

**OLEUROPEİN VE NANO-OLEOUROPEİN FORMUNUN 5RP7 VE 3T3
HÜCRELERİ ÜZERİNE APOPTOTİK ETKİLERİ**

Melike ÇEVİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ağustos 2019

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 1709F510 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Melike Çevik'in "OLEUROPEİN VE NANO-OLEOUEUROPEİN FORMUNUN 5RP7 VE 3T3 HÜCRELERİ ÜZERİNE APOPTOTİK ETKİLERİ" başlıklı tezi/...../20... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca İleri Teknolojiler Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvanı-Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU	
Üye	:	
Üye	:	

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

OLEUROPEİN VE NANO-OLEOEUROPEİN FORMUNUN 5RP7 VE 3T3 HÜCRELERİ ÜZERİNE APOPTOTİK ETKİLERİ

Melike ÇEVİK

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ağustos 2019

Danışman: Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU

Günümüzde kanser çok sık görülen, erken tanı ve teşhis konulmadığı zaman ölümcül olan bir hastalıktır. Kanser tedavi şekillerinden biri olan kemoterapinin hedefi kanserli hücreleri yok etmektir. Kemoterapi ilaçları her kanser türünde etkili olmamaktadır. Bu yüzden kanser tedavisi için yeni geliştirilmiş ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Oleuropein zeytinyağı ve yaprağından elde edilen fenolik bir bileşiktir. Yapılan çalışmalarda zeytinin kendisinde ve yağında yağ asitleri, polifenoller ve flavonoidler gibi güçlü antioksidanları bulundurduğunu ortaya koymuştur. Zeytindeki antioksidanların kardiyovasküler hastalıklar ve kanser riskini azalttığı ve hücrelerin genetik olarak hasar görmesini engellediği gibi sağlık üzerine olumlu etkilerinin olduğunu kaynaklarla desteklenmektedir.

Kanser tedavilerinde yeni yaklaşımlar, kanserli hücrelere yeni tedavi ajanlarının sokulması, yan etkileri en az olan ajanlar seçilip bunların geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmamızda oleuropeinin ve nano-oleuropein formunun H-ras sıçan embriyo fibroblast 5RP7 ve fare embriyo fibroblast 3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Deney sonuçlarımızdan oleuropein ve nano-oleo formunun sıçan embriyo fibroblast 5RP7 hücrelerinde sitotoksikite gösterdiği ancak 3T3 fare embriyo fibroblast hücrelerinde ise çok yüksek dozlarda çok düşük sitotoksikite gösterdiği bulunmuştur. Bu ajanın bu özelliğinden dolayı yeni tedavi ajanı olarak geliştirilip ileri araştırmalar yapıldıktan sonra kanser tedavisinde uygulanma potansiyeline sahip olduğunu vurgulamaktayız.

Anahtar kelimeler: Oleuropein, Oleo-nano, Apoptosis, 5RP7, 3T3

ABSTRACT

APOPTOTIC EFFECTS OF THE OLEUROPEIN AND NANO-OLEOEUROPEIN FORMS ON 5RP7 AND 3T3 CELLS

Melike ÇEVİK

Department of Advanced Technologies

Program in Biotechnology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, August 2019

Cancer incidence is in increase in recent years. Cancer is the most present disease of the recent years with high mortality rates when it is not diagnosed or treated in early stages. Chemotherapy is not effective for the therapy of all cancer types. Thus, there is a need of novel agents for cancer treatment.

Oleuropein is a phenolic compound obtained from olive tree leaf and olive oil. Recent research revealed that it has many properties such as anti-inflammatory, anti-bacterial, anti-oxidant, anti-microbial and anti-fungal. In addition to olive and olive oil also contain strong antioxidants such as polyphenols and flavonoids in fatty acids. In recent years studies have supported positive phenotypic effects on health, such as preventing lipoprotein oxidation, reducing cardiovascular disease and cancer risk, and preventing genetic damage to cells showing antioxidant effects.

New approaches to cancer treatments include the introduction of new therapeutic agents into cancerous cells, and the selection and development of agents with at least side effects. In this study, the cytotoxic effects of oleuropein and nano-oleo form on H-ras rat embryo fibroblast 5RP7 and mouse embryo fibroblast 3T3 cells will be investigated.

As a result of our study, oleuropein and nano-oleo forms have been shown to have high cytotoxicity on rat embryo fibroblast 5RP7 cells then on 3T3 mouse embryo fibroblast cells. Therefore, these agents are offered for further studies to develop anticancer agents.

Key words: Oleuropein, Oleo-nano, Apoptosis, 5RP7, 3T3

TEŐEKKÖR

Yüksek lisansta tez konuma karar vediğim andan itibaren her koşulda bana tam destek veren ve yanımda olan saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU başta olmak üzere, bu süreçte yine her zaman yanımda olan aileme, laboratuvarıda bana yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Ece KAYA ve Büşra ASLAN’a, değerli ev arkadaşım Esra BAYINDIR’a teşekkür ederim.

Melike ÇEVİK



....../....../20....

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....
(İmza)

.....
Melike ÇEVİK)

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

ÖZET.....**H**

ata! Yer işareti tanımlanmamış.

ABSTRACT.....4

TEŞEKKÜR.....v

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....vi

İÇİNDEKİLER7

TABLolar LİSTESİ..... xi

GÖRSELLER LİSTESİ.....xii

ŞEKİLLER LİSTESİ..... xiii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....xiv

1.GİRİŞ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

1.1.Kanser15

1.1.1.Normal bir hücre nasıl kansere dönüşür?.....15

1.1.2.Kanserin belirtileri ve sebepleri16

1.2.Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz.....16

1.2.1. Apoptoz ve kanser oluşumundaki etkisi19

1.2.2. Apoptoz ve Nekroz arasındaki farklar19

1.2.3. Apoptozun indüklenmesi **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**6

1.3. Hücre döngüsü.....24

1.3.1. Hücre döngüsü ve kanser27

1.4. Oleuropein.....28

1.4.1. Oleuropein'in kullanım alanları29

1.4.2. Oleuropein'in biyokimyasal özellikleri30

1.4.3. Oleuropein'in etki mekanizması.....31

1.4.3.1. Oleuropein ve kanser ilişkisi32

1.5. Sitotoksikite Testleri19

1.5.1. Kalitatif sitotoksikite testleri.....34

1.5.2. Kanitatif sitotoksikite testleri.....34

1.5.2.1. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) testi	34
1.6. Nanopartiküller.....	35
1.7. Katı lipid nanopartiküllerin sentezlenme yöntemleri	36
1.7.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi.....	37
1.7.2. Mikroemülsiyon yöntemi.....	38
1.7.3. Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon veya Çözücü Difüzyon Yöntemi	38
1.7.4. Yüksek Hızda Karıştırma ve / veya Ultrasonikasyon Yöntemi	39
1.7.5. Katı lipid nanopartiküllerin karakterizasyon metodları	39
2. MATERYAL VE METODLAR	41
2.1. Materyal	41
2.1.1. Kimyasal Maddeler.....	41
2.1.2. Cihazlar	41
2.2. Metod.....	28
2.2.1. Hücre Kültürü.....	28
2.2.1.1. Hücre soylarının stoktan çıkarılması	28
2.2.1.2. Hücre soylarının pasajlanması.....	28
2.2.1.3. Hücre soylarının stoklanması	29
2.2.1.4. Kullanılan besi yerinin hazırlanması	29
2.2.2. Oleuropein katı lipid nanopartikül sentezlenmesi	29
2.2.2.1. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin karakterizasyonu.....	44
2.2.2.1.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü	44
2.2.3. MTT canlılık yöntemi	44
2.2.4. Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopisi ile tayini.....	44
2.2.5. Geçirimli elektron mikroskopunda hücre takip yöntemi	45
2.2.6. Akım sitometri yöntemi	45
2.2.7. İstatistiksel analizler	46
3. BULGULAR	47
3.1. MTT Kolorimetrik Sitotoksikite Bulguları	47
3.1.1. Oleuropein'in 5RP7 hücreleri üzerindeki sitotoksikite bulguları.....	47
3.1.2. Oleuropein'in 3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik bulguları.....	48
3.2. Oleuropein Katı Lipid Nanopartiküllerinin Karakterizasyon Bulguları	48
3.2.1. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin zeta potansiyel ölçümü bulguları	48

3.2.2. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin 5RP7 hücreleri üzerindeki sitotoksikite bulguları.....	35
3.2.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin 3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik bulguları	36
3.3. Konfokal mikroskopik Bulgular.....	37
3.3.1. 5RP7 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısının konfokal mikroskopik bulguları....	37
3.3.2. Oleuropein'in 5RP7 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları.....	38
3.3.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin 5RP7 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları.....	39
3.4. Geçirimli Elektron Mikroskopi Bulguları.....	54
3.4.1. 5RP7 kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron mikroskopik bulguları	54
3.4.2. Oleuropein'in 5RP7 hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerinin geçirimli elektron mikroskopi bulguları	55
3.4.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin 5RP7 hücreleri üzerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerin geçirimli elektron mikroskopik bulguları	56
3.5. Akım Sitometri Bulguları	57
3.5.1. Anneksin-V boyamanın akım sitometrideki bulguları.....	57
3.5.1.1. 5RP7 kontrol hücrelerinin anneksin-V boyama bulguları	57
3.5.1.2. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin anneksin-V bulguları	57
3.5.1.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin anneksin-V bulguları.....	44
3.5.2. Kaspaz3/7 boyamanın akım sitometrideki bulguları	44
3.5.2.1. 5RP7 kontrol hücrelerinin kaspaz3/7 boyama bulguları.....	44
3.5.2.2. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin kaspaz3/7 bulguları.....	459
3.5.2.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin kaspaz3/7 bulguları.....	46
3.5.3. Hücre döngüsü analizinin akım sitometrideki bulguları.....	46
3.5.3.1. 5RP7 kontrol hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları.....	46
3.5.3.2. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları	47

3.5.3.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları	47
4. TARTIŞMA SONUÇ	48
5. KAYNAKÇA	64
6. ÖZGEÇMİŞ	



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Apoptozla nekroz arasındaki temel farklar.....	6
Tablo 2.1. Oleuropein zeta potansiyel ölçümleri.....	35
Tablo 2.2. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin zeta potansiyel ölçümleri.....	35



GÖRSELLER LİSTESİ

Görsel 3.1. Akridin Oranj ve falloidin ile ikili boyanmış 5RP7 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskopik görüntüsü.....	37
Görsel 3.2. Oleuropein'in 5RP7 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü.....	38
Görsel 3.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin 5RP7 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü.....	39
Görsel 3.4. 5RP7 kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron mikroskobuna ait görüntü.....	40
Görsel 3.5. Oleuropein'in IC ₅₀ konsantrasyonunun 24 saat uygulandığı 5RP7 hücrelerinin ince yapısal değişikliklerinin geçirimli elektron mikroskop görüntüsü.....	41
Görsel 3.6. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin IC ₅₀ konsantrasyonunun 24 saat uygulandığı 5RP7 hücrelerinin ince yapısal değişikliklerinin geçirimli elektron mikroskop görüntüsü.....	42

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler.....	7
Şekil 1.2. Hücre siklusu.....	12
Şekil 1.3 Hücre siklusunda kullanılan çeşitli proteinlerin etkileşimi.....	13
Şekil 1.4. Hücre siklusunda p53 proteinin rolü.....	14
Şekil 1.5. Oleuropein'in kimyasal yapı formülü.....	15
Şekil 3.1. 5RP7 hücreleri üzerine 24 saat boyunca uygulanan Oleuropein'in grafiği.....	33
Şekil 3.2. 3T3 hücreleri üzerine 24 saat boyunca uygulanan Oleuropein'in grafiği.....	34
Şekil 3.3. 5RP7 hücreleri üzerine 24 saat boyunca uygulanan Oleuropein yüklü katı lipid nanoparçacıklarının grafiği.....	36
Şekil 3.4. 3T3 hücreleri üzerine 24 saat boyunca uygulanan Oleuropein yüklü katı lipid nanoparçacıklarının grafiği.....	36
Şekil 3.5. 5RP7 kontrol hücrelerinin anneksin-V boyama bulguları.....	43
Şekil 3.6. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin anneksin-V bulguları.....	43
Şekil 3.7. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin anneksin-V bulguları.....	44
Şekil 3.8. 5RP7 kontrol hücrelerinin kaspaz3/7 boyama bulguları.....	44
Şekil 3.9. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin kaspaz3/7 bulguları.....	45
Şekil 3.10. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin kaspaz3/7 bulguları.....	46
Şekil 3.11. 5RP7 kontrol hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları.....	46
Şekil 3.12. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları.....	47
Şekil 3.13. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları.....	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CO₂ : Karbondioksit

DMSO : Dimetilsülfoksit

IC₅₀ : İnhibitör Konsantrasyonu 50

KLN : Katı Lipid Nanopartikül

mL : Mililitre

mM : Milimolar

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide sitotoksisite testi

nm : Nanometre

PBS : Phosphate Buffered Saline (Fosfat tamponu)

PI : Propidyum iyodit

rpm : Revolutions per minute

TEM : Transmission Electron Microscope

°C : Santigrad derece

µL : Mikrolitre

µM : Mikromolar

1.GİRİŞ

1.1.Kanser

Kanser; vücudun bir organ veya dokusunda beliren bazı anormal hücrelerin kontrolsüz ve düzensiz olarak aşırı miktarda çoğalması sonucu ortaya çıkan ve dokuyu harap eden bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Aşırı miktarda çoğalan bu kanser hücreleri bir araya gelerek kitle oluşumlarına sebep olmaktadır. Yaşamın erken dönemlerinde hatta zigottan ergin bir birey oluncaya kadar mitoz bölünmeler yaparak normal hücreler yaşamını sürdürmektedirler. Bu normal hücreler gelişim tamamlandıktan sonra da zarar gören ya da ölen hücrelerin yerini almak veya hasar gören hücrelerin tamir işlemini gerçekleştirmek için bölünüp ve çoğalmaya devam etmektedirler. Buna zıt olarak, kanser hücrelerinin çoğalması sürekli olduğu için, tümör kitleleri de devamlı olarak büyümektedir. Tümörler çevre dokulara da yayılarak tahribat meydana getirmektedir. Ayrıca tümör hücreleri kan ve lenf yolu ile vücudun diğer bölgelerine de metastaz yapabilmektedir. Metastaz, kan ve lenf yoluyla başka doku ve organlara kanser hücrelerinin taşınması ve tümör odakları meydana gelmesini ifade eden bir terimdir. Metastazın gerçekleştiği dokuda da kanser hücreleri çoğalmaya ve yeni tümör kitleleri oluşturarak yaşamlarını sürdürmeye devam etmektedir [4,9.27].

1.1.1.Normal bir hücre nasıl kansere dönüşür?

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesini tetikleyen birçok etmen vardır. Bunlar;

- Ağır metallerle aşırı maruz kalma
- Sigara ve alkol kullanımının artması
- Aflatoksin, kuru gıdalarda meydana gelen bozulma
- Hepatit B ve Hepatit C virüsü
- Hava ve su kirliliği
- Beslenme bozuklukları

gibi farklı kategorilerde yer almaktadır [25].

1.1.2.Kanserin belirtileri ve sebepleri

Kanserin belirtilerini kişilerin bilmesi erken teşhis açısından büyük bir öneme sahiptir. Nedensiz kilo kayıpları, yüksek ateş, halsizlik, deride meydana gelen değişiklikler, olağandışı kanamalar, dışkılama ve idrar yapma sıklığında değişiklik, öksürük ve horlama, ben ve siğillerdeki farklı değişimler gibi bazı belirtiler kanser belirtileri arasında yer almaktadır. Kişi, kanser belirtilerinden birine veya birkaçına sahip ise bu durum kişinin kansere yakalanmış olduğunu göstermemektedir. Bu belirtiler çok basit bir gribal enfeksiyonun da belirtileri olabileceği gibi başka hastalıkların belirtileri de olabilmektedir [26].

1.2.Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz patolojik bir hücre ölüm şeklini ifade etmektedir. Apoptoz süresince hücrenin ATP miktarı azalmakta, hücrenin iç dengesi hızla bozulmaktadır. İnflamasyonun meydana geldiği nekrozdan tamamen farklı olarak, apoptoz; inflamasyon olmadığında dahi hücrelerin kendilerini ölüme sürükledikleri, genlerle düzenlenen, programlı olan, RNA ve protein sentezi ile birlikte ATP'ye gereksinim duyan ve temel olarak organizmada iç dengeyi koruyan bir olaydır. Apoptoz mekanizması, uyarıcıya ve hücre hattına göre bir takım farklılıklar gösterebilmektedir. Apoptozu etkileyen hücre içi uyarıcılar genellikle üç ana grupta toplanabilir. Bunlar: büyüme faktörleri, onkogenler, tümör süpresör genlerdir [1].

Apoptozu etkileyen uyarıların bazılarını sıralamak gerekirse; büyüme faktörlerinin ortadan kalkması, sitokinler, hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış, tümör nekroz faktör (TNF), TGF-B (Transforming Growth Factor), Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA tahribatı sebebiyle bir tümör süpresör gen olan p53' ün aktif hale geçmesi, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve glukokortikoidler olarak sıralayabiliriz [1,2,6]. Apoptozda, hücre ölümü çevre dokuları ileri derecede etkilemeden meydana gelse de, bazen apoptoz dolaylı yoldan çevre dokuda nekrozu başlatabilir veya tam tersi durum da söz konusu olabilmektedir. Apoptoz süreci: DNA tahribatına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç değişik şekilde işlediği bilinmektedir [4,27]. Bu süreçlerin meydana gelmesinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar:

Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteini, kaspazlar ve Bcl-2 ailesi proteinleridir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi birçok morfolojik değişikliklerin meydana gelmesinden sorumludur [20].

Apoptoz sırasında, tek bir hücrenin büzüşmesi ve çevredeki diğer hücrelerle olan temasın ortadan kalkması gerçekleşmektedir. Hücresel büzüşmenin sebebi, Na (sodyum), K (potasyum), Cl (klor) taşıyıcı sisteminin durması sebebiyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı sirkülasyonunun gerçekleşmemesidir [10]. Apoptotik hücreler elektron mikroskobu ile görüntülendiğinde morfolojik olarak bazı değişiklikler meydana geldiği görülmektedir. Morfolojik bozulmalar plazma membranının şeklinin bozulmasıyla başlamaktadır. Daha sonra "zeiozis" ismi verilen karbancıklar meydana gelmektedir. Bunun ardından transglutaminaz enzimin etkisiyle hücre zarında tomurcuklanma ve parçalanmalar meydana gelmektedir. Hücre zarında içten dışa fosfatidilserin translokasyonu, plazma ve çekirdek kondansasyonunun hemen ardından da kromatinin kümelenmesi meydana gelmektedir. Kromatindeki değişiklikler başlamadan önce sitozolik Ca^{++} seviyesinde ciddi bir artış meydana gelmektedir. Kromatin kondansasyonunda, nukleozomların arasındaki bağlantı bölgelerinin ayrılması gerçekleşmektedir. 180-200 baz çiftinden oluşan bu küçük parçalar, elektroforez jelde yürütülürken ip merdiven (ladder) görüntüsü oluşturur [12,20]. Hücrenin parçalanmasıyla birlikte "apoptotik cisimcikler" oluşmaktadır. Apoptoz sırasında oluşan membran asimetrisi genellikle ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz esnasında ya ATP translokaz yetmezliği veya diğer enzim mekanizmasının etkinliği PS'nin dış yüzey tabakasına yerleşmesiyle sonuçlanmaktadır. Bu durum, apoptotik cisimciğin fagosite olması için bir sinyal teşkil etmektedir [27]. Apoptotik cisimcikler, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagositoz yoluyla imha edilirler. Apoptoz, vücudun her bir parçasının içerik ve büyüklüğünün fizyolojik gereksinimlerin belirlediği sınırlar içinde kalmasını sağlayan bir ölüm şeklidir. Apoptozun başlanması ve baskılanması karmaşık bir düzenleyici sinyal ağı tarafından kontrol edilmektedir. Apoptoz yaklaşık olarak 30-60 dakika gibi bir sürede gerçekleşmektedir [10]. Hücre iskeleti apoptozda önemli bir faktördür. Hücre iskeletinin kararlılığı apoptozu engellemektedir. Apoptozu uğrayan hücrelerin dokudan atılması ve yerine yeni hücrelerin konulması yaklaşık olarak günlük 1×10^{11} hücre olduğu düşünülmektedir [10,32].

Apoptozun genetik mekanizması ilk kez *Caenorhabditis elegans*'ın gelişim sürecinin araştırılmasında ortaya çıkmıştır. *C. elegans*'ın gelişim sürecinde toplam 1090 somatik hücre oluşmaktadır; ama bu hücrelerden 131 tanesi ölmektedir. Bu programlı hücre ölüm sürecini gerçekleştiren genler, araştırmacılar tarafından ced-3 ve ced-4 olarak isimlendirilmiştir. Bu genlerden biri veya her ikisi de mutasyona uğradığı zaman bu 131 hücre yaşamını sürdürmeye devam etmektedir [18,19,30]. Ced-3 geni bir sistein proteazı kodlamaktadır [7,28,30]. Apoptozun regülasyonu iki şekilde gerçekleşmektedir.

a) Granzim veya Perforin Sistemi: Apoptotik yollardan biri olan granzim veya perforin sistemi, patojenle infekte olmuş hücrelerin ve tümör hücrelerinin yok edilmesinde rol oynamaktadır. Perforinler ile granzimler, sitotoksik T lenfositler (CTL) ve Naturel Killer (NK) hücrelerinin sitoplazmik salgı granülleri içinde olan proteinlerdir. CTL reseptörü odak hücreye bağlandığı zaman, perforinler salgılanır ve salgılanan bu perforinler odak hücre üzerinde daire şeklinde bir por (açıklık) meydana getirirler. CTL reseptörünün açtığı bu por sayesinde granzim B, vezikül içinde açılan delikten odaklanan hücreye girer. Daha sonra hücreye girmiş olan perforin proteini, vezikülden granzim B' nin serbest bırakılmasını sağlar. Eğer granzim B'nin serbest kalırsa, granzim B hızlı bir şekilde DNA fragmentasyonunu ve apoptozla prokaspazı etkin kılarak aktif olmalarını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra granzim A' da, perforinle sinerjik olarak kaspaz bağımsız yolda apoptozda rol oynamaktadır [6].

b) Fas - Fas Ligandı veya CD95 Yolu: bu yol apoptozun salgıdan bağımsız olan mekanizması, hücre membranı üzerinde bulunan "ölüm reseptörlerinin" etkin kılınmasıyla kolerasyon içindedir. Fas (CD95), hücre yüzey reseptörü olmakla birlikte tümör nekrozis faktörü (TNF) ailesinin bir üyesidir. Fas ligandı (FasL) da, TNF ailesinin bir üyesidir. FasL'nin Fas reseptörüne bağlanması ile apoptoz mekanizması devreye girmektedir. TNF'nin TNFR-1'e bağlanması ile de benzer olaylar meydana gelmektedir. Fas ve TNFR-1'in sitoplazmik uzantısı, bir ölüm alanını (Death Domain, DD) içinde bulundurur. Fas'ın sitoplazmik bölümü FADD (Fas Associating protein with a Death Domain protein) ve RIP (Receptör Interacting Protein) birbiri ile etkileşim içindedir. Ölüm alanlarını içinde bulunduran bu TRADD ve RIP proteinleri, prokaspaz-8'in aktif olmasıyla apoptozu direkt olarak uyarır. Uyarılmış ve bununla birlikte aktive olan kaspaz-8 diğer uygulayıcı bir takım kaspazları aktive ederek apoptozu başlatmaktadır [2].

1.2.1. Apoptoz ve kanser oluşumundaki etkisi

Kanser hücrelerinin ortak özelliklerinden biri apoptoz sürecinden hızla kaçabilme yeteneğinde olmalıdır. Bu hücreler kendine özgü bir apoptozdan kaçma mekanizması geliştirmektedirler. Bu mekanizma ya antiapoptotik proteinlerin çok sayıda üretilmesiyle ya da proapoptotik proteinlerin üretilmesinin veya etkilerinin azalmasıyla apoptoza karşı dirençli bir nitelik kazanmaktadırlar. Mesela foliküler B hücreli lenfomada kromozomların bazı spesifik bölgelerinin yer değiştirmesi ile Bcl-2 proteininin yapımı artmaktadır. p53 yoluyla başlatılan apoptoz ile proteinlerin yapımları veya işlevlerindeki aksaklıkların insanlardaki kanserler oluşumlarının neredeyse yarısında etkili olduğu ispatlanmıştır [2,28]. Apaf-1 in metastatik melanom hücrelerinde sentezinin olmadığı ortaya koyulmuştur. Bazı kanser çeşitlerinde ölüm reseptörlerinden biri olan CD95'in yapımının azaldığı gözlemlenmiştir [19,28]. Kanserleşme ve apoptoz arasındaki kolerasyonun bozulması ile kemoterapi ilaçlarına ya da radyasyona karşı direnç oluşturmaktadır. Bunun da klinik tıbbı ilgilendiren bir takım sonuçlara yol açabileceği belirtilmektedir.

1.2.2. Apoptoz ve Nekroz arasındaki farklar

Nekrozda görülen hücre membranının ve hücredeki metabolik faaliyetlerin bir anda bozulduğu ve hücre zarının parçalanıp hücre içi materyalin dışarı saçılması olayından çok daha farklı olarak gerçekleşen apoptozda hücre zarının bütünlüğü bozulmamaktadır. Apoptoz ve nekroz dışında da ölüm yolakları bulunmaktadır fakat apoptoz dışındaki yolakların, morfolojik tanımları ve bununla birlikte klinik önemleri üzerinde bir uzlaşmaya henüz varılamamıştır [17]. Ölüm şekilleri, işleyiş sürecindeki biyokimyasallar, tetikleyen mekanizmalar ve sonuçları bakımından apoptoz ve nekroz birbirinden ayrılmaktadır. Apoptotik bir sinyalin alınmasıyla birlikte hücre bulunduğu yerden kopar, küçülür ve ardından kromatin kondenzasyonu meydana gelerek hücre zarlarla çevrili olan küçük apoptotik cisimcikler oluşturur ve bu apoptotik cisimler makrofajlar tarafından fagosite edilmektedirler. Apoptoz meydana gelirken yangı görülmemektedir [2,10]. Nekroziste ise apoptozun aksine zar bütünlüğü korunmaz, hücre direkt olarak patlayarak içindeki materyaller hücre dışına ve komşu hücrelere kadar ulaşır. Nekroziste inflamasyon meydana gelmektedir.

Tablo 1.1. Apoptozla nekroz arasındaki temel farklar. *TNF*; tümör nekrozis faktörü, *ER*; endoplazmik retikulum

	Apoptoz	Nekroz
Morfolojik özellikler	Küçülme, çekirdekte kromatin yoğunlaşması, tomurcuklanmanmayla apoptotik cisimlerin oluşması, komşu hücreler tarafından fagosit edileme	Şişme, hücre geçirgenliğinin hızla artması ve blebleşme, hücre içeriğinin dış ortama dağılması
Tetikleyen mekanizmalar	Hücre dışından ($TNF\ \alpha$, büyüme faktör eksikliği, antikanserojen ilaçlar, oksidatif stres, DNA hasarı), hücre içinden (mitokondri, ER)	Ani toksik etki sonucu zar geçirgenliğinin çok büyük ölçüde bozulması
Biyokimyasal değişimler	Hücre içinde proteolitik enzimlerin aktivasyonu, hücre içi proteinlerin ve DNA'nın yıkımı (kaspaz ve DNaz aktivasyonu)	Hücrede çok hızlı enerji yetmezliği ya da toksik etki sonucu zar geçirgenliğinin hızla artmasıyla osmotik dengenin bozulması, hücrenin patlaması
Sonuçları	Apoptoza uğrayan hücrenin inflamasyon oluşturmaksızın ortamdan temizlenmesi	Hücre içi maddelerin dağılmasıyla oluşan inflamasyon

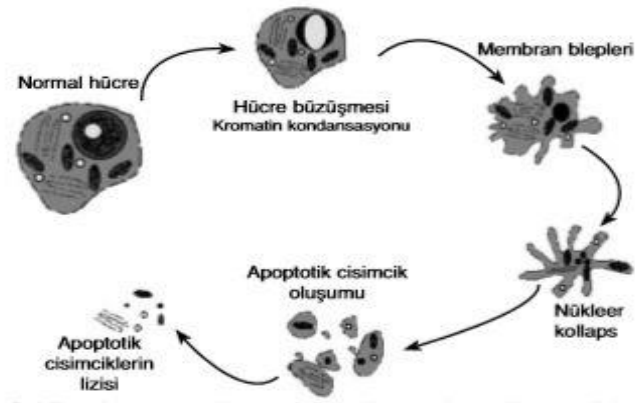
1.2.3. Apoptozun indüklenmesi

Apoptoz, Fas (APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) gibi hücre ölüm reseptörlerinin ligandları ile etkileşime girmesi sonucu indüklenmektedir. Bu reseptörler hücre zarında bulunup TNFR ailesinin bir elemanıdır. Fas ligand (FasL) lenfoid; hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokardda bile bulunabilmektedir.

FasL bir tümör nekroz faktör (TNF) elemanıdır. FasL'ler sitotoksik T lenfositleri ve "natural killer" hücrelerinde bulunmaktadır. Fas ve TNFR-1, ölüm uyarısı aldığı için hızlı bir protein/protein kompleksi yapma eğilimine girmektedirler. İlk olarak kendinde doğal olarak bulunan ölüm bölgeleri ismi verilen TRADD ("TNFR-1 associated death domain") ve FADD ("Fas associated death domain") ile etkileşime girerek, prokaspaz 8'i aktif hale getirerek kaspazların şelale tarzında aktivasyonlarını başlatmaktadırlar [2,3,10]. Apoptozu uyarmak için gereken etmenler genel olarak aşağıdaki şekilde sıralanabilmektedir;

- a) Genetik kontrol (Ebriyolojik evreden başlayarak doğum sonrasında yani yaşam boyu etkilidir),
- b) İyonize radyasyon,
- c) İlaç kullanımı ve çevresel etmenler (steroid tedavisi, kemoterapi, insektisitler, tarımda kullanılan zirai ilaçlar, kozmik ışınlar, vb.),
- d) İskemi sonrası meydana gelen reperfüzyon, mekanik travmalar, viremi, bakteriyemi sonrası gelişen sepsis septik şoklar.

Apoptozu uyaran sinyaller ise genel olarak hücre dışı ve hücre içi olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Hücre içi sinyallere örnek olarak hormonlar, büyüme faktörleri hücre-hücre teması, hücre dışı sinyallere ise iyonize radyasyon, viral enfeksiyonlar, serbest radikallerden kaynaklanan oksidatif tahribat örnek verilebilir.



Şekil 1.1. Apoptozu uyandıracak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler.

Apoptoz mekanizması iki yolla gerçekleşmektedir. Bunlar ölüm yolu reseptörleri ve mitokondriyal yoldur.

- 1) Ölüm yolu reseptörleri: Kendi içinde;
 - a) Doğrudan yol
 - b) Dolaylı yol olmak üzere ikiye ayrılır.
- 2) Mitokondriyal yol: Kendi içinde;
 - a) Apoptozom oluşmasıyla
 - b) Direkt mitokondriyal yol (primer ve sekonder) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır [11].

İnsanda meydana gelen apoptozun başlayıp başlamayacağına karar verilmesinden sorumlu olan gen p53 genidir. Bu süreç p53 proteini ile başlar kaspazlarla sona erer. p53 geninin mutasyon geçirmesi veya hücrede bulunmadığı durumlarda hücre çok uzun süre sağ kalabilmektedir. Genotoksik etmenler söz konusu olduğunda ortaya çıkan tahrip sonucunda p53 aktif hale gelerek DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı saptamaktadır. Bu aşama hücre döngüsünün G1'de durmasını sağlayarak tamir mekanizmalarının devreye girmesi için gereken süreyi sağlamaktadır. Bu hasar tamir edilemeyecek durumda ise hücre apoptoza yönlendirilir. Ayrıca, p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının miktarlarını düzenlediği kaynaklarda yer almaktadır [14,27,36].

Apoptozun düzenlenmesi, Bcl-2/Bax gen ailesi sayesinde sağlanmaktadır [14,27]. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır [25]; Bu genlerden Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1 gibileri antiapoptotiktir, Bax (Bax, Bak ve Bok) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bad, Bid) gibi genler ise proapoptotiktir [11]. Bcl-2, 24-26 kDa' luk protein kodlayan bir protoonkogendir. Mitokondrinin dış membranında sitoplazmaya bakan kısımda yer almaktadır. Ayrıca, endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek membranı üzerinde konumlanmıştır [37]. Bu proteinler, zarın parçalanmasını önlemekte ve iyon alış-verişini düzenlemektedirler. Özellikle antiapoptotik gen olan Bcl-xL'in mitokondriyal hasarı önleyerek mitokondrinin koruduğu kaynaklarda yer almıştır. Böylece, apoptoz inhibisyonu meydana gelmektedir [11]. Bcl-2 ailesinin prooksidan özelliğe de sahip olduğundan reaktif oksijen türü seviyelerinin apoptoz üzerindeki etkilerini kontrol altına alabilmektedir [10].

Bax proteinleri bazen hücrenin sitoplazmasında da bulunmaktadır. Sitoplazmada bulunan bu Bax proteinleri apoptotik uyarıcıyı aldıktan sonra mitokondrinin permeabilite poruna doğru yönelerek bağlanırlar. Böylece seçici iyon geçirgenliğini düşürebilmektedir. Membrandaki bu değişiklikler sebebiyle mitokondri membranı içinde bulunan sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi materyaller sitoplazmaya

doğru ilerleyebilmektedirler. AIF, doğrudan çekirdeğe gitmektedir. Bir tür sitoplazma proteini olan Apaf-1' in aktive edicisi ise sitokrom c'dir [27]. Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması ile prokaspaz-9 aktif hale gelerek "apoptozom" yapısı oluşmaktadır [29]. Prokaspaz-9'un aktif olması ile birlikte seri bir kaspaz aktivasyonu da başlamaktadır [27] (Şekil 1). Apaf-1 bu sırada enerji gereksinimi için ATP'ye de bağlanmaktadır [5].

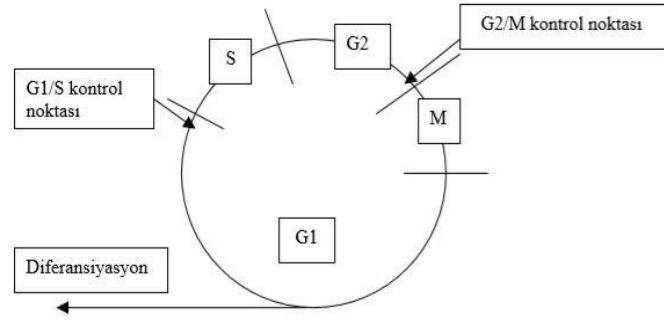
Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimler (kaspazlar) apoptoz mekanizmasında esas role sahip olan moleküllerdir [10,23]. Ölüm reseptörleri ölüm alanı diye isimlendirilen bir aminoasit serisi ve bununla birlikte reseptör genlerin polipeptitlerini içermektedir. Bu genler adaptör proteinlere bağlanmaktadır [10]. Günümüzde bilinen altı çeşit ölüm reseptörü bulunmaktadır. Bunlar; CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNFRelated Apoptosis-Inducing Ligand)-R1, TRAILR2, TNF-R1, DR3 ve DR6'dır [16]. Adaptör proteinler, reseptörlerden gelen sinyali alarak kaspazlara bağlanıp onları aktif hale getirmektedir. TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) bu ailenin en iyi tanımlanmış üyelerindendir. DNA yıkımına sebep olan Fas, kaspaz dizisini kaspazla aktive eden DNaz (caspaseactivated DNase; CAD) aracılığıyla aktive etmektedir [10]. Kaspazların aktif merkezlerinde bulunan ve memeli hücrelerinde sistein proteaz ailesinin bir üyesi olan sistein yer almaktadır. Sistein sitoplazmada aktif olmayan başlatıcı olarak görev almaktadır. Diğer bir ismiyle ICE proteazları da denebilir. Bu proteazlar bir proteaz aktivasyon dizisi başlatarak sitoplazmik aminoasitlerin yıkımında rol oynamaktadır. Bu esnada nukleazlar da aktif hale gelerek DNA parçalanması ve RNA yıkımı meydana getirmektedir [6,10]. Kaspazlar bir olay dizisinde diğer prokaspazları aktif hale getirirler. Kaspazların sitokin üretimine de katılırlar. Örneğin (kaspaz 1,4,5,13). Proteolizisin başlatıcıları (kaspaz 2,8,10) ya da "uygulayıcıları" (kaspaz 3,6,7) olarak gruplandırılabilirler [10,11]. Ölüm sinyali göderen başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve hücreleri ölüme yönlendirirler fakat hücre ölümünü gerçekleştirmezler. Görevleri sadece bunu yapacak olan uygulayıcı genleri aktive etmektir. Hücre ölümünü gerçekleştiren efektörler, kaspazlardır. Başlatıcı kaspazların ilerleyişini sağlayanlar uygulayıcı kaspazlardır [2,10]. Kaspazların aktif hale gelmesi hücrenin kendine özeldir. Kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları baskılayarak apoptozu durdurduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [2,6,10]. IAP'ın bir başka rolü de hücre döngüsünü kontrol ederek apoptozu durdurmaktır. Malign hücrelerde bu inhibitörlere sıkça rastlanmaktadır [12,27].

1.3. Hücre döngüsü

Hücre döngüsü, çoğalmak yani prolifer olmak üzere uyarı almış bir hücrede meydana gelen bir dizi kalıcı olmayan biyokimyasal etkinliklerin ve morfolojik değişikliklerin meydana geldiği karmaşık bir süreçtir. Bir hücre döngüsü, genetik ve yapısal olarak birbirine birebir benzeyen iki yeni hücrenin meydana gelmesiyle sonlanmaktadır. Hücre çoğalması, hücre döngüsünde yer alan bazı kontrol noktalarının (“check-points”) belirli zaman aralıklarında düzenli olarak kontrol edilmektedir. Hücre döngüsü çoğalma, farklılaşma (diferansiyasyon) ve apoptoz gibi etkinlikleri düzenlediği için büyüme ve gelişme olaylarıyla korelasyon içinde çalışmaktadır. Bu düzenleme özelliğinden dolayı canlıdaki hemen her tür fizyolojik ve patolojik olaylarda hücre döngüsünün spesifik bir öneme sahip olduğu kanıtlanmıştır. Buna karşın, kanser hastalığında, hücre döngüsünün regülatör proteinlerinin meydana getirdiği siklinler veya siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI)’nin düzeylerinde anormallikler bulunmuştur. Apoptoz, genel olarak hücrenin iç dengesini sağlamak amacıyla fizyolojik şartlar altında meydana gelen bir hücre ölüm şeklidir. Apoptoz ve hücre döngüsünün arasında kompleks bir çalışma prensibi söz konusudur. Örneğin, hücre döngüsü sırasında hasarlanmış olan hücrenin döngüsünü durdurması veya DNA’sını onarması için zaman kazandıran p53 geni apoptozda da rol oynamaktadır. Apoptoz ile insan vücudunda dokunun hücresel oranı sayısal olarak sürekli aynı kalmaktadır. Bu durumda doku iç dengesi yani yeniden yapım ve yıkım olaylarının bir devirdaim içinde oluşu ölüm/çoğalma dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Bu iç dengenin bozulması durumunda birçok önemli hastalığın yol açtığı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Eğer bu denge apoptozu hızlandıracak yönde bozulursa bir takım nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer gibi) ya da patojenik hastalıklar (AIDS gibi) meydana getirirken, apoptozisin durdurulması yönünde bu denge bozulursa karsinogenez meydana getirebileceği vurgulanmaktadır [17].

Bir hücrenin canlı olup olmadığına karar vermek için mitoz yoluyla birbirinin aynısı olan iki yeni hücre oluşturup oluşturmadığına bakılmaktadır. Bir hücre bölünme sinyali almadığı sürece hücre döngüsünde aktif olan (G1, G2, S ve M) evrelerine girmezler. Bu sırada istirahat evresi denen G0 evresinde beklemektedirler. Hücrelerin genetik olarak birbirinin aynısı olan iki hücre meydana getirmesi mitoz yoluyla veya gonadlarda mayoz yoluyla gerçekleşmektedir. Hücreyi bölünme yönünde uyaran

sinyallerin (büyüme faktörleri, sitokinler veya mitojenler) çok farklı türleri bulunmaktadır. Hücre, bölünme sinyalini aldığı zaman sinyal ileti kaskadı yani “signal transduction cascade” ismi verilen bir ileti sistemi (mesela, MAP kinaz, Protein Kinaz C veya JAK/STAT yolları) çalışmaya başlar. Bu ileti sistemi ya transkripsiyonu, hücre döngüsünü veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller ya da çekirdeğe ulaşarak (STAT’da olduğu gibi) direkt olarak transkripsiyonu module eder. Bu sayede, hücre döngüye sokularak bölünmeye yani mitozla yönlendirilmiş olur. Hücreler mitozla girecekleri zaman bir hazırlık evresi geçirmektedirler. Bu sürede hacimlerinde büyük oranda artış meydana gelmektedir. Bu hazırlık evresinde hücre bölünmesi için elzem olan birçok çeşitli düzenleyici ve yapıcı proteinler ve makromoleküller sentezlenmektedir. Bu hazırlık evresine interfaz denilmektedir. İnterfaz da kendi içinde G1, S, ve G2 olmak üzere 3 alt evreye bölünmektedir. Mitoz, interfazla birlikte hücre döngüsünü oluşturmaktadır. Bir hücre döngüsü, evrelerin işleyiş sırasına göre söylenecek olursa; G1, S, G2 ve M evrelerinden meydana gelmektedir. Hücre döngüsü, kendine özel proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treoninprotein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından spesifik bir şekilde sürdürülmektedir. Siklinler, CDK ve CDI’lerinin seviyeleri hücre döngüsünün değişik aşamalarında bir takım farklılıklar göstermektedirler. Oldukça karmaşık bir düzen içinde döngünün devam etmesini sağlayarak bunu düzenlemektedirler. CDK’lar tek başlarına bulundukları zaman inaktif, siklin’e bağlandıkları zaman ise aktif duruma gelmektedirler. Bunun sonucunda aktif siklin-CDK kompleksleri oluşur. Bu proteinlerin, eğer biyokimyasal bir şekilde ifade edilmesi gerekirse, birbirleriyle protein-protein komplike yapıları meydana getirerek karşılıklı etkinliklerini düzenlemektedirler. Bu etkinliklerin düzenlenmesi ise fosforillenme yoluyla gerçekleşmektedir. CDK’ların inaktif olmayan formları, substratları fosforilleyerek onları aktif hale getirmektedir. Bu sayede substrat aktivasyon durumuna göre hücre döngüsü ya durur ya da bir sonraki evreye geçmektedirler [33].



Şekil 1.2. Hücre siklusu

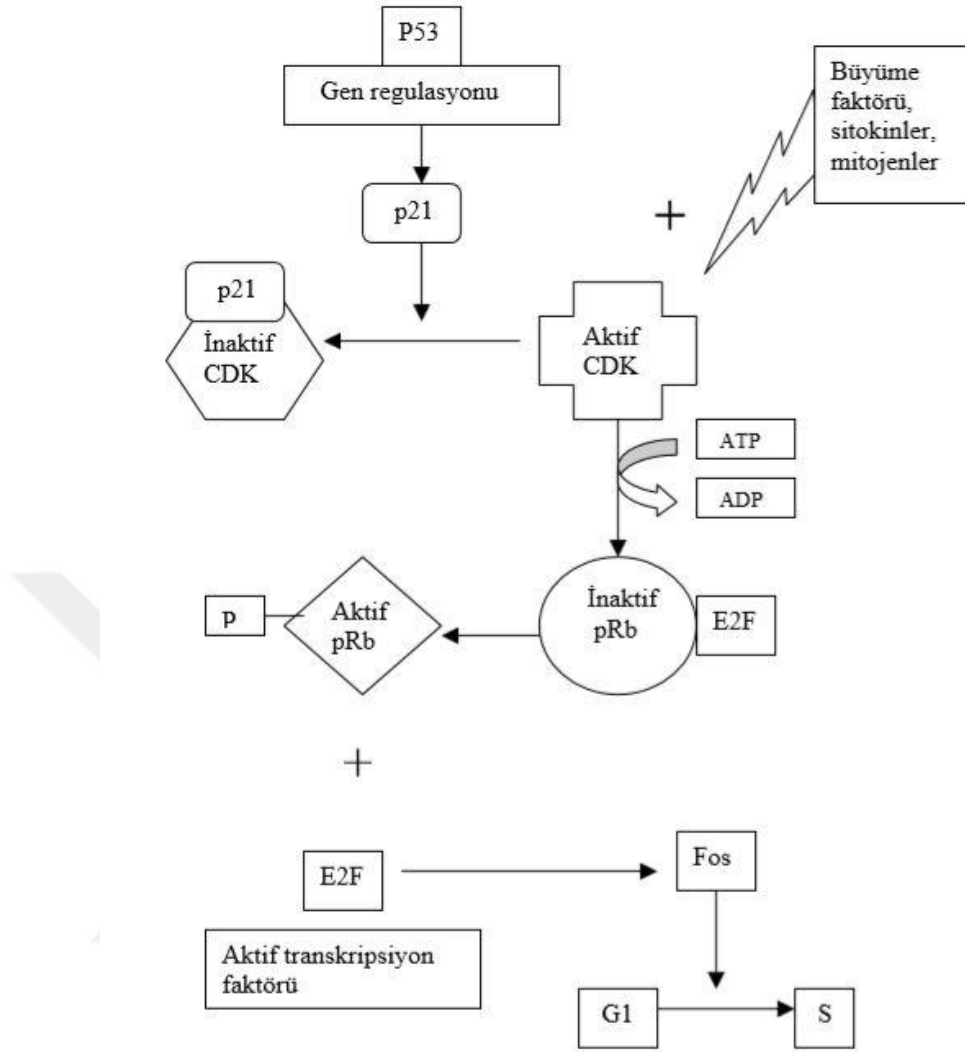
Hücrelerin hücre döngüsüne girmek için ilk olarak DNA'sını replike etmesi gerekmektedir. Repklikasyon sonrasında, iki eş yavru meydana gelecek şekilde bölünmektedir. Hücre döngüsünde çoğunlukla, G1 evresi DNA sentezine (S evresi) ve G2 evresi ise mitoz (M evresine) hazırlık evreleridir. Bu evrelerde protein ve RNA sentezleri yapılırken hücre bir yandan da tekrar bölünmek için kendisini tekrar düzenlemeye başlar. G1 evresi, hücre döngüsünün süresi bakımından en çok değişkenlik gösteren evredir. Bu evrede hücrenin ya bölünmek için, ya çoğalmak için, ya da ölmek için bir karar vermesi gerekmektedir. Bu sebeple genlerde bir takım değişiklikler meydana gelmeye başlar. S evresinde, hücre DNA'sını çok hızlı bir şekilde replike eder. Çok çabuk olmasının temel nedeni, DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması esnasında baz çiftleri, çeşitli ilaçlar veya mutajenler gibi dış etmenlerin etkisine karşı savunmasız hale gelmektedirler ve bu da DNA iplikçiklerinin mutasyona uğrama olasılığını artırmaktadır. Bu yüzden DNA sentezi başlar başlamaz hızlı bir şekilde bitirilmelidir. G2 evresinde, bir önceki (S) evrede replike olmuş DNA ve kromatin proteinleri kısalıp kalınlaşarak kardeş kromatidler şeklinde paketlenirler. G2 evresi kontrol noktalarından biridir. Hasarlı DNA veya replike olmamış DNA bu evrede kontrol edilmektedir. M evresinde, kardeş kromatidler ekvatoryal düzleme dizilmektedirler ve hemen ardından profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez aşamaları gerçekleşmektedir ve hücre ikiye bölünmüş olur [33].



Şekil 1.3 Hücre siklusunda kullanılan çeşitli proteinlerin etkileşimi

1.3.1. Hücre döngüsü ve kanser

Tümör supressör gen ürünü olan p53 geni hücre döngüsü ile apoptozun bir araya gelmesindeki ana faktördür. Bu genin esas görevi, DNA bir şekilde hasar gördüğü zaman, hücre döngüsünü durdurarak hücrenin tahrip olmuş DNA'sını tamir etmesi için ona süre kazandırmasıdır. Bu nedenle gen koruyucusu olarak da isimlendirilmektedir. p53 bilindiği gibi kanser hastalarında mutasyonuna en sık rastlanan proteindir. Bunun yanı sıra kanserlerin %50-55'i de mutant'dır. p53 normal şartlarda bir CKI'ü olan p21'in sentezini çoğaltarak hücre döngüsünü engeller. p21, siklin-CDK kompleksine bağlanarak onu aktiflikten çıkarıp inaktif hale getirir. Bunun sonucunda, bu kompleks pRb'yi fosforile edemeyeceğinden E2F ailesi de pRb'den ayrılamayacağı için döngü ilerletici görevini yerine getiremez olarak hücre döngüsü durdurulmuş olur. Hücre döngüsü durduğunda hücre hasarlı DNA'sını tamir etmek için zaman kazanmış. Bu esnada DNA tamir edilir. Fakat tahrip tamir edilemeyecek kadar yüksek seviyede ise bu kez p53 geni hücreyi apoptoza yönlendirmektedir. Bu sayede, apoptozisin hücre döngüsüyle olan korelasyonu da göz önünde bulundurulduğunda apoptoz, hücre döngüsü ve kemoterapinin aralarındaki etkileşimlerin kanser hastalarının tedaviye olan yanıtını belirleyeceğini göstermektedir [23].



Şekil 1.4. Hücre siklusunda p53 proteinin rolü

1.4. Oleuropein

Akdeniz ülkelerinde yapılan epidemiyolojik incelemeler ölüm oranının azaldığını ortaya koymuştur. Ölüm oranlarının azalması ise Akdeniz ülkelerinde yaşayanların beslenme şekilleri ile ilişkilendirilmiştir. Akdeniz diyeti sayesinde kardiyovasküler hastalıklar ve kanser oranında ciddi bir düşüş meydana gelmektedir. Kanser ve kardiyovasküler hastalıklardaki koruyucu etkisi hem meyve ve sebzeler açısından zengin hem de zeytin ürünleri açısından zengin olan Akdeniz diyeti sayesinde meydana geldiği ortaya konulmuştur. Sadece meyve ve sebzelerce zengin fakat zeytin ürünleri açısından fakir olan diyet, zeytin ürünlerince zengin olan diyetler kadar etkili olmamıştır. Zeytin ürünlerince fakir olan diyetler zeytin ürünlerince zengin olan diyetler kadar koruma sağlamadığı yapılan klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Bu koruyucu etki zeytin ve zeytinyağındaki polifenol ve flavonoidlerin antioksidan etki göstermesinden

kaynaklanmaktadır. Zeytin bitkisi antioksidan etki gösteren yağ asitlerince de zengin bir bitkidir. Antioksidan denilen bu bileşikler hücrelerde oksidasyonu engelleyebilmekte ya da geciktirebilmektedir [39].

Oleuropein, neredeyse zeytin bitkisinin tüm dokularında bulunmaktadır. Zeytinin olgunlaşmamış dönemlerinde, zeytinin yapraklarında çok fazla miktarda bulunduğu gösterilmiştir. Oleuropein zeytine acı tadını veren maddedir. Olgunlaşmamış zeytinlerde oleuropein, meyve ağırlığının yaklaşık olarak %2'sini meydana getirmektedir. Zeytin meyvesi olgunlaştıkça zeytindeki oleuropein miktarı da düşüş göstermektedir. Meyvelerde bulunan oleuropein içeriği, genç meyvedeki kuru maddenin %14'üne kadar ulaşabilmektedir. Küçük meyveli zeytinlerde, yüksek oranda oleuropein içeriği bulunurken, büyük meyveli zeytinlerde genellikle oleuropeinin az miktarlarını içermekte olduğu bildirilmektedir [39].

1.4.1. Oleuropein'in kullanım alanları

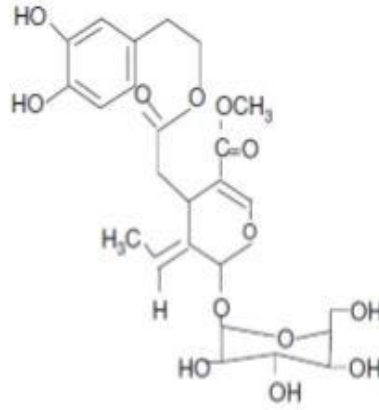
Zeytin meyvesinin ve zeytin yaprağının en önemli temel fenolik bileşenlerinden bir tanesi oleuropeindir. Oleuropein çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. 19. yüzyılda ateşli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarla, oleuropein'in antimikrobiyal, antiviral ve antifungal etkilerinin olduğu bulunmuştur. Oleuropein'in kimyasal yapısı 1970 yılında araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır. Yıllar önce olduğu gibi günümüzde de yapılan çalışmalar oleuropein'in kardiyovasküler hastalıkları azalttığı, lipoprotein yapılarının oksidasyonunu engelleği kanser riskini azalttığı antioksidan gibi davranarak hücrelerin genetik olarak mutasyona uğramasını engellemek gibi sağlık üzerine birçok olumlu etkilerinin olduğu desteklenmektedir [39,44].

Türkiye'nin coğrafi konumu nedeniyle dünyada zeytin ağacı sayısı bakımından en zengin ülkeler içinde yer aldığı bilinmektedir. Zeytin ağacınca zengin bir ülke olan Türkiye için zeytincilik sektörü, hem tarım hem de sanayi açısından çok büyük önem teşkil etmektedir. Akdeniz diyeti ile beslenme sayesinde zeytin ve zeytin ürünlerinin içeriğindeki yüksek fenolik maddeler insan sağlığı açısından çok önemli bir role sahiptir. Günümüzde ticari olarak tıp, ilaç ve kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılan zeytin bu denli değerli olmasından dolayı sürekli araştırmalara konu olmaktadır. Zeytinin meyvesi ve yaprağındaki fenolik bileşikler bu bitkiden yeni yararlanma yollarının

olacağını düşündürmekte ve ilgiyi üzerine çekmektedir. Zeytin sadece tıp, ilaç ve kozmetik sanayinde kullanılmakla kalmayıp gıda sanayinde de yerini almıştır. Zeytinin yapraklarından elde edilen çay piyasaya sürülmüş durumdadır. Bu çayı kullanan diyabet hastalarında insülin değerlerinin dengelediği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Sağladığı bu koruyucu etki dışında zeytin ağacının dayanıklılığını da önemli bir yer tutmaktadır. Oleuropein'in büyük bir kısmı hidrolize olarak zeytine yenilebilir bir özellik katmaktadır. Oleuropein aynı zamanda mikroorganizmalara karşı inhibe edici aktiviteye sahiptir. Doğal katkı maddesi olarak kullanımı amacı ile yan ürün olan zeytin yapraklarının değerlendirilme fırsatına sahip olması ve bu durumun ülke ekonomisine sağlayacağı büyük katkılar açısından da büyük önem arz etmektedir [39,44].

1.4.2. Oleuropein'in biyokimyasal özellikleri

Zeytin hiçbir işlemten geçmeden direkt olarak zeytinin kendisinden, posasından, zeytinyağından ve zeytinyağı üretim tesislerinde meydana gelen atıklardan oleuropein elde edilebilmektedir. Oleuropein yani zeytinin içeriğindeki fenolik madde miktarı tarımsal yetiştirme metoduna göre değişkenlik gösterebilmektedir. Yetiştirilen tüm zeytinlerde oleuropein olacağı anlamı çıkartılmamalıdır. Fakat oleuropein yerine demethyloleuropein ve verbacoside gibi değişik fenolik bileşikler oluşabilmektedir. Bazı istisnalar dışında oleuropein ve türevlerinin oranı meyvenin aşırı büyüme ve gelişme süresi içinde azaldığı bilinmektedir. Bu istisnalardan bir tanesine örnek verilecek olursa çok sıcak iklimlerde yetiştirilen zeytinlerden elde edilen zeytinyağlarının soğuk iklimlerde yetiştirilen zeytinlere göre çok daha fazla oranda biofenol içerdiğine sahip olduğu saptanmıştır. Zeytinyağından oleuropein eldesinde de mekanik yağ ekstraksiyon proseslerinde parçalama ve malaksasyon işlemleri kilit noktalardan biridir. Zeytinyağının içerdiği fenolik alkoller birbirleri ile sürekli etkileşim halinde bulunmaktadırlar. Mesela total fenol içeriği 200 µg/ml'den çok olan yağlarda 3,4-DHPEA ve bütün zeytinyağlarında mevcut olan p-hydroxyphenyl ethanol birbiri ile sürekli bir etkileşim halindedir. İki fazdan oluşan ve alperujo olarak isimlendirilen atıklar zeytinyağı yapımı sırasında meydana gelmektedir. Alperujonun organik olarak içeriğini şekerler, taninler, polialkoller, pektinler, lipidler ve fenoller meydana getirmektedir [13,44].



Şekil 1.5. *Oleuropein'in kimyasal yapı formülü (Moleküler ağırlığı: 540.51).*

1.4.3. Oleuropein'in etki mekanizması

Visioli ve Galli yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, oleuropein'in CuSO_4 ile indüklenen LDL oksidasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiğini ve bununla birlikte Akdeniz diyetleri arasında bir bağ olduğunu ifade etmişlerdir. Oleuropein'in, düşük yoğunluktaki lipoproteinlerin oksidasyonunu ve serbest radikal süpürmesini engellemek gibi güçlü antioksidan etki gösterdiğini ve bununla birlikte oleuropein, patofizyolojik süreçleri hücresel seviyede büyük oranda olumlu olarak değiştirdiği bulunmuştur. De la Puerta ve ark. oleuropeinin, hem nitrik oksidi ortadan kaldırma özelliğine hem de hücredeki indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunda bir artışa sebep olma özelliğine sahip olduğunu ispatlamıştır.

De la Puerta ve ark., rafine edilmemiş zeytinyağı apolar olmayan fraksiyonundan önemli fenolik bileşiklerin (oleuropein, tirosol, hidroksitiron ve kafeik asit) lökositlerindeki anti-eikozanoid ve antioksidan etkilerinin olduğunu saptamışlardır [32].

Carluccio ve ark. , oleuropein'in, aterogenezi ciddi bir erken adım olan vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1), mRNA ve proteininin yanında uyarılmış endotele monositoid hücre adezyonunu düşürdüğünü bildirmiştir.

Serbest radikal teorisine göre yaşlanma, hayatı boyunca en başta mitokondri olmak üzere oksidatif hasarın sonucu olarak meydana gelmektedir. Bazı oksidatif hasarlar tamamen engellenemez ve hücrelerde görev bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir. Mitokondriyal membranla, fosfolipidlerinin lipid kuyruklarında iki bağlı karbon-karbonunun olması sebebiyle, bilişsel ve nörodejeneratif hastalık yapmasına yol

açan serbest radikal istilasına karşı çok daha hassastır. *In vitro* ve epidemiyolojik çalışmalar, demans gibi yaşla alakalı bozuklukların insidansına naturel olarak ekstrakte edilen polifenollerin pozitif etkisi bulunduğu saptanmıştır. Başka bir çalışmada ise oleuropein'in Alzheimer hastalığına has A β agregasyonunun düşürülmesine hatta önlenmesine yönelik olumlu etkilerinin olduğunu göstermişlerdir. Oleuropein'in beyinin işlevleri üzerindeki potansiyel etkisi, AD'nin ateroskleroza çok benzediği çalışmalar sonucunda saptanmıştır. Her ikisi de, anormal olmayan bir metabolitin (sırasıyla kolesterol ve A β) normal olmayan birikiminin klinik semptomlardan önce geldiği ve hastalığa sebep olduğu ve bunun yaş ile ilgili hastalıklar olduğu saptanmıştır. Kalp hastalığı, hiperkolesterolemi ve AD arasındaki kolerasyon bu bozuklukların patogenezinde benzer mekanizmaları içinde barındırır. Kolesterol ile alakalı müdahalelerin A β tutulumunu artırıp azaltılabileceğine dair esaslı kanıtlar, AD'nin yönetiminde oleuropein'in umut verici pozitif etkisinin olabileceği düşünülmektedir [13,39,44].

1.4.3.1. Oleuropein ve kanser ilişkisi

Antioksidanlar, oksidasyonu geciktiren ya da engelleyen bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Oksidasyon tepkimeleri gerçekleştiğinde serbest radikaller ve reaktif oksijen çeşitlerinin olduğu ortaya konmuştur. Antioksidanların yapısında bulunan eşlenmemiş elektronlar vardır ve antioksidanlar oldukça reaktiftir. Bu yüzden diğer moleküllerle çok kolay reaksiyona girerler ve onların yapısını çok rahatlıkla bozabilmektedir [13,38]. Özellikle zeytin ve zeytin ürünlerinde α -tokoferol ve koruyucu antioksidan fenolik maddeler kompleksi sayesinde aşırı derece bir antioksidan kapasitesi olduğu saptanmıştır. Zeytin ve zeytinin türevlerinden meydana gelen ve en başta oleuropein olmak üzere zeytinde çok çeşitli (verbacoside, afijenin-7 glikozit, hidroksitrozol, ligustroside ve dimetiloleuropein gibi) fenolik bileşikler bulunmaktadır [13,38,44]. Bunlarla birlikte sürdürülen bilimsel çalışmalar, zeytin yaprağının da başta fenolik bileşikler (özellikle oleuropein) olmak üzere antioksidanlarca çok zengin olduğunu ve bağışıklık sistemi, patojenlerin kontrolü ve kalp-damar sağlığı üzerine pozitif etkilerinin olduğunu kanıtlamışlardır.

Oleuropein 1970 yılında Inouye ve ark. , tarafından oleuropein'in molekül formülü tanımlanmıştır. Bu durumda oleuropein, hidroksitrozol olarak tanımlanan bir polifenol, elenolik asit ismi verilen sekoiridoit ve bunlara ek olarak glikoz molekülünden meydana gelmektedir. Oleuropein'in temel bioaktif yapı taşı oluşturulan hidroksitrozol

çok güçlü bir antioksidan olduğu, diğerk bir yapı taşı elenolik asitin ise antiviral özellikleri olduğu saptanmıştır. Yani içeriğı de gözönüne alındığında oleuropein hem antioksidan hem de antiviral özellikleri içinde barındırmaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalar, oleuropein'in lipoproteinlerde meydana gelen oksidasyonu engellemek, kardiyovasküler hastalıkları ve özellikle de kanser riskini azaltmak ve antioksidan etki göstererek hücrelerin genetik olarak hasar almasını önlemek gibi sağlık üzerine pozitif etkilerinin olduğunu desteklemektedir [39,44].

Günümüzde oleuropeinin etki mekanizması henüz kesin olarak bilinmese de fenolik bileşiklerin, proteinleri bozma yeteneğine sahip olduğu ve hücre membranının geçirgenliğini olumsuz yönde etkilediğini bildirmişlerdir. Klasik olarak yüzey aktif ajanlar olan bu bileşikler antimikrobiyal aktivitelerini, hücre zarına hasar vererek gerçekleştirmektedir. Hücre peptidoglikanlarını parçalayarak; protein, inorganik fosfat, glutamat ya da potasyum gibi sitoplazma bileşenlerinin sızmasına sebep olmaktadırlar. Fenolik bileşiklerin düşük yoğunluklarda ATP üretiminde görev alan enzimlerin aktivitesini etkilerken, yüksek konsantrasyonları proteinleri çöktürmektedir [39,44].

1.5. Sitotoksisite Testleri

Sitotoksisite; moleküler olaylar sonucu çeşitli makromolekülerin üretilmesinin önlenmesi ve buna bağılı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında hasar oluşmasını tanımlayan bir terimdir. Sitotoksisite testleri ise, hücrelerde oluşan bu olayların varlığının tespit edilmesi ve hücrelerde hangi ölçüde ne derece hasar meydana getirdiğinin saptanması ilkesine dayanmaktadır.

In vitro ortamda yapılan çalışmalar; hücre canlılığının belirlenmesinde, hücre ölümü, hücre zarının yapısının bozulması, DNA ve protein üretimi, hücre bölünmesi gibi birçok faktörün rol oynadığı ortaya konulmuştur. Test edilecek olan aktif maddenin seçilen hücre üzerindeki toksik aktivitelerini ortaya koymak amaçlanmaktadır. Bundan sonra; potansiyel aktif maddelerin tanımlanması, maddenin hangi mekanizmayla toksik etkiyi meydana getirdiğı, antikanser aktivitenin tahmin edilmesi, potansiyel odak hücre popülasyonunun tanımlanması, toksik konsantrasyon aralığının tanımlanması, maruz kalma-yoğunluk korelasyonu incelenerek yöntemler belirlenmektedir.

1.5.1. Kalitatif sitotoksisite testleri

- a) Extraction/elution yöntemi
- b) Agar difüzyon yöntemi
- c) Direkt kontakt yöntemi

1.5.2. Kanitatif sitotoksisite testleri

- a) Tripan mavisi testi
- b) Nötral kırmızısı testi
- c) Alamar mavisi testi
- d) XTT testi
- e) MTS testi
- f) WST-1 ve WST-8 testi
- g) Hücrelerdeki ATP miktarının ölçümüne dayalı test- ATP ASSAY
- h) LDH testi
- i) MTT testi

1.5.2.1. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) testi

MTT testi, mikropate ölçümü, temel değişik parametrelerle beraber hücre canlılık ve çoğalmasına bağlı olarak geliştirilmiş bir yöntemdir. Hücrelerin canlılık düzeylerini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. DNA sentezi ve metabolik aktiviteler mikropate formatında kullanılan en önemli parametrelerdir. Hücresel hasardan korunma özelliği olan hücreler ve metabolik fonksiyonları büyüme ve gelişme için ATP sağlamak elzem hale gelmiştir. Metabolik aktivite ölçümü için bu parametre dayanak noktası temelidir. Klasik olarak bu yöntem hücrelerin mitokondriyal aktivitelerini ölçmektedir. Kısaca, MTT testi hücrenin canlılığının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Hücreler bir kolorimetrik substratla beraber inkübe edildikten sonra okuma gerçekleştirilmektedir. MTT tetrazolium tuzu kullanılan bir mikropate testi klasik olarak hücre çoğalması ve sitotoksitesinin kantitasyonunu ölçmek amacıyla kullanılmaktadır. Tetrazolium tuzunun sadece yaşamını sürdüren hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesi sebebiyle bu yöntem sadece canlı hücreleri belirlemektedir. MTT içerisinde bulunan canlı hücreler

boyanıp renklenirken, suda çözünmez formazan tuzu tarafından indirgenir. Formazan kristalleri çözüldükten hemen sonra, hızlı ve kolayca klasik mikropate okuyucusunda (maximum absorbans) 570 nm de miktarı belirlenebilmektedir. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzudur. Fenol kırmızısı içermeyen besiyeri veya tuz solüsyonlarıyla hazırlandığı zaman sarımtırak bir solüsyon meydana getirmektedir. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanması sonucunda MTT mor renkli çözünmez bir formazana dönüşmektedir. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri sayesinde meydana gelmektedir. Oluşan bu formazan izopropanol ya da farklı bir çözücü yardımı ile çözdürüldükten sonra oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunularak yüzde canlılık hesaplanacak absorbanslar elde edilmektedir [40].

1.6. Nanopartiküller

Son yıllarda yeni ve gelişen bir çalışma alanı oluşturan nano boyutlu malzemeler üzerine gerçekleştirilen çalışmalar ve araştırmaların sayısı artmıştır. Nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar veya nano ince filmler nano olarak adlandırılan malzemelerdir. Bu araştırmalar üzerine ilginin artmasının asıl nedeni maddelerin belli boyut aralığında hacimsel yapılarından farklı olarak sıradışı spesifik özellikler ve işlevsellik göstermeleridir. Büyüklükleri çoğu zaman 100 nm ve altında kalan toz parçacıkları olarak adlandırılan nanopartiküller ise nanoboyutlu malzemelerin yani kısaca nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadırlar. Bu partiküller diğer ticari malzemelerden neredeyse her zaman farklı ve çok daha üstün kabul edilen bir takım spesifik özellikler sergilemektedir. Günümüzde nanopartiküllerin bu denli çalışmalarda ilgi görmesinin sebebi kullanım alanı çok geniş olması, yüzeyinde bulunan atomların benzersiz karakteristik özellikleri ve bunların yanısıra yüksek olan yüzey/hacim miktarı olarak ön plana çıkmaktadır. Nanopartikül sentezi bu yapıların sergiledikleri sıradışı özellikler sayesinde yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için spesifik teknolojik malzemeler elde edilmiştir. Bununla birlikte süperiletkenler, aşınmaya karşı katkılar, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok farklı kullanım alanları sayesinde teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanması ve geliştirilmesinin önünü açmış bulunmaktadır. Bununla birlikte

nanoteknoloji birimi, nanotaşıyıcılar, sensörler, nanomakineler ve yüksek yoğunluklu veri depolama hücreleri gibi kendine has fonksiyonlara sahip minyatürleştirilmiş aygıtların meydana getirilmesine izin vermektedir. Nanoyapılı malzemelerin ve cihazların tasarlanmasını, üretimini ve fonksiyonel olarak kullanımını içine alan nanoteknoloji alanındaki yeni gelişmeler için vazgeçilemez ilk adım nanopartiküllerin üretimi olmuştur. Nanoteknolojik malzemelerin çıkış noktasını meydana getiren nanopartiküller çok geniş bir kimyasal aralık ve morfolojide üretilmektedirler. Nanopartiküllerin üretiminde kullanılan teknikler; aşağıdan yukarı ve yukarıdan aşağı olarak isimlendirilen iki ana yaklaşım altında incelenmektedir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımı ile çalışan tekniklere verilebilecek en klasik örnekler; fiziksel öğütme ve aşındırma olabilir. Bu yöntemler bazen yüksek hız değirmeni veya yüksek enerjili öğütme adımı da alabilmektedir. Bunun sebebi genellikle öğütme işlemi yapılırken çok daha fazla enerjiye ihtiyaç duymalarıdır. Molekül ya da atom boyutundaki yapıları bir takım kimyasal reaksiyonlar kullanılarak partikül boyutuna getirme metodu ise aşağıdan yukarı metodu olarak tanımlanmaktadır. Gaz yoğunlaştırma yönteminde nanokristal metal ve bunların alaşımlarının üretilmesi aşağıdan yukarıya metodu ile çalışmaktadır. Aşağıdan yukarıya metodunda gaz yoğunlaştırma dışında kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol jel ve sprej piroliz teknikleri de kullanılmaktadır. Bu yöntemler de aşağıdan yukarı metodunun en bilindik örneklerindendir. Yukarıda bahsedilen, partiküllerin üretim şekli dışında kimyasal ya da fiziksel temelli olmak üzere iki ayrı tasnif de yapılabilmektedir. Kimyasal temelli olan teknikler kimyasal reaksiyonları meydana geldiği, fiziksel temelli olan teknikler ise mekanik ve fiziksel enerji gerektiren mekanizmalardır [21,40].

1.7. Katı lipid nanopartiküllerin sentezlenme yöntemleri

Oda sıcaklığında ve vücut ısısında katı halde bulunan lipidlerle hazırlanan bununla birlikte emülgatörlerle kararlılığı sağlanan, nanometre boyutundaki partiküller katı lipid nanopartiküller (SLN) olarak tanımlanmaktadır. SLN'lerin bileşeni klasik olarak katı lipidler, emülgatörler ve sudan meydana gelmektedirler. Lipidin tanımlanmasındaki kullanılan skala çok geniş bir yer tutmaktadır. Lipidler çoğunlukla, GRAS özelliğine sahip olan fizyolojik bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Lipid çözücüsünü kararlı hale getirmek için kullanılabilecek emülgatör çeşitleri molekül ağırlığı ve yüklerine bakılarak belirlenmektedir. %1-5 emülgatör veya

emülgatör/yardımcı emülgatör kompleksi kullanılarak kararlı hale gelebilmektedirler. Seçilen emülgatör yöntemin uygulama şekline bağlıdır. Emülgatör amaçlı kullanılan maddelere lesitinler, poloksamerler, etoksillenmiş monogliseridler ve polisorbitatlar örnek verilebilir [21,40].

SLN'lerin Avantajları: SLN'ler; lipozom, emülsiyon ve katı partiküllerin sağladığı avantajların farklı kombinasyonunu içersinde barındırmaktadır. Avantajları şu şeklide sıralanabilir. Organik madde çözücü kalıntısı içermezler. Sistemik toksisitesi düşüktür. Düşük sitotoksisiteye sahiptirler. Üretimi ve kullanımı kolaydır ve büyük oranda üretilebilirler. Bunların yanı sıra yağ emülsiyonlarının ve dokulara etken madde odaklanabilmesi gibi lipozomların avantajlarını içinde barındırırlar. Katı lipid matrisleri sayesinde kontrollü etken madde salımı sağlarlar. Kimyasal bozunmaya karşı etkin maddelerin korunma sağlarlar. Katı polimerik nanopartiküllerin avantajlarına da bünyesinde bulundurmaktadır [21,40].

1.7.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi

SLN üretimi için güvenilir ve etkili bir yöntem olarak yüksek basınçlı homojenizasyon (HPH) yöntemi günümüzde karşımıza çıkmaktadır. Bu prensipte, ilk önce sıvı çok yüksek bir basınçla (100-2000 bar), mikron kadar küçük çaptaki bir delikten itilir. Bu esnada sıvı çok kısa bir sürede çok yüksek bir hıza ulaşmış olur. Bu hız yaklaşık olarak saatte 1000 km/saati'in üzerindedir. Çok yüksek kayma gerilimi ve kavitasyon kuvvetleri, partikülleri mikron altı büyüklüğe kadar parçalayabilmektedir [40]. Yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminin iki farklı uygulanma şekli vardır;

a) Sıcak Homojenizasyon: Her lipidin bir erime noktası vardır. Sıcak homojenizasyon yönteminde de, lipidin erime noktasının üstündeki ısılarda gerçekleştirilmektedir. Bu sebeple, emülsiyonun homojenizasyonu olarak nitelendirilebilir [21]. Kullanılacak olan aktif madde, erime noktasının 5-10 °C üzerine çıkartılan ve eritilmiş olan lipid içerisinde çözülür ya da disperse edilir. Aktif maddeyi içinde barındıran ve erimiş olan lipid, aynı ısıdaki sulu emülgatör çözeltisi içinde yüksek hızda karıştırma yapılarak disperse edilir. Bunun sonucunda elde edilen sıcak pre-emülsiyon homojenizatörden geçirilir ve sonuçta oluşan sıcak nanoemülsiyon oda ısına gelinceye dek soğutulur. Filtreden geçirilir. Bu şekilde lipid katı hale gelir yani rekristalize olur ve katı lipid nanopartiküller elde edilmiş olur. Sıcak homojenizasyon

yöntemi, ısıya duyarlılığı düşük olan etkin maddeler için çok uygun bir yöntemdir [21,40].

b) Soğuk Homojenizasyon: Kuru buz ya da sıvı nitrojen kullanılarak çok hızlı olarak etkin maddenin içinde çözölmüş olan veya disperse edilmiş olan erimiş lipid soğutulur. Katı lipid, yaklaşık 50 – 100 µm boyutundaki lipid mikropartiköllere kadar küçük parçalara ayrıştırılır. Katı lipid mikropartiköller, soğuk emölgatör çözeltisi içersinde disperse edilirler. Elde edilen pre-süspansiyon, oda ısısında ya da oda ısısının altında yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilir. Bu işlemlerin sonucunda katı lipid nanopartiköller meydana gelmektedir [21,40].

1.7.2. Mikroemülsiyon yöntemi

Gasco ve ark, mikroemülsiyonların dilüsyonu temeline dayanan bir SLN hazırlama metodu geliştirmişlerdir. Bu yöntemde ilk olarak, lipid (yağ asitleri ya da gliseridler) eritilmektedir. Su, emölgatör ve koemölgatör karışımı, lipidle aynı ısıda olacak şekilde sıcaklığı yükseltilir ve erimiş lipidin üzerine eklenerek karıştırma işlemi yapılır. Bu maddeler, mikroemülsiyon oluşumu için elzem miktarlarda karıştırıldığı zaman, transparan ve termodinamik olarak kararlı bir mekanizma elde edilir. Oluşan sıcak ya da ılık mikroemülsiyon, spesifik olarak geliştirilen termostatl bir şırınga yardımı ile, çok yüksek miktardaki soğuk su (2–3 °C) içersinde fiziksel bir karıştırma ile disperse edilir. Sıcak mikroemülsiyon: soğuk su hacim oranı, 1:25 ile 1:50 aralığında bir değişiklik göstermektedir. Fazla su, ultrafiltrasyon veya liyofilizasyon sayesinde uzaklaştırılmaktadır [21,40].

1.7.3. Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon veya Çözücü Difüzyon Yöntemi

Bu yöntemde lipid, su ile etkileşime girmeyen organik bir çözücü içinde (toluen, kloroform vb) disperse edilir ve oluşan bu çözelti, bir sulu faz içinde emülsifiye edilmektedir. Çözücünün vakum ile buharlaştırılmasıyla, lipid nanopartikölleri oluşarak çökmektedirler. Bu metodun ciddi bir avantajı, hazırlama esnasında ısı uygulanmamasıdır. Bu sebeple, yüksek sıcaklıkta bozulan aktif maddelerin kullanılabilmesi için uygun bir metoddur [40]. Yöntemin tek dezavantajı da, organik çözücü kullanımını gerektirmesidir. Bunun yanı sıra, bu metod ile üretimin ölçeklendirilmesinde de problemler meydana gelmektedir [21,40]. Bu metod ile elde edilen ürünün ortalama partikül büyüklüğü, organik fazdaki lipidin yoğunluğuna bağlı

olarak değişiklik göstermektedir [40]. Çözücü difüzyon metodunda; su ile nispeten karışabilen çözücüler kullanılmaktadır. Lipid, su ile doyurulmuş çözücü içinde çözülür ve yüksek ısılardaki, çözücü doyurulmuş sulu emülgatör çözeltisi ile emülsifiye edilir. Çok yüksek miktarda suyun eklenmesinin ardından, organik çözücünün emülsiyon damlacıklarından sürekli faza difüzyonu sebebiyle SLN'ler çöker. Hiç de deşişik olmayan bu dispersiyon, ultrafiltrasyon veya liyofilizasyon ile aşırı doymuş hale getirilmektedir [40]. Trotta ve ark., çözücü difüzyon metodu ile ve çok düşük toksisiteye sahip oldukları varsayılan çözücüler ve emülgatörleri kullanarak, gliserin monostearat nanopartiküllerinin hazırlanıp hazırlanamayacağını araştırmışlardır. Benzil alkol veya bütıl laktat gibi kimyasalları kullanarak, emülsifikasyon difüzyon yöntemi ile katı lipid nanokürelerin üretiminin namümkün olmadığını göstermişlerdir [21,40].

1.7.4. Yüksek Hızda Karıştırma ve / veya Ultrasonikasyon Yöntemi

Her iki yöntem de, çok sık bir şekilde kullanılan ve uygulanması çok basit metodlardır. Klasik olarak bu metodlar bir arada kullanılmakta ve belli bir süre zarfında yüksek ısılarda uygulanmaktadır. Yüksek hızda karıştırma metodunun dezavantajı, mikrometre boyutuna ulaşabilen geniş partikül büyüklüğünde ürün elde edilebilmesidir. Bu dezavantaj da, saklama esnasında partikül büyümesi gibi fiziksel kararlılığını koruyamama problemlerine neden olmaktadır. Bunların yanı sıra, ultrasonikasyon metodu kullanılıyorsa, metal kontaminasyonunun dikkate alınması gerektiği unutulmamalıdır [21,40]. SLN üretimi için, modifiye yüksek hızda homojenizasyon ve ultrason metodu geliştirilmiş bulunmaktadır. Bu yöntemin, organik çözücüye ihtiyaç duymadan yüksek kalitede SLN'lerin hazırlanmasında kullanılabilecek, basit, ekonomik ve etkin bir metod olduğu ortaya konmuştur [21].

1.7.5. Katı lipid nanopartiküllerin karakterizasyon metodları

a) Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelin ölçülmesi:

Partikül büyüklüğü ve dağılımı, kolloidal taşıyıcı mekanizmaların en önemli fizikokimyasal özelliği olarak karşımıza çıkmaktadır. Hazırlama yönteminin parametreleri, partikül büyüklüğünü ve dağılımını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Devir sayısı ile birlikte basıncın da çoğaltılması ile partiküllerin büyüklüğünde büyük oranda azalma olduğu gösterilmiştir. Üretimde kullanılan emülgatörün tipi ve oranı da, partikül boyutunu ciddi bir şekilde etkilemektedir. Partikül büyüklüğü ile

emülgatör oranı ters orantılıdır. Yani emülgatör oranını belli bir seviyeye kadar artırmak partikül büyüklüğünü azaltmaktadır. Emülgatörler, SLN'lerin hazırlanması sırasında, damlacıkların yüzeylerini çepeçevre sararak damlacık kümeleşmesini ve uzun vadedeki partikül birleşmesini önleyecek mekanik ya da elektriksel bir engel oluşturmaya çalışmaktadırlar. Damlacıkların kararlılığı gerektiği kadar sağlanabilir ise, katılaştırma işleminden sonra elde edilen partiküllerin boyutu nanometrik aralıkta kalmaktadır [21]. Partikül büyüklüğünün klasik ölçümleri için en güçlü metodlar; foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ve lazer kırınımı tekniği (LD)'dir. SLN'lerin partikül büyüklüğü ölçümünde çok az kullanılmaktadır [40]. Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve elektron mikroskobu SLN'lerin şekillerinin belirlenmesinde kullanılabilmektedir. Düz bir silikon yüzeye sabitlenen nanopartiküllerin şekilleri, AFM ile vakuma ihtiyaç duyulmadan belirlenebilmektedir [21,40]. Kolloidal çözücünün kararlı bir şekilde saklanabilmesi hakkında tahminde bulunmak için zeta potansiyelinin ölçümleri yapılmaktadır. Klasik olarak, yüklü partiküllerde (yüksek zeta potansiyeli), elektriksel itme sebebiyle, partikül birleşmesinin oluşma ihtimali çok daha düşük seviyededir. Fakat bu kural, sterik stabilizatörler içeren sistemler için tam olarak geçerli olmamaktadır. Çünkü sterik stabilizatörlerin adsorbsiyonu, zeta potansiyelini çok bariz bir şekilde düşürmektedir [40].

b) Lipid matrisin yapısının (lipid modifikasyonunun), rekristallenme özelliklerinin ve diğer kolloidal yapıların değerlendirilmesi:

SLN kalitesini belirlemek için, partikül boyutu analizi gereklidir; fakat tek başına yeterli değildir. Lipid modifikasyonunun ve lipidin kristalinite derecesinin karakterizasyonu da gerekli ve önemlidir [40]. Çünkü, bu parametrelerin yani lipid yapıdaki değişikliklerin belirlenmesi, lipid matristeki aktif madde enkapsülasyonu ve etkin maddenin salım hızı ile korelasyon içersindedir [21,40]. DSC ve X ışını kırınımı metodları, lipidin durumunu incelemek için çok sık ve yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Lipidlerin yapısal özelliklerini incelemek için IR ve Raman spektroskopisi yöntemleri de zaman zaman kullanılabilmektedir [50,51,52]. Etkin madde içeriğinin lipidin kristal özelliklerine etkisi, spesifik olarak X ışını kırınımı cihazı ile incelenebilmektedir [21,40].

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

FBS (Fetal Bovine Serum)

Penicilin streptomycine

L-glutamin

DMSO (dimetilsülfoksit)

Tripsin

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide;
Thiazolyl blue)

Oleuropein

Tween 80

2.1.2. Cihazlar

Biyogüvenlik kabini Class 2

Mikroplate okuyucu

Inverted mikroskobu

Santrifüj

Otomatik Pipetler

CO₂ inkübatörü

Su banyosu

Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)

Sıvı azot tankı

Flow sitometri

2.2. Metod

2.2.1. Hücre Kültürü

2.2.1.1. Hücre soylarının stoktan çıkarılması

Hücreler kültür koleksiyonundan alındığında üreyen kültür şeklinde veya donmuş halde bulunmaktadır. Hücreler -80 veya -196 °C’de uzun süre saklanabilmektedir. Dondurulmuş halde bulunan hücreler 37 °C’lik su banyosunda çok hızlı bir şekilde (yaklaşık 1-2 dk) cryo tüpün içine su girmeyecek şekilde bekletilerek çözündürülür. Daha sonra olası kontaminasyonları önlemek için %70’lik etil alkol ile silinerek steril kabine alınır. Önceden 37 °C’ye ısıtılmış olan mediumdan 5 ml alınarak falkon tüpe koyulur. Daha sonra mediumun üstüne çözündürülen hücreler eklenir. Ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra 1000 rpm de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüj işlemi bittikten sonra steril kabin içine alınıp tüpündeki medyum uzaklaştırılır. Sonra tüpün üstüne yeni medyum eklenip pipetaj yapıldıktan sonra flaska 5 ml’lik hacimde aktarılır. Ağzı kapatıldıktan sonra 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılır. Olası bir kontaminasyon yada pasajlamaya karar verebilmek için hücreler günlük olarak inverted mikroskopta kontrol edilir.

2.2.1.2. Hücre soylarının pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması gerektiğine ve sağlıklı olup olmadıklarına karar verebilmek için hücreler günlük olarak kontrol edilmelidir. Kontrol edildiğinde eğer flastaki hücre yoğunluğu yaklaşık olarak %80 veya daha yoğun olduğu gözlenirse pasajlama işlemi gerçekleştirilir. Pasajlanacak hücreler mikroskopta bakıldıktan sonra steril kabinin içine alınır. Flaskın üstündeki medyum uzaklaştırılır. Sonra önceden 37°C’ye getirilmiş olan PBS’den 3 ml flaska konulur ve ağzı kapatılarak flask nazikçe sağa sola hareket ettirilir ve bu şekilde hücreler yıkanır. Daha sonra PBS uzaklaştırılır. Hücrelerin üzerine tripsin eklenir. Flaskın ağzı kapatılarak 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 5 dk inkübe edilir. İnkübasyon süresinin sonunda flask tekrar steril kabine alınır. Üzerine tripsini nötralize etmek için medyum ilave edilir ve iyice pipetaj yapılır. Flaskın içindeki tüm materyal falkon tüpe alınır. 1000 rpm’ de 5 dk santrifüj edilir. Falkon tüp %70’lik etil alkol ile silinerek steril kabin içine alınır. Tüpteki medyum uzaklaştırılır. Tekrar üzerine medyum ilave edilerek yeni flaslara hücrenin yoğunluğuna göre

bölüştürülür. Bir sonraki pasajlamaya kadar hücreler 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilir. Hücreler günlük kontrol edilir.

2.2.1.3. Hücre soylarının stoklanması

Doluluk oranı artmış olan flasklar steril kabine alınarak üzerindeki medyum uzaklaştırılır. 3 ml PBS ile yıkanır. Üzerine 500 µl tripsin eklenir ve 5 dk inkübasyona bırakılır. Flaskın üzerine 5 ml medyum eklenir. Falkon tüpe alınarak 1200 rpm de 5 dk santrifüj edilir. Tüpteki medyum uzaklaştırılır. Üzerine 1,8 ml medyum eklenir. İyice pipetaj yapılır. Falkon tüpteki hücreler cryo tüpe alınır. Üzerine 0,2 ml DMSO yavaş yavaş eklenir ve cryo tüpün ağzı sıkıca kapatılır. Buz dolu bir kabın içerisinde yarım saat kadar bekletilir. Daha sonra -20 °C de 2 saat kadar bekletilir. -80 °C'deki buzdolaplarına ya da -196 °C'deki azot tankına yerleştirilir. Hücreler bu şekilde stoklanarak uzun süre saklanabilir.

2.2.1.4. Kullanılan besi yerinin hazırlanması

Kullanılan besi yerinin hazırlanması için;

500 ml sıvı DMEM,

5 ml Penicilin streptomycine,

50 ml FBS (Fetal Bovine Serum) kullanılır.

Hepsi karıştırılır ve 22 µm filtreden geçirilerek filtre edilir.

Hazırlanan besi yeri +4 °C'de saklanır.

2.2.2. Oleuropein katı lipid nanopartikül sentezlenmesi

Bu çalışmada kullanılacak olan oleuropein katı lipid nanopartikülü sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Sıcak homojenizasyon, lipidin erime noktasının üstündeki ısılarda gerçekleştirilir ve bu sebeble, emülsiyonun homojenizasyonu olarak değerlendirilebilir [52]. Oleuropein, erime noktasının 5-10 °C üzerinde bir sıcaklığa kadar eritilmiş olan lipid içerisinde disperse edildi. Oleuropein içeren erimiş lipid, aynı sıcaklıktaki sulu emülgatör çözeltisi içinde yüksek hızda karıştırma ile disperse edildi. Elde edilen sıcak pre-emülsiyon homojenizatörden geçirildi ve sonuçta oluşan sıcak nanoemülsiyonu oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutuldu. Daha

sonra filtrasyon gerçekleştirildi. Bu şekilde lipid katılaştı (rekristalize oldu) ve katı lipid nanopartikller elde edildi [21,38,40].

2.2.2.1. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin karakterizasyonu

2.2.2.1.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyel lm

Oleuropeinin nano-oleo formunun zeta potansiyel, partikül boyutu ve elektriksel iletkenlik lmleri Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Bu lm için nanopartikller sonikatörde hazırlanmış ve 50 μ S iletkenlikteki distile suda seyreltilerek, sıcaklığı 25°C, ışık saçılım açısı 90° olarak ayarlanmış cihazda analiz edilmiştir. Üç kez gerçekleştirilen analizlerin ortalama değerleri kullanılmıştır.

2.2.3. MTT canlılık yöntemi

3T3 ve 5RP7 hücreleri her kuyucukta 5×10^3 olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Seri dilüsyon yöntemi ile 3T3 ve 5RP7 hücreleri 1,56 -100 μ M dozları arasında oleuropein ve nano-oleo ile 24 saat süreyle 37 °C ve %5 CO₂ inkübatörde muamele edilmiştir. 24 saat inkübasyonun sonunda her kuyuya 20 μ l MTT eklenip tekrar 2 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası canlı hücrelere giren MTT koyu mavi renkli formazan ürününe dönüştüğü için renk değişimi gözlenmiştir. Inkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki medyum ve ilaçlar uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 100 μ l DMSO zeltisi koyulup formazan kristallerinin çözülmesi sağlandıktan sonra plaka okuyucusunda 540 nm de absorbans değerleri okutulmuştur.

2.2.4. Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopi ile tayini

Oleuropein ve nano-oleo formu ile 24 saat IC₅₀ konsantrasyonunda 6 kuyulu plakalarda muamele edilen 3T3 ve 5RP7 hücreleri falloidin ve akridin oranj ile ikili boyanarak konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. İşaretlenmiş örneklerden yüksek çözünürlükte farklı fokal dzelemlerden alınan optik kesit katmanları tekrar st üste koyulup yapılandırılarak görüntüler Leica SP5II konfokal mikroskobu arayüzünde elde edilmiştir [15,24].

2.2.5. Geçirimli elektron mikroskobunda hücre takip yöntemi

Araştırmacılar tarafından elektron mikroskopu (EM) ile değerlendirme yöntemi apoptozisde en değerli yöntem (“gold standard”) olduğunu belirtilmektedirler. Morfolojik değişikliklerin en kesin ve güvenilir olarak gözlemlendiği bir metoddur. Üstelik çok ince detaylar (örn. mitokondrinin durumu, hücre membranı veya nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) da incelenebilmektedir [30,31]. Yine 24 saat süre ile oleuropeinin ve nano formülasyonunun IC₅₀ değerine maruz bırakılan hücreler flasklarda glutaraldehit ile fikse edilmiş ve tüpte 1200 rpm’de 5 dakika santrifüjlendikten sonra ağara gömülerek standart doku takip prodesürüne maruz bırakılmışlardır. Doku takibi sonunda örnekler resine gömülerek 60 derecede 48 saat inkübatörde polimerize edilmişlerdir. Elde edilen bloklar traşlandıktan sonra yarı ince kesitler alınmış ve ince kesit alınacak bölgeler belirlenmiştir. 100 nm boyutundaki ince kesitler ultramikrotomla alınarak bakır gridlere yerleştirilmiştir. Uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanan kesitlerin geçirimli elektron mikroskobunda (FEI, Tacnai, BioTwin, Hollanda) görüntüleri alınmıştır.

2.2.6. Akım sitometri yöntemi

Normal hücrelerde hücre membranının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza gidiyorsa normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre membranının dış yüzüne doğru harekete geçer. Bu yer değiştirme hücre zar bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelmektedir. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğundan dolayı, floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilmektedir [35]. Hücreler bu çalışmada 24 saat süre ile oleuropein ve nano-oleo formu ile muamle edildikten sonra 6 kuyulu plakalarda standart hücre kaldırma prosedürü uygulanarak kaldırılmış ve tripsini nötralize etmek için medyum kullanılmıştır. Santrifüj işlemi 2 kez 1200 rpm’de 5’er dakika gerçekleştirilmiştir. Her santrifüjde yeni PBS ilavesi ile hücreler yıkanmış ve son PBS ilavesinden sonra tüp içerisinde süspanse edilmiştir. Bu hücre süspansiyonundan bir ependorf tüpüne 100 µL aktarıldıktan sonra üzerine aneksin V solüsyonundan 100 µL 20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübasyon gerçekleştirilmiş ve hücre analiz cihazında (Muse Cell Analyser, Merck-Millipore) analiz işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.2.7. İstatiksel analizler

İn vitro sitotoksosite testlerinde IC₅₀ değerlerinin hesaplanmasında Excel programının tahmin fonksiyonundan yararlanılmıştır. Elde edilen % canlılık değerlerinin kontrole göre olan anlamlılıkları Graph Pad Prism 7.0 bilgisayar programı ANOVA analizi ile hesaplanmış ve p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



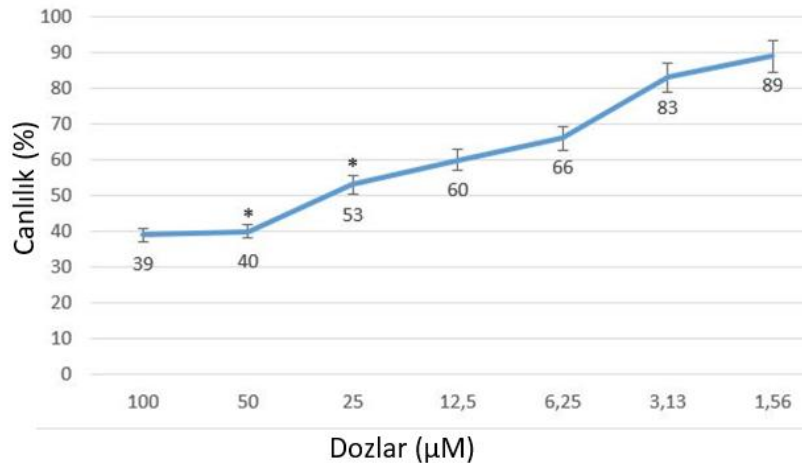
3. BULGULAR

3.1. MTT Kolorimetrik Sitotoksosite Bulguları

Çalışmada kullanılan oleuropein ve nano oleo forunun in vitro sitotoksik etkileri MTT testi ile araştırılmıştır. Test sonucunda elde edilen absorbanslardan kontrole göre yüzde canlılık değerleri hesaplanmıştır ve IC_{50} değeri hesaplanmıştır. H-ras transforme edilmiş 5RP7 hücreleri için oleuropeinin 24 saatlik IC_{50} değeri $63 \mu M$ olarak hesaplanmıştır. Diğer deneylerde de bu değer kullanılmıştır. Yine 5RP7 hücreleri için nano-oleo'nun IC_{50} değeri $21 \mu M$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer de diğer çalışma aşamalarında kullanılarak doz olarak belirlenmiş ve kullanılmıştır. Normal 3T3 fare embriyo fibroblast hücreleri için IC_{50} değeri hem oleuropein hemde nano-oleo için uygulanan dozların çok daha üst dozları olduğu için hesaplanamamıştır.

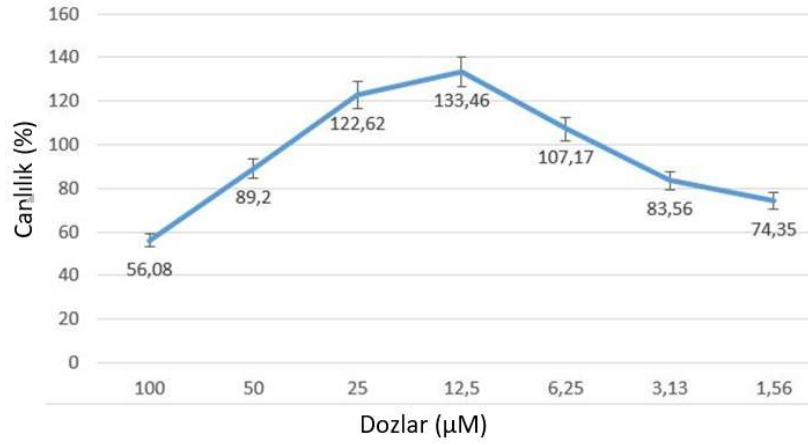
3.1.1. Oleuropein'in 5RP7 hücreleri üzerindeki sitotoksosite bulguları

Sıçan embriyo fibroblast 5RP7 hücreleri üzerine 24 saat süreyle uygulanan oleuropein'in hücreler üzerine sitotoksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Hücrelerin %50'sini öldüren doz IC_{50} değeri $63 \mu M$ belirlenmiştir. Oleuropein'in 5RP7 hücreleri üzerine düşük dozda sitotoksik etki ettiği bulunmuştur. Bu etkinin doza bağlı olarak arttığı gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 5RP7 hücreleri üzerine 24 saat boyunca uygulanan Oleuropein'in grafiği (IC_{50} değerinin $63 \mu M$ olduğu tespit edilmiştir. $*P < 0,05$).

3.1.2. Oleuropein'in 3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik bulguları



Şekil 3.2. 3T3 hücreleri üzerine 24 saat boyunca uygulanan Oleuropein'in grafiği.

Oleuropein'in 3T3 fare embriyo fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin olmadığı başka bir deyişle bu tez deneyleri kapsamında saptanamadığı belirlenmiştir.

3.2. Oleuropein Katı Lipid Nanopartiküllerinin Karakterizasyon Bulguları

3.2.1. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin zeta potansiyel ölçümü bulguları

Zeta potansiyeli ölçümü katı lipid nanopartiküllerin yüzeyindeki net yükün belirlenmesinde kullanılmaktadır. Nanopartiküller zeta potansiyellerine göre farklı kararlılıkta olabilirler. Laboratuvarımızda sentezlenen oleuropein katı lipid nanopartiküllerin kararlılığını belirlemek amacıyla zeta potansiyelleri ölçümü yapılmıştır. Değerler aşağıdaki şekilde verilmiştir.

Tablo 2.1. *Oleuropein zeta potansiyel ölçümleri*

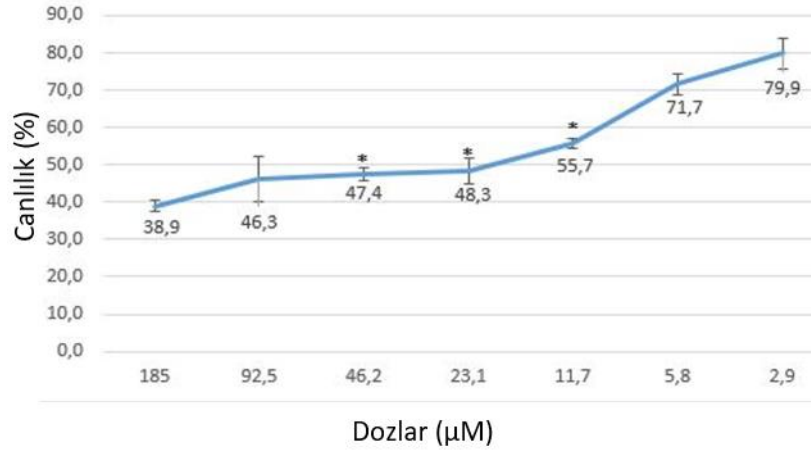
Partikül Boyutu (nm)	1920
Zeta Potansiyel (mV)	-5,72
İletkenlik (mS/cm ²)	0,0124
Polidispers İndex	1

Tablo 2.2. *Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin zeta potansiyel ölçümleri*

Partikül Boyutu (nm)	13,54
Zeta Potansiyel (mV)	-5,72
İletkenlik (mS/cm ²)	0,0124
Polidispers İndex	0,0421

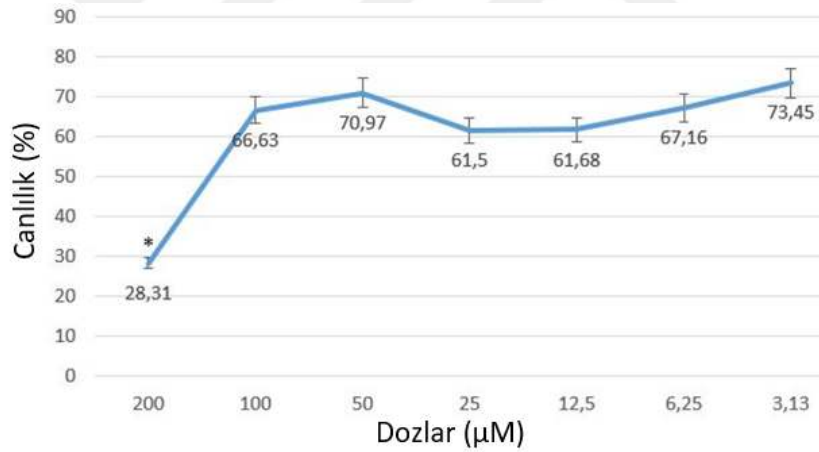
3.2.2. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin 5RP7 hücreleri üzerindeki sitotoksikite bulguları

Sıçan embriyo fibroblast 5RP7 hücreleri üzerine 24 saat süreyle uygulanan oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin hücreler üzerine çok düşük dozlarda sitotoksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Hücrelerin %50'sini öldüren doz (IC₅₀ değeri) 21 µM belirlenmiştir. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin oleuropein'e göre 5RP7 hücreleri üzerine çok daha düşük dozda sitotoksik etki ettiği bulunmuştur.



Şekil 3.3. 5RP7 hücreleri üzerine 24 saat boyunca uygulanan Oleuropein yüklü katı lipid nanoparçacıklarının grafiği (IC_{50} değerinin $21\mu M$ olduğu tespit edilmiştir).

3.2.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin 3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik bulguları

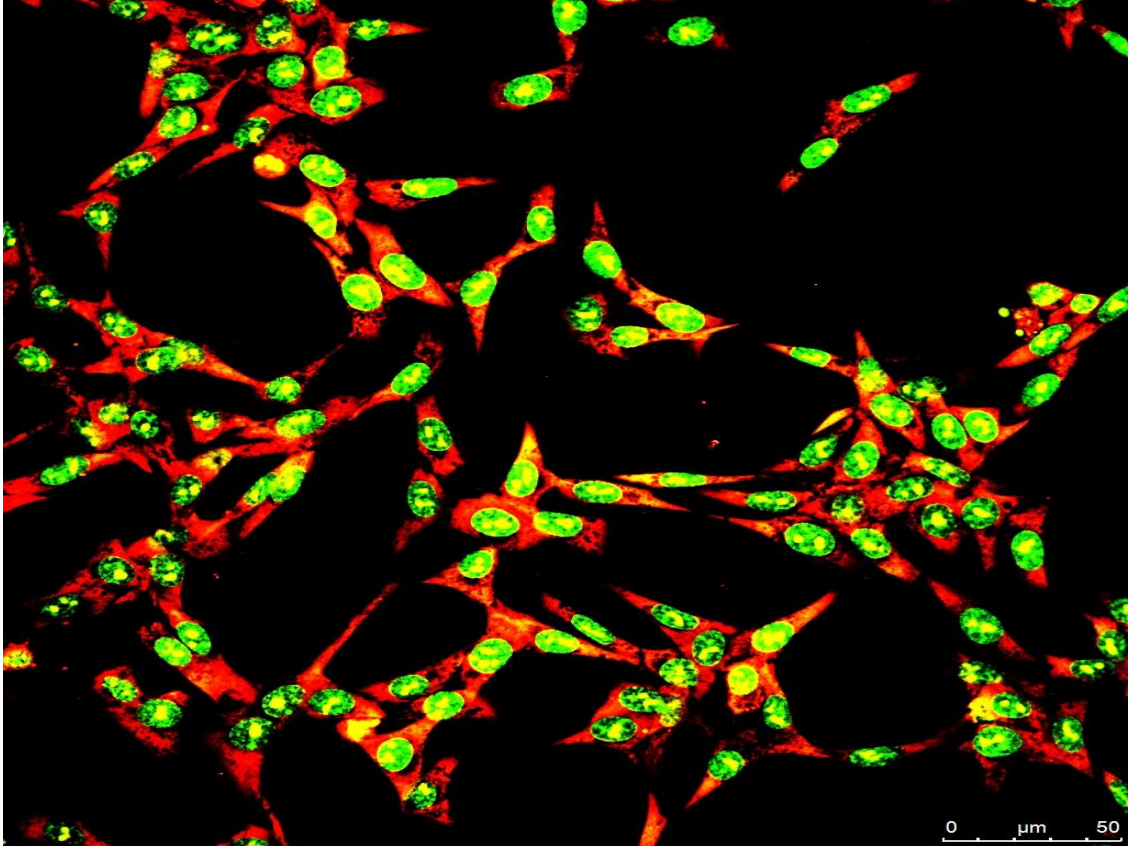


Şekil 3.4. 3T3 hücreleri üzerine 24 saat boyunca uygulanan Oleuropein yüklü katı lipid nanoparçacıklarının grafiği

Oleuropeinin kendisinde de olduğu gibi nano-oleo formu da 3T3 fare embriyo fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin çok yüksek dozlarda olduğu saptanmıştır. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin oleuropeine göre daha düşük dozlarda sitotoksikite göstermesine karşın 3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin çok yüksek dozlarda olduğu bulunmuştur.

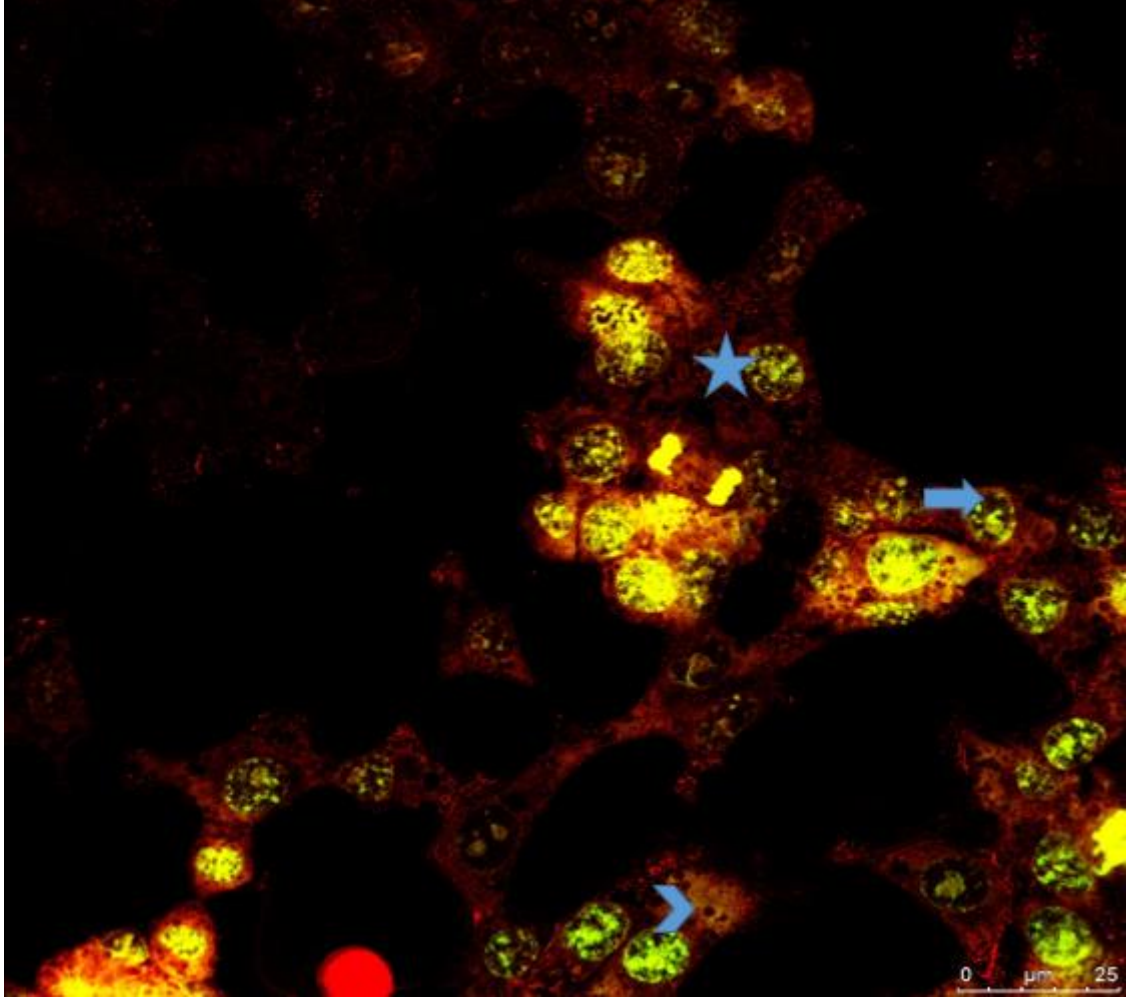
3.3. Konfokal Mikroskopik Bulgular

3.3.1. 5RP7 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısının konfokal mikroskopik bulguları



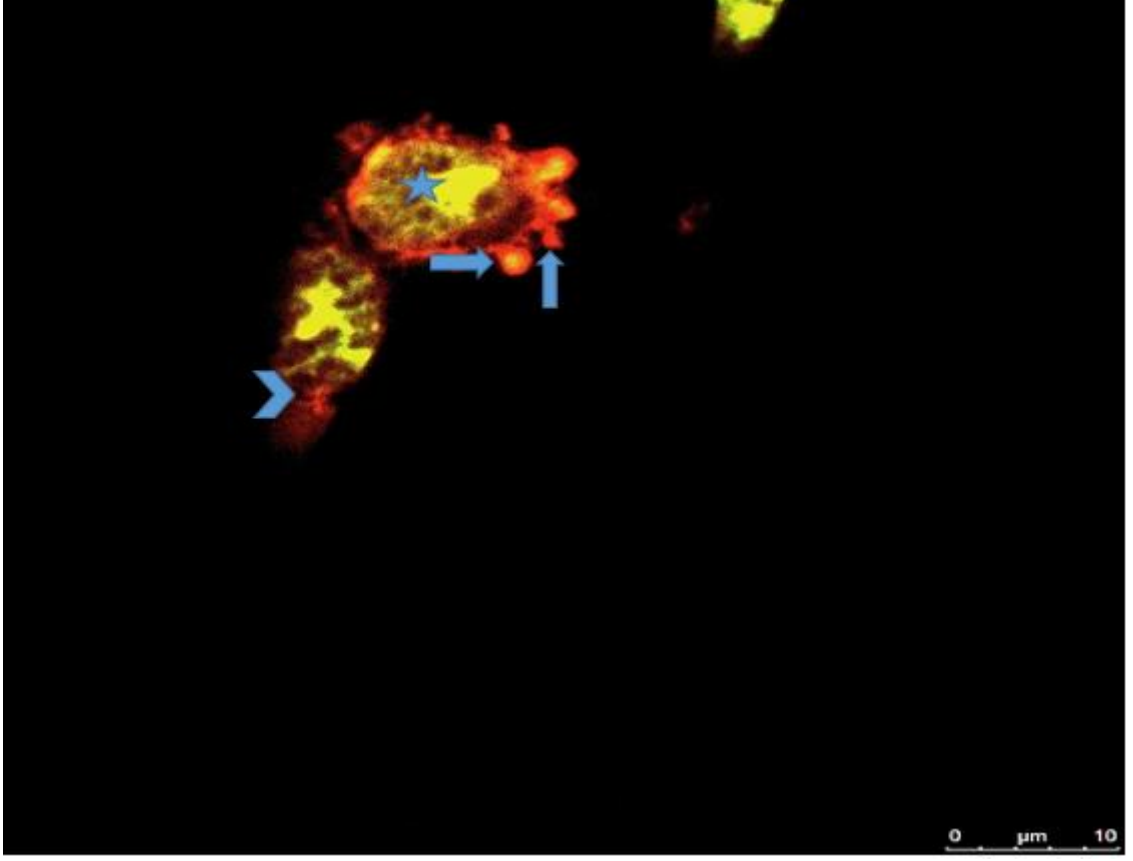
Görsel 3.1. *Akridin Oranj ve falloidin ile ikili boyanmış 5RP7 kontrol hücrelerinin konfokal mikroskopik görüntüsü.*

3.3.2. Oleuropein'in 5RP7 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları



Görsel 3.2. *Oleuropein'in 5RP7 hücrelerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü. (Ok; kromatin kondenzasyonu, ok başı; hücre iskeletinde delik oluşumu ve parçalanma; yıldız; çekirdek parçalanması)*

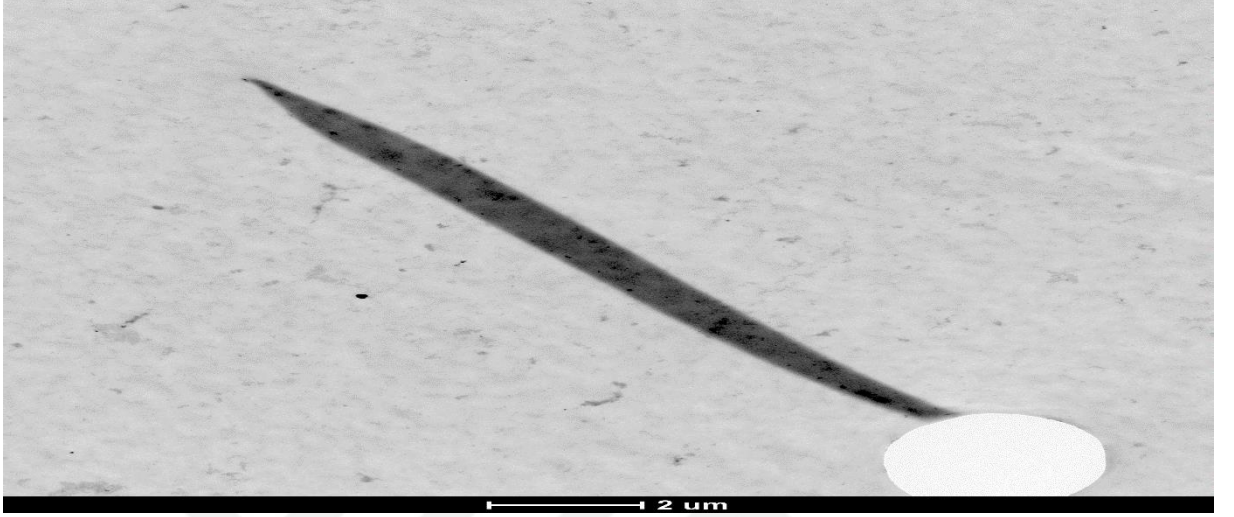
3.3.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin 5RP7 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları



Görsel 3.3. *Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin 5RP7 hücreleri üzerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü. (Ok; membran tomurcuklanması, yıldız; kromatin yoğunlaşması; ok başı; hücre iskeletinde delik oluşumu)*

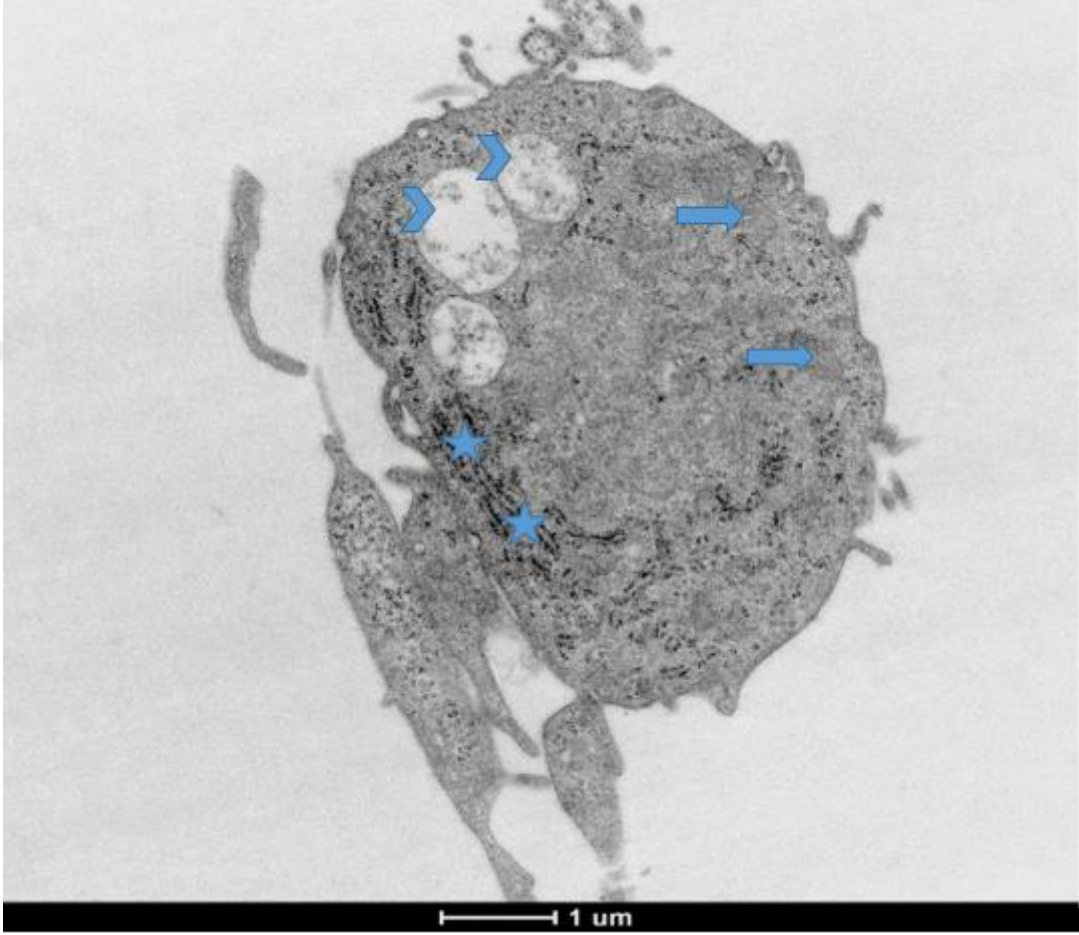
3.4. Geçirimli Elektron Mikroskopi Bulguları

3.4.1. 5RP7 kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron mikroskopik bulguları



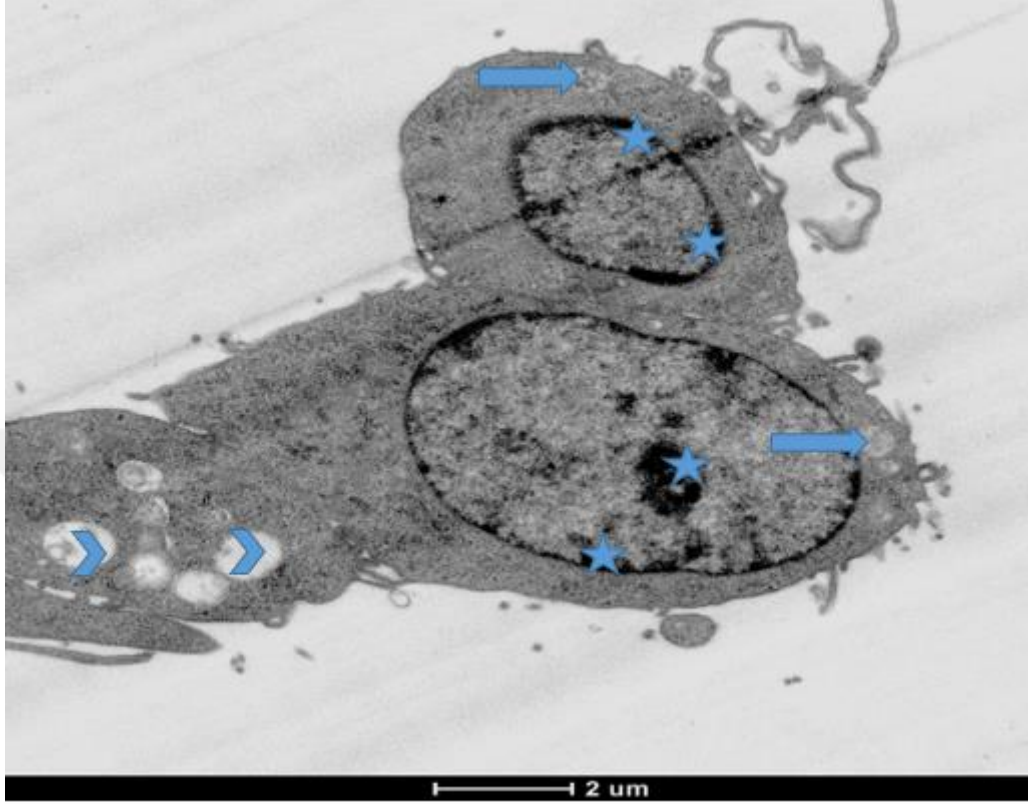
Görsel 3.4. 5RP7 kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron mikroskopuna ait görüntü

3.4.2. Oleuropein'in 5RP7 hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerinin geçirimli elektron mikroskopi bulguları



Görsel 3.5. *Oleuropein'in IC₅₀ konsantrasyonunun 24 saat uygulandığı 5RP7 hücrelerinin ince yapısal değişikliklerinin geçirimli elektron mikroskop görüntüsü. (Ok; mitokondrilerde krista kaybı, ok başı; vakuol oluşumu; ER sisternalarında genişleme)*

3.4.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin 5RP7 hücreleri üzerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerin geçirimli elektron mikroskopik bulguları

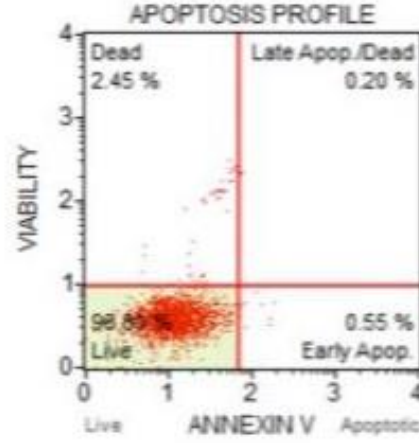


Görsel 3.6. *Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin IC_{50} konsantrasyonunun 24 saat uygulandığı 5RP7 hücrelerinin ince yapısal değişikliklerinin geçirimli elektron mikroskop görüntüsü (Yıldız; kromatin kondenzasyonu, Ok başı; vakuol ve sekonder lizozom oluşumu; Ok; İçi boşalmış mitokondriler)*

3.5. Akım Sitometri Bulguları

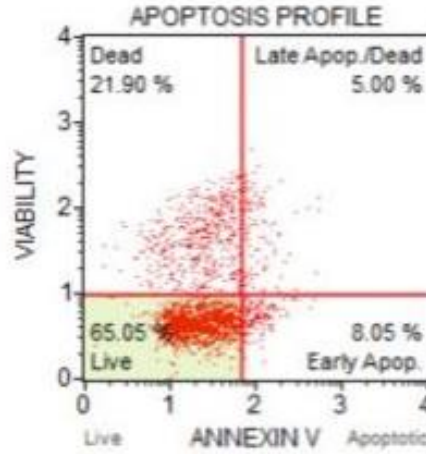
3.5.1. Anneksin-V boyamanın akım sitometrideki bulguları

3.5.1.1. 5RP7 kontrol hücrelerinin anneksin-V boyama bulguları



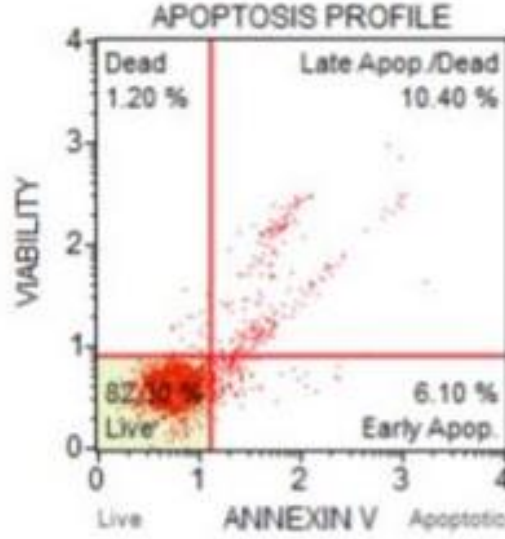
Şekil 3.5. 5RP7 kontrol hücrelerinin anneksin-V boyama bulguları

3.5.1.2. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin anneksin-V bulguları



Şekil 3.6. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin anneksin-V bulguları

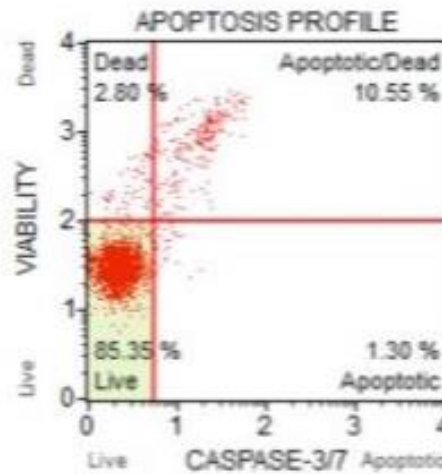
3.5.1.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin anneksin-V bulguları



Şekil 3.7. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin anneksin-V bulguları

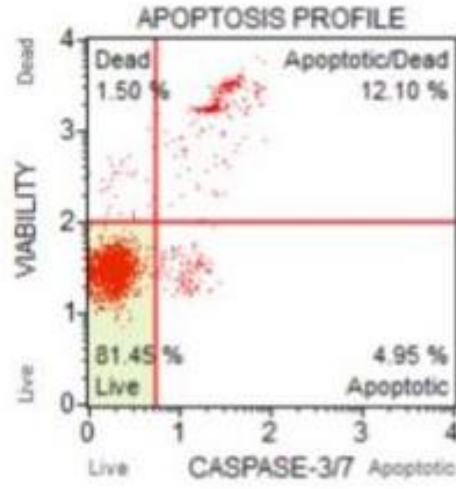
3.5.2. Kaspaz3/7 boyamanın akım sitometrideki bulguları

3.5.2.1. 5RP7 kontrol hücrelerinin kaspaz3/7 boyama bulguları



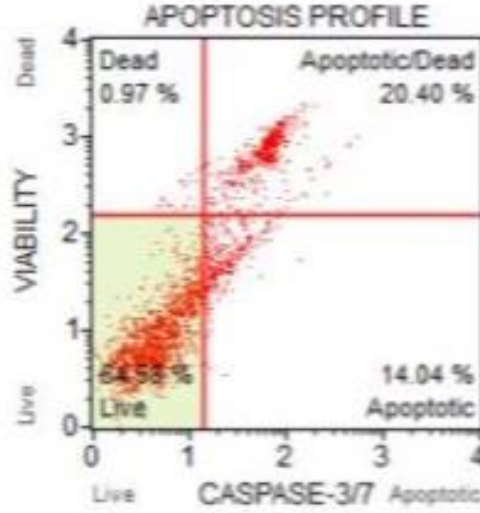
Şekil 3.8. 5RP7 kontrol hücrelerinin kaspaz3/7 boyama bulguları

3.5.2.2. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin kaspaz3/7 bulguları



Şekil 3.9. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin kaspaz3/7 bulguları

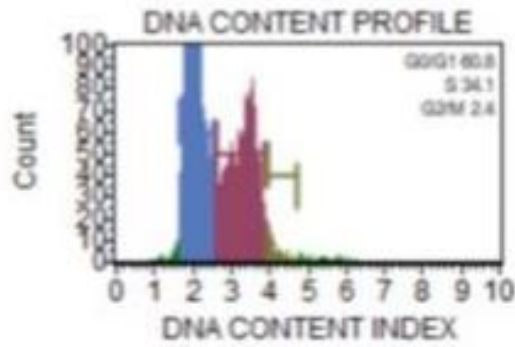
3.5.2.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin kaspaz3/7 bulguları



Şekil 3.10. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin kaspaz3/7 bulguları

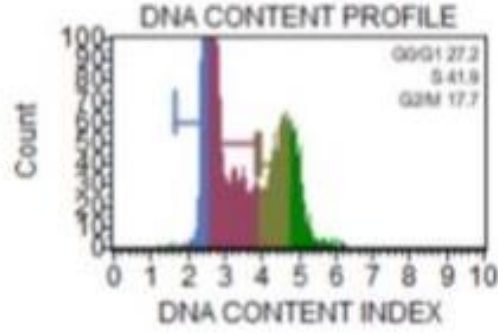
3.5.3. Hücre döngüsü analizinin akım sitometrideki bulguları

3.5.3.1. 5RP7 kontrol hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları



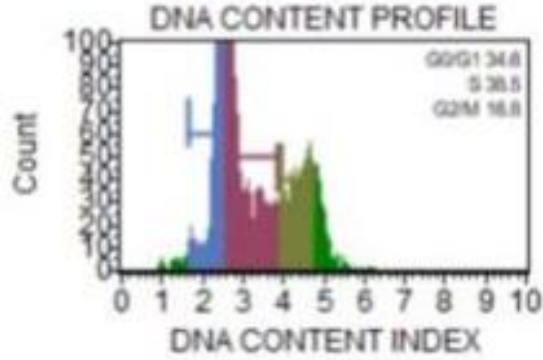
Şekil 3.11. 5RP7 kontrol hücrelerinin hücre döngüsü analizi bulguları

3.5.3.2. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları



Şekil 3.12. Oleuropein uygulanan 5RP7 hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları

3.5.3.3. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları



Şekil 3.13. Oleuropein katı lipid nanopartiküllerinin uygulandığı 5RP7 hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları

4. TARTIŞMA SONUÇ

Kanser günümüzde çok yaygın bir hastalıktır. Epidemiyolojik çalışmalar ve bilimsel araştırmalar son yıllardaki kanser insidans artışını birçok diğer etkenin yanında beslenme şekli ve buna bağlı olarak yaşanan coğrafyaya da bağlamaktadır. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar Akdeniz ülkelerinde kanser görülme sıklığı ve kanser görülme riskinin diğer ülkelere göre daha az olduğunu göstermektedir. Bu durumun Akdeniz tipi beslenme ve bu tip beslenmenin ana elemanı olan zeytin, zeytinyağı ve zeytin ürünlerinden kaynaklanıyor olabileceği bilim adamlarının dikkatini son yıllarda daha da çok çekmeye başlamıştır. Zeytin bitkisinin faydaları çok uzun yıllar önce insanlar tarafından keşfedilmiş fakat ne tür faydaları olduğu saptanamamıştır. Zeytin ve zeytinyağında bulunan antioksidan maddelerin kanser riskini azalttığı, kalp damar hastalıklarını önlediği görülmektedir. Kanser hücreleri üzerinde yapılan deneylerde zeytinin fenolik bileşiklerinden olan oleuropeinin kanser hücrelerini yok ettiği görülmüştür. Ancak oleuropeinin normal fibroblast ve H-ras transforme fibroblast hücreleri ile yapılmış bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Ayrıca kanser tedavisinde son zamanlarda kemoterapotiklere karşı çoklu direnç geliştirilmesinden dolayı yeni yaklaşımlara ve tedavi ajanlarına ihtiyaç duyulduğu tüm kanser araştırmalarında vurgulanmaktadır. Teknolojik gelişmeler her sektörde olduğu gibi sağlık sektörü ve kanser araştırmalarını da nanoteknoloji yönüne sevk etmiştir. Son yıllarda farklı nano boyutlu partiküller farklı yöntemlerle sentezlenmeye çalışılmış ve bunların kanser tedavisi üzerine etkileri in vitro ve in vivo olarak araştırılmıştır. Burada amaç kanser hücrelerini yok edip sağlıklı hücrelerin çoğalmasını ve sağkalımını tetiklemektir. Kanser hücrelerini bu yöntemlerle öldürmeye çalışmanın bir diğer amacı ise yangısız bir ölüm şekli olan apoptozu tetikleyebilmektir. Literatürde oleuropeinin sentezlenmiş nanopartikül formu ve bunun kanser tedavisi üzerine etkinliğinin araştırılması yönünde bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu bilimsel veriler ışığında bu tez çalışmasında oleuropein ve katı lipid nanopartikül formülasyonunun 3T3 ve 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Oleuropeinin H-ras transforme hücre hattı olan 5RP7 hücrelerinin canlılığını 24 saatlik akut uygulamada doza bağlı olarak etkili bir şekilde düşürdüğü ancak aynı dozlarda normal fibroblast hücrelerinde (3T3) aynı uygulama süresi içerisinde hücrelerin yarısını öldüren dozun daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu durum oleuropeinin kanser hücrelerine seçici bir potansiyel

olabileceğini göstermektedir. Yeni sentezlenen nanopartikül formülasyonunda da aynı durum söz konusu olmuştur. Bu durumda 2 saatlik hücrelerin yarısını öldüren doz oleuropein ile karşılaştırıldığında neredeyse 3 kat daha düşmüştür. Nanopartikül formülasyonunun oleuropeine göre hem kanser hücrelerini 3 kat daha düşük dozda öldürdüğü hem de 3T3 hücrelerinde yine hücrelerin yarısını öldüren doz hesaplanamadığından kanser hücrelerine seçiciliğin vurgulandığı gösterilmiştir. Karakterizasyon bulguları oleuropein nanopartikül formülasyonunun oleuropeinin partikül boyutuna göre yaklaşık 100 kat kadar düştüğü ve 13 nm'ye düştüğü tespit edilmiştir. Bu boyut hem nanopartikülün başarılı olarak sentezlendiğini hem ne lipid yapısı ve boyut küçüklüğünden dolayı hücre içine daha çok madde sokmayı ve kolay geçişi sağlayabilecek potansiyelde olabileceğinin göstergesi olarak yorumlanmıştır. Ayrıca bu yöntem ile sentezlenen nanopartikül formülasyonunun hedeflenebilir olması avantaj sağlayabilecektir. Yine hem oleuropein hem de nano oleo formunda da inflamasyona neden olmayan apoptotik hücre ölüm şeklinin tetiklenmiş olduğu hem ince yapısal analizlerden hem de morfolojik değişiklik analizlerden görüleceği gibi flow sitometri analizlerinde de kaspaz aktivasyonu, hücre döngüsünü durdurma ve fosfotaidilserin translokasyonu gibi bulgular ise gösterilmiştir. Sonuç olarak oleuropein ve katı lipid nanopartikül formülasyonunun kanser hücrelerine seçici olma potansiyelinin olduğu, düşük dozlarda kanser hücrelerinde özellikle nanopartikül formunun etkili olduğu ayrıca da hücre ölüm modu olarak apoptozu tetiklediği gösterildiği için oleuropein ve nanopartikül formülasyonunu kanser tedavi ajanı tasarlamak konusunda daha ileri araştırmaların yapılması konusunda önermekteyiz. İleri in vitro ve in vivo analizlerden sonra geliştirilebilme ihtimali olan anti-kanser ilacın günümüzde çok yaygın hastalık olan kanserin tedavisinde yeni ve umut verici bir alternatif sunacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKÇA

- [1] Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, Solbach W, Laskay T, 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. J Immunol, 169(2): 898-905.
- [2] Akarid K, Arnoult D, Micic-Polianski J, Sif J, Estaquier J, Ameisen JC, 2004. *Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. J Leukoc Biol, 76: 95- 103.
- [3] Akşit H, Bildik A, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye Makale Geliş Ve Kabul Tarihi:14.09.2007-18.01.2008 Sorumlu Araştırmacı: Hasanaksit@Adu.Edu.Tr
- [4] Aktaş S.H: Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri Ve Mide Kanserinde Vegf Düzeylerine Etkisinin İn Vivo Ve İn Vitro İncelemesi.
- [5] Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of The Cell. New York: Garland Publishing. 1994: 1076.
- [6] Altunkaynak BZ, Özbek E, 2008. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? Tıp Araş Derg, 6 (2): 93 -104.
- [7] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and Modulation. Science 2001; 281:1305-8 1998.
- [8] Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler Özay Güleş^{1*} Ülker Eren² 1adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji- Embriyoloji Ad, Aydın, Türkiye 2adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Histoloji- Embriyoloji Ad, Aydın, Türkiye Geliş Tarihi: 20.11.2008 Kabul Tarihi: 03.12.2008
- [9] Bylinsky G. Cell suicide: the birth of a mega- market. Fortune 1995;131:75-6.
- [10] Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. Sendrom 2001; 13:102-7.
- [11] Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annual Review of Cell and Developmental Biology 1999; 15:269-90.

- [12] Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. Official Publication of The American College of Chest Physicians (CHEST) 2000; 117:1771-7.
- [13] Basmacıoğlu H, Zeytin Yağı İşleme Yan Ürünlerinden Zeytin Yaprağı İle Zeytin Karasuyunun Antimikrobiyal Ve Antioksidan Etkileri, Hayvansal Üretim 52(1):49-58, 2011
- [14] Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. Annual Review of Immunology 1998; 16:395-419.
- [15] Dinçel GÇ. ve Kul O, Patolojik Apoptozis Ve Tanı Yöntemleri, Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi / Gümüşhane University Journal Of Health Sciences:2016;5(1) 86
- [16] Eichhorst ST and Krammer PH. Derangement of apoptosis in cancer. The Lancet 2001; 358:345-6.
- [17] Engin K ve Özyardımcı N, Akciğer Kanseri Tanı Ve Tedavide Temel İlkeler Ve Uygulamalar, Avrupa Tıp Kitapçılık İstanbul, 2001
- [18] Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? Biochemical and Biophysical Research Communications 1999; 266 :699-717
- [19] Gedik, T.N., ‘‘Kopolimer İlaç Konjugatlarının Kemik Kanseri Hücreleri Üzerine Sitotoksikite, Antitümör ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması ve Apoptoz Sürecinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi’’, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2016.
- [20] Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E, Hücrede Apoptoz Ve Sağkalım Mekanizmalarının Keşfedilmesi Ve Yeni Potansiyel Tedavi Stratejileri, Turk Kardiyol Dern Ars. 2008; 36(2): 120-130
- [21] Gürmen S. ve Ebin B, Nanopartiküller Ve Üretim Yöntemleri, Metalurji Dergisi, 2008
- [22] Hart S. The drama of cellular death. Bioscience 1994; 44:451-5.
- [23] Hetts SW. To die or not to die. The Journal of The American Medical Association (JAMA) 1998; 279:3007.
- [24] [Http://Daytam.Atauni.Edu.Tr/Cihaz/Lazer-Taramali-Konfokal-Mikroskop](http://Daytam.Atauni.Edu.Tr/Cihaz/Lazer-Taramali-Konfokal-Mikroskop)

- [25] <https://www.kanserdenkorkma.org/Normal-Bir-Hucre-Nasil-Kansere-Donusur.Html>
- [26] <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-nedir-belirtileri/kanser-nedir-belirtileri1/357-kanser-dairesi-baskanligi-kanser-nedir-belirtileri.html>
- [27] Israels LG, Israels ED. Apoptosis. The Oncologist 1999; 4:332-9.
- [28] İnci A, Yıldırım A, Yavuz Ö, Düzlü Ö, Bazı Protozoon Enfeksiyonlarda Apoptozis, 2009, Cilt 6, Sayı 2, Sayfalar 121-133
- [29] Johnson DE. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. Leukemia 2000; 14:1340-44.
- [30] Kaipia A, Hsueh AJW. Regulation of ovarian follicle atresia. Annual Review of Physiology 1997; 59:349-63.
- [31] Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. Annual Review of Physiology 1998; 60:533-73 .
- [32] Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. Annual Review of Genetics 1999; 33:29-55.
- [33] Nanji AA, Hiller-Sturmhöfel S. Apoptosis and necrosis: two types of cell death in alcoholic liver disease. Alcohol Health and Research World 1997; 21:325-30.
- [34] Numanoglu U, Tarımcı N, Katı Lipid Nanopartiküllerin (Sİntm) Özellikleri, Farmasötik Ve Kozmetik Alandaki Uygulamaları Characterization Of Solid Lipid Nanoparticles (Sİntm) And Their Pharmaceutical And Cosmetic Applications, Ankara Ecz. Fak. Derg, 2006
- [35] Özay G, Ülker E, Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, Aydın, 2008.
- [36] Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? British Medical Journal/(Clinical Research Ed.) (BMJ) 2001; 322:1536-8.
- [37] Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and Apoptosis. Annual Review of Microbiology 1999; 53:577-628.
- [38] Tuğrul B, Oktay L.M, Sağlık Ve Hastalıkta Hidroksitirozolün Rolü The Role Of Hydroxytyrosol İn Health And Disease, Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi, 2014 - onkder.org
- [39] Türköz G, Baydar T, Sözbilen M, Hışıl Y, Oleuropein Ve Ekstraksiyon Yöntemleri, 2008 - kimyakongreleri.org

- [40] Tokur O ve Aksoy A, In Vitro Sitotoksisite Testleri, 2017 - dergipark.org.tr
- [41] Terim Kapakin KA, Scanning- Elektron Mikroskobu, 2006, Cilt 17, Sayı 1, Sayfalar 55-58
- [42] Terim Kapakin KA, Transmission Elektron Mikroskobu, Yyü Vet Fak Derg (2007), 18(1):105-110
- [43] Thompson EB. The many roles of c-Myc in apoptosis. Annual Review of Physiology 1998; 60:575-600.
- [44] Yıldız G, Uylaşer V, Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein, Ziraat Fakültesi Dergisi, 2011 - dergipark.org.tr



ÖZGEÇMİŞ

İLETİŞİM BİLGİLERİ

İsim: Melike ÇEVİK

Email: melikecevik4669@hotmail.com

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi: 03.01.1994

Doğum Yeri: Kahramanmaraş

Medeni Hali: Bekar

EĞİTİM

Eskişehir Teknik Üniversitesi, İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalı, Biyoteknoloji, Yüksek Lisans

Bayburt Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği (2012-2016)

Lise: Hoca Ahmed Yesevi Lisesi (2008-2012)

İlk ve Ortaokul: Ziya Gökalp İlköğretim Okulu (2000-2008)

ÇALIŞMA VE STAJ

Tarih: Şubat 2016 - Haziran 2016

Kurum/Şirket: Bayburt Ortaokulu (Bayburt /TÜRKİYE)

Statü: Stajyer (Fen Bilgisi Öğretmeni)

YETENEKLER

Bilgisayar Programları: Microsoft Excel, Outlook, Word ve Power Point (Hepsi Çok İyi Derecede)

DİLLER

İngilizce (Orta- Üst Derecede)

SERTİFİKALAR

LEICA Elektron Mikroskopisinde Örnek Biyolojik Materyallerin Hazırlanması, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, İstanbul

Tip: Katılımcı

Tarih: 03-04 Mayıs, 2018

23. ULUSAL ELEKTRON MİKROSKOPİ KONGRESİ (Ulusal Katılımlı)

Tip: Katılımcı

Tarih : 19-21 Mayıs, 2017 / Kervansaray Lara Hotel, ANTALYA

15. Uluslararası Histokimya ve Sitokimya Kongresi, ICHC 2017 Kervansaray Lara Hotel, ANTALYA, 18-21 Mayıs,2017

Tip: Katılımcı

Tarih: 18-21 Mayıs,2017

EBSAD Öğretmenlik Vizyon Programı (Eğitim Bilimleri ve Sosyal Araştırmalar Derneği)

Tip: Katılımcı

Tarih: 14.05.2016

TUBITAK 2229 “ Bilimsel Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı” (Fen ve Teknoloji Öğretmen Adaylarına Yönelik Bilgisayar Destekli Kavram Karikatürü)

Tip: Katılımcı

Tarih: 01.04.02.2016

T.C MİLLİ EĞİTİM BAKANLIĞI, Hayat Boyu Öğrenme Genel Müdürlüğü, (İngilizce Kurs Bitirme Belgesi)

Tip: Katılımcı

Tarih: 2015

Derece: A1-A2

T.C Kalkınma Bakanlığı, Birleşmiş Milletler Kalkınma Programı, Habitat Kalkınma ve Yönetişim Derneği (Bilenler Bilmeyenlere Bilgisayar Öğretiyor)

Tip: Katılımcı

Tarih: 24.05.2013