatlik maruziyet sonrasında % hücre canlılığı.

Sonuçlar 3 çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir. Anlamlılık *p<0,05 ve **p≤0,001 şeklinde hesaplanmıştır.

4.2. Flurbiprofen Genotoksisitesinin Tek Hücre Jel Elektroforezi (*COMET*) Yöntemi ile Belirlenmesi

4.2.1. Flurbiprofenin HeLa Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Tek Hücre Jel Elektroforezi (*COMET*) Yöntemi ile Genotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

48 saatlik maruziyet süresi sonunda HeLa hücrelerinde DNA hasarı *COMET* yöntemi ile değerlendirilmiştir. Flurbiprofen dozları; 5 µM, 50 µM, 125 µM, 250 µM ve 500 µM olarak çalışılmıştır. DNA hasarı; DNA kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti şeklinde değerlendirilmiştir. Sonuçlar negatif kontrol (%1 etanol) ile karşılaştırılmıştır. 50 µM H_2O_2, yöntemi doğrulamak amacıyla pozitif kontrol olarak çalışılmıştır (Tablo 4.1.).

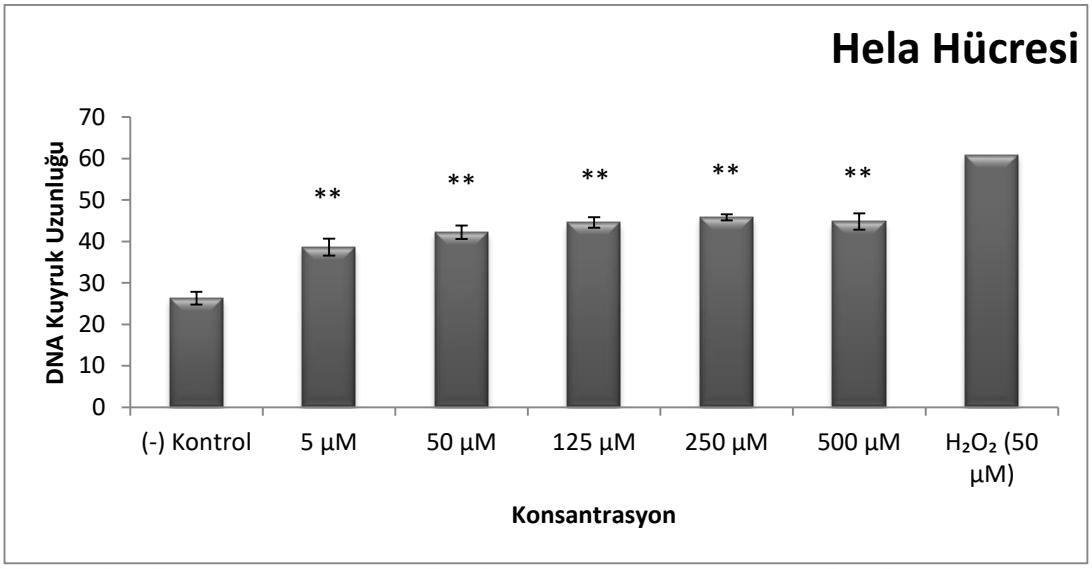
Tablo 4.1. Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular.

Konsantrasyon	DNA Kuyruk Uzunluğu	DNA Kuyruk Yoğunluğu	DNA Kuyruk Momenti
(-) Kontrol	26,31±1,56	2,70±0,24	0,50±0,05
5 µM	38,62±2,02**	5,62±0,41*	1,22±0,10
50 µM	42,20±1,63**	9,53±0,61**	2,14±0,15*
125 µM	44,57±1,27**	11,85±1,16**	2,59±0,18*
250 µM	45,78±0,74**	13,63±1,58**	2,89±0,23**
500 µM	44,82±1,94**	16,02±1,37**	3,63±0,28**
H_2O_2 (50 µM)	60,89±3,50	38,54±3,31**	11,32±1,21

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir.
*p<0,05, **p≤0,001 ve sonuçlar negatif kontrol ile kıyaslanmıştır.

Deneyler 3 kere tekrarlanmış ve her bir tekrar ikili olarak çalışılmıştır. Her bir lamda rastgele seçilen 100 hücre sayılmıştır.

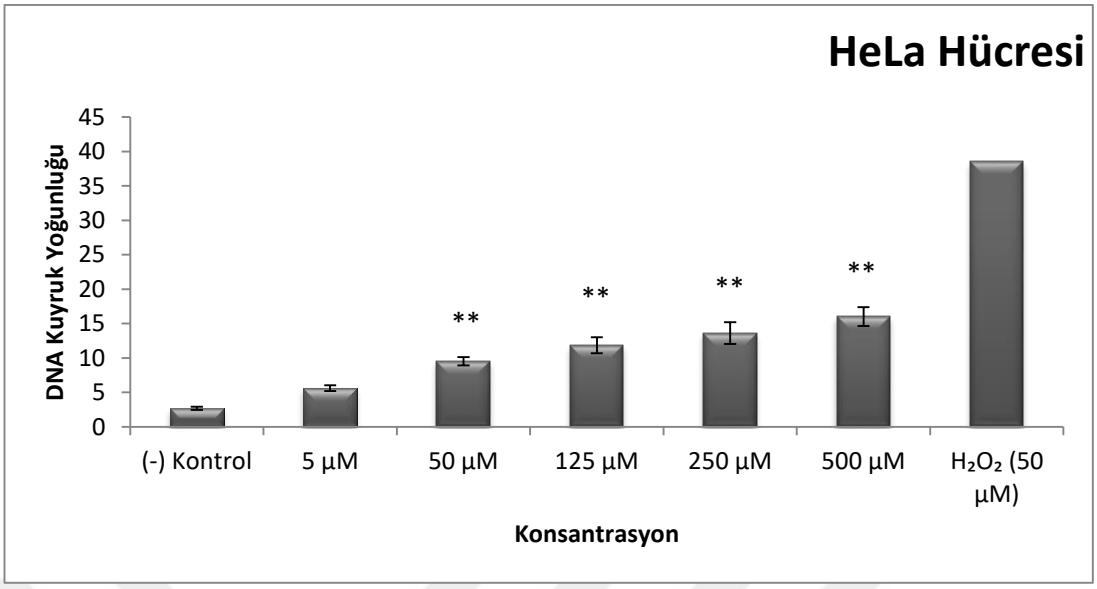
DNA hasarı, kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirildiğinde; bütün konsantrasyonlarda negatif kontrol ile karşılaştırıldığında HeLa hücrelerinde DNA hasarında oldukça anlamlı artış (p≤0,001) gözlenmiştir. 500 µM dozda kuyruk uzunluğu 250 µM dozdaki kuyruk uzunluğuna göre azalmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HeLa hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk uzunluğu.

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir.
**$p \leq 0{,}001$ ve sonuçlar negatif kontrol ile kıyaslanmıştır.

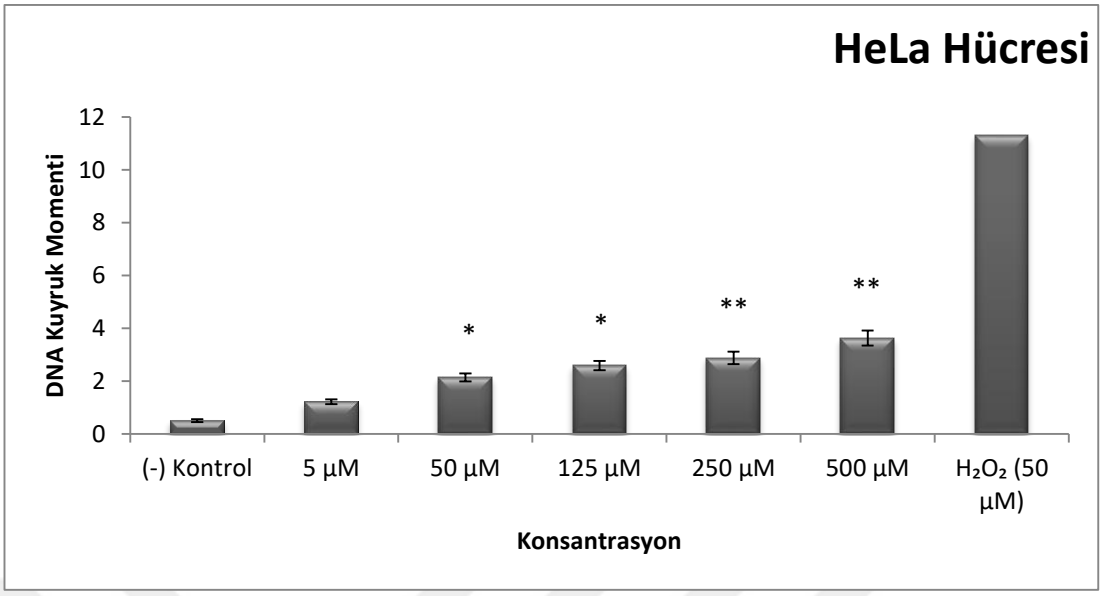
DNA hasarı, kuyruk yoğunluğu cinsinden değerlendirildiğinde; negatif kontrol ile karşılaşıldığında 5 µM dozda DNA hasarında anlamlı artış gözlenirken ($p \leq 0{,}05$), 50, 125, 250 ve 500 µM dozlarda ise oldukça anlamlı artış gözlenmiştir ($p \leq 0{,}001$). Kuyruk yoğunluğu cinsinden, DNA hasarında doza bağlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HeLa hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk yoğunluğu.

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir.
**$p \leq 0{,}001$ ve sonuçlar negatif kontrol ile kıyaslanmıştır.

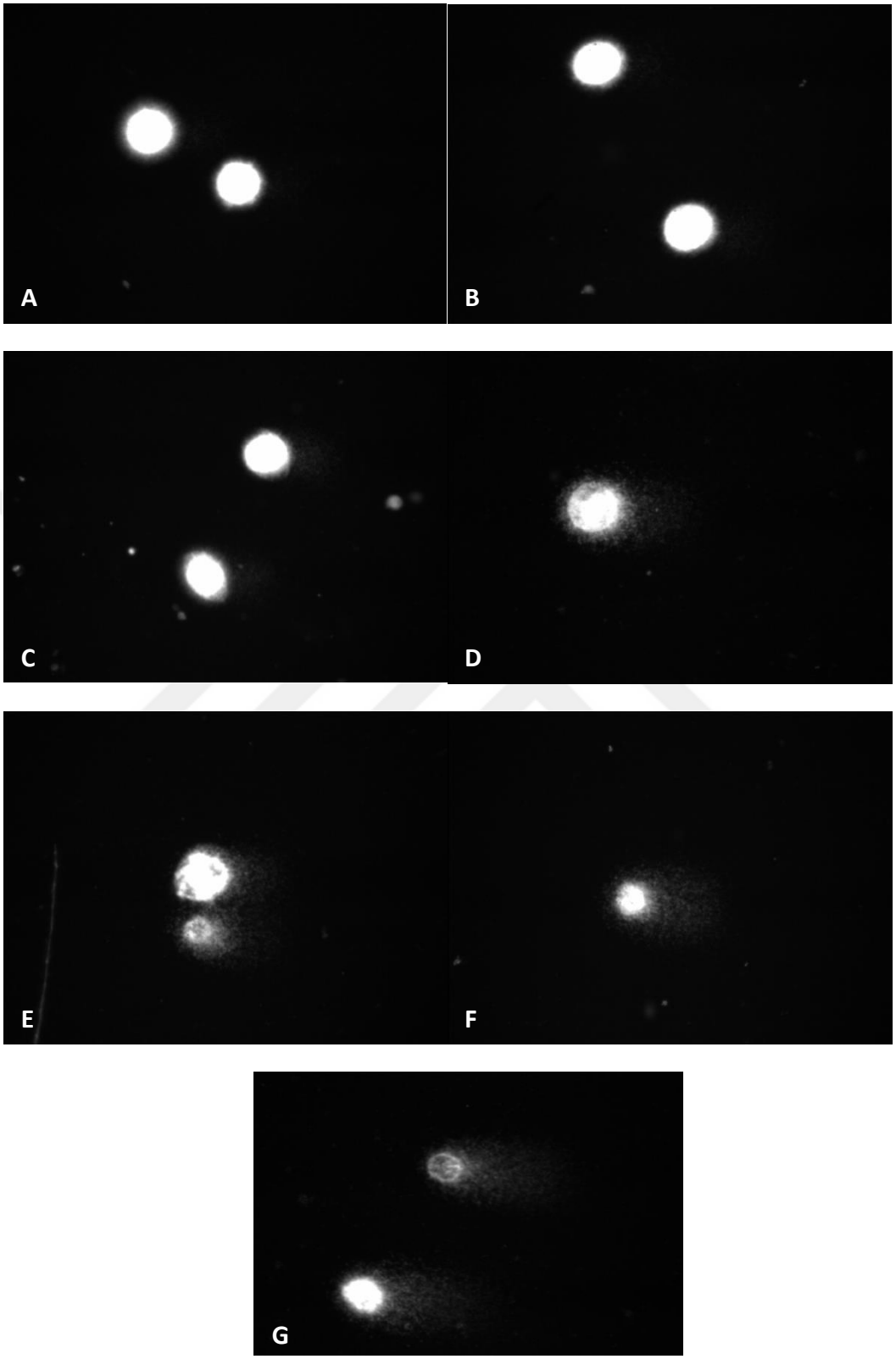
DNA hasarı kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde ise; negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 5 µM dozda DNA hasarında anlamlı artış tespit edilmemiştir. 50 µM ve 125 µM dozlarda anlamlı artış gözlenirken ($p \leq 0{,}05$), 250 µM ve 500 µM dozlarda oldukça anlamlı artış gözlenmiştir ($p \leq 0{,}001$). Kuyruk momenti cinsinden, DNA hasarında doza bağlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HeLa hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk momenti.

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir.
**p*<0,05, ***p*≤0,001 ve sonuçlar negatif kontrol ile kıyaslanmıştır.

Flurbiprofen ile 48 saat inkübasyon sonrası HeLa hücrelerindeki DNA hasarına ilişkin görüntüler Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Flurbiprofenin 48 saat inkübasyon sonrası HeLa hücrelerindeki DNA hasarı görüntüleri: A) negatif kontrol B) 5 µM FB C) 50 µM FB D) 125 µM FB E) 250 µM FB F) 500 µM FB, G) 50 µM H_2O_2.

4.2.2. Flurbiprofenin HepG2 Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Tek Hücre Jel Elektroforezi (*COMET*) Yöntemi ile Genotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

48 saatlik maruziyet süresi sonunda HepG2 hücrelerinde DNA hasarı *COMET* yöntemi ile değerlendirilmiştir. Flurbiprofen dozları; 5 µM, 50 µM, 125 µM, 250 µM ve 500 µM olarak çalışılmıştır. DNA hasarı; DNA kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti şeklinde değerlendirilmiştir. Sonuçlar negatif kontrol (%1 etanol) ile karşılaştırılmıştır. 50 µM H_2O_2, yöntemi doğrulamak amacıyla pozitif kontrol olarak çalışılmıştır (Tablo 4.2.).

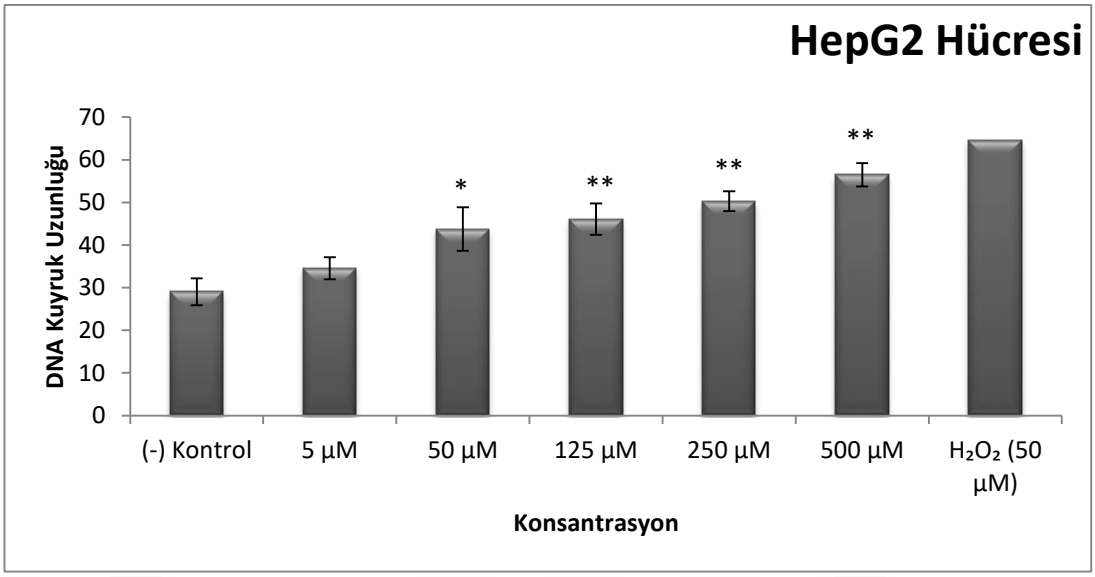
Tablo 4.2. Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular.

Konsantrasyon	DNA Kuyruk Uzunluğu	DNA Kuyruk Yoğunluğu	DNA Kuyruk Momenti
(-) Kontrol	29,03±3,18923	3,20±0,31	0,62±0,07
5 µM	34,55±2,57827*	5,57±0,78*	1,19±0,20
50 µM	43,77±5,10141*	9,77±0,87**	2,26±0,36
125 µM	46,07±3,68220**	13,90±1,56**	3,20±0,57*
250 µM	50,25±2,32499**	18,65±2,27**	4,53±0,69*
500 µM	56,47±2,73198**	27,00±3,36**	7,55±1,25**
H_2O_2 (50 µM)	64,66±5,01803	42,75±3,55	13,14±1,64

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir.
*p<0,05, **p≤0,001 ve sonuçlar negatif kontrol ile kıyaslanmıştır.

Deneyler üç kere tekrarlanmış ve her bir tekrar ikili olarak çalışılmıştır. Her bir lamda rastgele seçilen 100 hücre sayılmıştır.

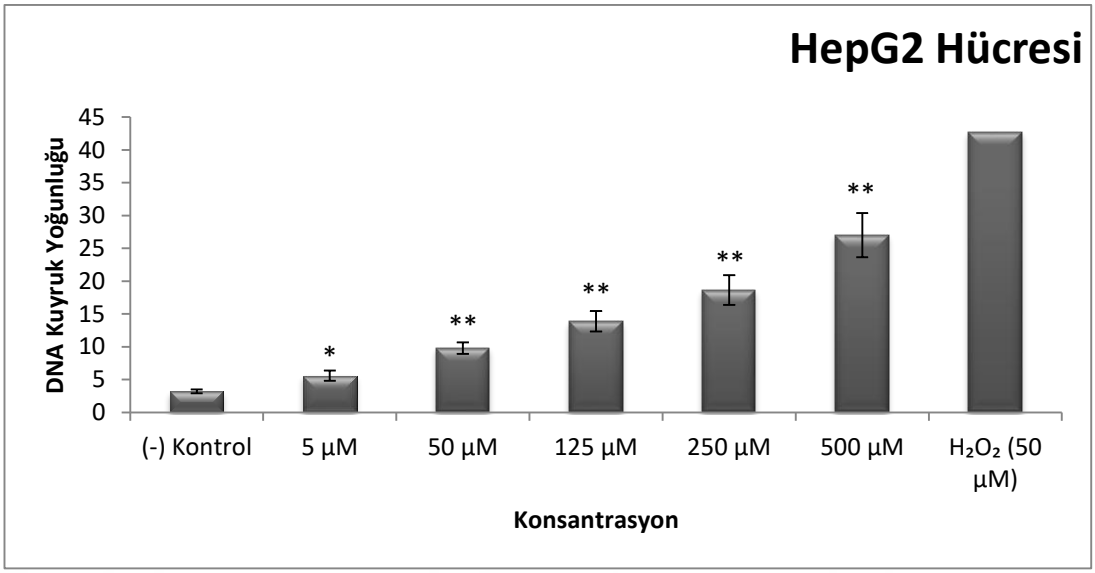
DNA hasarı, kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirildiğinde; negatif kontrol ile karşılaştırıldığında HepG2 hücrelerinde 5 µM ve 50 µM dozlarda DNA hasarında anlamlı artış gözlenirken (p<0,05), 125 µM, 250 µM ve 500 µM dozlarda oldukça anlamlı artış gözlenmiştir (p≤0,001). Kuyruk uzunluğu cinsinden, DNA hasarında doza bağlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HepG2 hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk uzunluğu.

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir.
**p*<0,05, ***p*≤0,001 ve sonuçlar negatif kontrol ile kıyaslanmıştır.

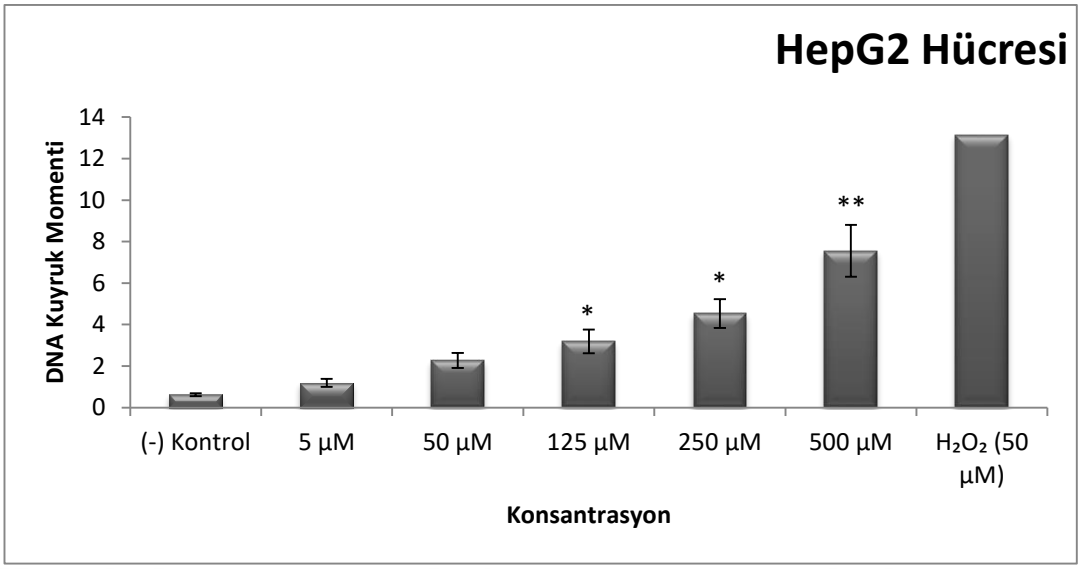
DNA hasarı, kuyruk yoğunluğu cinsinden değerlendirildiğinde; negatif kontrol ile karşılaşıldığında 5 µM dozda DNA hasarında anlamlı artış gözlenirken (*p*<0,05), 50 µM, 125 µM, 250 µM ve 500 µM dozlarda oldukça anlamlı artış gözlenmiştir (*p*≤0,001). Kuyruk yoğunluğu cinsinden, DNA hasarında doza bağlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HepG2 hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk yoğunluğu.

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir.
*p<0,05, **p≤0,001 ve sonuçlar negatif kontrol ile kıyaslanmıştır.

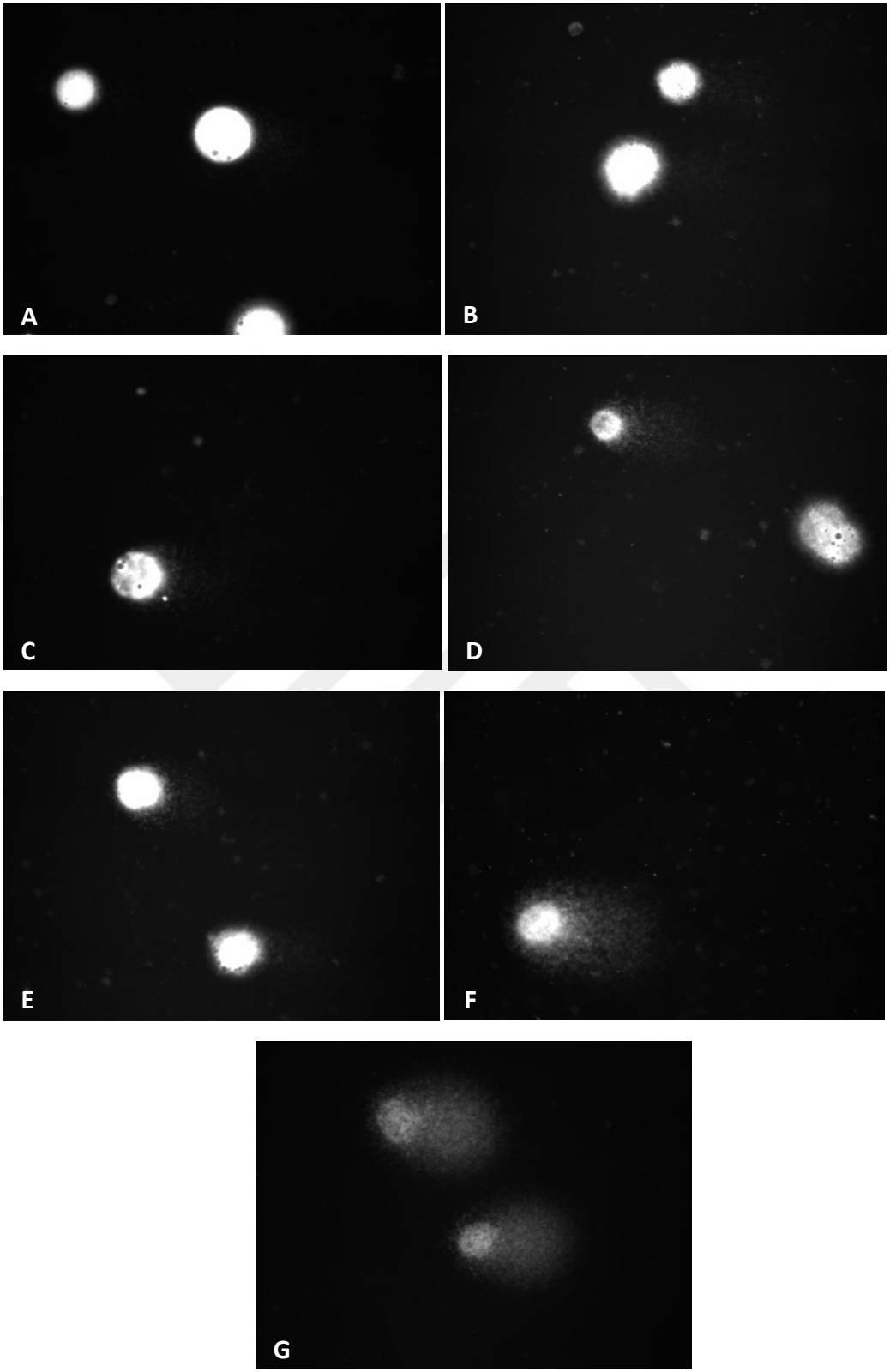
DNA hasarı, kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde ise; negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 5 µM ve 50 µM dozlarda DNA hasarında anlamlı artış gözlenmemiştir. 125 µM ve 250 µM dozlarda anlamlı artış gözlenirken (p<0,05), 500 µM dozda oldukça anlamlı artış gözlenmiştir (p≤0,001). Kuyruk momenti cinsinden, DNA hasarında doza bağlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Flurbiprofenin 48 saatlik inkübasyonu sonunda HepG2 hücrelerinde DNA hasarına ilişkin bulgular-DNA kuyruk momenti.

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeridir ve ORT±SEM olarak verilmiştir.
**p*<0,05, ***p*≤0,001 ve sonuçlar negatif kontrol ile kıyaslanmıştır.

Flurbiprofenle 48 saat inkübasyon sonrası HepG2 hücrelerindeki DNA hasarına ilişkin görüntüler Şekil 4.14.'de gösterilmiştir.



Şekil. 4.14. Flurbiprofenin 48 saat inkübasyon sonrası HepG2 hücrelerindeki DNA hasarı görüntüleri: A) negatif kontrol B) 5 µM FB C) 50 µM FB D) 125 µM FB E) 250 µM FB F) 500 µM FB G) 50 µM H_2O_2.

4.3. Flurbiprofenin Gen Ekspresyonuna İlişkin Bulgular

Flurbiprofenin apoptotik ve antiapoptotik genler (p53, kaspaz-3, kaspaz-9, Bax, BcL-2, Survivin/BIRC5) üzerine etkilerini incelemek amacıyla HeLa ve HepG2 hücreleri; 5, 50, 125, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarda flurbiprofene 48 saat boyunca maruz bırakılmıştır.

Gen ekspresyon değerlendirme yazılım programında Ct (eşik döngü değeri) değerleri kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

4.3.1. Flurbiprofenin HeLa Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Gen Ekspresyon Analizlerine Ait Bulgular

HeLa hücrelerinde kontrol grubu (%1 etanol) ve flurbiprofen dozlarına ait Ct değerleri Tablo 4. 3.'te verilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken üst sınır Ct değeri 35 olarak alınmıştır. 35'ten daha yüksek değerler de 35 olarak kabul edilmiştir. β-aktin geni kontrol geni olarak kullanılmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

Tablo 4.3. Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde ortalama Ct değerleri.

Dozlar/ Genler	Negatif Kontrol	5 µM FB	50 µM FB	125 µM FB	250 µM FB	500 µM FB
β-aktin	24,42±0,98	25,32±0,90	26,05±1,65	24,26±0,19	23,35±0,28	24,82±1,44
p53	29,49±1,19	29,72±2,07	29,45±1,93	28,27±1,44	26,80±0,03	28,62±2,62
Kaspaz-3	32,20±2,80	29,78±1,57	29,98±0,79	27,84±0,63	27,82±2,80	28,38±2,19
Kaspaz-9	28,23±3,68	25,76±3,34	26,10±4,42	23,84±2,72	22,80±1,70	23,85±2,39
Bax	34,61±2,24	34,13±1,11	32,76±0,15	30,70±1,13	30,31±1,50	30,68±1,03
BcL-2	27,22±0,50	28,16±0,39	29,53±0,49	27,99±0,85	26,84±1,28	28,11±0,64
Birc5	30,70±0,71	31,85±0,17	32,61±1,40	31,72±0,52	31,24±0,05	32,28±0,73

Sonuçlar ORT±SEM sapma şeklinde verilmiştir.
Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

ΔCt değerleri incelendiğinde p53, kaspaz-3 ve kaspaz-9 genleri için; flurbiprofen uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre azalma, Bax, BcL-2 ve Birc5 genleri için; flurbiprofen uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre artma meydana gelmiştir. ΔCt bulguları Tablo 4.4.'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde ortalama ΔCt değerleri.

Dozlar/ Genler	Negatif Kontrol	5 µM FB	50 µM FB	125 µM FB	250 µM FB	500 µM FB
β-aktin	0	0	0	0	0	0
p53	5,07±2,17	4,40±1,17	3,40±0,28	4,01±1,63	3,45±0,25	3,80±1,18
Kaspaz-3	7,79±1,81	4,46±2,47	3,93±2,44	3,58±0,44	4,48±2,53	3,56±3,63
Kaspaz-9	3,82±4,67	0,44±2,45	0,05±2,77	-0,43±2,91	-0,55±1,98	-0,98±0,94
Bax	8,35±1,25	8,58±2,01	6,71±1,81	6,44±0,94	6,97±1,23	5,86±2,47
BcL-2	2,80±0,49	2,84±0,51	3,48±1,16	3,73±0,66	3,50±1,01	3,29±0,81
Birc5	6,29±1,70	6,53±0,73	6,56±0,25	7,46±0,71	7,89±0,33	7,46±0,71

Sonuçlar ORT±SEM olarak verilmiştir. Kontrol geni β-aktin değeri 0 olarak alınmıştır.
Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

$2^{-\Delta Ct}$ değerleri incelendiğinde p53, kaspaz-3 ve kaspaz-9 genleri için; flurbiprofen uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre artma, Bax geni için; 5 µM dozunda azalma ve diğer gruplarda artma, BcL-2 ve Birc5 genleri için; flurbiprofen uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre azalma meydana gelmiştir. $2^{-\Delta Ct}$ bulguları Tablo 4. 5.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Flurbiprofenin HeLa hücrelerinde ortalama $2^{-\Delta Ct}$ değerleri.

Dozlar/ Genler	Negatif Kontrol	5µM FB	50µM FB	125µM FB	250µM FB	500µM FB
β-aktin	1	1	1	1	1	1
p53	0,02977	0,04737	0,09473	0,06207	0,09151	0,07204
Kaspaz-3	0,00452	0,04544	0,06561	0,08391	0,04497	0,08508
Kaspaz-9	0,07105	0,73969	0,96929	1,34257	1,45902	1,96564
Bax	0,00307	0,00262	0,00959	0,01156	0,00800	0,01722
BcL-2	0,14359	0,14015	0,08962	0,07536	0,08870	0,10259
Birc5	0,01282	0,01082	0,01060	0,00568	0,00422	0,00570

Sonuçlar ortalama $2^{-\Delta Ct}$ olarak verilmiştir. Kontrol geni β-aktin değeri 1 olarak alınmıştır.
Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

Flurbiprofenin kat değişimi (*fold change*), kat regülasyonu (*fold regulation*) ve biyolojik anlamlılığı incelendiğinde kontrol grubuna göre; p53 ekspresyonunun 50 µM, 125 µM, 250 µM ve 500 µM dozlarda anlamlı olarak arttığı, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonlarının bütün dozlarda anlamlı olarak arttığı, Bax ekspresyonunun 50 µM, 125 µM, 250 µM ve 500 µM dozlarda anlamlı olarak arttığı, BcL-2 ekspresyonundaki değişiklerin anlamlı olmadığı, Birc5 ekspresyonunun ise 125, 250 ve 500 µM dozlarda anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Kat değişimi ve kat regülasyonu bulguları Tablo 4.6., 4.7 ve Şekil 4.15.'te, Bax/BcL-2 oranları ise Şekil 4.16.'te gösterilmişir.

Tablo 4.6. Flurbiprofen dozlarının HeLa hücrelerinde kat değişimi değerleri.

Dozlar/ Genler	5µM FB	50µM FB	125µM FB	250µM FB	500µM FB
β-aktin	1	1	1	1	1
p53	1,5911	3,1821	2,0849	3,0738	2,42
Kaspaz-3	10,0561	14,5203	18,5713	9,9521	18,8305
Kaspaz-9	10,4107	13,6422	18,8959	20,5348	27,6652
Bax	0,8556	3,1275	3,7711	2,6117	5,6178
BcL-2	0,976	0,6242	0,5249	0,6177	0,7145
Birc5	0,8438	0,8265	0,4429	0,3287	0,4444

Sonuçlar negatif kontrol grubuna karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni β-aktin değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

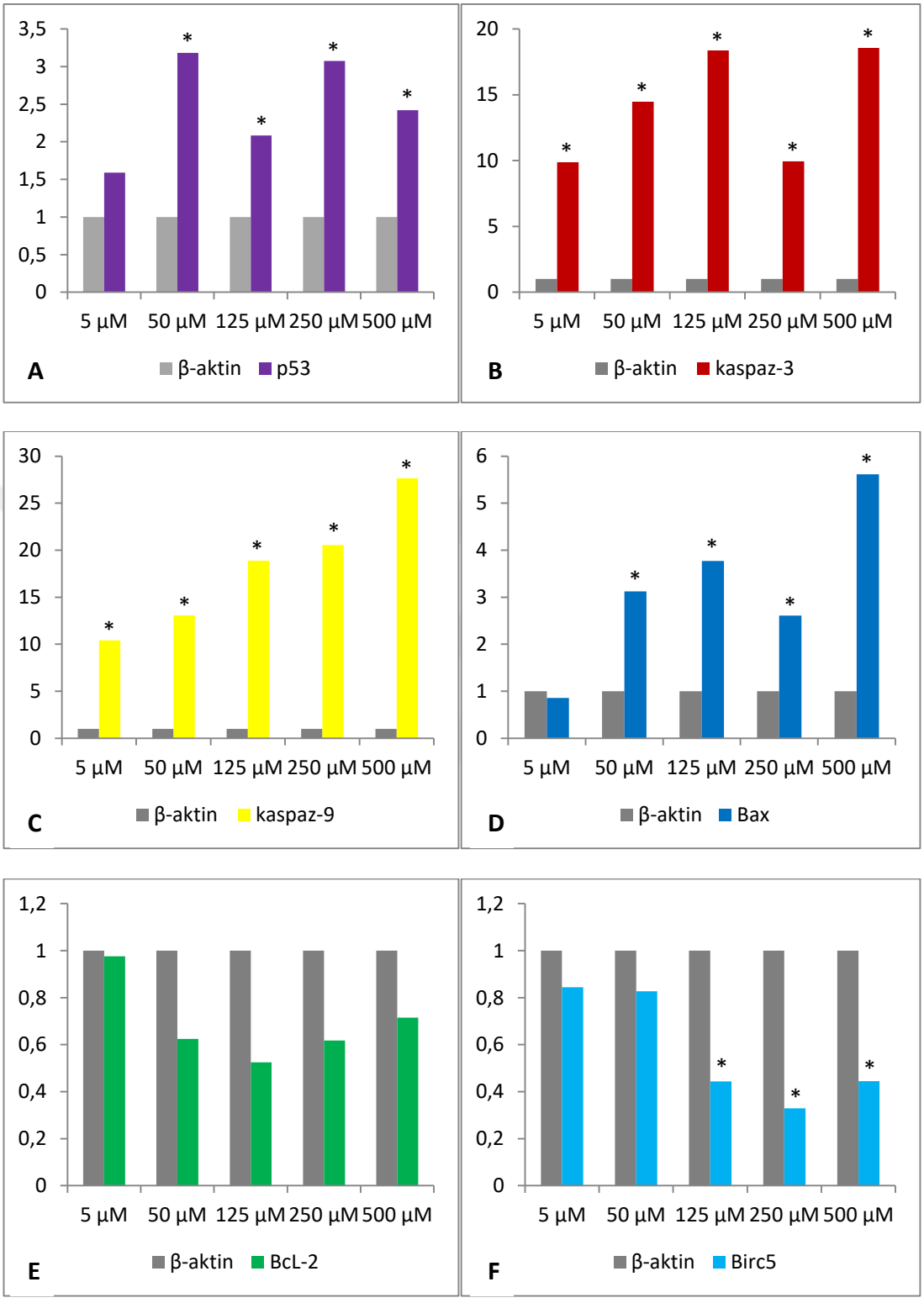
Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık $p<0,05$'e göre hesaplanmıştır.

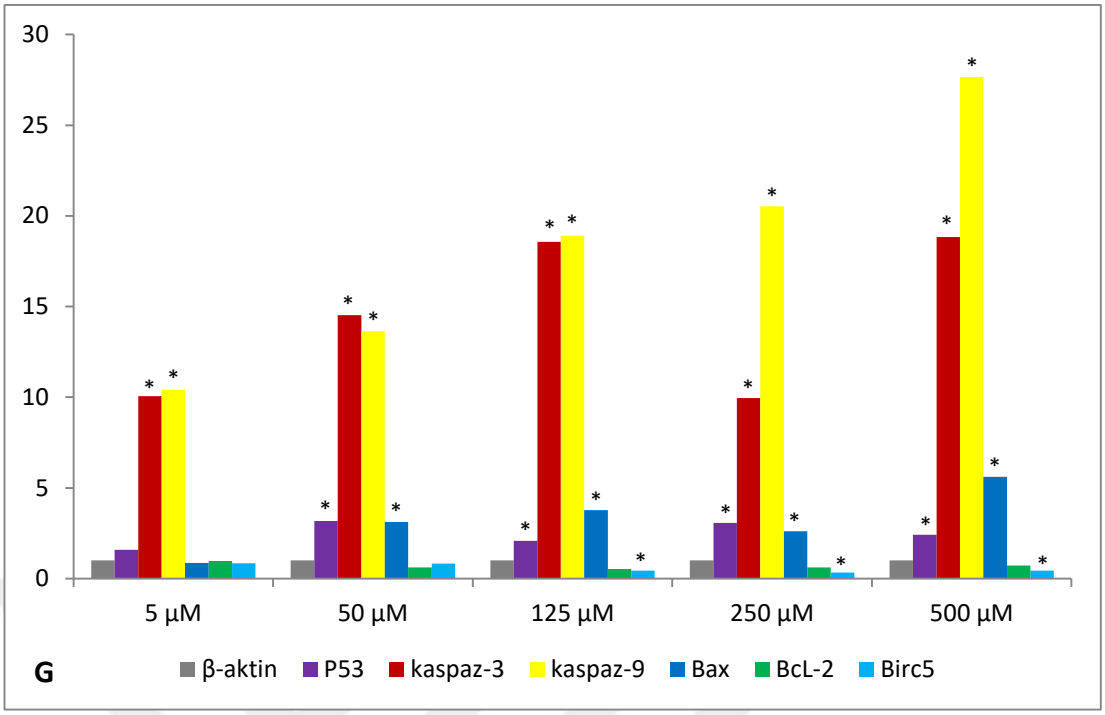
Tablo 4.7. Flurbiprofen dozlarının HeLa hücrelerinde kat regülasyonu değerleri.

Dozlar/ Genler	5µM FB	50µM FB	125µM FB	250µM FB	500µM FB
β-aktin	1	1	1	1	1
p53	1.59	3.18	2.08	3.07	2.42
Kaspaz-3	10.06	14.52	18.57	9.95	18.83
Kaspaz-9	10.41	13.64	18.90	20.53	27.67
Bax	-1.17	3.13	3.77	2.61	5.62
BcL-2	-1.02	-1.60	-1.91	-1.62	-1.40
Birc5	-1.19	-1.21	-2.26	-3.04	-2.25

Sonuçlar negatif kontrol grubuna karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni β-aktin değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık $p<0,05$'e göre hesaplanmıştır.

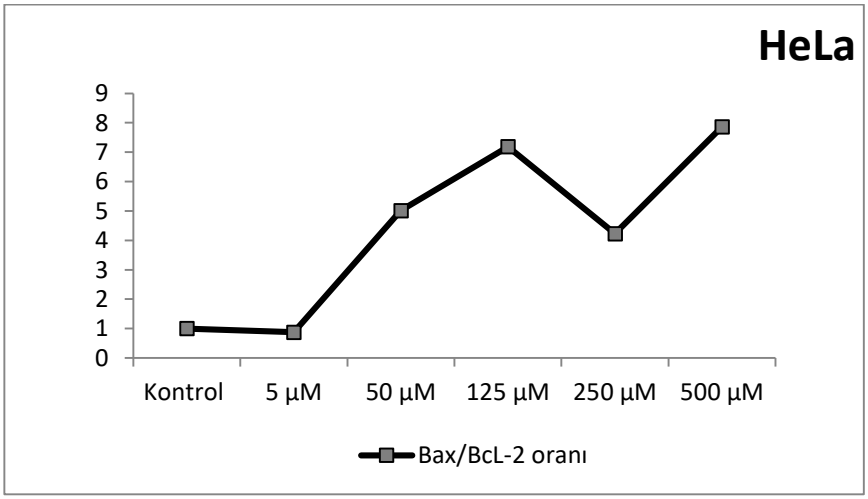

3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
5 µM
50 µM
125 µM
250 µM
500 µM
A
β-aktin
p53
20
15
10
5
0
B
kaspaz-3
30
25
20
15
10
5
0
C
kaspaz-9
6
5
4
3
2
1
0
D
Bax
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
E
BcL-2
F
Birc5



Şekil 4.15. Flurbiprofen dozlarının Hela hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla kat değişimi değerleri.

A) p53 ekspresyonu **B)** Kaspaz-3 ekspresyonu **C)** Kaspaz-9 ekspresyonu **D)** Bax ekspresyonu **E)** BcL-2 ekspresyonu **F)** Birc5 ekspresyonu **G)** Tüm genlerin ekspresyonu

*p<0,05 ve sonuçlar negatif kontrol grubuna karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni β-aktin değeri 1 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.16. Flurbiprofen dozlarının HeLa hücrelerindeki Bax/BcL-2 ekspresyon oranları.

4.3.2. Flurbiprofenin HepG2 Hücrelerinde 48 Saatlik İnkübasyon Süresi Sonundaki Gen Ekspresyon Analizlerine Ait Bulgular

HepG2 hücrelerinde kontrol grubu (%1 etanol) ve flurbiprofen dozlarına ait Ct değerleri Tablo 4.8.'de verilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken üst sınır Ct değeri 35 olarak alınmıştır. 35'ten daha yüksek değerler de 35 olarak hesaplanmıştır. β-aktin geni kontrol geni olarak kullanılmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

Tablo 4.8. Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde ortalama Ct değerleri.

Dozlar/ Genler	Negatif Kontrol	5 µM FB	50 µM FB	125 µM FB	250 µM FB	500 µM FB
β-aktin	24,78±0,86	28,1±3,69	26,18±1,49	25,1±0,42	23,62±0,47	25,65±1,62
p53	29,82±0,76	32,54±0,48	30,69±2,63	28,75±0,40	27,09±0,41	27,56±1,33
Kaspaz-3	30,29±4,42	30,77±0,23	29,00±2,37	29,39±3,46	26,97±1,83	27,44±0,64
Kaspaz-9	25,51±0,83	26,41±1,81	23,98±1,56	23,58±1,78	22,97±1,12	23,12±1,25
Bax	28,46±0,92	30,59±2,06	29,78±1,86	28,22±1,13	27,66±1,37	28,51±1,28
BcL-2	28,17±1,13	29,95±0,97	29,6±1,05	30,23±0,35	29,78±0,12	30,65±0,73
Birc5	30,05±0,72	33,36±2,35	33,25±0,91	31,91±1,84	31,19±0,78	32,84±0,89

Sonuçlar ORT±SEM şeklinde verilmiştir.
Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

ΔCt değerleri incelendiğinde p53, kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bax genleri için; flurbiprofen uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre azalma, BcL-2 geni için; 5 µM dozda azalma, diğer dozlarda artma, Birc5 geni için; 5 µM dozda herhangi bir fark olmamış, diğer dozlarda artma meydana gelmiştir. ΔCt bulguları Tablo 4.9.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde ortalama ΔCt değerleri.

Dozlar/ Genler	Negatif Kontrol	5 µM FB	50 µM FB	125 µM FB	250 µM FB	500 µM FB
β-aktin	0	0	0	0	0	0
p53	5,04±0,10	4,44±4,17	4,51±1,14	3,65±0,82	3,47±0,06	1,91±0,29
Kaspaz-3	5,51±3,56	2,67±3,47	2,82±3,86	4,29±3,04	3,35±1,36	1,79±2,25
Kaspaz-9	0,73±1,69	-1,70±1,89	-2,20±0,07	-1,53±2,20	-0,66±1,59	-2,53±0,37
Bax	3,68±0,06	2,49±1,63	3,60±0,36	3,12±0,71	4,04±0,90	2,87±0,33
BcL-2	3,39±0,27	1,85±4,66	3,42±2,54	5,13±0,07	6,16±0,35	5,00±0,88
Birc5	5,27±0,14	5,26±1,34	7,07±0,58	6,81±2,26	7,57±0,31	7,19±0,73

Sonuçlar ORT±SEM olarak verilmiştir. Kontrol geni β-aktin değeri 0 olarak alınmıştır.
Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

$2^{-\Delta Ct}$ değerleri incelendiğinde p53, kaspaz-3 ve kaspaz-9 genleri için; flurbiprofen uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre artma, Bax geni için; 250 µM dozunda azalma ve diğer gruplarda artma, BcL-2 ve Birc5 genleri için; 5 µM dozunda artma ve diğer gruplarda azalma meydana gelmiştir. $2^{-\Delta Ct}$ bulguları Tablo 4.10.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10. Flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde ortalama $2^{-\Delta Ct}$ değerleri.

Dozlar/ Genler	Negatif Kontrol	5µM FB	50µM FB	125µM FB	250µM FB	500µM FB
β-aktin	1	1	1	1	1	1
p53	0,03050	0,04607	0,04389	0,07966	0,09025	0,26609
Kaspaz-3	0,02194	0,15767	0,14210	0,05112	0,09807	0,28917
Kaspaz-9	0,60290	3,23777	4,59479	2,87787	1,57462	5,75573
Bax	0,07829	0,17801	0,08276	0,11502	0,06079	0,13726
BcL-2	0,09572	0,27739	0,09375	0,02866	0,01399	0,03125
Birc5	0,02601	0,02610	0,00744	0,00891	0,00528	0,00685

Sonuçlar ortalama $2^{-\Delta Ct}$ olarak verilmiştir. Kontrol geni β-aktin değeri 1 olarak alınmıştır.
Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

Flurbiprofenin HepG2 hücrelerindeki kat değişimi, kat regülasyonu ve biyolojik anlamlılığı incelendiğinde kontrol grubuna göre; p53 ekspresyonunun 125 µM, 250 µM ve 500 µM dozlarda anlamlı olarak doza bağlı olarak arttığı, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonlarının bütün dozlarda anlamlı olarak arttığı, Bax ekspresyonunun 5 µM dozda anlamlı olarak arttığı, BcL-2 ekspresyonunun 5 µM dozda anlamlı olarak arttığı ve 125, 250 ve 500 µM dozlarda anlamlı olarak azaldığı, Birc5 ekspresyonunun ise 50, 125, 250 ve 500 µM dozlarda anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Kat değişimi ve kat regülasyonu bulguları Tablo 4.11., 4.12 ve Şekil 4.17.'te, Bax/BcL-2 oranları ise Şekil 4.18'da gösterilmiştir.

Tablo 4.11. Flurbiprofen dozlarının HepG2 hücrelerinde kat değişimi değerleri.

Dozlar/ Genler	5µM FB	50µM FB	125µM FB	250µM FB	500µM FB
β-aktin	1	1	1	1	1
p53	1,5105	1,4389	2,6117	2,9588	8,7241
Kaspaz-3	7,1851	6,4755	2,3295	4,4691	13,1775
Kaspaz-9	5,3703	7,6211	4,7733	2,6117	9,5467
Bax	2,2736	1,057	1,4692	0,7765	1,7532
BcL-2	2,8979	0,9794	0,2994	0,1461	0,3265
Birc5	1,0035	0,2862	0,3427	0,2031	0,2633

Sonuçlar negatif kontrol grubuna karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni β-aktin değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

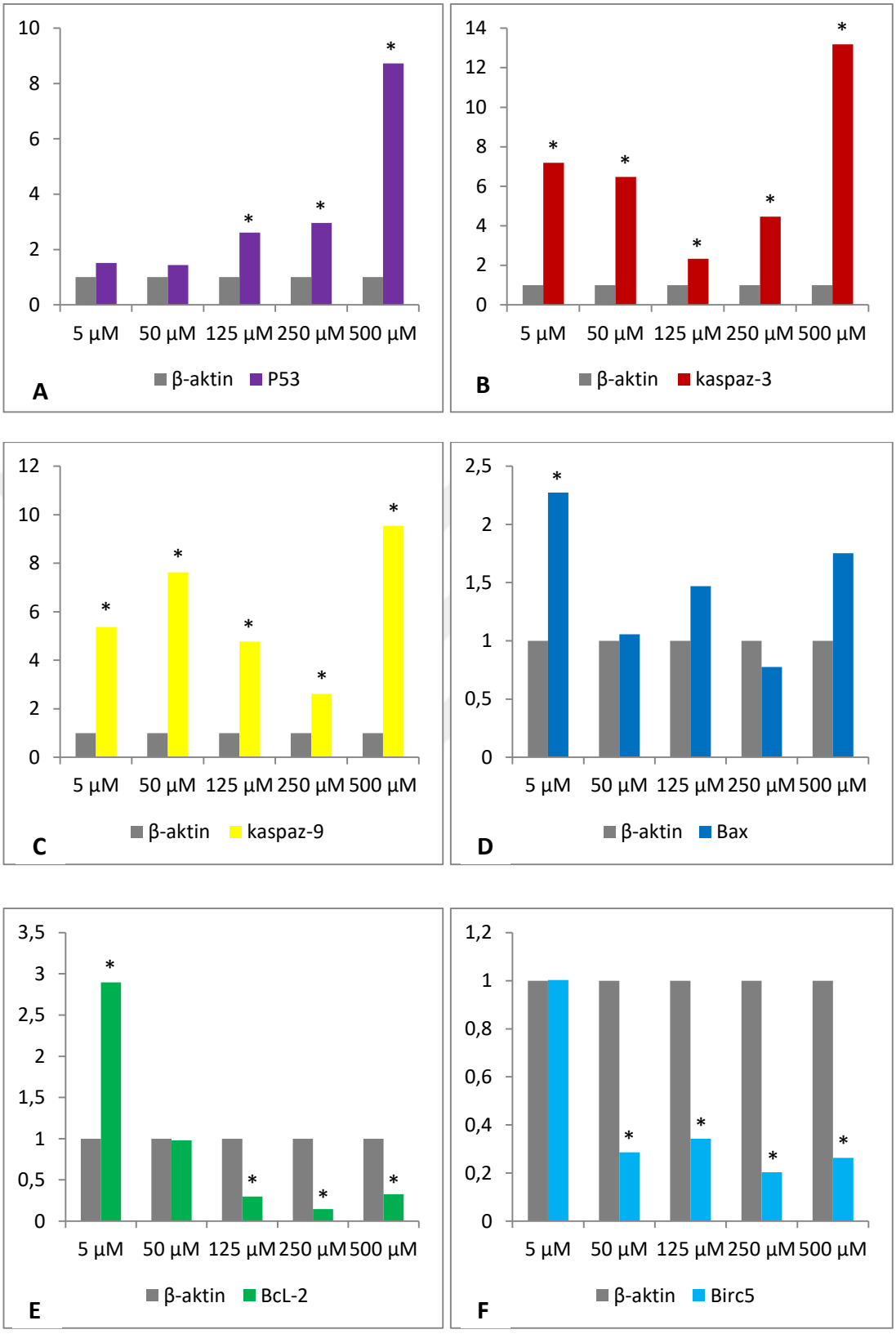
Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık $p<0,05$'e göre hesaplanmıştır.

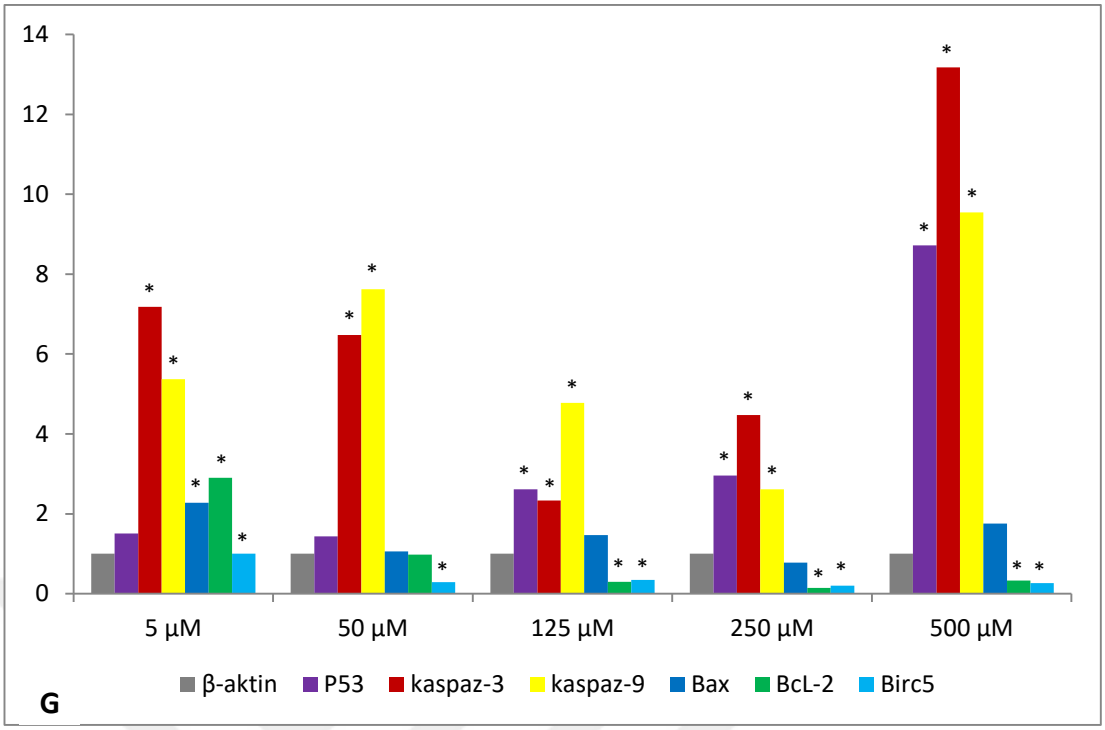
Tablo 4.12. Flurbiprofen dozlarının HepG2 hücrelerinde kat regülasyonu değerleri.

Dozlar/ Genler	5µM FB	50µM FB	125µM FB	250µM FB	500µM FB
β-aktin	1	1	1	1	1
p53	1,51	1,44	2,61	2,96	8,72
Kaspaz-3	7,19	6,48	2,33	4,47	13,18
Kaspaz-9	5,37	7,62	4,77	2,61	9,55
Bax	2,27	1,06	1,47	-1,29	1,75
BcL-2	2,90	-1,02	-3,34	-6,84	-3,06
Birc5	1,00	-3,49	-2,92	-4,92	-3,80

Sonuçlar negatif kontrol grubuna karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni β-aktin değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

Kırmızıyla gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, maviyle gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir. Anlamlılık $p<0,05$'e göre hesaplanmıştır.

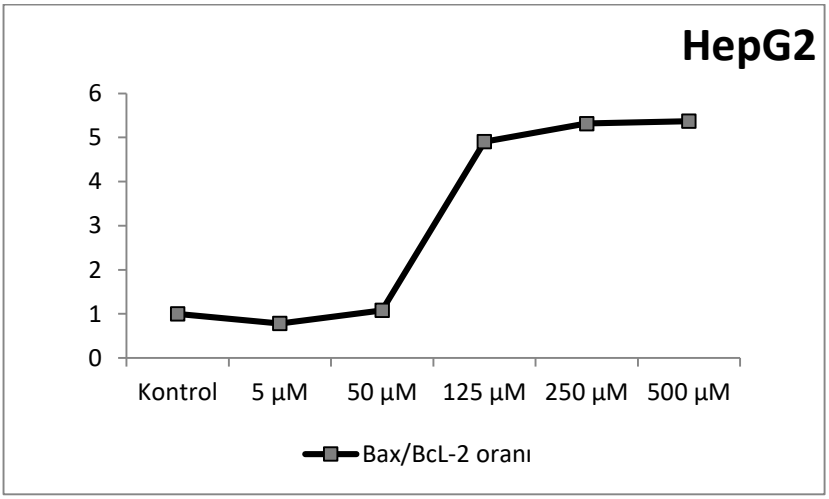

10
8
6
4
2
0
*
*
*
5 µM 50 µM 125 µM 250 µM 500 µM
β-aktin P53
A
14
12
10
8
6
4
2
0
*
*
*
*
*
5 µM 50 µM 125 µM 250 µM 500 µM
β-aktin kaspaz-3
B
12
10
8
6
4
2
0
*
*
*
*
*
5 µM 50 µM 125 µM 250 µM 500 µM
β-aktin kaspaz-9
C
2,5
2
1,5
1
0,5
0
*
5 µM 50 µM 125 µM 250 µM 500 µM
β-aktin Bax
D
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
*
*
*
5 µM 50 µM 125 µM 250 µM 500 µM
β-aktin BcL-2
E
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
*
*
*
5 µM 50 µM 125 µM 250 µM 500 µM
β-aktin Birc5
F



Şekil 4.17. Flurbiprofen dozlarının HepG2 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla kat değişimi değerleri.

A) p53 ekspresyonu **B)** Kaspaz-3 ekspresyonu **C)** Kaspaz-9 ekspresyonu **D)** Bax ekspresyonu **E)** BcL-2 ekspresyonu **F)** Birc5 ekspresyonu **G)** Tüm genlerin ekspresyonu

*p<0,05 ve sonuçlar negatif kontrol grubuna karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni β-aktin değeri 1 olarak hesaplanmıştır.



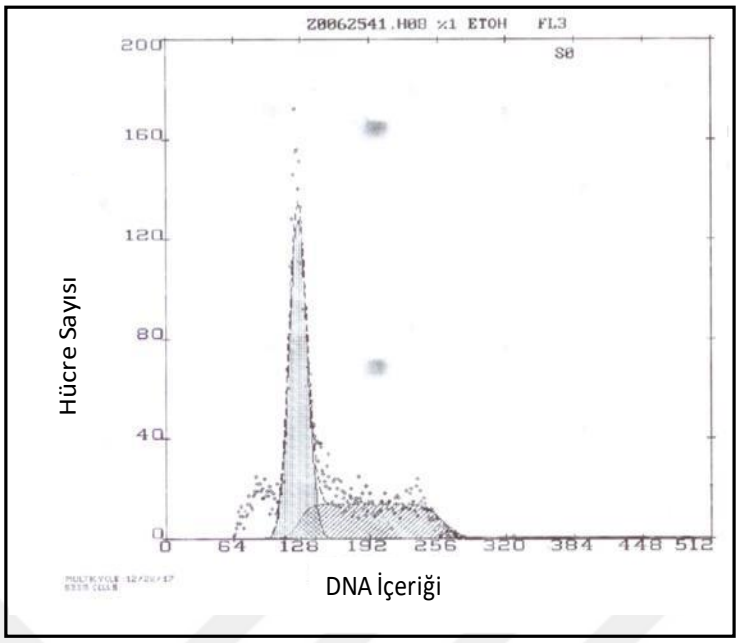
Şekil 4.18. Flurbiprofen dozlarının HepG2 hücrelerindeki Bax/BcL-2 ekspresyon oranları.

4.4. Flurbiprofenin Apoptotik Etkilerinin ve Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Akım Sitometri ile Belirlenmesi

4.4.1. Flurbiprofenin HeLa Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin ve Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Flurbiprofenin 5-3000 µM arası derişimlerinin HeLa hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkileri ve geç apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. HeLa hücresinde hücre döngüsü fazlarındaki hücre dağılım yüzdelerinin hesaplandığı örnek histogram Şekil 4.19.'te verilmiştir. Tüm sonuçlar Tablo 4.13. ve Şekil 4.20.'te gösterilmiştir. Geç apoptoz göstergesi olarak SubG1 piki değerlendirilmiş, yalnızca 1500 µM dozunda %43 oranında apoptoz görülmüştür. Bu dozda S fazında artım olmuştur. Daha yüksek dozlarda hücreler hasara uğradıkları için apoptotik pik görülmemiştir.

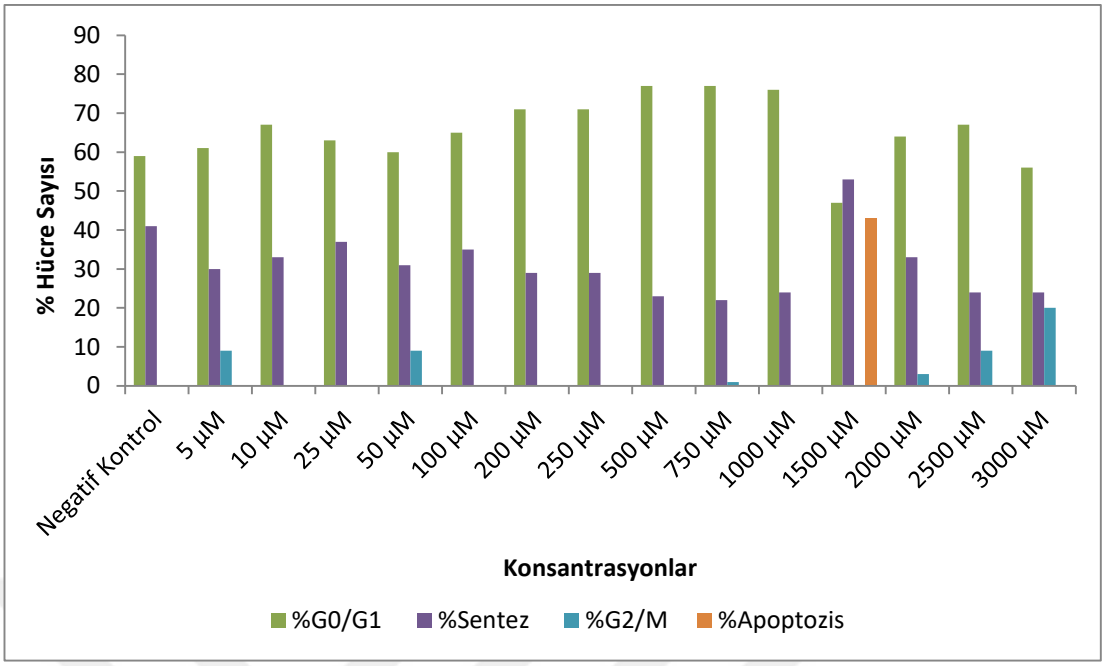
Hücre döngüsü negatif kontrol (%1 etanol) grubuna göre değerlendirildiğinde, G0/G1 fazındaki hücre yüzdesinin arttığı, S fazındaki hücre yüzdesinin ise azaldığı gözlenmiştir. 5, 50, 750, 2000, 2500 ve 3000 µM dozlarında mitoza yönelen, yani G2/M fazında hücreler görülmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde, flurbiprofenin Hela hücrelerinde hücre siklusu üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı, hücrelerin genel prolifere hücre döngüsü profili gösterdiği söylenebilir.



Şekil 4.19. HeLa hücresinde negatif kontrol (%1 etanol) grubundaki hücre döngüsü dağılımını gösteren histogram.

Tablo 4.13. Flurbiprofenin HeLa Hücrelerinde Apoptotik Etkileri ve Hücre Döngüsü Analizleri.

Konsantrasyon	% G0/G1	% Sentez	% G2/M	% Apoptoz
Negatif kontrol	59	41	0	0
5 µM FB	61	30	9	0
10 µM FB	67	33	0	0
25 µM FB	63	37	0	0
50 µM FB	60	31	9	0
100 µM FB	65	35	0	0
200 µM FB	71	29	0	0
250 µM FB	71	29	0	0
500 µM FB	77	23	0	0
750 µM FB	77	22	1	0
1000 µM FB	76	24	0	0
1500 µM FB	47	53	0	43
2000 µM FB	64	33	3	0
2500 µM FB	67	24	9	0
3000 µM FB	56	24	20	0

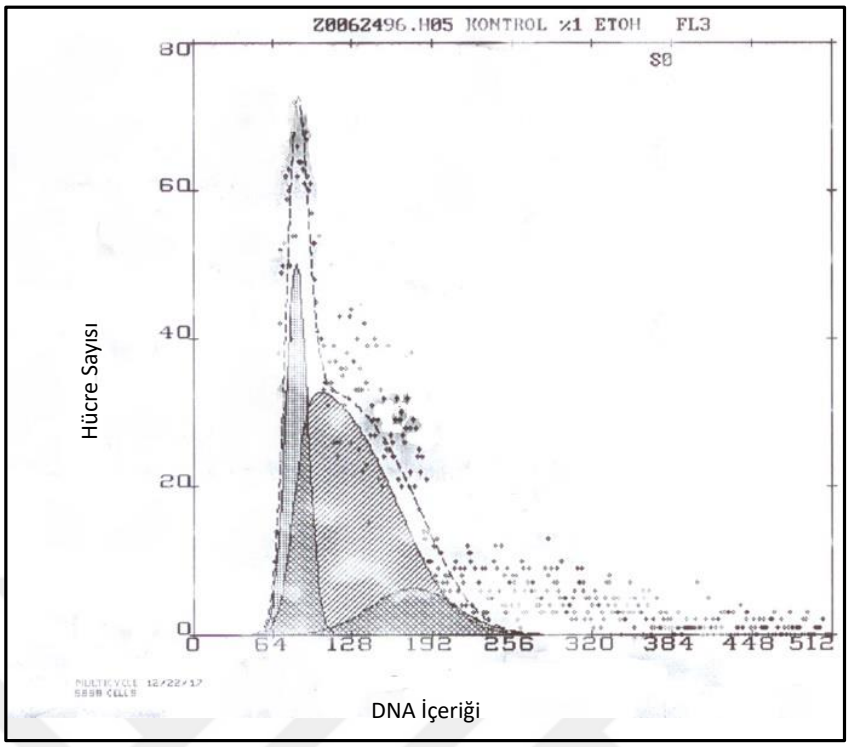


Şekil 4.20. Fluriprofenin HeLa Hücrelerindeki Apoptotik Etkileri ve Hücre Döngüsü.

4.4.2. Flurbiprofenin HepG2 Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin ve Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Flurbiprofenin 5-3000 µM arası derişimlerinin HepG2 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkileri ve geç apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. HepG2 hücresinde hücre döngüsü fazlarındaki hücre dağılım yüzdelerinin hesaplandığı örnek histogram Şekil 4.21'de verilmiştir. Tüm sonuçlar Tablo 4.14. ve Şekil 4.22'de gösterilmiştir. Geç apoptoz göstergesi olarak SubG1 piki değerlendirilmiş, hiçbir dozda apoptoz görülmemiştir.

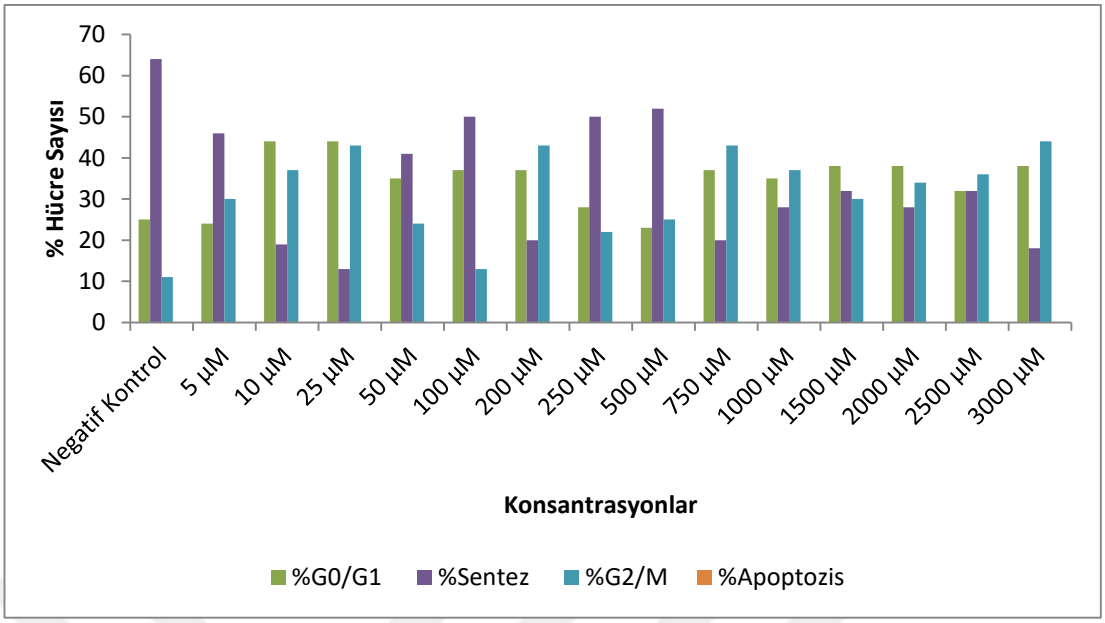
Hücre döngüsü negatif kontrol (%1 etanol) grubuna göre değerlendirildiğinde, 500 µM dozda S fazında artım görülmüştür. Genel olarak değerlendirildiğinde, flurbiprofenin HepG2 hücrelerinde hücre döngüsü üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı, hücre popülasyonunun proliferasyon gösterdiği görülmüştür. Hücre döngüsü HepG2 hücrelerinde hızlı ilerlemektedir.



Şekil 4.21. HepG2 hücresinde negatif kontrol (%1 etanol) grubundaki hücre döngüsü dağılımını gösteren histogram.

Tablo 4.14. Flurbiprofenin HepG2 Hücrelerinde Apoptotik Etkileri ve Hücre Döngüsü Analizleri.

Konsantrasyon	% G0/G1	% Sentez	% G2/M	% Apoptoz
Negatif kontrol	25	64	11	0
5 µM FB	24	46	30	0
10 µM FB	44	19	37	0
25 µM FB	44	13	43	0
50 µM FB	35	41	24	0
100 µM FB	37	50	13	0
200 µM FB	37	20	43	0
250 µM FB	28	50	22	0
500 µM FB	23	52	25	0
750 µM FB	37	20	43	0
1000 µM FB	35	28	37	0
1500 µM FB	38	32	30	0
2000 µM FB	38	28	34	0
2500 µM FB	32	32	36	0
3000 µM FB	38	18	44	0



Şekil 4.22. Fluriprofenin HepG2 Hücrelerindeki Apoptotik Etkileri ve Hücre Döngüsü Analizleri.

5. TARTIŞMA

İnfeksiyonların, inflamasyonların ve otoimmün hastalıkların kanserle ilişkisi ve kanser öncesi lezyon gelişiminin inflamasyon varlığıyla güçlü bağlantısı son zamanlarda üzerinde durulan bir konudur. Örneğin; pankreatit varlığının pankreas kanseri riskini 10-20 kat artırdığını, ülseratif kolit varlığının kolorektal kanseri riskini % 25 oranında arttırdığını ve prostatit varlığının prostat kanseri riskini yaklaşık % 14 oranında arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (26, 198).

İnflamasyon ve kanser arasındaki bu bağlantı, NSAİ'ler gibi antiinflamatuvar ilaçların antineoplastik aktiviteye sahip olabilecekleri fikrini desteklemektedir (26). *İn vitro* ve *in vivo* yapılan bir çalışmada flurbiprofenin over kanser hücre hattında apoptozu indüklediği, *in vivo* olarak da tümör oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (199). Aynı zamanda özellikle aspirin ile yapılan epidemiyolojik çalışmalar, uzun dönem düşük doz NSAİ ilaç kullanımının bazı kanser türlerinin gelişmesini önlediğini göstermektedir (200). Örneğin, 2918 hasta ile yapılan bir çalışmada günlük aspirin kullanan hastalarda polip oluşma oranının aspirin kullanmayanlara göre daha az olduğu gösterilmiştir (201). Yine başka bir çalışmada düzenli NSAİ ilaç kullanımının kolorektal kanser insidansında azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (202).

Bu tez çalışması kapsamında, sıklıkla kullanılan bir NSAİ ilaç olan flurbiprofenin insan karaciğer kanser hücre hattı ve insan rahim ağzı kanser hücre hattında, son dönemde üzerinde durulan bir konu olan antikanser etkisi incelenmiştir. Öncelikle sitotoksisite deneyi ile hücre canlılığında azalmaya sebep olan ve hücrelere toksik olan dozlar ile maruziyet süreleri değerlendirilmiştir. Daha sonra genotoksisite çalışması ile toksik olmayan dozların hücrelerde gen düzeyinde bir hasar oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Son olarak RT-PCR analizleri ile hücrelerde apoptotik ve anti-apoptotik gen düzeyleri incelenerek erken apoptoz, akım sitometri cihazı ile de geç apoptoz ve hüce döngüsü değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda HeLa hücrelerinde MTT yöntemiyle elde edilen sitotoksisite bulgularında 24 saatlik maruziyet süresinde IC_{50} dozu 2594 µM, 48 saatlik maruziyet süresinde 990 µM ve 72 saatlik maruziyet süresinde ise 907 µM olarak bulunmuştur. HepG2 hücrelerinde ise IC_{50} değerleri sırasıyla 2904 µM, 1234 µM ve 633 µM olarak

bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde her iki hücre hattında da doza bağımlı hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. Çalışılan iki hücre hattı kıyaslandığında, HepG2 hücre hattının Hela hücre hattına göre daha dirençli olduğu, fakat daha uzun süre maruziyette HeLa hücre hattının daha dirençli olduğu gözlenmiştir.

Literatürleri incelediğimizde flurbiprofen ve türevleri ile farklı hücre hatlarında yapılan sitotoksisite çalışmalarındaki sonuçlar ile kendi çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların benzer olduğu görülmüştür. GH4C1 ve primer hipofiz adenoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada, 72 saatlik *R*-flurbiprofen maruziyeti sonucu IC_{50} dozları sırasıyla 0,5 mM ve 0,4 mM olarak bulunmuştur (203). Bu çalışmadaki hücre hatlarının bizim çalışmamızdaki HepG2 hücre hattı ile elde edilen IC_{50} doz sonuçlarıyla daha çok benzerlik gösterdiği, yine de çalıştığımız hücre hatlarına göre daha az dirençli olduğu görülmektedir. Yapılan başka bir çalışmada 0-250 µM doz aralığında flurbiprofenin, üç farklı mezotelyoma hücre hattında ve COX-2 pozitif A549 akciğer kanser hücre hattında MTT analizi yapılmıştır, 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetler çalışılmış ve en etkin maruziyet süresi bizim çalışmamızla da tutarlı olarak 72 saat olarak bulunmuştur. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MSTO-211H ve NCI-H2452 hücrelerinde IC_{50} dozları sırasıyla 155 µM ve 152 µM olarak bulunmuş, diğer mezotelyoma hücre hattında ve akciğer hücre hattında IC_{50} dozları çalışılan doz aralığında bulunamamıştır (204). Over, kolon, mesane, prostat, nöroblastoma, glioblastoma, prostat, skuamoz kanser hücre hatlarında birçok NSAİ ilaç ile yapılan bir başka çalışmada ise 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda *R*-flurbiprofenin hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı en düşük doz 500 µM olarak bulunmuştur (8). King ve ark. (21)'nın yaptığı bir çalışmada 24 saatlik inkübasyon sonrası beyin tümör hücrelerinde hücre büyümesindeki artışta inhibisyon görülmüş, 48 saatlik inkübasyonda bu inhibisyon daha da beilrginleşmiş ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 400 µM flurbiprofenin hücre büyümesini tamamen durdurduğu gözlenmiştir. İnsan primer kondrosit kültüründe yapılan bir başka çalışmada 1-1000 µM dozlarında flurbiprofene 24, 48 ve 72 saat maruz bırakılan hücrelerde doza ve zamana bağlı olarak hücre ölümünde artış gözlenmiştir (205).

Tez kapsamında çalışılan hücre hatları ile yapılan diğer çalışmaları incelediğimizde, He ve ark. (206), 10 µg/mL flurbiprofenin 1, 4 ve 48 saatlik maruziyetleri sonucunda HeLa hücrelerinde koloni oluşturma yeteneğini azalttığını gözlemlemişlerdir. Serviks kanser modeli oluşturulmuş fareler üzerinde yapılan *in vivo* bir çalışmada ise flurbiprofen aksetil kullanılmış, tümörlerdeki proliferasyonu ve PGE_2 oluşumunu inhibe ettiği gözlenmiştir (207). Vasconcelos ve ark. (208) ise flurbiprofenin nanopartikül formlarını HeLa ve HepG2 hücrelerinde çalışmışlardır ve nanopartikül formlarının ilaç permeabilitesini artırdığını göstermişlerdir

Flurbiprofenin toksik etkilere karşı koruyuculuğunun araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur. Zhao ve ark. (209)'nın yaptıkları bir çalışmada insan nöroblastoma hücre hatlarında MTT ve XTT yöntemleriyle tarenflurbil (*R*-flurbiprofen)'in H_2O_2 ile indüklenmiş hücre hasarına karşı etkisi çalışılmış ve tarenflurbilin bu toksisiteyi azalttığı gözlenmiştir. Yine bir kombinasyon çalışmasında insan T lenfosit hücrelerinde benzokinon toksisitesine karşı flurbiprofen ve sodyum diklofenak ile çalışılmış ve ilaçların hücrelerde benzokinon toksisitesine karşı koruyucu oldukları saptanmıştır (210). Radyosensitizerlere karşı flurbiprofenin koruyucu etkisi olduğu da yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (211).

Literatürleri incelediğimizde, flurbiprofenin genotoksisitesi ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Literatürdeki bu boşluğu doldurmak amacıyla yaptığımız genetik toksisite çalışmasında, 48 saatlik maruziyet süresi sonunda HeLa ve HepG2 hücrelerinde DNA hasarı *COMET* yöntemi ile çalışılmış ve DNA hasarı; DNA kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti şeklinde değerlendirilmiştir. Flurbiprofen dozları; 5 µM, 50 µM, 125 µM, 250 µM ve 500 µM olarak seçilmiştir. Her iki hücrede de her üç parametreye göre negatif kontrol ile kıyaslandığında genel olarak doza bağımlı bir şekilde hücrelerde DNA hasarı anlamlı bulunmuştur.

Flurbiprofen ile yapılan diğer genotoksisite çalışmaları da mevcuttur. Timocin ve ark. (212)'nın yaptıkları bir çalışmada 10, 20, 30 ve 40 µg/mL (40, 80, 120, 160 µM) flurbiprofene 24 ve 48 saat süre ile maruz bırakılan insan kültür lenfositlerinde *SCE*, *CA* ve sitokinez bloklu mikroçekirdek (*CBMN*) yöntemleri kullanılarak genotoksisite değerlendirilmiş ve bu testler sonucunda genotoksisite anlamlı bulunmamıştır. Timocin

ve Ila (213) başka bir çalışmada ise ratlara flurbiprofen uygulayıp 12 ve 24 saat maruz bırakarak kemik iliği hücrelerinde *CA* testi ile genotoksisite değerlendirmişler ve anlamlı bir kromozom aberasyonu gözlememişlerdir. Başka bir çalışmada iki hafta flurbiprofen kullanan hastalardan periferal kan örnekleri alınarak *SCE* yöntemiyle genotoksisite değerlendirilmiş ve genotoksik etki tespit edilmemiştir (214). Yine yapılan bir kombinasyon çalışmasında flurbiprofen ve roksitromisin birlikte uygulandığında insan kültür lenfositlerinde anlamlı bir genotoksik etki göstermemiştir, ayrıca flurbiprofenin H_2O_2 etkisine karşı DNA'yı koruyucu olduğu gösterilmiştir (215).

Elde ettiğimiz sonuçlar ile benzerlik gösteren farklı NSAİ ilaçlar ile yapılan genetik toksisite çalışmaları da mevcuttur. Tripathi ve ark. (216)'nın yaptıkları bir çalışmada ibuprofenin farelerin kemik iliği hücrelerinde oluşturduğu genotoksisite *CA* testiyle ölçülmüş ve ibuprofenin doza bağımlı bir şekilde genotoksisiteyi indüklediği gözlenmiştir. Bunu destekleyen bir tez çalışmasında ise, aspirin ve ibuprofenin *bulk* ve nano formalarının hematolojik kanserli hastaların lenfositlerinde *COMET* ve *MN* yöntemleri ile genotoksisiteleri değerlendirilmiş ve genotoksisitenin ilaçlar ile indüklendiği gösterilmiştir. Ayrıca ilaçların nanopartikül formlarında genotoksik etkinin daha az olduğu da bildirilmiştir (217).

Elde ettiğimiz sonuçlar ile farklılık gösteren diğer NSAİ ilaçlarla yapılan genotoksisite çalışmaları da mevcuttur. Öztürk ve ark. (218) selektif COX-2 inhibitörü olan meloksikam ve etodolak ve selektif COX-2 inhibitörü olmayan naproksen ile çalışmışlardır. Gönüllülerden aldıkları periferik kanlara 24 saat süre ile ilaç uygulamışlardır. Sonuçta ölçülen *SCE* miktarında anlamlı bir artış gözlememişlerdir. İbuprofen, ketoprofen ve naproksen ile yapılan başka bir çalışmada ise üç farklı Salmonella suşunda *Ames* testi ile mutajenite çalışılmış ve *in vivo* olarak fare kemik iliği hücresinde *SCE* yöntemiyle değerlendirilmiştir. Üç ilaç için de mutajenite sonuçları negatif çıkarken *SCE* yöntemi ile değerlendirilen genotoksik etkide hafif bir artış görüldüğü belirtilmiştir (219). 48 hasta ile yapılan bir çalışmada hastalar ibuprofen, ketoprofen, naproksen, indometazin ve asetil salisilik asit ile iki hafta tedavi edilmiştir. Maruziyetten önce ve sonra kültür lenfositlerde *SCE* miktarı ölçülmüş ve anlamlı bir artış gözlenmemiştir (220). İbuprofen ve aspirinin iki formunun (*bulk*/ambalajlanmamış

ve nano) kullanıldığı bir çalışmada *COMET* ve *CBMN* yöntemleriyle genotoksisite değerlendirilmiştir. Meme kanseri olan ve sağlıklı gönüllülerin lenfositlerinde DNA hasarı ölçülmüştür. Kanserli hastaların lenfositlerinde ilaçların her iki formları ile de DNA hasarında azalma gözlenirken sağlıklı hastalarda böyle bir etkiye rastlanmamıştır (221).

Sonuç olarak, flurbiprofenin genotoksisite çalışmalarının oldukça sınırlı ve elde edilen bulguların da farklı olması, bu konuda daha fazla araştırmaların yapılmasının gerekli olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda 48 saat süresince 5, 50, 125, 250 ve 500 µM flurbiprofen maruziyeti sonucu HeLa ve HepG2 hücrelerinde erken apoptoz RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. p53, Bax, BcL-2, kaspaz-3, kaspaz-9 ve survivin genlerinin ekspresyonları ölçülmüştür. Geç apoptoz ise geniş doz aralığında flurbiprofene maruz bırakılan hücrelerde 48 saatlik inkübasyon sonucu akım sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre HeLa hücrelerinde; p53 ve Bax ekspresyonunun en düşük doz haricinde anlamlı olarak arttığı, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonlarının bütün dozlarda anlamlı olarak arttığı, BcL-2 ekspresyonundaki değişiklerin anlamlı olmadığı, survivin ekspresyonunun ise yüksek dozlarda anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Akım sitometri sonuçlarına bakıldığında ise her iki hücrede de hücre popülasyonları prolifere özellik göstermiş ve RT-PCR uygulanan dozlarda akım sitometride apoptoz bulguları gözlenmemiştir. HeLa hücrelerinde yalnızca 1500 µM dozda yüksek oranda apoptoz görülmüştür. Yine HeLa hücrelerinde kontrol grubuna göre dozlanan gruplarda genel olarak G_0/G_1 fazında artma, S fazında azalma olduğu belirlenmiştir.

Her iki hücrede de RT-PCR çalışmaları sonucunda apoptotik gen ifadeleri artarken antiapoptotik gen ifadelerinin azaldığı, Bax/BcL-2 oranının arttığı gözlenmiştir. Buna karşılık akım sitometri sonuçlarına göre ortak olan konsantrasyonlarda apoptotiz görülmemesi, hücrelerde apoptozun erken evrede olduğuna işaret etmektedir.

Flurbiprofen türevleri ile yapılan bir çalışmada insan epidermal kanser hücrelerinde (A-431) 24 saatlik maruziyet sonucu ilaçların apoptotik etkileri incelenmiştir. Akım sitometride hücrelerin G_0/G_1 fazında yığılma gösterdikleri ve

apoptotik hücre popülasyonunun arttığı gözlenmiştir. Ayrıca DAPI boyama ile gözlenen floresan mikroskop bulguları da apoptotik morfoloji göstererek akım sitometri sonuçlarını doğrulamıştır (222). Flurbiprofenin de içinde bulunduğu bir grup NSAİ ilaç ile yapılan başka bir çalışmada kolon, prostat, mesane, skuamoz, over, nöroglioma ve nöroblastoma kanser hücrelerinde RT-PCR sonuçları tümör süpresör gen ekspresyonunun arttığını ve apoptozun indüklendiğini göstermektedir (8). Bu çalışmaların aksine bir çalışmada flurbiprofenin BcL-2/Bax oranını artırıp beyin dokusundaki apoptozu azaltarak iskemi/reperfüzyona karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (223). Yine buna benzer bir çalışmada flurbiprofen aksetilin apoptozu baskılayarak ve inflamasyonu azaltarak sıçanlarda serebral iskemi/reperfüzyon hasarını hafiflettiği gözlenmiştir (224). Fu ve ark.(225) yaptıkları bir çalışmada ise flurbiprofenin sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu inhibe ederek fareleri hepatik iskemiden koruduğundan bahsetmişlerdir.

Grosch ve ark. (226)'nın yaptıkları bir çalışmada, flurbiprofen enantiyomerlerinin 300-1000 µM arası konsantrasyonlarına 24 saat maruz bırakılan üç farklı kolon kanseri hücre hattında akım sitometri sonuçlarına göre hücre döngüsünün subG1 fazında yığılma gözlendiği, yani proliferasyonun engellendiği ve apoptozun doza bağımlı bir şekilde indüklendiği gözlenmiştir. Akım sitometri sonuçlarının bizim çalışmamızla farklı olması, bu çalışmada kullanılan dozların daha yüksek olmasından veya hücre tipi farklılığından kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan *in vivo* bir çalışmada ise 18 haftalık maruziyet süresinde E-7869 (*R*-flurbiprofen) ile günlük dozlanan TRAMP farelerinde prostat kanser sıklığının azalabileceği veya kanser ilerlemesinin yavaşlayabileceği bildirilmişir (9).

Tez çalışmamız ile benzer olarak King ve Khalili (21), yaptıkları bir çalışmada 1-400 µM doz aralığında 24, 48, 72 ve 96 saat flurbiprofen ile muamele edilmiş farklı beyin tümör hücrelerinde akım sitometri sonuçlarına göre 24 ve 48. saatlerde kontrol grubuna göre flurbiprofen ile dozlanan gruplarda hücre siklusu dağılımında önemli bir fark görmezken, 72 ve 96. saatlerde kontrol grubuna göre farklılık oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bu sonuç da 48 saatten sonra geç apoptoz bulgularının açığa çıktığını doğrulamaktadır.

Flurbiprofen dışındaki NSAİ ilaçlar ile HeLa hücresinin de içinde bulunduğu rahim ağzı kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada, NSAİ ilaçların bu kanser türüne karşı potansiyel bir antineoplastik ajan olabileceklerinden bahsedilmiştir (227). Aspirin ile yapılan başka bir çalışmada 1,2 ve 3 mM aspirin 48 saat süre ile HeLa TG hücrelerine uygulanmıştır. Morfolojik açıdan apoptoz görülmüş ve akım sitometri ile de doğrulanmıştır. Ayrıca kaspaz-3 protein miktarında artma, BcL-2 protein miktarında azalma gözlenmiş, p53 düzeyinde ise herhangi bir değişiklik saptanamamıştır. (228). Yine aspirin ile sisplatin kombinasyonunu değerlendirilen bir çalışmada HeLa hücrelerinde Bax gen ifadesinin arttığı ve BcL-2 gen ifadesinin azaldığı gözlenmiş, apoptoz varlığı akım sitometri ile doğrulanmıştır. Aspirinin apoptotik etkisinin sisplatin ile kombinasyonu sonucu sinerjistik bir etkiyle arttığı bildirilmiştir (229). Selektif bir COX-2 inhibitörü olan selekoksib ile yapılan bir çalışmada selekoksibin HeLa hücrelerinde kaspaz-3 gen ve protein düzeyini artırdığı, survivin gen ve protein düzeyini ise azalttığı gözlenmiştir (230).

HepG2 hücrelerinde NSAİ ilaçların apoptotik etkilerine bakıldığında; aspirin ile yapılan bir çalışmada 48 saatlik inkübasyon sonucu kaspaz-3 aktivasyonunda ve sitokrom c salınımda artma, BcL-2 aktivasyonunda azalma gözlenmştir. Ayrıca akım sitometride hücrelerin G0/G1 fazında birikim gösterdiği, dolayısıyla apoptoza gittiği gözlenmiştir (231). Yine aspirin ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* bir çalışmada HepG2 hücrelerinde kaspaz-3,kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitelerinin arttığı, FasL, Fas ifade düzeylerinin ve sitokrom c salınımının indüklendiği dolayısıyla apoptozun hem ekstrinsik hem intrinsik yoldan tetiklendiği tespit edilmiştir. Ayrıca *in vivo* deneyle de farelere 7 hafta boyunca günlük uygulanan aspirinin tümör gelişimini engellediği gösterilerek sonuçlar desteklenmiştir (232). HepG2, HeLa ve başka kanser hücrelerinin de içinde bulunduğu bir çalışmada 24, 48, 72, 96 saatlik maruziyetlerde naproksenin antikanser etkileri incelenmiş ve en belirgin etki 96 saat maruziyet sonucu görülmüştür. p53, kaspaz-3 gen ifadelerinde görülen artma ve survivin gen ifadesinde, hücre proliferasyonunda, hücre canlılığında görülen azalma naproksenin antikanser etkileri olduğunu göstermiştir (233). Sulindak, selekoksib, indometazin, diklofenak, NS-398 gibi

birçok NSAİ ilaçla yapılan çalışmalarda HepG2 hücrelerinde apoptoz varlığından bahsedilmiştir (234-239).

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar genel olarak incelendiğinde; flurbiprofenin HeLa ve HepG2 hücre hatlarında sitotoksik olmayan dozlarda yapılan genotoksisite ve apoptoz çalışmalarına göre flurbiprofenin her iki hücre hattında da doza bağımlı olarak DNA kırıklarına sebep olduğu ve hücreleri apoptoza yönlendirdiği gözlenmiştir. Apoptotik gen düzeylerindeki artış, antiapoptotik gen düzeylerindeki azalış ve dolayısıyla Bax/BcL-2 oranındaki yükselme, erken apoptoz bulguları olarak karşımıza çıkmaktadır. Akım sitometri analizi sonucunda gen düzeylerinin incelendiği flurbiprofen dozlarında apoptoza giden hücre popülasyonunun görülmemesi ise geç apoptozun gözlenmediğini göstermektedir.

RT-PCR sonuçlarına göre; Bax, kaspaz-9, kaspaz-3 gen ifadelerinin yükselmesi ve BcL-2 gen ifadesinin azalması, bu proteinler hücre içi yolakta rol aldıklarından apoptozun hücre içi yolak ile geliştiğini göstermektedir. Tümör baskılayıcı gen olan p53 gen ifadesinin DNA hasarına karşı arttığı ve survivin gen ifadesindeki azalmanın da yine hücre içi yolakla ve p53 gen ifadesinin artmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Her iki hücre hattı karşılaştırılacak olursa; sitotoksisite verilerine göre 24 ve 48 saatlik maruziyetlerde IC_{50} dozunun HepG2 hücre hattında daha yüksek, 72 saatlik maruziyette ise HeLa hücre hattında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Fakat doza bağımlı yüzde canlılık oranları iki hücre hattında birbirine yakın olduğundan dolayı genotoksisite ve apoptoz çalışmaları aynı dozlar seçilerek yapılmıştır. Genotoksisite ve apoptoz çalışmaları sonuçlarına bakıldığında ise her iki hücre hattının hemen hemen yakın sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, her iki hücre hattında da *COMET* analizi sonucunda gen hasarı ve RT-PCR analizi sonucunda erken apoptoz bulguları gözlenmiş, akım sitometri analizi sonucunda ise geç apoptoz bulguları gözlenmemiştir. 48 saatlik maruziyette her iki hücre grubunun da bu maruziyet süresinde apoptoza girdiği ve geç apoptoz bulguları gözlenemediği için hücrelerin henüz apoptoz sürecinin geç evresine ilerlemediği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında çalıştığımız HeLa ve HepG2 hücrelerinde flurbiprofenin *COMET* analizi sonucu doza bağımlı olarak DNA kırıklarına sebep olduğu, RT-PCR analizi sonucu apoptotik gen ifadelerinin arttığı ve antiapoptotik gen ifadelerinin azaldığı, akım sitometri sonucunda ise hücrelerin genel prolifere hücre popülasyonu gösterdikleri görülmüştür. 48 saatlik maruziyette hücrelerin apoptoz döngüsüne girdikleri tespit edilmiştir. Kaspaz 9, Bax ve BcL-2 gen düzeylerinde gözlenen değişimler, apoptozun hücre içi yolak üzerinden ilerlediğini göstermiştir.

Literatürler incelendiğinde NSAİ ilaçların sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerinin son zamanlarda önem kazandığı, daha çok mekanizma aydınlatılmasına dayanan moleküler çalışmaların ön plana çıktığı görülmektedir. Hala birçok NSAİ ilacın antikanser etki mekanizması aydınlatılabilmiş değildir. Bu ilaçların neoplastik hücre büyümesini ve çoğalmasını apoptozu indükleyerek sağladığının bilindiği fakat mekanizmaları tam olarak anlaşılamadığı için bu konu ile ilgili geniş bir araştırmaya gerek duyulmaktadır (77). Flurbiprofen dışındaki diğer NSAİ ilaçlarla yapılan çalışmaların ise elde ettiğimiz sonuçlar ile benzer olduğu görülmekte fakat flurbiprofenle ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Özellikle genotoksisite çalışmaları sınırlıdır ve çelişkili sonuçlar sözkonusudur, bu nedenle daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar olarak sıklıkla kullanılan bir profen grubu NSAİ ilaç olan flurbiprofenin hücre proliferasyonunu engellediği gözlenmiştir. Bu bilgi ve bulgular ışığında kemoterapötik ilaçların aksine daha az yan etki potansiyeli olan, daha ucuz ve kolay elde edilebilir flurbiprofenin karaciğer ve rahim ağzı kanser olgularında potansiyel bir antiproliferatif ajan olabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Tsutsumi S, Gotoh T, Tomisato W, Mima S, Hoshino T, Hwang H ve ark. Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. Cell Death Differ. 2004;11(9):1009-16.

2. Kalantar M, Rezaei M, Moghimipour E, Bavarsad N, Kalantari H, Varnaseri G ve ark. Evaluation of Apoptosis Induced by Celecoxib Loaded Liposomes in Isolated Rat Hepatocytes. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2015;10(3).

3. King Jr JG, Khalili K. Inhibition of human brain tumor cell growth by the anti-inflammatory drug, flurbiprofen. Oncogene. 2001;20(47):6864.

4. Fabbri F, Brigliadori G, Ulivi P, Tesei A, Vannini I, Rosetti M ve ark. Pro-apoptotic effect of a nitric oxide-donating NSAID, NCX 4040, on bladder carcinoma cells. Apoptosis. 2005;10(5):1095-103.

5. Agrawal R, Lee CS, Gonzalez-Lopez JJ, Khan S, Rodrigues V, Pavesio C. Flurbiprofen: a nonselective cyclooxygenase (COX) inhibitor for treatment of noninfectious, non-necrotizing anterior scleritis. Ocul Immunol Inflamm. 2016;24(1):35-42.

6. Fecker LF, Stockfleth E, Braun FK, Rodust PM, Schwarz C, Köhler A ve ark. Enhanced death ligand-induced apoptosis in cutaneous SCC cells by treatment with diclofenac/hyaluronic acid correlates with downregulation of c-FLIP. J Investig Dermatol. 2010;130(8):2098-109.

7. Gómez-Lechón MJ, O'connor E, Castell JV, Jover R. Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes. Toxicol Sci. 2002;65(2):299-308.

8. Andrews P, Zhao X, Allen J, Li F, Chang M. A comparison of the effectiveness of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives against cancer cells in vitro. Cancer Chemother Pharmacol. 2008;61(2):203-14.

9. Wechter WJ, Leipold DD, Murray ED, Quiggle D, McCracken JD, Barrios RS ve ark. E-7869 (R-flurbiprofen) inhibits progression of prostate cancer in the TRAMP mouse. Cancer Res. 2000;60(8):2203-8.

10. Albano F, Arcucci A, Granato G, Romano S, Montagnani S, De Vendittis E ve ark. Markers of mitochondrial dysfunction during the diclofenac-induced apoptosis in melanoma cell lines. Biochimie. 2013;95(4):934-45.

11. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002;420(6917):860.

12. Saito T, Tamura D, Asano R. Usefulness of selective COX-2 inhibitors as therapeutic agents against canine mammary tumors. Oncol Rep. 2014;31(4):1637-44.

13. Hasegawa K, Torii Y, Ishii R, Oe S, Kato R, Udagawa Y. Effects of a selective COX-2 inhibitor in patients with uterine endometrial cancers. Arch Gynecol Obstet. 2011;284(6):1515-21.

14. Banno K, Iida M, Yanokura M, Irie H, Masuda K, Kobayashi Y ve ark. Drug repositioning for gynecologic tumors: a new therapeutic strategy for cancer. Sci World J. 2015;2015.

15. Liu R, Xu K-P, Tan G-S. Cyclooxygenase-2 inhibitors in lung cancer treatment: Bench to bed. Eur J Pharmacol. 2015;769:127-33.

16. Hiľovská L, Jendželovský R, Fedoročko P. Potency of non-steroidal anti-inflammatory drugs in chemotherapy. Mol Clin Oncol. 2015;3(1):3-12.

17. Rai N, Sarkar M, Raha S. Piroxicam, a traditional non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) causes apoptosis by ROS mediated Akt activation. Pharmacol Rep. 2015;67(6):1215-23.

18. Derry S, Wiffen P, Häuser W, Mücke M, Tölle T, Bell R ve ark. Oral nonsteroidal anti-inflammatory drugs for fibromyalgia in adults. Cochrane Lib. 2016.

19. Arantes-Rodrigues R, Pinto-Leite R, Ferreira R, Neuparth MJ, Pires MJ, Gaivão I ve ark. Meloxicam in the treatment of in vitro and in vivo models of urinary bladder cancer. Biomed Pharmacother. 2013;67(4):277-84.

20. Özbudak H, ÜNAL AZ, SABUNCUOĞLU S. Gebelikte non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların kullanımının değerlendirilmesi. Marmara Pharmaceutical Journal. 2016;20: 64-71

21. Jr JGK, Khalili K. Inhibition of human brain tumor cell growth by the anti-inflammatory drug, flurbiprofen. Oncogene. 2001;20:6864-70.

22. Agrawal A, Fentiman I. NSAIDs and breast cancer: a possible prevention and treatment strategy. Int J Clin Pract. 2008;62(3):444-9.

23. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. Cancer Lett. 2004;215(1):1-20.

24. Weksler BB. Prostanoids and NSAIDs in cardiovascular biology and disease. Curr Atheroscler Rep. 2015;17(7):41.

25. Şentürk T. Non-Steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ). İç Hastalıkları Dergisi. 2014;2:490-5.

26. Wang D, DuBois RN. Prostaglandins and cancer. Gut. 2006;55(1):115-22.

27. Ozen G, Norel X. Prostanoids in the pathophysiology of human coronary artery. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2017.

28. Kayaalp SO, Melli M. Non-Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar. Kayaalp SO, editör. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd Şti; 2005.

29. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. J Natl Cancer Inst. 2002;94(4):252-66.

30. Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and-2. Adv Immunol. 1996;62:167-215.

31. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nature. 1971;231(25):232-5.

32. Jana N. NSAIDs and apoptosis. Cell Mol Life Sci. 2008;65(9):1295-301.

33. Piazza GA, Keeton AB, Tinsley HN, Whitt JD, Gary BD, Mathew B ve ark. NSAIDs: old drugs reveal new anticancer targets. Pharmaceuticals. 2010;3(5):1652-67.

34. Chandrasekharan N, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS ve ark. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci. 2002;99(21):13926-31.

35. Akıncı Tan A. Antiinflamatuvar ilaçların akılcı kullanımı. Dahili Tıp Bilimleri Dergisi. 2005;12:38-46.

36. Flurbiprofen [internet]. [Erişim tarihi 6 Mayıs 2018]. Erişim adresi: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/flurbiprofen#section=Top.

37. Brogden R, Heel R, Speight T, Avery G. Flurbiprofen: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases. Drugs. 1979;18(6):417-38.

38. McCormick D, Moon R. Inhibition of mammary carcinogenesis by flurbiprofen, a non-steroidal antiinflammatory agent. Br J Cancer. 1983;48(6):859.

39. Grösch S, Schilling K, Janssen A, Maier TJ, Niederberger E, Geisslinger G. Induction of apoptosis by R-flurbiprofen in human colon carcinoma cells: involvement of p53. Biochemical pharmacology. 2005;69(5):831-9.

40. Flurbiprofen [internet]. [Erişim tarihi 8 Mayıs 2018]. Erişim adresi: https://www.webmd.com/drugs/2/drug-13459/flurbiprofen-oral/details.

41. Flurbiprofen [internet]. [Erişim tarihi 8 Mayıs 2018]. Erişim adresi: https://www.drugs.com/sfx/flurbiprofen-side-effects.html.

42. Davies NM. Clinical pharmacokinetics of flurbiprofen and its enantiomers. Clin Pharmacokinet. 1995;28(2):100-14.

43. Maroof K, Zafar F, Ali H, Naveed S. Flurbiprofen: A potent pain reliever. J Bioequiv Availab. 2015;7:056-8.

44. Cardoe N, De-Silva M, Glass R, Risdall P. Serum concentrations of flurbiprofen in rheumatoid patients receiving flurbiprofen over long periods of time. Curr Med Res Opin. 1977;5(1):21-5.

45. Üstünes, L. Rx Media PharmaPharma. [internet]. 2018. [Erişim tarihi 4 Mayıs 2018].

46. Interaction [internet]. [Erişim tarihi 4 Mayıs 2018]. Erişim adresi: https://www.drugs.com/drug-interactions/flurbiprofen.html.

47. Greenblatt DJ, Moltke LL, Perloff ES, Luo Y, Harmatz JS, Zinny MA. Interaction of flurbiprofen with cranberry juice, grape juice, tea, and fluconazole: in vitro and clinical studies. Clin Pharmacol Ther. 2006;79(1):125-33.

48. Altunkaynak B, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir. Tıp Araştırmaları Dergisi. 2008;6(2):93-104.

49. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. Toraks Dergisi. 2001;2(1):91-5.

50. Solakoğlu Z. Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. Klinik Gelişim. 2009;22(3):20-5.

51. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.

52. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;26(4):239.

53. AKŞİT H, BİLDİK A. Apoptozis. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008;19(1):55-63.

54. ERÖZ R, KARATAŞ A, ALKOÇ OA, BALTACI D, OKTAY M, ÇOLAKOĞLU S. Apoptozis hakkında bilinenler (literatür taraması). Duzce Medical Journal. 2012;14(2).

55. Law M, Elmore S. Mechanisms of Cell Death. Smart RC, Hodgson E, editors. Molecular and Biochemical Toxicology. New Jersey: John Wiley & Sons;2008.

56. TOMATIR AG. Apoptoz: Programlı hücre ölümü. T Klin J Med Sci. 2003;23(6):499-508.

57. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K ve ark. Molecular Biology of THE CELL. 6th ed. New York: Garland Science; 2015.

58. Suliman FA, Khodeer DM, Ibrahiem A, Mehanna ET, El-Kherbetawy MK, Mohammad HM ve ark. Renoprotective effect of the isoflavonoid biochanin A against cisplatin induced acute kidney injury in mice: Effect on inflammatory burden and p53 apoptosis. Int Immunopharmacol. 2018;61:8-19.

59. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An ER stress-specific caspase cascade in apoptosis: cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. J Biol Chem. 2002;13;277(37):34287-94.

60. ATAGÜN G, Zafer E, GÜRKANLI İ. Apoptoziste mitokondrinin rolü. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 2011(2):9-53.

61. Li J, Han Y, Zhou D, Zhou Y, Ye M, Wang H ve ark. Downregulation of Survivin Gene Expression Affects Ionizing Radiation Resistance of Human T98 Glioma Cells. Cell Mol Neurobiol. 2018:1-8.

62. Lyu H, Huang J, He Z, Liu B. Epigenetic mechanism of survivin dysregulation in human cancer. Sci China Life Sci. 2018:1-7.

63. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. J Biol Chem. 2001;277(5):3247-57

64. Kim Y-S, Seol C-H, Jung J-W, Oh S-J, Hwang K-E, Kim H-J ve ark. Synergistic effect of sulindac and simvastatin on apoptosis in lung cancer A549 cells through AKT-dependent downregulation of survivin. Cancer Res Treat. 2015;47(1):90.

65. Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death. Apoptosis. 2017;22(2):306-23.

66. Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi. 2016;5(3):154-65.

67. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res. 1989;49(17):4682-9.

68. Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. Surg Oncol. 1997;6(3):133-42.

69. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science. 1998;281(5381):1322-6.

70. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S ve ark. Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. J Cell Biochem. 1996;60(1):23-32.

71. Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t (11; 14) chromosome translocation. Science. 1984;224(4656):1403-6.

72. Puthier D, Derenne S, Barillé S, Moreau P, Harousseau JL, Bataille R ve ark. Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells. Br J Haematol. 1999;107(2):392-5.

73. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC ve ark. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. Science. 1997;275(5302):967-9.

74. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu Rev Biochem. 2004;73(1):39-85.

75. Greenblatt M, Bennett WP, Hollstein M, Harris C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res. 1994;54(18):4855-78.

76. Nakagawa Y, Abe S, Kurata M, Hasegawa M, Yamamoto K, Inoue M ve ark. IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. Am J Hematol. 2006;81(11):824-31.

77. Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. Lancet Oncol. 2002;3(3):166-74.

78. Matsuhashi N, Nakajima A, Shinohara K, Oka T, Yazaki Y. Rectal cancer after sulindac therapy for a sporadic adenomatous colonic polyp. Am J Gastroenterol. 1998;93(11):2261.

79. Waddell WR, Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon. J Surg Oncol. 1983;24(1):83-7.

80. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Celano P, ark. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med. 1993;328(18):1313-6.

81. Nugent K, Farmer K, Spigelman A, Williams C, Phillips R. Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis. Br J Surg. 1993;80(12):1618-9.

82. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB ve ark. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med. 2000;342(26):1946-52.

83. Brown JR, DuBois RN. COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. J. Clin. Oncol. 2005;23(12):2840-55.

84. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, Dubois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology. 1994;107(4):1183-8.

85. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K ve ark. Expression of cyclooxygenase-1 and-2 in human colorectal cancer. Cancer Res. 1995;55(17):3785-9.

86. Alberts DS, Hixson L, Ahnen D, Bogert C, Einspahr J, Paranka N ve ark. Do NSAIDs exert their colon cancer chemoprevention activities through the inhibition of mucosal prostaglandin synthetase? J Cell Biochem. 1995;59(S22):18-23.

87. Piazza GA, Rahm ALK, Krutzsch M, Sperl G, Paranka NS, Gross PH ve ark. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. Cancer Res. 1995;55(14):3110-6.

88. Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L ve ark Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. Biochem Pharmacol. 1996;52(2):237-45.

89. Elder D, Halton DE, Hague A, Paraskeva C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. Clin. Cancer Res. 1997;3(10):1679-83.

90. Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. Proc Natl Acad Sci. 1998;95(2):681-6.

91. Rice PL, Goldberg RJ, Ray EC, Driggers LJ, Ahnen DJ. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation and induction of apoptosis by sulindac metabolites. Cancer Res. 2001;61(4):1541-7.

92. Williams C, Luongo C, Radhika A, Zhang T, Lamps L, Nanney L ve ark. Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. Gastroenterology. 1996;111(4):1134-40.

93. DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, Entingh AJ. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. Gastroenterology. 1996;110(4):1259-62.

94. Desai SJ, Prickril B, Rasooly A. Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inflammation Related to Cancer. Nutr Cancer. 2018;70(3):350-75.

95. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. Proc Natl Acad Sci. 2000;97(21):11280-5.

96. Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P. Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition implications for tumor necrosis factor-α apoptotic signaling. J Biol Chem. 2001;276(15):12035-40.

97. Hannun YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. Science. 1996;274(5294):1855-9.

98. Garg A, Aggarwal B. Nuclear transcription factor-κB as a target for cancer drug development. Leukemia. 2002;16(6):1053.

99. Yin M-J, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of IκB kinase-β. Nature. 1998;396(6706):77.

100. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. Science. 1994;265(5174):956-9.

101. Gu Q, Wang JD, Xia HH, Lin MC, He H, Zou B ve ark. Activation of the caspase-8/Bid and Bax pathways in aspirin-induced apoptosis in gastric cancer. Carcinogenesis. 2005;26(3):541-6.

102. Zimmermann KC, Waterhouse NJ, Goldstein JC, Schuler M, Green DR. Aspirin induces apoptosis through release of cytochrome c from mitochondria. Neoplasia. 2000;2(6):505-13.

103. Piqué M, Barragán M, Dalmau M, Bellosillo B, Pons G, Gil J. Aspirin induces apoptosis through mitochondrial cytochrome c release. FEBS Lett. 2000;480(2-3):193-6.

104. Ho CC, Yang X, Lee TL, Liao PH, Yang SH, Tsai CH ve ark. Activation of p53 signalling in acetylsalicylic acid-induced apoptosis in OC2 human oral cancer cells. Eur J Clin Invest. 2003;33(10):875-82.

105. Zhou XM, Wong BCY, Fan XM, Zhang HB, Lin MCM, Kung HF ve ark. Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak. Carcinogenesis. 2001;22(9):1393-7.

106. Dikshit P, Chatterjee M, Goswami A, Mishra A, Jana NR. Aspirin induces apoptosis through the inhibition of proteasome function. J Biol Chem. 2006;281(39):29228-35.

107. Bock JM, Menon SG, Goswami PC, Sinclair LL, Bedford NS, Domann FE ve ark. Relative non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) antiproliferative activity is mediated through p21-induced G1 arrest and E2F inhibition. Mol Carcinog. 2007;46(10):857-64.

108. Piazza GA, Rahm AK, Finn TS, Fryer BH, Li H, Stoumen AL ve ark. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. Cancer Res. 1997;57(12):2452-9.

109. Gao J, Liu X, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin induces apoptosis in human colon cancer cells through induction of oxidative stress. Proc Natl Acad Sci. 2005;102(47):17207-12.

110. Adachi M, Sakamoto H, Kawamura R, Wang W, Imai K, Shinomura Y. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and oxidative stress in cancer cells. Histol Histopathol. 2007;22(4):437-42.

111. Akçalı A. Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. Türk Onkoloji Dergisi. 2010;25(3):119-23.

112. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 7th ed. USA: John Wiley & Sons; 2015.

113. Langdon SP. Basic Principles of Cancer Cell Culture. Langdon SP, editör. Cancer cell culture. New Jersey: Springer; 2010.

114. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. Nat Rev Cancer. 2002;2(4):315.

115. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. Arch Pathol Lab Med. 2009;133(9):1463-7.

116. American Type Culture Collection [internet]. 2016. [Erişim tarihi 11 Eylül 2018]. Erişim adresi:https://www.lgcstandardsatcc.org/Products/All/CCL2.aspx#generalinformation.

117. American Type Culture Collection [internet].2016. [Erişim tarihi 11 Eylül 2018]. Erişim adresi https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-2.aspx#characteristics.

118. López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. Hum Pathol. 2009;40(10):1512-5.

119. Carney EW, Settivari R. Predictive toxicology: biological assay platforms. A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development: Elsevier; 2013. p. 777-806.

120. Renzulli C, Galvano F, Pierdomenico L, Speroni E, Guerra M. Effects of rosmarinic acid against aflatoxin B1 and ochratoxin-A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2). J Appl Toxicol: An International Journal. 2004;24(4):289-96.

121. Costa S, Schwaiger S, Cervellati R, Stuppner H, Speroni E, Guerra MC. In vitro evaluation of the chemoprotective action mechanisms of leontopodic acid against aflatoxin B1 and deoxynivalenol-induced cell damage. J Appl Toxicol. 2009;29(1):7-14.

122. Babich H, Sardanaand M, Borenfreund E. Acute cytotoxicities of polynuclear aromatic hydrocarbons determined in vitro with the human liver tumor cell line, HepG2. Cell Biol Toxicol. 1988;4(3):295-309.

123. Dehn P, White C, Conners D, Shipkey G, Cumbo T. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2004;40(5-6):172-82.

124. American Type Culture Collection [internet]. 2016. [Erişim tarihi 12 Eylül 2018]. Erişim adresi:https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx.

125. American Type Culture Collection [internet]. 2016. [Erişim tarihi 12 Eylül 2018]. Erişim adresi:https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx#characteristics.

126. Komissarova EV, Saha SK, Rossman TG. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. Toxicol Appl Pharmacol. 2005;202(1):99-107.

127. Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. Anal Biochem. 1989;179(1):1-7.

128. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. Int J Pharm. 2005;288(2):369-76.

129. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. J Immunol Methods. 1983;64(3):313-20.

130. Riss TL, Moravec RA. Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. Celis JE, editor. Cell Biology. Burlington: Elsevier; 2006.

131. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol Lett. 1985;24(2-3):119-24.

132. Tokur O, Aksoy A. In vitro sitotoksisite testleri. Harran Üniversitesi Vet Fakültesi Dergisi. 2017;6:112-8.

133. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55-63.

134. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. J. Neurochem. 1997;69(2):581-93.

135. Vinken M, Blaauboer BJ. In vitro testing of basal cytotoxicity: establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. Toxicol In Vitro. 2017;39:104-10.

136. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicol Lett. 2006;160(2):171-7.

137. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 1986;89(2):271-7.

138. Chapdelaine JM. MTT reduction-a tetrazolium-based colorimetric assay for cell survival and proliferation, Waverly: MAXlineTM; 2001. Aplication Note 5.

139. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochem. 2012;114(8):785-96.

140. Vellonen K-S, Honkakoski P, Urtti A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. Eur J Pharm Sci. 2004;23(2):181-8.

141. Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, Eichenlaub-Ritter U, Decordier I. Indirect mechanisms of genotoxicity. Toxicol Lett. 2003;140:63-74.

142. Mateuca R, Lombaert N, Aka P, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. Biochimie. 2006;88(11):1515-31.

143. Decordier I, Dillen L, Cundari E, Kirsch-Volders M. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. Mutagenesis. 2002;17(4):337-44.

144. Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V. Genetik toksisite testleri. TÜBAV Bilim Dergisi. 2011;4(3):221-9.

145. Zeiger E. History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. Environ Mol Mutagen. 2004;44(5):363-71.

146. Zeiger E. Genetic Toxicity Tests for Predicting Carcinogenicity. Choy WN, editor. Genetic toxicology and cancer risk assessment. New York: CRC Press; 2001.

147. Vural N. Toksikoloji. 3. Baskı. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. 2017.

148. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. Mol Biotechnol. 2004;26(3):249.

149. Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. Arch Toxicol. 2013;87(6):949-68.

150. Langie SA, Azqueta A, Collins AR. The comet assay: past, present, and future. Front Genet. 2015;6:266.

151. Ritter D, Knebel J. Genotoxicity testing in vitro–development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. Toxicol In Vitro. 2009;23(8):1570-5.

152. Dinçer Y, Kankaya S. DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2010;30(4):1365-73.

153. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, ve ark. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. Mutagenesis. 2003;18(1):45-51.

154. Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF, editors. DNA repair mechanisms. Colorado: Elsevier; 1978.

155. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun. 1984;123(1):291-8.

156. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988;175(1):184-91.

157. Azqueta A, Gutzkow KB, Priestley CC, Meier S, Walker JS, Brunborg G ve ark. A comparative performance test of standard, medium-and high-throughput comet assays. Toxicol In Vitro. 2013;27(2):768-73.

158. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H ve ark. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen. 2000;35(3):206-21.

159. Collins A, Dušinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S ve ark. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. Environ Mol Mutagen. 1997;30(2):139-46.

160. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutation Research/DNA Repair. 1996;363(2):89-96.

161. McKelvey-Martin V, Green M, Schmezer P, Pool-Zobel B, De Meo M, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. Mutat Res-Fund Mol M. 1993;288(1):47-63.

162. Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. Mutat Res Rev Mutat Res. 2000;463(1):13-31.

163. Tice RR, Strauss GH. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. Mutat Res Environ Mutagen Relat Subj. 1992;271(3):243-52.

164. Speit G, Schütz P, Bonzheim I, Trenz K, Hoffmann H. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. Toxicol Lett. 2004;146(2):151-8.

165. Ramos AA, Lima CF, Pereira-Wilson C. DNA damage protection and induction of repair by dietary phytochemicals and cancer prevention: what do we know? Chen C, editor. Selected Topics in DNA Repair. Portugal: InTech; 2011.

166. Domijan A-M, Želježić D, Kopjar N, Peraica M. Standard and Fpg-modified comet assay in kidney cells of ochratoxin A-and fumonisin B1-treated rats. Toxicology. 2006;222(1-2):53-9.

167. Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M. Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. Biochemistry. 1992;31(1):106-10.

168. O'Connor T, Graves R, De Murcia G, Castaing B, Laval J. Fpg protein of Escherichia coli is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role. Journal of Biological Chemistry. 1993;268(12):9063-70.

169. Olive PL, Frazer G, Banáth JP. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. Radiat Res. 1993;136(1):130-6.

170. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J ve ark. Global quantification of mammalian gene expression control. Nature. 2011;473(7347):337.

171. Kubista M, Stalberg A, Bar T. Light-up-probe-based real-time Q-PCR. Raghavachari R, Tan W, editors. Genomics and proteomics Technologies. San Jose: International Society for Optics and Photonics; 2001.

172. DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science. 1997;278(5338):680-6.

173. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB ve ark. Comprehensive identification of cell cycle–regulated genes of the yeast Saccharomyces cerevisiae by microarray hybridization. Mol Biol Cell. 1998;9(12):3273-97.

174. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996;6(10):986-94.

175. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev Mol Diagn. 2005;5(2):209-19.

176. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Nature Biotechnol. 1993;11(9):1026.

177. Kubista M. Emerging real-time PCR application. DDW:Drug Discovery World. 2008;9(3):57.

178. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Nature Biotechnol. 1992;10(4):413.

179. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 2000;25(2):169-93.

180. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc. 2006;1(3):1559.

181. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K ve ark. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006;27(2-3):95-125.

182. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. Turkiye Klinikleri J Med Sci. 2007;27(5):763-7.

183. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnol. 1996;14(3):303.

184. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA ve ark. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985;230(4732):1350-4.

185. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT ve ark. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988;239(4839):487-91.

186. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques. 2005;39(1):75-85.

187. Schafer K. The cell cycle: a review. Vet Pathol. 1998;35(6):461-78.

188. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif. 2003;36(3):131-49.

189. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A ve ark. Moleküler Hücre Biyolojisi. 6. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2011.

190. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. Science. 1994;266(5192):1821-8.

191. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. Cell Prolif. 2003;36(3):165-75.

192. Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. Mol Biotechnol. 1999;11(1):37-53.

193. Bakke AC. The principles of flow cytometry. Lab Medicine. 2001;32(4):207-11.

194. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clin Chem. 2000;46(8):1221-9.

195. Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. Curr Issues Mol Bİol. 2001;3:67-70.

196. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat Protoc. 2006;1(3):1458.

197. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. Curr Protoc Immunol. 2018;120(1):5.1. -5.1. 11.

198. Rayburn ER, Ezell SJ, Zhang R. Anti-inflammatory agents for cancer therapy. Mol Cell Pharmacol. 2009;1(1):29.

199. Duncan K, Uwimpuhwe H, Czibere A, Sarkar D, Libermann TA, Fisher PB ve ark. NSAIDs induce apoptosis in nonproliferating ovarian cancer cells and inhibit tumor growth in vivo. IUBMB life. 2012;64(7):636-43.

200. Singh R, Cadeddu R-P, Fröbel J, Wilk CM, Bruns I, Zerbini LF ve ark. The non-steroidal anti-inflammatory drugs Sulindac sulfide and Diclofenac induce apoptosis and differentiation in human acute myeloid leukemia cells through an AP-1 dependent pathway. Apoptosis. 2011;16(9):889.

201. Drew DA, Goh G, Mo A, Grady JJ, Forouhar F, Egan G ve ark. Colorectal polyp prevention by daily aspirin use is abrogated among active smokers. Cancer Causes & Control. 2016;27(1):93-103.

202. Cao Y, Nishihara R, Qian ZR, Song M, Mima K, Inamura K ve ark. Regular aspirin use associates with lower risk of colorectal cancers with low numbers of tumor-infiltrating lymphocytes. Gastroenterology. 2016;151(5):879-92. e4.

203. Liu JK, Patel SK, Gillespie DL, Whang K, Couldwell WT. R-flurbiprofen, a novel nonsteroidal anti-inflammatory drug, decreases cell proliferation and induces apoptosis in pituitary adenoma cells in vitro. J Neurooncol. 2012;106(3):561-9.

204. O'Kane SL, Eagle GL, Greenman J, Lind MJ, Cawkwell L. COX-2 specific inhibitors enhance the cytotoxic effects of pemetrexed in mesothelioma cell lines. Lung Cancer. 2010;67(2):160-5.

205. Ali Gumustas S, Isyar M, Topuk S, Yilmaz I, Oznam K, Onay T ve ark. Systematic evaluation of drug-loaded hydrogels for application in osteosarcoma treatment. Curr Pharm Biotechnol. 2016;17(10):866-72.

206. He B, Tong X, Wang L, Wang Q, Ye H, Liu B ve ark. Tramadol and flurbiprofen depress the cytotoxicity of cisplatin via their effects on gap junctions. Clin Cancer Res. 2009:1078-0432. CCR-09-811.

207. Lu J, Wang S, Chen G, Sun X, Li K. THE INVESTIGATION OF EFFECT OF FLURBIPROFEN AXETIL ON THE TISSUE GROWTH AND THE CONTENT OF PGE2 IN CERVICAL CANCER. Acta Pol Pharm. 2016;73(6):1649-52.

208. Vasconcelos A, Vega E, Pérez Y, Gómara MJ, García ML, Haro I. Conjugation of cell-penetrating peptides with poly (lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanoparticles improves ocular drug delivery. Int J Nanomedicine. 2015;10:609.

209. Zhao X, Rebeck GW, Hoe H-S, Andrews PM. Tarenflurbil protection from cytotoxicity is associated with an upregulation of neurotrophins. J Alzheimers Dis. 2008;15(3):397-407.

210. Flescher E, Snyder CA. Aspirin-like drugs can protect human T lymphocytes against benzoquinone cytotoxicity. Arch Toxicol. 1995;69(10):684-9.

211. Millar B, Jinks S, Powles T. Flurbiprofen, a non-steroid anti-inflammatory agent, protects cells against hypoxic cell radiosensitizers in vitro. Br J Cancer. 1981;44(5):733.

212. Timocin T, Ila HB, Dordu T, Husunet MT, Tazehkand MN, Valipour E ve ark. Assessment of in vitro genotoxic and cytotoxic effects of flurbiprofen on human cultured lymphocytes. Drug Chem Toxicol. 2016;39(3):338-43.

213. Timocin T, Ila HB. Investigation of flurbiprofen genotoxicity and cytotoxicity in rat bone marrow cells. Drug Chem Toxicol. 2015;38(3):355-60.

214. Kullich W, Klein G. Investigations of the influence of nonsteroidal antirheumatic drugs on the rates of sister-chromatid exchange. Mutat Res Lett. 1986;174(2):131-4.

215. Timocin T, Husunet MT, Valipour E, Norizadeh Tazehkand M, Celik R, Topaktas M ve ark. In vitro cytogenetic evaluation of the particular combination of flurbiprofen and roxithromycin. Drug Chem Toxicol. 2017;40(3):326-32.

216. Tripathi R, Pancholi SS, Tripathi P. Genotoxicity of ibuprofen in mouse bone marrow cells in vivo. Drug Chem Toxicol. 2012;35(4):389-92.

217. Normington C. Genotoxic effects of NSAIDs and hydrocortisone on bulk and nano forms in lymphocytes from patients with haematological cancers [Master thesis]. England: University of Bradford; 2017.

218. Öztürk S, Köseoglu BG, Koçak H, Palanduz S, Çefle K, Erkal H. In vitro effects of selective and non-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the frequency of sister chromatid exchanges. Drugs in R & D. 2004;5(6):327-30.

219. Philipose B, Singh R, Khan K, Giri A. Comparative mutagenic and genotoxic effects of three propionic acid derivatives ibuprofen, ketoprofen and naproxen. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 1997;393(1):123-31.

220. Ozkul Y, Erenmemisoglu A, Ekecik A, Saatci C, Ozdamar S, Demirtas H. Do non-steroidal anti-inflammatory drugs induce sister chromatid exchanges in T lymphocytes? J Int Med Res. 1996;24(1):84-7.

221. Dandah O, Najafzadeh M, Isreb M, Linforth R, Tait C, Baumgartner A ve ark. Aspirin and ibuprofen, in bulk and nanoforms: Effects on DNA damage in peripheral lymphocytes from breast cancer patients and healthy individuals. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2018;826:41-6.

222. Nath N, Liu X, Jacobs L, Kashfi K. Flurbiprofen benzyl nitrate (NBS-242) inhibits the growth of A-431 human epidermoid carcinoma cells and targets β-catenin. Drug Des Devel Ther. 2013;7:389.

223. Sun B, Chen L, Wei X, Xiang Y, Liu X, Zhang X. The Akt/GSK-3β pathway mediates flurbiprofen-induced neuroprotection against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. Biochem Biophys Res Commun. 2011;409(4):808-13.

224. Wu H, Tang C, Tai LW, Yao W, Guo P, Hong J ve ark. Flurbiprofen Axetil Attenuates Cerebral Ischemia Reperfusion Injury by Reducing Inflammation in a Rat Model of Transient Global Cerebral Ischemia Reperfusion. Biosci Rep. 2018;28(4):1-12

225. Fu H, Chen H, Wang C, Xu H, Liu F, Guo M ve ark. Flurbiprofen, a cyclooxygenase inhibitor, protects mice from hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting GSK-3β signaling and mitochondrial permeability transition. Mol Med. 2012;18(1):1128.

226. GrOsch S, Tegeder I, Schilling K, Maier TJ, Niederberger E, Geisslinger G. Activation of c-Jun-N-terminal-kinase is crucial for the induction of a cell cycle arrest in human colon carcinoma cells caused by flurbiprofen enantiomers. FASEB J. 2003;17(10):1316-8.

227. Soriano-Hernandez AD, Madrigal-Pérez D, Galvan-Salazar HR, Martinez-Fierro ML, Valdez-Velazquez LL, Espinoza-Gómez F ve ark. Anti-inflammatory drugs and uterine cervical cancer cells: Antineoplastic effect of meclofenamic acid. Oncol Lett. 2015;10(4):2574-8.

228. Kim KY, Seol JY, Jeon G-A, Nam MJ. The combined treatment of aspirin and radiation induces apoptosis by the regulation of bcl-2 and caspase-3 in human cervical cancer cell. Cancer Lett. 2003;189(2):157-66.

229. Yueling W, Hongmin Z, Lin L, Jiangfen W. Effect of aspirin alone or combined with cisplatin on human cervical carcinoma HeLa cells. Journal of Medical Colleges of PLA. 2010;25(1):11-8.

230. Fukada K, Takahashi-Yanaga F, Sakoguchi-Okada N, Shiraishi F, Miwa Y, Morimoto S ve ark. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting the expression of survivin in HeLa cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007;357(4):1166-71.

231. Raza H, John A, Benedict S. Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. Eur J Pharmacol. 2011;668(1-2):15-24.

232. Hossain MA, Kim DH, Jang JY, Kang YJ, Yoon J-H, Moon J-O ve ark. Aspirin induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells in a nude mouse xenograft model. Int J Oncol. 2012;40(4):1298-304.

233. Motawi TM, Bustanji Y, EL-Maraghy S, Taha MO, Al-Ghussein MA. Evaluation of naproxen and cromolyn activities against cancer cells viability, proliferation, apoptosis, p53 and gene expression of survivin and caspase-3. J Enzyme Inhib Med Chem. 2014;29(2):153-61.

234. Rahman MA, Dhar DK, Masunaga R, Yamanoi A, Kohno H, Nagasue N. Sulindac and exisulind exhibit a significant antiproliferative effect and induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. Cancer Res. 2000;60(8):2085-9.

235. Liu N-B, Peng T, Pan C, Yao Y-Y, Shen B, Leng J. Overexpression of cyclooxygenase-2 in human HepG2, Bel-7402 and SMMC-7721 hepatoma cell lines and mechanism of cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib-induced cell growth inhibition and apoptosis. World J Gastroenterol. 2005;11(40):6281.

236. FODERÀ D, D'ALESSANDRO N, CUSIMANO A, POMA P, NOTARBARTOLO M, LAMPIASI N ve ark. Induction of apoptosis and inhibition of cell growth in human hepatocellular carcinoma cells by COX-2 inhibitors. Ann N Y Acad Sci. 2004;1028(1):440-9.

237. Fredriksson L, Herpers B, Benedetti G, Matadin Q, Puigvert JC, de Bont H ve ark. Diclofenac inhibits tumor necrosis factor-α-induced nuclear factor-κB activation causing synergistic hepatocyte apoptosis. Hepatology. 2011;53(6):2027-41.

238. Baek JY, Hur W, Wang JS, Bae SH, Yoon SK. Selective COX-2 inhibitor, NS-398, suppresses cellular proliferation in human hepatocellular carcinoma cell lines via cell cycle arrest. World J Gastroenterol. 2007;13(8):1175.

239. Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, O'connor E, Donato T, Castell JV, Jover R. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. Biochem Pharmacol. 2003;66(11):2155-67.

8. EKLER

EK 1: Tez Çalışması Orjinallik Raporu

turnitin

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Elçin Bakir
Ödev başlığı:	FLURBİFROFENİN SİTOTOKSİK, G...
Gönderi Başlığı:	FLURBİFROFENİN SİTOTOKSİK, G...
Dosya adı:	EL_N_TEZ_TURN_T_N.docx
Dosya boyutu:	4.82M
Sayfa sayısı:	94
Kelime sayısı:	19,220
Karakter sayısı:	134,490
Gönderim Tarihi:	31-Eki-2018 04:50PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	1030352760

Copyright 2018 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

FLURBİPROFENİN SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%11	%6	%3	%8
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	%5
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	d-nb.info İnternet Kaynağı	%1
4	www.duzce.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Cumhuriyet University Öğrenci Ödevi	<%1
6	slideplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	ichastaliklariromatoloji.medicine.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

9. ÖZGEÇMİŞ

1. Kişisel Bilgiler

Adı/Soyadı	**:**	Elçin BAKIR
Doğum Yeri	**:**	Kayseri
Doğum Tarihi	**:**	24.02.1989
Uyruğu	**:**	T.C.
Adresi	**:**	Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 38280, TALAS/KAYSERİ
Telefon	**:**	03522076666-28351
e-mail	**:**	elcinozger@erciyes.edu.tr
Ünvanı	**:**	Eczacı
Yabancı dil	**:**	İngilizce

2. Eğitim

2013-2018	**:**	Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Doktora Programı
2008-2013	**:**	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
2003-2007	**:**	Nuh Mehmet Küçükçalık Anadolu Lisesi

3. Mesleki Deneyim

2014-	**:**	Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Araştırma Görevlisi