

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**TESTİS KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE N-ASETİLSİSTEİNİN
BLEOMİSİNİN SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ertan KÜÇÜKSAYAN

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2011

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

**TESTİS KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE N-ASETİLSİSTEİNİN
BLEOMİSİNİN SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ertan KÜÇÜKSAYAN

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Gültekin YÜCEL

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2009.02.0122.009)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 08/07/2011

Tez Danışman : **Prof. Dr. Gültekin YÜCEL**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Tomris ÖZBEN**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Ash BAYKAL ATAMAN**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih, sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Kanser hücrelerinde oksidatif stresin, hücre proliferasyonunun stimülasyonu, mutasyonların ve genetik instabilitenin artışı, antikanser ilaçlarına karşı hücresel duyarlılığın değişmesi gibi belirgin sonuçları olabilir. Buna karşıt olarak, oksidatif stresin artışı, kanser hücrelerini öldürmek için bir fırsat da sağlayabilir. Çalışmamızda kullandığımız Bleomisin, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini üretir (1). Bleomisin testis kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır ve bu ilacın yüksek düzeyde ROS oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (2). Oluşan bu ROS sonucunda hücrenin hayatta kalmasını sağlayan yapı taşları hasara uğramaktadır. Lipidlerden ve proteinlerden oluşan zararlı ROS hasarına karşı hassastırlar. Ayrıca ROS seviyelerinin yüksekliğinin hücrede apoptozisi indüklediği bilinmektedir. Antineoplastik ajanların, oksidanları indükleyerek kanser hücrelerini apoptozis yoluyla öldürdüğünü bildiren birçok çalışma vardır (3-13).

Çalışmamızda Bleomisin'in tedavi sırasında antioksidanlarla birlikte kullanılmasının tedavi sürecini olumsuz yönde etkileyebileceğini düşündük. N-asetilsistein (NAC) antioksidan olarak in vivo ve in vitro yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. NAC canlı organizmalarda üretilen ve sülfür içeren doğal amino asit türevi güçlü antioksidan özelliği olduğu bilinen bir bileşiktir (14). Bu nedenle Bleomisin'in testis kanseri hücre kültüründe oluşturduğu sitotoksik etki üzerinde, bir antioksidan olarak tedaviye etkisi tartışmalı olan NAC'in etkisi incelenmiştir. NAC detoksifikasyonda rol oynadığı gibi, oksidatif strese karşı hücreyi ve komponentlerini korur. Bu özelliğinden dolayı çalışmamızda NAC'ın Bleomisin'in oluşturduğu oksidatif stres üzerindeki etkileri incelenmiştir. Oksidatif stresin etkileri Protein Karbonil kiti ile ölçülmüştür.

Çalışmamızda testis kanseri hücre kültürlerinde Bleomisin'in sitotoksik dozu belirledik. Kontrol, Bleomisin, NAC ve Bleomisin ile birlikte NAC olmak üzere dört deney grubu oluşturduk. Bu deney gruplarında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonucunda sitotoksikite MTT testi ile belirlendi. Oksidanların, apoptozisi indükleyerek hücreleri öldürdüğünü ileri süren çalışmaların bir kısmı kantitatif değildir, birçok çalışmada apoptozis ve nekrozla ölen hücrelerin yüzde oranı tayin edilmemiştir (6). Bizim Kaspaz-3 ve Anneksin V kitleri kullanarak yaptığımız çalışma apoptozis ve nekrozla ölen hücrelerin yüzdelarını belirleme açısından tam anlamıyla kantitatif bir çalışma olmuştur. Tüm deney gruplarında inkübasyondan 6 saat sonra erken apoptozisi gösteren Anneksin V testi Flow Sitometri cihazı kullanılarak uygulandı. Bleomisin grubunda apoptozisin yüzdesinin en fazla olduğu ve NAC+Bleomisin grubunda ise apoptozisin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi. 24 saatlik inkübasyondan sonra yapılan Kaspaz-3 deneyi sonuçları da Anneksin V testini desteklemektedir.

Yaptığımız tüm deney sonuçlarına göre testis kanseri olan hastalara yapılacak olan kemoterapötik tedavinin hastalığın prognozu açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu çalışmamızın sonuçları ROS üreterek testis kanseri hücrelerini öldüren Bleomisin'in, tedavisi sırasında antioksidanlarla birlikte kullanılmasının tedavi sürecini olumsuz yönde etkileyeceği görüşünü desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler :Apoptozis, testis kanseri, hücre kültürü, oksidatif stres, antioksidan

ABSTRACT

In cancer cells, oxidative stress, stimulation of cell proliferation, mutations and genetic instability increase, such as cellular sensitivity change to anticancer drugs may be significant consequences. In contrast, increase oxidative stress, it can also provide an opportunity to kill cancer cells. Used in our study bleomycin generates reactive oxygen species such as superoxide and hydrogen peroxide (1). Bleomycin is a drug commonly used to treat of testicular cancer and It's shown to lead to the formation of ROS high levels of this drug (2). A result of ROS formed building blocks to ensure the survival of the cell are damaged. Membranes composed of lipids and proteins sensitive to damage ROS. In addition, the height of the levels of ROS are known to induce cell apoptosis. Antineoplastic agents inducing oxidants cancer cells killed by apoptosis many studies have reported (3-13).

In our study, we thought during therapy the use of bleomycin with antioxidants can adversely affect the process of treated. N-acetylcysteine (NAC) as an antioxidant widely used in vivo and in vitro. NAC produced by living organisms and the natural sulfur-containing amino acid derivative is a compound known to have powerful antioxidant properties (14). Therefore, on cytotoxic effects in testicular cancer cell culture formed by Bleomycin, which is controversial as an antioxidant effect of NAC treatment were investigated. Like NAC play a role in detoxification protects a cell and the components of the cell against oxidative stress. Due to the property, in our study examined the effects of NAC on oxidative stress created by Bleomycin. The effects of oxidative stress was measured by protein carbonyl kit.

In our study, we identified the cytotoxic dose of bleomycin in testicular cancer cell lines. Control, bleomycin, NAC and bleomycin with NAC were created four experimental groups. This experimental groups, 24, 48 and 72-hour incubations with the cytotoxicity was determined by MTT test. Oxidants, cells killed by apoptosis, which suggests some of the studies are not quantitative, percentage of dead cells of apoptosis and necrosis have not been determined in many studies (6). In our study we made using the Caspase-3 and Annexin V kits in terms of determining the percentage of cells died of apoptosis and necrosis has been working a fully quantitative. After 6 hours of incubation in all experimental groups, indicating early apoptosis Annexin V test was performed using Flow Cytometer. Bleomycin group has the highest percentage of apoptosis and apoptosis were statistically significantly decreased in the NAC + bleomycin group. After 24-hour incubation Caspase-3 experiment results support Annexin V also testing.

We think it is important for prognosis of the disease of the chemotherapeutic treatment of patients with testicular cancer all the experiment results. During treatment Bleomycin kills testicular cancer cells by generated ROS. Because of antioxidants prevent ROS, we believe that the use of antioxidants during treatment with Bleomycin negatively affect the treatment process.

Key words: Apoptosis, testicular cancer, cell culture, oxidative stress, antioxidant

TEŞEKKÜR

Eğitici ve öğretici olma konusundaki gayretlerini esirgemedi, çalışmam boyunca bana destek olan ve bu çalışmayı yapmama olanak sağlayan değerli hocam Prof.Dr. Tomris ÖZBEN'e,

Her konuda destek olarak bana her aşamada yardımcı olan ve çok önemli katkıları ile çalışmamda beni yönlendiren danışmanım sayın hocam Prof.Dr. Gültekin YÜCEL'e,

Bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olarak destek verdikleri için Ayşegül ÇÖRT ve Müjgan TİMUR'a,

Merkezi laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Melike ULUBAŞI'ye

Öğrenim hayatım boyunca desteğini, ilgisini ve fedakarlıklarını hep hissettiğim aileme,

İstatistiksel analizleri yapmamda yardımcı olan, tanıştığımız günden beri sıkıntılara karşı koymada beni cesaretlendiren, bana ben olabilmeyi öğreten, ilgisini, şefkatini ve özverisini hiç esirgemeyen EŞİM Aslınur SIRCAN KÜÇÜKSAYAN'a

sonsuz teşekkür ederim.

Haziran, 2011

Ertan KÜÇÜKSAYAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Kanseri	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Risk Faktörleri	3
2.1.3. Tedavi	4
2.2. Bleomisin	4
2.2.1. Bleomisin'in Kimyasal Yapısı	4
2.2.2. Bleomisin'in Etki Mekanizması	5
2.2.3. Bleomisin'in Tedavide Kullanımı	6
2.3. Apoptozis	7
2.3.1. Hücre Ölümünün İki Şekli : Apoptozis ve Nekrozis	7
2.3.2. Apoptozisin Aşamaları	8
2.3.3. Apoptozisin Önemi	8
2.3.4. Apoptozisde Meydana Gelen Biyokimyasal ve Morfolojik Değişimler	9
2.3.5. Apoptozis Yolakları	10
2.3.6. Kaspazlar ve Kazpaz-3	13
2.4. Oksidatif Stres	15
2.4.1. Kanser Hücrelerindeki İntrinsik Oksidatif Stres	15
2.4.2. Kanser Terapisi İle İndüklenen Oksidatif Stres	15
2.4.3. Kanser Hücrelerinde Oksidatif Strese Hücresel Cevap	16
2.5. Kanser Tedavisi Sırasında Oluşan ROS'un İndüklediği Apoptozis	16
2.5.1. Reaktif Oksijen Ürünleri Ve Antioksidasyon Mekanizma	17
2.5.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkisi	20
2.5.3. Glutatyon ve NAC	22
2.5.4. Kanser Tedavisinde Antioksidan Kullanımı İle İlgili Çelişkili Görüşler	23

GEREÇLER VE YÖNTEMLER	25
3.1. Testis Kanseri Hücre Kültür Çalışmaları	25
3.1.1. Hücre Dizileri ve İlaçlar	25
3.1.2. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Deneylere Hazırlanması İçin Gerekli Çözeltiler	25
3.1.3. Hücrelerin Çoğaltılması	26
3.1.4. Hücrelerin Dondurulması	26
3.1.5. Hücrelerin Çözülmesi	26
3.2. Bleomisin ve NAC'in Sitotoksosite Çalışmaları	27
3.2.1. Ön Çalışmalar	27
3.2.2. Hücrelerin %50'sini Öldüren Konsantrasyonun MTT Kiti İle Belirlenmesi	27
3.3. Apoptozisin Belirlenmesi	28
3.3.1. Anneksin V Kiti İle Belirlenmesi	28
3.3.2. Kaspaz-3 Kiti İle Belirlenmesi	29
3.4. Oksidatif Stresin Belirlenmesi	31
3.4.1. Protein Karbonil Kiti İle Oksidatif Stresin Belirlenmesi	31
BULGULAR	33
4.1. Sitotoksosite Bulguları	33
4.1.1. NTERA Hücrelerinde Bleomisin'in Sitotoksitesi	33
4.1.2. NTERA Hücrelerinde Bleomisin'in Etkisinin Mikroskopla Gözlenmesi	36
4.1.3. NTERA Hücrelerinde NAC'in Sitotoksik Etkileri	39
4.1.4. NTERA Hücrelerinde NAC'in Etkisinin Mikroskopla Gözlenmesi	40
4.1.5. NTERA Hücrelerinde Bleomisin ile Birlikte NAC'in Sitotoksik Etkileri	43
4.1.6. NTERA Hücrelerinde NAC'in Bleomisin ile Birlikte Etkisinin Mikroskopla Gözlenmesi	45
4.2. Apoptozis Deney Bulguları	47
4.2.1. Ntera Hücre Dizisinde Anneksin Deney Sonuçları	47
4.2.2. Ntera Hücre Dizisi Kaspaz-3 Deney Sonuçları	56
4.3. Oksidatif Stres Deney Sonuçları	56
4.3.1. NTERA Hücre Dizisi Protein Karbonil Deney Sonuçları	56
TARTIŞMA	58
SONUÇLAR	62
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	:	Edinsel İmmun Yetmezlik Sendromu
AIF	:	Apoptozis İnhibe Edici Faktör
Apaf-1	:	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
APO-1	:	Apoptozisi Tetikleyen Reseptör-1
ATCC	:	American Type Culture Collection
ATP	:	Adenozin Trifosfat
Bcl-2	:	B Hücreli Lenfoma-2
BEP	:	Bleomisin, Etoposid, ve Sisplatin
BLM	:	Bleomisin
Bp	:	Baz Çifti
CAD	:	Kaspaz İle Aktive Edilen DNAaz
CAT	:	Katalaz
CED	:	C. Elegans kaspaz
DIABLO	:	Düşük pI İle Direk Olarak IAP Bağlayan Protein
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DNPH	:	2,4-dinitrofenilhidrazin
Endo G	:	Endonükleaz G
ETS	:	Elektron Transport Sistemi
FasL	:	FasR Ligandı
FADD	:	Fas İlişkili Ölüm Birimi
FasR	:	Ölüm Reseptörü
FBS	:	Fetal Sığır Serumumu
FITC	:	Floresin İzotiyosiyanat
GCT	:	Germ Hücreli Tümör
GPx	:	Glutasyon Peroksidaz
GSH	:	Glutasyon
H⁺	:	Proton
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit
HOCl	:	Hipoklorit
IAP	:	Apoptozis İnhibitörü
ICAD	:	Kaspaz İle Aktive Edilen DNAaz İnhibitör

Kaspaz	:	Aspartat Spesifik Sistein Proteaz
NAC	:	N-asetilsistein
mRNA	:	Mesajcı RNA
MTT	:	[3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid]
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO	:	Nitrik Oksit
NO₂	:	Peroksi Nitrik Oksit
O₂	:	Moleküler Oksijen
O₂^{•-}	:	Süper Oksit Anyonu
O₂²⁻	:	Peroksil Anyonunu
OH[•]	:	Hidroksil Radikali
PBS	:	Fosfat Tuzu Tamponu
PI	:	Propidyum İyodid
RPMI	:	Roswell Park Memorial Institute
PUFA	:	Poliansatüre Yağ Asiti
R[•]	:	Karbon Merkezli Organik Radikal
RCOO[•]	:	Organik Peroksit
RO[•]	:	Alkoksi Radikali
ROO[•]	:	Lipit Peroksid
ROS	:	Reaktif Oksijen Türlerini
RNA	:	Ribonükleik Asit
RS[•]	:	Tiyil Radikali
Smac/Diablo	:	Mitokondriden Türetilen İkinci Aktivatör
SOD	:	Süper Oksit Dismutaz
TCA	:	Trikloroasetik Asit
TNF	:	Tümör Nekroz Faktörü
TRAIL	:	Tümör Nekrozis Faktör İle İlişkili Apoptozise Sebep Olan Ligand
UV	:	Ultra Viyole Radyasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
2. 1. Bleomisin'in kimyasal yapısı.	5
2. 2. Apoptozisde Meydana Gelen Morfolojik Değişimler	10
2. 3. Apoptozisde ekstrinsik ve intrinsik yollar.	11
2. 4. Memeli kaspaz ailesi ve C. Elegans kaspaz CED-3.	14
2. 5. Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları.	21
2. 6. Peptid bağının diamid(a) ve α -amidasyon(b) metabolik yolları ile ayrılması.	22
3. 1. Protein karbonillerin DNPH ile oluşturdukları hidrazon	31
4. 1. Farklı dozlardaki Bleomisin'in NTERA hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisi	33
4. 2. Farklı dozlardaki Bleomisin'in NTERA hücrelerinde 48 saat için % canlılık üzerine etkisi	34
4. 3. Farklı dozlardaki Bleomisin'in NTERA hücrelerinde 72 saat için % canlılık üzerine etkisi	34
4. 4. 400, 450 ve 500 μ g/ml dozlarındaki Bleomisin'in NTERA hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisi nin %50 civarında olduğu gözlenmektedir.	35
4. 5. Farklı dozlardaki Bleomisin'in NTERA hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat için % canlılık üzerine etkisi nin süreye bağlı olarak arttığı gözlenmektedir.	36
4. 6. Hiçbir şekilde ilaç ile muamele edilmeyen Kontrol grubu nun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	37
4. 7. 100 μ g/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 100 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	37
4. 8. 200 μ g/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 200 grubu nun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	38
4. 9. 400 μ g/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 400 grubu nun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	38
4. 10. 600 μ g/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 600 grubu nun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	39
4. 11. Değişen dozlarındaki NAC'in NTERA hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisi	40
4. 12. 1 mM NAC ile muamele edilen NAC 1 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	41
4. 13. 3 mM NAC ile muamele edilen NAC 3 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	41
4. 14. 5 mM NAC ile muamele edilen NAC 5 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	42

4. 15. 10 mM NAC ile muamele edilen NAC 10 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	42
4. 16. Değişen dozlarındaki NAC'in sabit Bleomisin ile birlikte NTERA hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisi.	43
4. 17. Değişen dozlarındaki NAC'in sabit Bleomisin ile birlikte NTERA hücrelerinde 48 saat için % canlılık üzerine etkisi	44
4. 18. Değişen dozlarındaki NAC'in sabit Bleomisin ile birlikte NTERA hücrelerinde 72 saat için % canlılık üzerine etkisi	44
4. 19. Farklı dozlardaki NAC'nin Bleomisin ile birlikte NTERA hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat için % canlılık üzerine etkisi	45
4. 20. 3 mM NAC ve 400 µg/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 400 NAC 3 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	46
4. 21. 5 mM NAC ve 400 µg/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 400 NAC 5 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	46
4. 22. 10 mM NAC ve 400 µg/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 400 NAC 10 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.	47
4. 23. Lazer ışığının hücreden saçılması ve dedektörlerden toplanması.	48
4. 24. Kontrol grubunun FSC ve SSC analizi.	48
4. 25. Kontrol grubu Flow grafiği	49
4. 26. Bleomisin grubunun FSC ve SSC analizi.	50
4. 27. Bleomisin grubu Flow grafiği.	51
4. 28. NAC grubunun FSC ve SSC analizi.	52
4. 29. NAC grubu Flow grafiği	53
4. 30. Bleomisin + NAC grubunun FSC ve SSC analizi.	54
4. 31. Bleomisin + NAC grubunun Flow grafiği.	55
4. 32. Kontrol ve diğer deney gruplarında Kaspaz-3 deney sonuçları	56
4. 33. NTERA hücre dizisi kontrol ve diğer deney gruplarında protein karbonil 24 saat deney sonuçları	57

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
2. 1. Reaktif oksijen bileşikleri	17
2. 2. Oksidasyona yatkın olan amino asitler ve oksidasyon ürünleri	20
4. 1. Kontrol grubu bölge yüzdeleri.	50
4. 2. Bleomisin grubu bölge yüzdeleri.	51
4. 3. NAC grubu bölge yüzdeleri.	53
4. 4. Bleomisin + NAC grubu bölge yüzdeleri.	55

GİRİŞ

Kanser insidansı; tür, yaş, cinsiyet ve coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermekle birlikte, toplumda 100.000 de 100 ile 350 kişide görülen bir hastalıktır. Cinsiyete bağlı olarak kanser türlerinde farklılıklar gözlenmekle birlikte, her iki cinsiyet için en sık görülen ölüm nedenleri sıralamasında ikinci sıradadır (15). Testiküler karsinom, gelişmiş ülkelerdeki genç erkeklerde en sık görülen kanserdir. İnsidansı özellikle 20. Yüzyılın ikinci yarısında artış göstermiştir (16). Genel popülasyonda görülme oranı 1/100000 olan testis karsinomunun inmemiş testis olguları içinde görülme oranı 1/2550' dir ve bu durum 40 kata kadar artmış riski göstermektedir (17).

Testis kanseri geçmişte ölüme neden olan bir hastalık olarak bilinirken, hastalarının %80'i, kemoterapi ve cerrahi ile tedavi edilmektedir. Fakat kalan %20'lik dilimdeki hastalar hala günümüzde tedavi edilememektedir (18). Bleomisin, etoposid, cis-platinum'un beraber kullanılmasını içeren tedavilerdeki gelişmeler, tedavi yüzdesini tedavi edilebilen hastalarda, %90'lara çekmiştir. Erken evredeki hastalarda ise tedavi oranı %100'e ulaşmaktadır (19). Tedavi edilen testis kanserli hastaların, tedavi sonrası beklenen sağlıklı yaşam süreleri, oldukça uzundur (20).

Kanser tedavisi sırasında kullanılan bazı kemoterapötiklerin ve radyasyon terapisinin reaktif oksijen türleri oluşturduğu bilinmektedir. Serbest radikaller, özellikle reaktif oksijen türleri (ROS) apoptozisin yaygın mediatörleri olarak öne sürülmüştür. Son çalışmalar, hücrel ölüm tipinin, oksidatif hasarın ciddiyetine ve düzeyine bağlı olduğunu göstermiştir.

Bleomisin'in, Bleomisin ile birlikte N-asetilsistein testis kanseri hücre dizilerindeki sitotoksik etkisi, MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid] deneyi ile belirlenecektir. Bleomisin'in değişen konsantrasyonları ile hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübe edilerek, sitotoksikite testi ile hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu (IC₅₀ değeri) saptanacaktır. Yapılan 24 saatlik inkübasyonlar sonucunda belirli dozlarda verilen ajanların hücre üzerindeki etkilerini görebilmek için mikroskopla hücrelerin fotoğrafları çekilecektir.

Testis kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan Bleomisin'in, yüksek düzeyde ROS oluşturduğu gösterilmiştir (2). Bu etki sayesinde hücrenin hayatta kalmasını sağlayan yapı taşlarını hasara uğratmaktadır. Oksidatif stres parametresi olarak protein oksidasyonu düzeyleri ölçülecektir.

Çalışmalarımızda N-asetilsistein, Bleomisin, Bleomisinin N-asetilsistein ile birlikte uygulamalarının, testis kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini araştırmak için, hücre içerisinde apoptozis mekanizmaları harekete geçtikten sonra hücre dışına verilen ilk sinyallerden olan fosfotidilserin çalışmamızda apoptozis ilk belirteci olarak tespit edilecektir. Bu ölçüm Anneksin V antikoru ile yapılacaktır. Bir diğer apoptozis belirteci bir protein olan Kaspaz-3'tür. Bu protein fosfotidilserinin aksine apoptozisi belirlemede son belirteç olarak çalışmamızda kullanılacaktır. İntrinsik ve ekstrinsik yollardaki başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, -9, -10) tarafından aktive edilen Kaspaz-3, en önemli uygulama kaspazıdır. Hem aktif kaspaz-8, hem de kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktive ederler ve apoptozise yol açarlar. Kaspaz-3, apoptozisde

meydana gelen endonükleaz aktivasyonuna, kromatin kondensasyonuna ve membran cepciklerinin oluşumuna aracılık eder.

Yapılan literatür taraması sonucunda Bleomisin'nin testis kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin NAC tarafından inhibe edilebileceğine dair bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışma da bir antioksidan olan NAC'ın Bleomisin kullanımı sonucu testis kanser hücreleri üzerinde oluşan sitotoksik etkinin azaltılabileceğini düşünmekteyiz. Bu da tedavi sürecini ve hastalığın prognozunu nasıl seyredeceğinin kestirilmesi açısından bize moleküler bir rehber olacaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Kanseri

Kanser insidansı; tür, yaş, cinsiyet ve coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermekle birlikte, toplumda 100.000 de 100 ile 350 kişide görülen bir hastalıktır. Cinsiyete bağlı olarak kanser türlerinde farklılıklar gözlenmekle birlikte, her iki cinsiyet için en sık görülen ölüm nedenleri sıralamasında ikinci sıradadır (15).

Testis kanseri 15-35 yaş arası genç erkeklerde en yaygın görülen kanser tipidir (19, 21). Son 50 yılda testis kanserinin insidansı giderek artmaktadır (22, 23). Testis kanser hastalarının %80'i, kemoterapi ve cerrahi ile tedavi edilmektedir. Erken evredeki hastalarda ise tedavi oranı %100'e ulaşmaktadır. Fakat özellikle geç teşhis edilen %20 lik dilimdeki hastalar, günümüzde hala tedavi edilememektedir (18).

Testiküler karsinom, gelişmiş ülkelerdeki genç erkeklerde en sık görülen kanserdir. İnsidansı özellikle 20. Yüzyılın ikinci yarısında artış göstermiştir (16). Genel populasyonda görülme oranı 1/100000 olan testis karsinomunun inmemiş testis olguları içinde görülme oranı 1/2550' dir ve bu durum 40 kata kadar artmış riski göstermektedir (17). Testis kanserinin etiyojisi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte çok etmene bağlı olduğu bilinmektedir. Genetik faktörler, kimyasal karsinojenlere maruziyet, travma, orşit ve inmemiş testis bilinen risk faktörleridir (24).

2.1.1. Epidemiyoloji

Testis kanserinin insidansında coğrafi çeşitlilik vardır ve bu insidans giderek artmaktadır (25). Testis kanser insidansı, İskandinavya, İsviçre ve Almanya'da en yüksek düzeyde, Amerika Birleşik Devletleri ve İngiltere'de orta düzeyde, Afrika ve Asya'da ise en az düzeydedir. Testisin germ hücre tümörleri daha çok beyaz ırkta, nadir olarak da Afrika orijinli Amerikalılarda görülmektedir. Yapılan çalışmalarda beyaz ırkta Afrika orijinli Amerikalılardan 5 kat daha fazla testis kanseri görüldüğü bildirilmiştir (25).

Son yıllarda testis tümöründe mortalite azalmasına rağmen, insidans bir çok populasyonda artmaktadır. İnsidanstaki bu artışın nedeni açıklanamamaktadır, ancak mortalitenin azalmasının nedenleri ilerlemiş evredeki hastalarda tedavi edici kemoterapinin bulunmuş olması, erken evrede hastalığın yakalanmasındaki artış ve nonseminomlara göre seminomların daha fazla görülmesidir (26).

2.1.2. Risk Faktörleri

Germ hücreli tümörlerin (GCT) nedenleri tam olarak bilinmemektedir (26). GCT oluşumu için en önemli risk faktörleri içerisinde kriptorşidizm, ailede GCT öyküsü, Klinefelter Sendromu, spermatik ve testiküler dizgenezi yer almaktadır (27). Daha önce testis kanseri tanısı konmuş bir hastanın diğer testisinde ikinci bir kanser gelişme riski, %2-3'dür (19). Hastaların yaklaşık %2'si testis kanseri olan bir aile üyesine sahiptir. Literatürde bildirilen ailelerin çoğunun testis kanseri olan iki üyesi vardır. Nadiren bazı ailelerde 3 ya da daha fazla üye testis kanseridir. Bu da çekinik ya da düşük baskınlıkta bir kalıtım olabileceğini önermektedir (28).

Diğer risk faktörleri, testiküler atrofi, kasık fitiği ve hidroseldir (29). Kısır ya da çocuk sahibi olma olasılığı normale göre az olan erkeklerde, testis kanseri riski artmaktadır (19).

2.1.3. Tedavi

Testis kanseri tedavisini, histopatoloji, serolojik belirteçler, hastalığın evresi, hasta ve doktorun tercihlerini içeren çeşitli faktörler belirler. Tedavi, cerrahi, radyoterapi, ve kemoterapinin tümünü ya da bir kısmını içerebilir. Testis kanseri, yüksek oranda tedavi edilebilir olmasına rağmen, bu kanserin tüm aşamalarında uygun tedavinin seçilmesi ve uygulanması önemini korumaktadır. Yerinde olmayan uygulamalar morbiditeyi, mortaliteyi ve tedavi yükünü arttırmaktadır (25). Kanserli testisler, her zaman cerrahi yöntemle vücuttan uzaklaştırılırlar. Radyoterapi ile kanser hücrelerinin hasar görmesi ve büyümesinin durdurulması sağlanmaktadır. Anti-kanser ilaçlar, genellikle hastalığın vücudun başka kısımlarına metastaz yapması durumlarında tercih edilirler. Bu ilaçlar bazen tümörün cerrahi girişim öncesine kadar küçülmesini sağlamak amacıyla da kullanılabilirler (30). Bleomisin, etoposid, ve sisplatin (BEP) kombinasyonu, metastatik non-seminomatöz testis tümörlerinde tercih edilen en etkili tedavi kürüdür. Bu kür, 1. evre testis tümörü için uygulanan orşidektomi sonrasında tümör dokusunda saptanan vasküler invazyonun yaratabileceği yüksek nüks ihtimali için de kullanılabilir (1). Bleomisin, etoposid ve cis-platinum'un beraberce kullanılması, iyileşme yüzdesini tedavi edilebilen hastalarda, %90'lara çekmiştir. Tedavi edilen testis kanserli hastaların, tedavi sonrası beklenen sağlıklı yaşam süreleri, oldukça uzundur (20).

2.2. Bleomisin

2.2.1. Bleomisin'in Kimyasal Yapısı

Bleomisin (BLM), 1699 da Umezewa tarafından keşfedilmiş *streptomyces verticillus* mantar türünden izole edilmiş antitümöral etkili bir antibiyotiktir (26, 31). Bleomisin skuamöz hücre, testiküler ve lenfomatöz kanserlerin tedavisinde efektif bir ajandır (32). Bleomisin grubu ilaçlar 200'ün üzerinde yakın ilişkili bileşik içerirken, Bleomisin'in uygulanan formu olan Bleomisin başlıca A₂ ve B₂ formlarını içermektedir (33). Bleomisin ailesi terminal amin kısmının birbirinden farklı olması ile ayrılır (34).

Demir bakır ve kobalt gibi birçok metalin, Bleomisin indüklü DNA kırılmasını desteklediği gösterilmiştir. Fakat demirin vivo olarak etki gösteren başlıca metal olduğuna inanılmaktadır (35).

Bleomisin kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmektedir (33, 35). Bleomisin'in yapısının 4 ana bölgeden oluştuğu tespit edilmiştir.

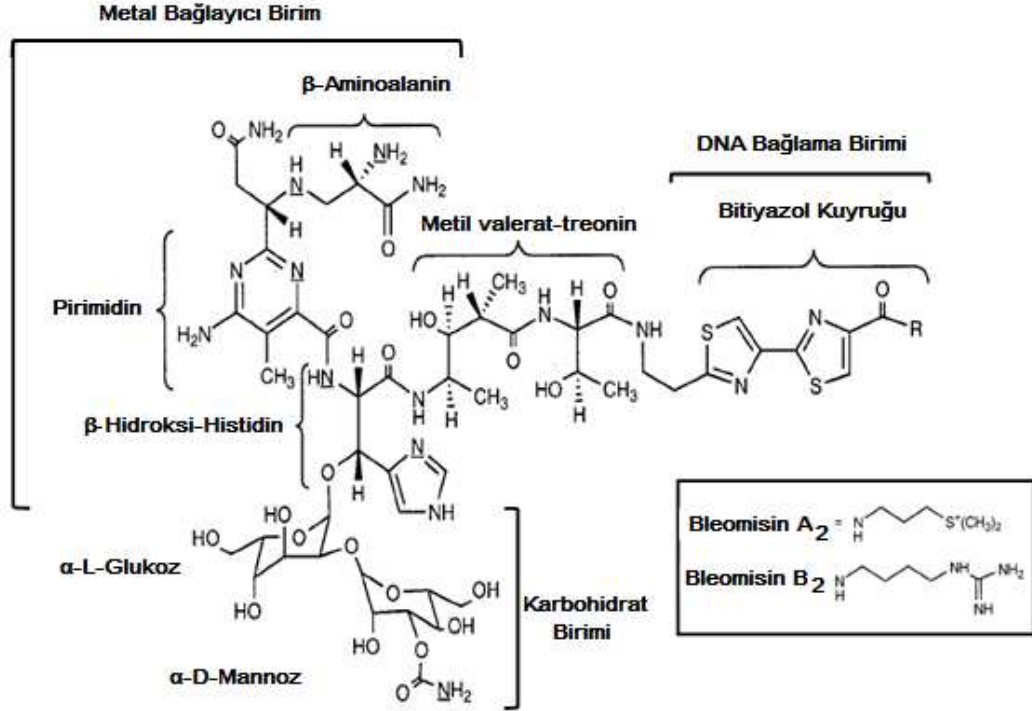
N-terminal birim. Bu birim metal bağlanmasından, oksijen aktivasyonundan ve alan selektif DNA kırılmasından sorumludur.

Metilvalerat-treonin grubu.

C-terminal birim. DNA'ya bağlanma afinitesini sağlayan fonksiyonel bir bitiyazol grubu içerir.

Glukoz ve mannoz şekerlerini içeren bir disakkarit grubu içerir. Disakkarit grubunun metal iyon bağlanması, hücre yüzeyinin tanınması ve bazı hücrelerde Bleomisin'in selektif birikimi üzerinde etkisinin olabileceği düşünülmektedir (33).

Bleomisin'ler, katyonik moleküllerdir ve hücre membranından Bleomisin bağlayıcı protein ile zayıfça bağlanarak hücre içine alınırlar. Alınan Bleomisin ya nükleusa transloke olur, ya da Bleomisin hidrolaz tarafından parçalanır. Bleomisin hidrolaz ise normal ve malign hücrelerde bulunan bir sistein proteazdır. Fakat akciğer ve deride çok az bulunmaktadır.



Şekil 2.1. Bleomisin'in kimyasal yapısı (36).

2.2.2. Bleomisin'in Etki Mekanizması

Bleomisin, DNA'ya direkt bağlanarak ve tek ve çift zincir kırılmalarına yol açarak, büyüyen hücrelerde apoptozisi tetikler. Bu aktivite oksijen ve ferröz iyonuna bağlıdır (37).

Bleomisin'in anti-neoplastik etkisinin mekanizması, Bleomisin-demir kompleksinin, moleküler oksijeni, süperoksit ve hidroksil radikale redüklemesi esasına dayanmaktadır. Oluşan bu radikaller DNA'ya atak yaparak zincir kırılmalarına yol açmaktadır ve bu da DNA-RNA-protein sentezinde (transkripsiyon ve translasyon basamakları) hasara sebep olarak anti-neoplastik etki gösterir (38). Oksijen serbest radikallerinin rolü, süperoksit dismutaz'ın, Bleomisin indüklü DNA hasarını önlediğini gösteren çalışmalarla desteklenmiştir. Bleomisin'in oluşturduğu değişimler sonucu ortama göç eden inflamatuvar hücrelerden bir çok oksijen metabolitinin salındığı ve DNA kırıkları dahil bir çok yapı fonksiyonlarının ortaya çıktığı da son zamanlarda Bleomisin'in toksisitesi hakkında bildirilen gelişmelerdir. Bütün bu çalışmalara rağmen hasarın tam mekanizması tam olarak açıklanamamıştır.

değildir (39). Bleomisin, aynı zamanda hücre siklusunu etkileyen spesifik bir ilaçtır ve hücrelerin hücre siklusunun G2 fazında birikimine neden olur (40).

DNA kırılması için, DNA ile Bleomisin'in metal bağlayıcı birimi ve bitiyazol kısmının etkileşimini gerektiren bir mekanizma önerilmiştir. Labil Fe (II)-BLM-O₂ kompleksinin, aktive edilmiş Bleomisin'e dönüşümü, DNA'yı hasara uğratar. Bunun yanında son çalışmalarda, Bleomisin'in RNA'nın alışılmamış 3 boyutlu yapısını yıktığını gösterilmiştir (34).

Deneysel çalışmalar, Bleomisin hassasiyetinin birçok nedeni olabileceğini göstermiştir. DNA tamir mekanizmasındaki bozukluklar, çift zincir kırılmalarının tamirinde gerekli olan genlerdeki mutasyonlarla ilişkilidir. Bu mutasyonlar aşırı hassasiyete yol açarlar. Çift zincir tamirine katkıda bulunan bir gen olan RAD21'in inhibisyonu, hücrelerin Bleomisin'e hassasiyetinin artmasına yol açar. Yapılan çalışmalarda, Bleomisin direncinin birçok nedeni ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenler, Bleomisin hidrolaz aktivitesindeki artış, taşıyıcı yetersizliğinden dolayı ilacın hücreye alınmasındaki azalma, artmış DNA tamir kapasitesi ya da serbest radikallerin artmış detoksifikasyonu olabilir (41).

2.2.3. Bleomisin'in Tedavide Kullanımı

Bleomisin (BLM), germ hücreli tümörler, lenfomalar, kaposi sarkoma, servikal kanserler, baş ve boyun squamous hücreli kanserlerinin tedavisinde kullanılan doğal bir ilaçtır (42).

Bu ilacın bir diğer avantajı derialtına, kasa veya kana verilebilmesidir. Kas içine enjeksiyondan sonra, pik kan değerleri 30-60 dakika içinde görülmektedir. Benzer dozajların kana enjeksiyonu ile en yüksek pik konsantrasyonları elde edilmektedir ve ilacın yarı ömrü yaklaşık 2,5 saattir (43). Bleomisin'in eliminasyonu başlıca böbreklerle olur. Bleomisin'in alınmasından 24 saat sonra, ilacın yaklaşık %60'ı değiştirilmemiş olarak atılır. Bleomisin, Bleomisin hidrolaz adlı bir enzimle deaktive edilir. Bu enzim başlıca karaciğer, dalak, kemik iliği ve bağırsakta bulunur. Bleomisin uygulanması bazen ölümcül yan etkiler meydana getirebilmektedir. Bleomisin'i inaktive eden enzim olan Bleomisin hidrolazın eksikliğinden dolayı Bleomisin toksisitesi, başlıca akciğer ve deride meydana gelir. Bleomisin'in alınımından sonra ateş ve bazen de hipotansiyon görülebilmektedir (31).

Pulmoner toksisite, Bleomisin için doz sınırlayıcı bir yan etkidir ve bu yan etki genellikle kendini fizik muayenede öksürük, dispne, kuru inspiratuvar raller ve röntgende toraks infiltrasyonları olarak gösterir. 400 üniteden daha fazla doz alanlarda ve Bleomisin tedavisi öncesi mediastinal ya da göğüs bölgesine radyoterapi uygulanmış olanlarda, pulmoner yan etkilerin görülme insidansı daha yüksektir. Nadir de olsa bazı olgularda pulmoner toksisite öldürücü olabilmektedir. Bleomisin, akciğerde pulmoner fibrozisi olumsuz etkiler, çünkü Bleomisin'i inaktive eden hidrolaz akciğerde yok denecek kadar azdır. Bu yüzden farelerde Bleomisin indüklü pulmonar fibrozis modeli, özellikle oksijen serbest radikallerinin indüklediği fibröz oluşum mekanizmasının incelenmesi için yardımcı bir araçtır (40).

Orta dereceli ateş, lokalize göğüs ağrısı ve gastrointestinal sistem şikayetleri gibi yan etkilere yol açan bleomisin, plevra boşluğunda sınırlı emilimi nedeniyle hastalarda az oranda sistemik toksisiteye yol açar (44).

2.3. Apoptozis

Apoptozis 'apo' =ayrı, 'ptosis' =düşmek kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur (45). Apoptozis kelimesi ilk kez Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür (46, 47). Apoptosis terimi Kerr ve arkadaşları tarafından programlı hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır (47, 48).

Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Apoptozis, embriyo döneminden ölüme kadar pek çok fizyolojik veya patolojik olayda izlenir. Apoptozis fizyolojik olarak doku gelişimi, hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımı (remodelling), normal hücre sirkülasyonu (turnover) ve immün cevap regülasyonu gibi süreçlerde rol olarak doku homeostazisinin devamlılığını sağlar. İnsanlarda normal apoptotik hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımının günde yaklaşık 1×10^{11} hücreyi bulduğu hesaplanmaktadır (49, 50).

2.3.1. Hücre Ölümünün İki Şekli: Apoptozis ve Nekrozis

Apoptozis ve nekrozis, farklı şartlarda indüklenen, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri farklı olan, hücre ölümünün iki değişik şeklidir (6). Nekrozis, geri dönüşümsüz hasar sonucu oluşan ve hücrenin ölümüne yol açan pasif bir olaydır. Nekrozis, aşırı stres koşulları veya toksik ajanların neden olduğu akut hücresel disfonksiyonun bir sonucudur ve hızlı ATP tüketimi kendisine eşlik eder (51). Nekrozisle ölen hücreler, şişerek lizize uğrar. Açığa çıkan hücre içerikleri, komşu hücreleri etkileyerek ve proinflamatuvar hücreleri lezyon alanına çekerek, daha ileri doku hasarına sebep olur ve inflamatuvar bir yanıt oluşturur (5, 51).

Apoptozis, morfolojik ve biyokimyasal olarak farklı, yaşlanmış, hasarlı ya da gereksiz hücrelerin organizmadan uzaklaştırılmasına olanak sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptozis, hücre değişimi, doku yenilenmesi ve hasarlı hücrelerin uzaklaştırılması için yaygın bir mekanizmadır (51, 52). Nekrozis patolojik bir olaydır; apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir. Apoptozisin nekrozise göre birçok avantajı vardır. Apoptotik hücreler, fagositler tarafından temizlenip, intraselüler olarak parçalanırlar. Böylece inflamatuvar yanıtın indüksiyonu önlenerek çevre dokular hasardan korunur (5). Apoptozis, hücre büzülmesi, kromatin kondansasyonu, membran kabarcıklarının oluşumu (blebbing), oligonükleozomal DNA fragmentasyonu, komşu hücreler veya fagositler tarafından fagosite edilen apoptotik cisimlerin oluşumu ile karakterize edilen, iyi düzenlenmiş kompleks bir olaydır (5, 51, 53-56).

Apoptotik süreç, hem eksternal hem de internal faktörler tarafından başlatılabilir (57, 58). İnternal faktörler sıklıkla reseptör aracılıdır ve FAS reseptörü, TNF ailesi reseptörleri ve purinerjik reseptör P_{2Z} apoptozisle ilgilidir. Büyüme faktörlerinin eksikliğinin ve hormon konsantrasyonlarının değişiminin lenfosit, memeli ve prostatik hücreler gibi hassas hücrelerde, apoptozisi başlattığı gösterilmiştir. Apoptozisi indükleyen eksternal tetikleyiciler, DNA hasarını, oksijen veya besin eksikliğini ve viral enfeksiyonları içermektedir. Oksidatif stres, iyonize ya da UV radyasyon, kemoterapötik ajanlar, yüksek ısı, büyüme faktörleri, hormon azalması, glukokortikoidler, sitokinler gibi birçok uyaran ve onarılamayan DNA hasarı apoptozisi başlatabilir (52, 56).

DNA'ya hasar veren uyarılara maruz kalındığında, bir hücrenin apoptozis ya da nekrozis tarafından öldürüleceği, DNA hasarının tipine, maruziyetin süresine ve konsantrasyonuna bağlıdır. Ayrıca apoptozis kurtarıcı moleküllerinin varlığına ve tetikleyici moleküllerin fonksiyonuna da bağlıdır (58). ATP'nin hücre içi konsantrasyonu, hücre ölüm şeklinin seçilmesinde önemlidir. ATP'nin yüksek konsantrasyonda olması apoptozisin baskın olmasına sebep olurken, ATP'nin düşük konsantrasyonda olması hücrenin nekroze doğru kaymasına sebep olur (46).

2.3.2. Apoptozisin Aşamaları

Apoptozis 3 aşamaya ayrılabilir. İlk aşamada, hücre apoptotik bir sinyal alır. Hücreye, hem içten hem de dıştan gelen çeşitli uyarılar, apoptotik yolları aktive edebilir. Bunlara örnek olarak, hücre yüzey reseptörlerinin bağlanma ile uyarılması, esansiyel büyüme faktörlerinin ortamdan uzaklaştırılması ya da hücrelerin çeşitli kimyasal ajanlara maruz bırakılması verilebilir. Bunlara ek olarak, hücrelerin UV ya da iyonize radyasyona, ısıya ve osmolarite değişikliklerine maruz kalmaları, apoptozisi uyurabilir.

Apoptozisin ikinci aşamasında hücreler tüm bu çeşitli sinyalleri toplar ve apoptozisi devam ettirir ya da ettirmez. Bu olaylar aktivasyon-inaktivasyon, serin/treonin ve tirozin kinaz, fosfataz ve seramidleri de içeren lipid ikincil mesajcıların sentezi, değişmiş gen ekspresyonları ve kaspaz olarak bilinen özel proteazların aktivasyonu gibi birçok sinyal yollarını içerir.

Apoptozisin devamı için son karar, apoptotik ve hayati faktörlerin (Bcl-2 grubu proteinleri içerir) göreceli düzeyleri, hücrelerin metabolik durumları ve hücre siklus durumu gibi birçok faktöre bağlıdır. Son çalışmalar birçok apoptotik uyarının mitokondri tarafından alınıp değerlendirildiğini göstermiştir. Apoptozisin son aşamasında genel yıkıcı bir sinyal yolağı aktive olur ve apoptozis ile ilgili karakteristik morfolojik değişiklikler tetiklenir (47, 57)

2.3.3. Apoptozisin Önemi

Apoptozis, yaşamın gerekli bir parçasıdır. Bağışıklık sisteminde, gelişme ve hücre homeostazisi gibi birçok biyolojik süreçte, istenmeyen ya da fazla üretilmiş hücrelerin yok edilmesi için, apoptozis gereklidir. Apoptozisin regülasyonunun bozulması, kanser, otoimmünite, nörodejenaratif hastalıklar, hemopoietik bozukluklar ve infertilite gibi klinik bozukluklarla ilişkilidir (46, 59). Belirli beyin nöronlarındaki kontrolsüz apoptozis, Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıkların oluşumunu destekleyebilir, tam tersine DNA hasarına maruz kalmış hücrelerin apoptozis ile yok edilememesi ise kanser oluşumuna neden olabilir (60).

Fizyolojik hücre ölümü, insan vücudunun büyümesinde ve sürekli yenilenmesinde önemli bir rol oynar. Sinir sistemi gelişiminde, uygun bağlantı oluşturamayan nöronlar bu yolla ölür. Fizyolojik hücre ölümü, enfekte hücrelerin sitotoksik T lenfositler tarafından ortadan kaldırılmalarında, oto-reaktif immün hücrelerin yok edilmelerinde, sindirim sisteminin, kıkırdak ve kemik gelişimlerinde de önemli rol oynar. Normalde gerçekleşmesi gereken fizyolojik hücre ölümü inhibe olursa, uygunsuz fizyolojik hücre ölümü gerçekleşebilir ve bu da birçok hastalığın temelini oluşturur. Örneğin, Alzheimer ve Parkinson gibi dejeneratif nöral hastalıklarda, bazı grup nöronlarda prematür hücre ölümü izlenir. AIDS hastalığındaki T lenfosit ölümü de bir çeşit fizyolojik hücre ölümü formudur. İmmün

sistemde hücre ölümü inhibisyonu, oto-reaktif B ve T lenfositlerin varlığını devam ettirmesine ve buna bağlı olarak da oto-immün hastalıklara neden olur (61).

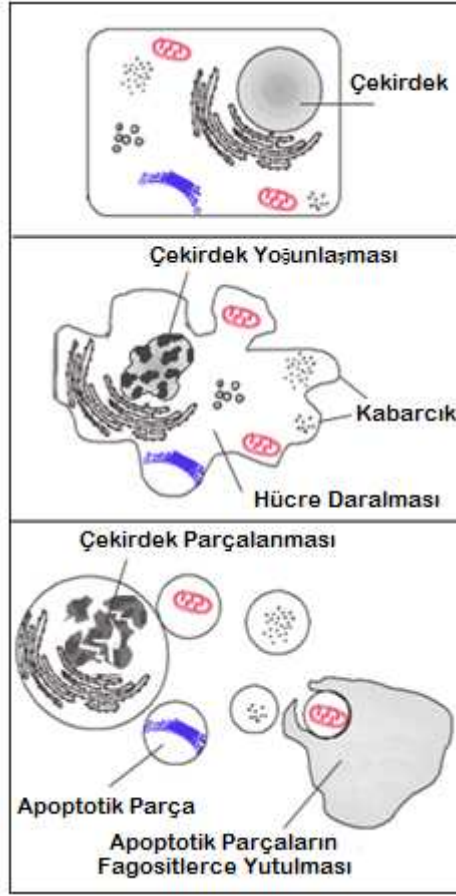
2.3.4. Apoptozisde Meydana Gelen Biyokimyasal ve Morfolojik Değişimler

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü hücre büzüşmesi, kromatin kondansasyonu, nükleer fragmentasyon, membran cecikleri ve apoptotik cisim oluşumu gibi morfolojik değişimler ile tanımlanır. Biyokimyasal olarak apoptotik hücreler, mitokondriyal transmembran potansiyelin azalması, hücre içi asidifikasyon, reaktif oksijen türlerinin üretimi, fosfotidilserinin membranın iç yüzünden dış tarafına çıkması gibi olaylarla karakterize edilir (48, 62, 63)

Apoptozisin başlangıcında çok hafif değişiklikler meydana gelirken hücre membran bütünlüğü korunmaktadır. Daha sonra hücre, profesyonel fagositler (makrofaj ve dendritik hücreler) tarafından in vivo olarak alınan, membranla çevrili fragmentlere (apoptotik cisim) parçalanır. Apoptozisin geç döneminde, apoptotik cisimlerin plazma membranı, bütünlüğünü kaybeder ve bu olay sekonder nekroz olarak tanımlanır (64). Apoptotik hücrelerin bir başka özelliği, transglutaminazların ekspresyonu ve aktivasyonu ile meydana gelen yoğun protein çapraz bağlanmalarıdır.

Kalsiyum ve magnezyuma bağlı endonükleazlar tarafından DNA'nın kırılması, 180-200 baz çiftlik DNA parçalarının oluşumu ile sonuçlanır. Bu kırıklar, UV ışığı altında etidyum bromid boyasıyla agaroz jel elektroforezinde "DNA merdiveni" olarak tanımlanan karakteristik merdiven görüntüsünü verir (65). Sitolitik serbest kalsiyum ve magnezyumun artması ve sitolitik pH'ın ve potasyumun azalması apoptozise katkıda bulunmaktadır (1). Fosfotidil serinin plazma membranının dış tarafına çıkması apoptozise uğrayan hücrelerde evrensel bir olaydır. Fosfotidilserinin membranın dış tarafında bulunması, büyük olasılıkla, nekrozda oluşan inflamasyondan farklı olarak, inflamasyona neden olmadan apoptotik hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılması içindir. Fosfotidilserin, membranın dış tarafından iç tarafına aminofosfolipid translokazlar tarafından geçirilir. Bu mekanizma tamamen anlaşılabilir. Apoptozis sırasında membranın dış tarafında fosfotidilserinin görülmesinin, hem aminofosfolipid translokaz aktivitesinin kaybından, hem de fosfolipidlerin spesifik olmayan membran boyunca hareketinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (66).

Nötral ya da asidik sfingomiyelinazların aktivasyonu, apoptozisin pek çok modelinde meydana gelmektedir. Bu olay sfingomiyelinden seramidin üretimine yol açar. Seramid, proapoptotik sinyal kaskadını aktive eder. Transglutaminazlar tarafından proteinlerin çapraz bağlanması, hücrenin parçalanması esnasında, apoptotik cisimlerin oluşmasında etkilidir (1).



Şekil 2.2. Apoptozisde Meydana Gelen Morfolojik Değişimler

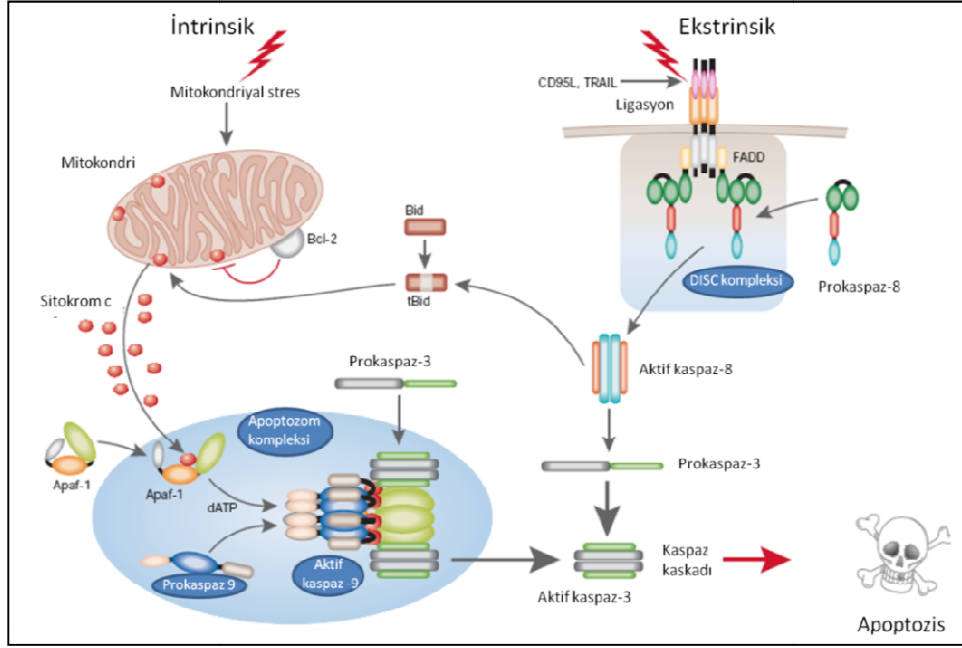
Apoptozis aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonun kaybı ile de karakterizedir. Apoptozisle ölen hücreler, plazma membran bütünlüğünü korurlar. Ancak apoptotik hücrelerin plazma membranlarındaki değişim, fagositik hücreler tarafından alınmaları için sinyal verir ve böylece degradasyon süreci tamamlanır. Hücreler, apoptotik cisimlere parçalanarak fagositik hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptozisin önemli bir özelliği ölen hücrelerin inflamasyona yol açmadan ortadan kaldırılmasıdır. Buna karşın nekrotik hücreler, erken membran bütünlüklerini kaybederler. Bu da sitoplazmik içeriklerinin dış ortama sızması ve o bölgede inflamasyon gelişmesi ile sonuçlanır (67).

2.3.5. Apoptozis Yolakları

Apoptozisi indükleyen iki ana yolak vardır. Bunlardan biri, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine ligand bağlanması ile başlar (ekstrinsik yolak). Ekstrinsik ya da sitoplazmik yolak olarak bilinen bu yolak, Tumor Nekrozis Faktör (TNF), Fas veya Tumor Nekrozis Faktör (TNF) ile ilişkili Apoptozis İndükleyici Ligand (TRAIL) reseptörleri ile meydana gelir. İkincisi, intrinsik ya da mitokondriyal yolak olarak adlandırılır ve çeşitli stimülasyonlarla mitokondriden sitokrom c salınımıyla, ölüm sinyalinin aktive olduğu yolaktır (68). Apoptozisde ekstrinsik ve intrinsik yolaklar Şekil 2.3'de gösterilmektedir (69).

Bu apoptotik yolaklara ek olarak endoplazmik retikulum-indüklü apoptozis ve kaspaz bağımsız apoptozis olmak üzere iki yolak daha vardır (64). Ayrıca T hücre aracılı sitotoksikite ve perforin granzim bağımlı hücre ölümü yolağı da vardır.

Perforin/granzim yolağı, apoptozisi, ya granzim A ya da granzim B yoluyla aktive eder (51, 70). Perforin ve granzim B, tümör hücrelerinde ve intraselüler patojenlerle enfekte olmuş hücrelerde, apoptozisi beraberce indükler. Perforin hücreleri geçirgen yaparak granzimin sitozole geçişini sağlar ve granzim de kaspaz-3'ü aktive eder. Ekstrinsik, intrinsik ve granzim B yolakları aynı uçta birleşmektedir. Bu yolak, kaspaz-3'ün kırılması ile başlar ve DNA fragmentasyonu, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin degradasyonu, apoptotik cisimlerin oluşumu, fagositik reseptörler için ligandların ekspresyonu ve sonuç olarak fagositik hücreler tarafından alımı ile sonuçlanır (65).



Şekil 2.3. Apoptozide ekstrinsik ve intrinsik yolaklar.

Ekstrinsik yolakda rol oynayan ölüm reseptörleri, tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör süper ailesinin üyeleridir. Bu ailenin üyeleri hem sisteinden zengin hücre dışı birimlere, hem de ölüm birimi olarak bilinen hücre dışında bulunan sitoplazmik kısımları olan birimlere sahiptir. En iyi bilinen reseptörler CD95/Fas/Apo1, TNFR1, TNFR2, DR3/Wsl-1/Tramp, DR4/TRAIL-R1 (TNF-ilişkili apoptozis-indükleyici ligand reseptör-1), DR5/ TRAIL-R2/TRICK2/Killer, ve DR6'dir. Ekstrinsik yolakta apoptozis, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanan, ölüm ligandları ile indüklenen kaspazlar tarafından kontrol edilir (51, 71-77). Ölüm reseptörleri, ekstraselüler ölüm sinyallerinin varlığını algırlar ve saatler içinde hücrede apoptozise yol açacak kaspazları aktive ederler (60, 78). Ölüm reseptörlerinin, sitoplazmada bulunan homolog sekans içeren ölüm domaini, hücrelerde apoptozisi başlatır (79). Ligand bağlanması üzerine reseptörler, adaptor protein ile sitozolik bir kompleks oluşturur ve prokaspaz-8 ve -10 ile etkileşerek bu kaspazların aktivasyonunu sağlar (65, 80). Kaspaz-8 doğrudan kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozise yol açar (81). Kaspaz-8 aktivasyonuna öncülük eden olaylar, ölüm reseptörlerinden birinin ligasyonu ile başlar, bunu reseptör trimerizasyonu ve adaptör molekülün reseptörün sitoplazmik domainine bağlanması takip eder (68, 82).

Multimerik bir protein olan, adaptör molekül, moleküler bir yapı iskelesi (scaffold) olarak davranır ve böylece birçok prokaspaz-8 molekülünü yanyana getirir. Bu da aktif kaspaz 8'in serbestleşmesine yol açar. Aktif kaspaz-8, prokaspaz-7 ve -3'ü yıkararak aktifleştirir. Aktif kaspaz-3 de prokaspaz-6'yı yıkar (68, 83). Sitoplazmada kaspaz-3 tarafından inhibitöründen ayrılan, kaspaz bağımlı endonükleaz, nükleusa girer ve DNA'yı oligonükleozomal fragmanlara (180bp) parçalar (51, 84). Birçok ölüm reseptörleri için farklı ligand ve adaptör molekülleri olmasına rağmen, aktive olan yollar benzerdir (68, 82).

İntrinsik yolda, mitokondriden sitokrom c salınımı apoptozisi indükler ve bu yolda hücre yüzey reseptörleri ile ilişkili değildir (51). Mitokondri apoptozis sinyal yolağında, önemli bir düzenleyici organeldir. Çoğu ölüm sinyali, mitokondrinin geri dönüşümsüz olarak fonksiyonunun bozulmasına yol açar. Böylece mitokondri membranları arasında bulunan sitokrom c, apoptozis inhibe edici faktör (AIF), Smac/DIABLO, Endo G ve Omi/HtrA2 gibi proteinler apoptotik hücre ölümünde aktivasyonlarını gösterecekleri sitozole ya da nükleusa geçer (85).

İntrinsik yolda, Bcl-2 ailesinin kontrolü altındadır ve mitokondri membranları arasından sitokrom c ve Smac/DIABLO'nun salınması ile başlar. Smac/DIABLO apoptozis protein inhibitörlerine bağlanarak fonksiyon gösterir. Bu yüzden, apoptozis protein inhibitörlerinin, kaspaz-3, -7, -9'nin aktivitelerini durdurması engellenir (80). Mitokondri dış membranında lokalize antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin konformasyon ve/veya aktivasyonundaki değişikliklerin bir sonucu olarak, sitokrom c, mitokondri'deki membranlar arası boşluktan sitoplazmaya salınır ve sitoplazmada, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'e (Apaf-1) bağlanır (68, 86, 87). Bcl-2 ailesi, hücre canlılığının ve apoptozisin gerekli araçlarıdır. Bcl-2 ailesinin hem antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl-1/A1, Bcl-W, Bcl-G), hem de pro-apoptotik (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, Bim, Bcl-XS, Krk, Mtd, Nip3, Noxa, Bcl-B) üyeleri tanımlanmıştır. Proapoptotik ve apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin oranını, büyüme faktöründen yoksunluk, hipoksi, radyasyon, antikanser ilaçlar, oksidanlar ve aşırı kalsiyum gibi çeşitli apoptotik etkenlere direnç, ya da hassasiyetleri belirler. Bcl-2 ailesi proteinlerinin dimerizasyonu ve ekspresyonu, sitokrom c salınımını düzenler. Bcl-2 proteinleri aynı zamanda sitokrom c'den bağımsız olarak da kaspazlarla etkileşebilir. Antiapoptotik protein Bcl-XL, kaspaz adaptörü Apaf-1'e bağlanır ve onu inaktive eder. Apaf-1, sitokrom c ve Datp için bağlanma yerleri içerir ve diğer Apaf molekülleri ile oligomerize olur. Apaf-1, kaspaz-9 ve sitokrom c, apoptozom olarak adlandırılır. Oluşan kompleks, ATP veya dATP'ye bağımlı konformasyonel değişikliklere uğrayarak, Apaf-1'in, prokaspaz-9'a bağlanmasını sağlar (51). Bu etkileşim, zimojen formundaki prokaspaz-9'da konformasyonel değişikliklere yol açarak, proteolitik aktivitesini artırır. Oluşan kaspaz-9, multimerik kompleksten ayrılır ve daha uzaktaki kaspaz-3, -7 ve -6'yı aktive eder (68, 88).

İki kaspaz aktivasyon yolağı arasındaki etkileşim olduğu ve bunun cevapları amplifiye ettiği bildirilmiştir (68, 89). Anti-neoplastik ilaçlara direnci önlemek için, antikanser ilaçların hangi apoptotik yolağı aktive ettiğini bilmek çok önemlidir. Değişik neoplastik hücrelerde yapılan çalışmalar, birçok antikanser ilacının, Fas'a bağlanan FasL sentezini indükleyerek ve ölüm reseptör yolağını aktive ederek apoptozisi başlattığını göstermiştir (68, 90, 91). Doksorubisin, etopozid, tenipozid, metotreksat, sitarabin, sisplatin, ve Bleomisin, FasL mRNA'sını arttırdığı gösterilen kanser ilaçları arasındadır (68, 90, 91). Ölüm reseptör yolağının kemoterapinin

indüklediği apoptoziste önemli bir rol oynadığına dair olan ilk düşünceler, mitokondriyel yolağın bulunmasından sonra oldukça değişmiştir. Yapılan çalışmalar, antikanser ilaçlarının çoğunluğunun sitokrom c/Apaf-1/kaspaz-9 yolağı ile apoptozisi başlattığını ortaya koymuştur (68, 92).

2.3.6. Kaspazlar ve Kaspaz-3

Kaspazlar, apoptozis’de önemli rol oynayan sistein içeren, aspartik asit-spesifik, sistein-proteaz ailesidir (93). Kaspaz aktivasyonu, apoptoziste anahtar bir basamaktır ve birçok uyarıcı kaspazları aktive eder (45). Apoptozise, kaspazlar denen spesifik proteazların aktivasyonu ve fosfotidilserin çıkışına yola açan membran fosfolipid asimetrisinin kaybı eşlik eder (56). Kaspazlar, aspartat substrat spesifiteleri ile birlikte, sistein aktif bölgeleri ile karakterize edilirler (94). Kaspazlar, kataliz için sistein kullanmaları ve sadece aspartat rezidülerinden sonra kırılmaları yönleriyle diğer proteazlardan farklıdır. Bu alışılmadık aspartat substrat spesifitesi, sadece bir proteaz olan granzim B’de de bulunur (57). Kaspazlar, tüm hücrelerin nükleer matriksinde, mitokondri’de membranlar arası boşlukta ve sitoplazmada zimojen olarak bulunurlar (51, 53).

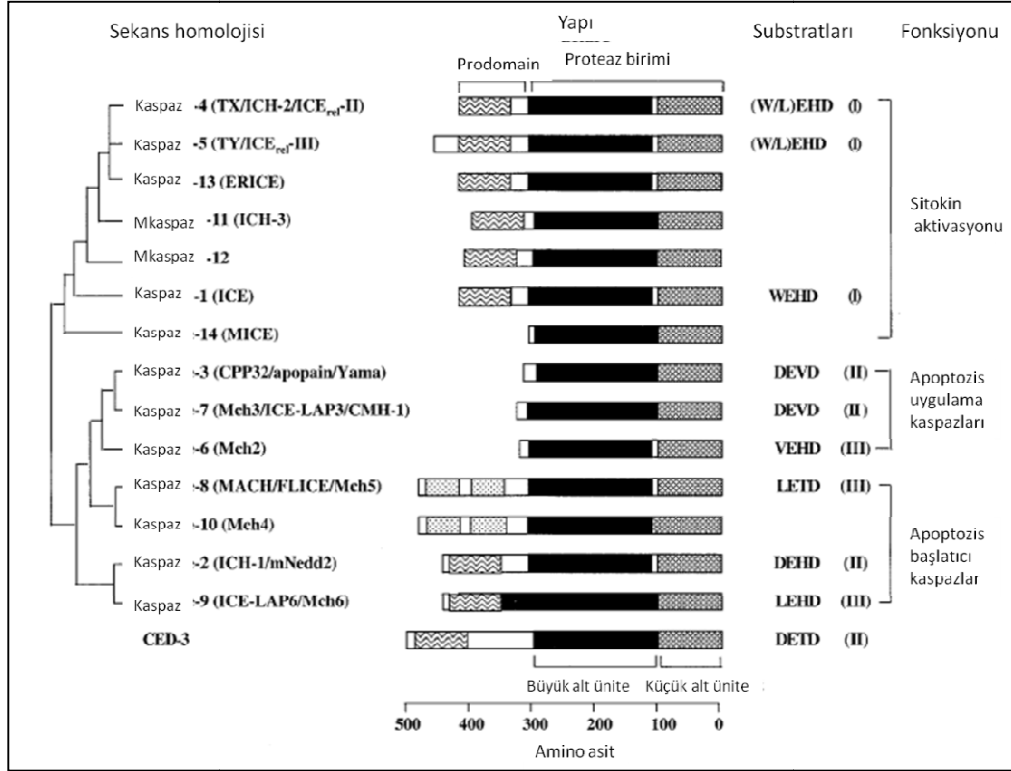
Kaspazlar, tek bir polipeptid zinciri ve inaktif bir zimojen olarak sentezlenirler (57). Sekans analizleri ve x-ray kristalografisi, tüm kaspazların ortak bir yapısı olduğunu göstermiştir. Her zimojen, bir N-terminal prodomain, korunmuş bir QACXG motif içinde aktif bölgesinde sistein bulunan büyük alt birim ve C terminalinde küçük bir alt birim içermektedir. Aspartat kırılma bölgeleri, büyük alt ünite ile prodomain arasında ve büyük ve küçük alt ünite arasında bulunur (95). Aktivasyon sırasında her polipeptid zinciri, 20 kDa’luk bir büyük (p20) ve 10 kDa’luk bir de küçük alt üniteye (p10) ayrılır ve daha sonra dimerize olur. Enzimatik aktivitenin tam olması için, 2 küçük 2 büyük alt ünite gereklidir (57). Çoğu prokaspazda, büyük ve küçük alt ünite arasında, yaklaşık 10 aminoasitlik küçük bağlayıcı bir dizi vardır (96). Kaspazlar, spesifik aspartik asit rezidülerinden kırılarak hızlı bir şekilde aktive edilir (64, 97).

Kaspazlar, sekans benzerliklerine göre gruplandırılır. Sekans kimliklendirmesine göre kaspazlar 3 gruba ayrılır ve bu gruplandırma fizyolojik fonksiyonları ile uyumludur. Grup 1: inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5); Grup 2: Efektör, uygulama kaspazlar (effector, downstream) (kaspaz-3, -6, -7); Grup 3: başlatıcı kaspazlar (initiator, upstream) (kaspaz-2, -8, -9, -10) (65, 96).

Kaspaz-3, -6, -7 gibi uygulama kaspazları, apoptozis ile ilişkili karakteristik değişikliklerin meydana gelmesine yol açan substrat kırılmalarını oluşturan kaspazlardır. Kaspaz-8 ve -9 gibi başlatıcı kaspazlar ise uygulama kaspazlarını aktive eder (98). Bazı kaspazlar diğer proteinlerle etkileşerek aktive olurlar. Örneğin kaspaz-8, Fas ilişkili ölüm birimi (FADD) ile, kaspaz-9 ise sitokrom c, dATP (veya ATP) ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)’in etkileşimi ile aktive olur. Bir başka aktivasyon mekanizması da kaspazların diğer kaspazlarla aktivasyonudur. Örneğin hem aktif kaspaz-8 hem de kaspaz-9, kaspaz-3’ü aktive ederler (57).

Kaspaz ailesinin birçok üyesi, primer yapıları ve substrat özgüllükleri (spesifiteleri) farklı olmasına rağmen, aynı özellikleri paylaşır (68, 83). İnsan kaspaz ailesinin 12 üyesi mevcuttur ve bunlardan 6 tanesi (kaspaz-3, -6, -7, -8, -9, ve -10) apoptoziste rol alır (68). Başlatıcı (initiator, upstream) (kaspaz-8, -9, ve -10)

kaspazlar, proapoptotik sinyallere cevaben proteolitik kaskadı başlatırlar. Memeli kaspaz ailesi ve *C. Elegans* kaspaz CED-3 Şekil 2.4’de gösterilmektedir (99).



Şekil 2.4. Memeli kaspaz ailesi ve *C. Elegans* kaspaz CED-3.

Efektör (effector, downstream) (kaspaz-3, -6, ve -7) kaspazlar ise, aktive olduktan sonra çeşitli hüresel proteinleri parçalarlar. Efektör kaspazlar, etkilerini çeşitli stratejiler kullanarak gösterirler: a) Apoptozisin inhibitörlerini inaktive ederek, b) Hücre yapısını bozarak, c) Enzimin katalitik kısmı ile düzenleyici bölgesini ayırıp enzim aktivitesini bozarak. Kaspaz -8 ve -9, başlıca başlatıcı kaspazlardır. Aktive olduktan sonra kaspaz -8 ve -9, efektör kaspazları yıkmaya ve aktive etmeye yeteneği kazanır. Kaspaz-3, -6, ve -7, en önemli efektör kaspazlardır ve aktive oldukları zaman, apoptotik hücrelerdeki polipeptidlerin çoğunu proteolize uğratırlar (68, 83).

Kaspaz-3, spesifik bir endonükleaz olan, kaspaz ile aktive edilen DNAaz (CAD)'ı aktive eder. İnternükleozomal DNA yıkılımına, kaspaz-3 tarafından aktive edilen CAD (Caspase-activated Dnase) denilen bir endonükleazın salınımı yol açar (68, 100). Çoğalan hücrelerde CAD, inhibitörü olan, kaspaz ile aktive edilen DNAaz inhibitör (ICAD) ile birlikte bulunmaktadır. Apoptotik hücrelerde aktive edilmiş kaspaz-3, ICAD'ı kırarak CAD'ı serbest bırakır. Daha sonra CAD, çekirdekte kromozomal DNA'yı yıkar ve kromatin kondensasyonuna neden olur (65). Apoptotik kromatin kondensasyonu, apoptozis indükleyen faktör, topoizomeraz II ve iki proteaz aktive edici faktör, CAD ve asinus denen kromatin kondensasyon faktörünün etkileri sonucu oluşur (68, 101). Ek olarak asinus ve helikardın kırılması, kromatin kondensasyonuna neden olur. Normalde nükleusun yapısal bütünlüğünü sağlayan laminlerin ve nükleer/mitotik aparat proteininin kırılması, nükleus

fragmentasyonuna yol açar. Apoptotik hücrelerdeki diğer proteolitik kırılmalar, DNA onarımını bozar ve hücre yaşamını inaktive eder (68, 83).

Kaspaz-3, aynı zamanda hücre iskeletinin tekrar organize olmasını ve hücrenin apoptotik cisimlere parçalanmasını indükler. Bir aktin bağlayıcı protein olan gelsolin, aktive kaspaz-3'ün anahtar substratlarından biridir. Gelsolin, karakteristik olarak aktin polimerizasyonu için önemli bir rol oynar. Kaspaz-3 gelsolini parçalar ve gelsolinin kırılması kalsiyumdan bağımsız bir şekilde aktin filamentlerini kırar. Bu olay hücre iskeletinin, hücre içi taşınmanın ve sinyal iletiminin bozulması ile sonuçlanır (65).

2.4. Oksidatif Stres

Kanser tedavisi sırasında kullanılan bazı kemoterapötiklerin ve radyasyon terapisinin reaktif oksijen türleri oluşturduğu bilinmektedir. Serbest radikaller, özellikle reaktif oksijen türleri (ROS) apoptozisin yaygın mediatörleri olarak öne sürülmüştür. Son çalışmalar, hücre ölüm tipinin, oksidatif hasarın ciddiyetine ve düzeyine bağlı olduğunu göstermiştir.

2.4.1. Kanser Hücrelerindeki İntrensik Oksidatif Stres

Oksidatif stresin biyolojik fonksiyonları, kanser gelişimi ve ilerlemesindeki potansiyel rolü, uzun zamandır araştırmaktadır. Kanser kendisi de oksidatif stresi indüklemektedir. Kanser hücreleri kontrolsüz hücre gelişimi ve farklılaşmasını devam ettirebilmek için, yüksek düzeyde ATP'ye ihtiyaç duyarlar. Bu yüksek enerji ihtiyacı mitokondrial solunum zincirinin, ROS oluşumunu arttırmasına sebep olur (102).

Malnutrisyona bağlı enerji metabolizmasının değişmesi, pro-inflamatuar sitokinlerin aşırı üretimi, anti-neoplastik ilaçların kullanımı gibi birçok diğer mekanizma, kanser hastalarında oksidatif strese yol açar (103).

Kanser hücrelerinde oksidatif stresin, hücre proliferasyonunun stimülasyonu, mutasyonların ve genetik instabilitenin artışı, antikanser ilaçlarına karşı hücrel duyarlılığın değişmesi gibi belirgin sonuçları olabilir. Buna karşın, oksidatif stresin artışı, kanser hücrelerini öldürmek için bir fırsat sağlayabilir.

2.4.2. Kanser Terapisi İle İndüklenen Oksidatif Stres

Bazı kemoterapötik ajanların ve radyasyon terapisinin kanser tedavisi sırasında reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturduğu iyi bilinmektedir (104-107). Çalışmamızda kullandığımız Bleomisin, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini üretir. Bleomisin, mitokondrilerin elektron transport sisteminde (ETS), elektron transportu sırasında yüksek düzeyde ROS ve süperoksit radikali oluşturur (104). Oluşan bu reaktif oksijen türlerinin, DNA'ya atak yaparak zincirleri koparması, Bleomisin'in kanser hücrelerine toksisitesinde rol oynamaktadır.

Günümüzde Bleomisin, çeşitli kanser tiplerinin (başlıca testis kanseri, lenfoma ve yassı hücreli kanser) tedavisinde, yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle testis kanserinin tedavisinde, Bleomisin, kemoterapinin indüksiyonunda kullanılan en önemli temel ilaçtır. Myelo-toksisitesinin az olması önemli bir avantajdır, pulmoner toksisitesi de doza bağlı olarak değişmektedir. Bleomisin, DNA'ya direkt bağlanarak, tek ve çift zincir kırılmalarına yol açarak, hücrelerde apoptozisi tetikler. Bu aktivite oksijen ve ferröz iyonuna bağlıdır.

2.4.3. Kanser Hücrelerinde Oksidatif Strese Hücresel Cevap

Artmış hücresel oksidatif stres, hücrenin redoks durumunu değiştirir ve birçok reaksiyonu tetikler (4). Oksidatif stres, geçici büyüme durması, adaptasyon, gen transkripsiyonu, sinyal iletim yollarının başlaması ve hasarlı DNA'nın onarılması gibi, birçok değişik biyolojik cevabı indükleyebilir (56, 108). Bu olaylar, hücrenin nekroza mı, apoptozise mi gideceğini, yoksa canlı kalıp proliferere mi olacağını belirler (56). Kanser hücrelerinin oksidatif strese hücresel cevabı, hücrenin genetik geçmişine, içerdiği ROS tipine, oksidatif stresin yoğunluğuna ve süresine bağlıdır (102, 109). Yüksek oksidatif stresin hücreye zararlı olduğu bildirilmiştir, ancak düşük oksidatif stres düzeyleri hücresel proliferasyonu artırabilir. Bu da hücresel cevabın ROS'un dozuna bağlı olduğunu göstermektedir (4).

Lipid membranlar, ROS hasarına karşı hassastırlar. ROS'un hücrede apoptozisi indüklediği bilinmektedir. Mitokondrial membranda ROS tarafından oluşturulan hasar, sitokrom c'nin salınımına sebep olur ve apoptotik yolu aktive eder (48, 102). Hücrelerde yoğun ROS düzeyleri, hücrenin apoptozis yerine nekrozuna yol açar (102, 110). ROS'un bu iki hücresel ölümü birden tetiklemesi de olasıdır ve aynı dokuda aynı anda, hem apoptozis hem de nekroz gerçekleşebilir (102, 111, 112).

2.5. Kanser Tedavisi Sırasında Oluşan ROS'un İndüklediği Apoptozis

Pek çok in vitro çalışma, antikanser ajanların çoğunun malign hücrelerde apoptozisi indüklediğini göstermiştir (3, 10, 11, 13, 68). Başlangıçta oluşan stres, hücreleri hemen öldürmez, ancak apoptotik hücre ölümüne yol açan sinyal olaylarını başlatır (56). Hücre viabilitesi, oluşan stresin tipine bağlıdır. Serbest radikaller, özellikle serbest oksijen türleri (ROS), apoptozisin yaygın mediatörleridir. Çeşitli ilaçların indüklediği apoptoziste, akut ROS oluşumu veya geçici ROS patlaması sıkça gözlenir (48). Kanser hücrelerinin, ROS oluşturan antikanser ajanlarına maruz kalması, hücresel antioksidan kapasiteyi yok eder ve ROS düzeyini apoptozise yol açacak seviyenin üzerine getirir (109). Hücrelerin eksojen oksidanlarla inkübasyonunun, apoptozise yol açtığı gösterilmiştir (52, 113, 114). Apoptozisi indükleyen birçok ajan ya oksidatif maddedir, ya da selüler oksidatif metabolizmanın stimülatörüdür. Zıt olarak, apoptozisin birçok inhibitörünün antioksidan aktivitesi vardır ve selüler antioksidatif savunmayı artırır (52). Antioksidan savunma yeterli olmadığında, oksidatif stres, apoptozisten sorumlu genlerin (stres-responsive transcription factors) aktivasyonuna yol açar. ROS'taki artışa, redoks değişikliklerine hassas JNK/SAPK sinyal yolağının aktivasyonu, apoptozis ile ilişkili genlerin transkripsiyonel aktivasyonu ve apoptozis için gerekli proteinlerin post-translasyonel modifikasyonu eşlik eder (52). Oksidan sinyaller, hücre yaşam ve ölümünün önemli düzenleyecileridir. Apoptozisi indükleyen tedavilerin çoğu oksidatif stres oluşturur. Orta seviyede oksidatif uyarı apoptozisi başlatırken, ciddi oksidatif stres nekroza yol açar.

Literatürde antineoplastik ajanların, oksidanları indükleyerek kanser hücrelerini apoptozis yoluyla öldürdüğünü bildiren birçok çalışma vardır (3-13). Ancak, literatürde çelişkili raporların varlığı, bu görüşün genelleşmesini engellemektedir (6, 8, 9). Birçok çalışma apoptozis için ROS'ların gerekli olduğunu bildirirken, bazı çalışmalar ise apoptozisin, ROS oluşumunun inhibe edildiği hipoksik koşullar altında da indüklenebildiğini ileri sürmektedirler (115). Oksidanların, apoptozisi indükleyerek hücreleri öldürdüğünü ileri süren çalışmaların bir kısmı kantitatif

değildir, birçok çalışmada apoptozis ve nekrozla ölen hücrelerin yüzde oranı tayin edilmemiştir (6).

Antikanser ilaçlarının hemen tümü, DNA sentezi üzerinden etki gösterir. Bu ilaçlar, hücreler bölünmedikleri sürece, dinlenme halindeki hücreleri öldürmezler. Kemoterapide kullanılan antikanser ilaçlarının etkinliğinde kısıtlayıcı faktör, aktif olarak bölünen hücre fraksiyonudur (116). Antikanser ilaçlar, hücreler hızla proliferasyonunda etkin oldukları için, hücre büyümesini yavaşlatan ya da durduran oksidatif stres, kemoterapinin etkinliğine engel olabilir. Bu da yavaş ilerleyen kanser türlerinin, kemoterapiye neden cevap vermediğini açıklamaktadır (117).

2.5.1. Reaktif Oksijen Ürünleri Ve Antioksidasyon Mekanizma

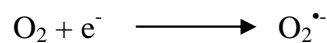
Reaktif oksijen partikülleri çoğu hastalıkların primer sebebi olmasalar da patogenezlere rol oynayabilir ve doku hasarını arttırabilirler. Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Yani sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli düzeyin üzerine çıkar veya antioksidanlar yetersiz olursa yani denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerini bozarak zararlı etkilere yol açarlar (118).

Oksijen molekülünün dış yörüngesinde eşleşmemiş iki elektron bulunması oksijen serbest radikallerinin oluşumuna neden olur. Tablo 2.1.'de de görüldüğü gibi süperoksit, hidroksil, peroksil, alkoksil ve hidroperoksil reaktif oksijen ürünleridir. Ayrıca, NO ve NO₂ iki nitrojen serbest radikalleridir. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri, hidrojen peroksit (H₂O₂), hipokloröz asit, hipobromöz asit ve peroksinitrit gibi radikal olmayan reaktif türevlere çevrilebilir. Reaktif oksijen ve nitrojen türevleri insan ve hayvanlarda fizyolojik ve patolojik koşullarda oluşturur (119). Reaktif oksijen türleri (ROS) serbest radikal sınıfına ait yüksek düzeyde oksitlenen reaktif bileşiklerdir. Karaciğer ve testis gibi çeşitli organlarda ROS üretimi normal fizyolojik bir olaydır. Bununla birlikte bunların sentezindeki artışlar hücrelerde oksidasyona ve DNA hasarına yol açmaktadır (120).

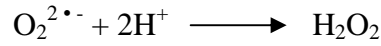
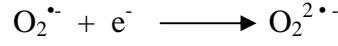
Tablo 2.1. Reaktif oksijen bileşikleri (121)

Radikaller	Radikal olmayanlar
Hidroksil ($\cdot\text{OH}$)	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Alkoksil (RO \cdot)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Peroksil (ROO \cdot)	Ozon (O ₃)
Süperoksit (O ₂ $^{\cdot-}$)	Hipokloröz asit (HOCl)
Nitrik oksit (NO \cdot)	Lipid hidroperoksit(LOOH)
Azot dioksit (NO ₂ \cdot)	Peroksinitrit (ONOO $^-$)

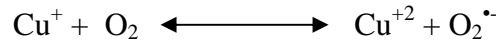
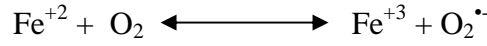
Süperoksit hücre içerisinde moleküler oksijenin redüksiyonu ile oluşan başlıca serbest radikaldir (122).



Süperoksit anyonu elektron fazlasını bir başka elektron alıcısına vererek tekrar moleküler oksijene (O₂) oksitlenebilir. Ya da bir elektron daha alarak peroksil anyonunu (O₂²⁻) oluşturur, bu da ortamdan iki proton alarak (H⁺) H₂O₂ oluşumuna neden olur (123).

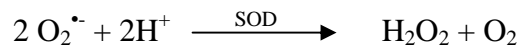


İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu O₂^{•-} meydana getirebilir.



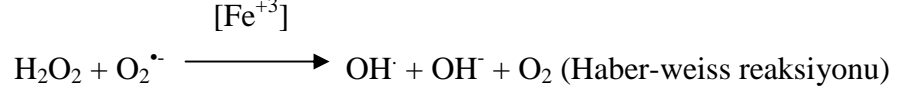
Geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü reaksiyonlardır. Süperoksit radikal anyonunun ondan meydana gelen diğer reaktif ara ürünlerin oluşumunda merkezi rol oynadığı görünür. Mitokondrideki respiratuar zincir öncelikle O₂⁻ ve O₂^{•-} dismutasyonunun bir ürünü olarak H₂O₂ ROS'un güçlü bir kaynağıdır (124). Bu durum mitokondriyal elektron taşıma zincirinin spesifik bir bölgesinde oksijenin O₂⁻'e uygunsuz redüksiyonu ile sonuçlanan olası eşleşmemiş elektron sızıntısından kaynaklanır (125). Bir diğer önemli ROS kaynağı inflamatuar (özellikle kronik inflamasyon) reaksiyonlardır. Aktive olmuş makrofajlar ve nötrofiller gibi inflamatuar hücreler çeşitli ROS'ları (H₂O₂, NO, O₂⁻) ve hipokloriti (HOCl) serbest bırakırlar (126). Nötrofiller membrana bağlı çok bileşenli NADPH oksidaz olarak adlandırılan bir enzim kompleksine sahiptirler. NADPH oksidaz aktive edildiğinde büyük miktarda ROS üretir (127). Bu sistem nötrofil "respiratuar patlama"dan (fagositozda artmış solunum) sorumludur.

Süperoksit anyonu, hücre membranlarından kolay geçemediği için kendisi doğrudan zarar vermemektedir (128). Süperoksitin asıl önemi, geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi ve H₂O₂ kaynağı olmasıdır. Hidrojen peroksit üretimi Süper Oksit Dismutaz (SOD) tarafından katalizlenen O₂^{•-} dismutasyonu ile olmaktadır.

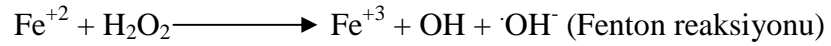
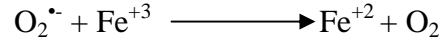


Hidrojen peroksit düşük elektriksel yükü ve noniyonize özelliklerinden dolayı hücre membranlarından hızlı bir şekilde geçer. Geçiş grubu metal iyonlarının varlığında yüksek derecede reaktif serbest radikaller oluşur (128, 129).

Dış çevre de ısı, UV ışık, terapötik ilaçlar ve χ - ve γ - radyasyon gibi birçok kaynaktan ROS üretebilir (130). Demir katalizli Haber-weiss reaksiyonu, $O_2^{\cdot-}$, askorbat, tiyoller ve diğer redükthanlar Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye, H_2O_2 'yi etkili bir oksidan olan ve lipit oksidasyonuna neden olan OH^{\cdot} 'a indirgerler (122).

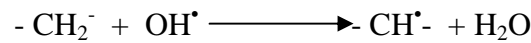
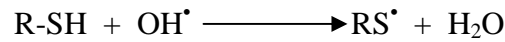


Haber-Weiss reaksiyonu genellikle fizyolojik durumlarda yavaştır. Fakat geçiş metalleri, metal şelatörler veya hemoproteinlerin varlığında bu reaksiyon hızlı oluşur. Bu durum Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır. Biyolojik sistemlerde demir benzeri geçiş metalleri, demir içeren maddeler (transferrin, laktoferrin, hemoglobin) mevcuttur. Süperoksit radikali ferrik (Fe^{+3}) demiri, ferröz (Fe^{+2}) demire indirger. Bu sırada H_2O_2 , OH^{\cdot} 'a dönüşür (131).



Mitokondriyer membran lipitleri, proteinler ve mitokondrial DNA'nın oksidatif hasarını iletten düşük moleküler ağırlıklı Fe^{2+} komplekslerinin birikimi için ana bölümdür.

Hidroksil radikali en reaktif oksijen türevidir. Bu radikal yüksek reaktivitesinden dolayı oluştuğu yerde çevredeki hedef moleküller ile derhal reaksiyona girer. Hidroksil radikali oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS^{\cdot}), karbon merkezli organik radikaller (R^{\cdot}), organik peroksitler ($RCOO^{\cdot}$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur.



Peroksil radikalleri, poliansatüre yağ asitlerinden (PUFA) hidrojen atomunun çıkarılması ile başlatılan lipit peroksidasyonu sırasında meydana getirilebilir (132). Peroksil radikalleri biyolojik sistemlerde önemli difüzyon kabiliyetine sahip ve oldukça uzun ömürlü türevlerdir. Ayrıca lipit peroksidasyonunda oluşan ürünler aldehitlerdir (133). Lipit peroksidasyonu $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 tarafından başlatılmadığında OH^{\cdot} , alkoksi radikalleri (RO^{\cdot}) ve ROO^{\cdot} lipit peroksidasyonunun başlamasına yol açar (134). Lipit peroksil radikalleri diğer lipitler, proteinler ve nükleik asitler ile reaksiyona girer böylece elektronların transferinin artmasına ve substratların oksidasyonuna sebep olur. Hücre membranları yapısal olarak oksidatif saldırıya

oldukça hassas olan çok miktarda PUFA'dan oluşmuştur ve PUFA'da meydana gelen önemli değişiklikler; değişmiş membran akışkanlığı, geçirgenliği ve hücrel metabolik disfonksiyon ile sonuçlanır (135).

Dokularda, oksidatif hasara karşı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan mekanizmalar vardır. Antioksidan enzim sistemleri; iki süperoksit dismutaz (CuZnSOD ve MnSOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir (136). ROS birikmeye başladığında, hücreler bu çeşitli antioksidan enzimleri kullanarak bir savunma mekanizması oluşturur. Bilinen bu biyolojik antioksidanlar serbest radikallerin ortadan kaldırılması ve baskılanmasında önemli bir role sahiptir (120, 137, 138). Peroksitler için asıl detoksifiye sistemi CAT ve GSH'dır. CAT bir katalizör olarak demirin varlığında yüksek derecede bir reaktif $\cdot\text{OH}$ (hidroksil radikali) oluşturarak H_2O_2 'i yok edebilen antioksidan bir enzimdir. Glutatyon redoks siklusuna katılarak GSH-Px ile birlikte GSH, H_2O_2 ve lipit peroksitleri toksik olmayan ürünlere dönüştürür (120, 139, 140). Bu yüzden ROS süpürücü etkiye sahip maddelerin testis ve karaciğer fonksiyonlarını düzeltmesi muhtemeldir (120, 137, 138).

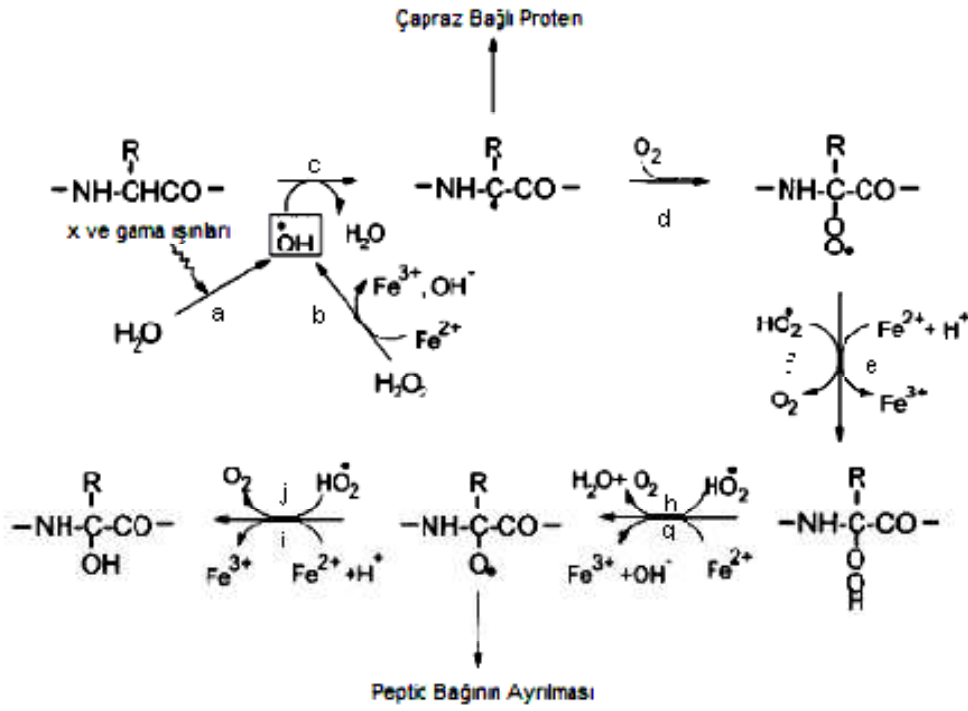
2.5.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkisi

Proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu protein oksidasyonu meydana gelir. Araştırmacılar protein oksidasyonuna yol açan ana mekanizmaların polipeptid omurgasındaki çeşitli amino asitlerin α -karbon atomlarından $\cdot\text{OH}$ radikalının etkisiyle hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda başladığını saptamışlardır. Protein oksidasyonu esas olarak $\cdot\text{OH}$ ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde O_2 ile birlikte $\text{O}_2 \cdot^-$ ve onun protonlanmış formu olan $\text{HO}_2 \cdot$ 'in varlığı da gereklidir. Adı geçen bu reaktif oksijen bileşikleri amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile proteinin parçalanmasına neden olur. Tablo 2.2 'de oksidasyona yatkın olan aminoasitler ve oksidasyon ürünleri görülmektedir (141-143).

Tablo 2.2. Oksidasyona yatkın olan amino asitler ve oksidasyon ürünleri (143)

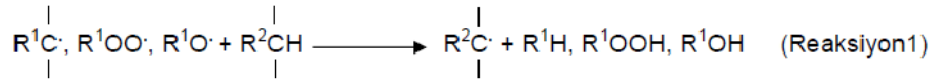
Aminoasit	Oksidasyon ürünleri
Histidin	Aspartat, asparagin, oxo-histidin
Prolin	Hidroksiprolin, glutamat, γ -glutamilsesialdehit
Arginin	γ Glutamilsesialdehit
Lizin	Amino-adipiksialdehit
Treonin	Amino-ketobutirat
Tirozin	Tirozin-tirozin çapraz bağları(ditirozin)
Sistein	Disülfidler, sisteik asit

Şekil 2.5' da görüldüğü gibi x ve gama ışınlarıyla suyun radyolizinden veya H_2O_2 ' in metal katalizli yıkımından açığa çıkan (reaksiyon a ve b) $\cdot\text{OH}$ radikali polipeptid omurgasındaki α -karbon atomundan α -hidrojen atomunun çıkmasına neden olur. Peptid zincirindeki α -hidrojen atomunu kaybetmiş olan amino asit kalıntısı karbon merkezli radikal haline dönüşür.



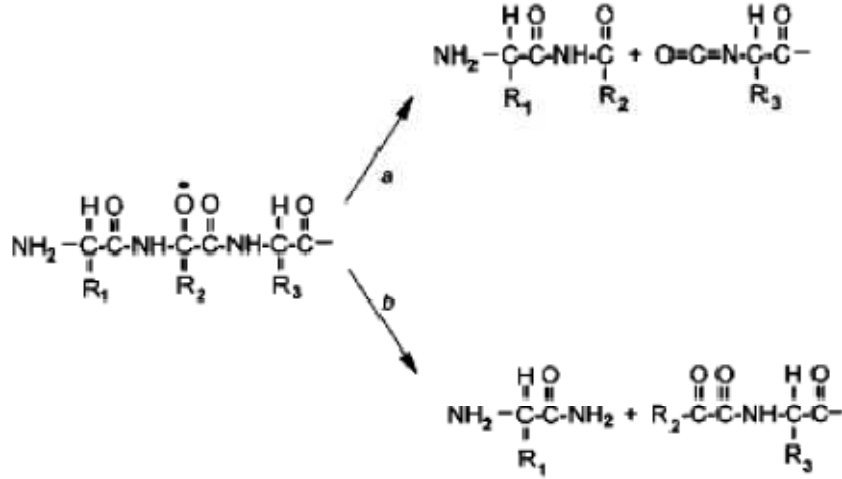
Şekil 2.5. Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları (142) (141).

Oluşan karbon merkezli radikal moleküler oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyona girer (reaksiyon d) ve daha sonra alkilperoksidi verecek olan alkilperoksil radikal ara ürününü oluşturur. Alkilperoksit, alkoksil radikali (reaksiyon h) üzerinden hidroksi protein türevini verir (reaksiyon j). Reaksiyon basamaklarının pek çoğunda Fe^{+2} ve Cu^{+} varlığında $HO_2 \cdot$ ile etkileşim önem taşır (reaksiyon e,g,i). Bu metabolik yolda oluşan alkil, alkilperoksil, ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı veya farklı protein molekülündeki amino asitlerin R yan zincirleri ile etkileşerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumuna yol açar. Oluşan bu yeni karbon merkezli radikaller ile yukarıdaki reaksiyonlar tekrarlanır (reaksiyon1). Oksijen yokluğunda reaksiyon d gerçekleşmez. Oluşan karbon merkezli radikal diğer bir karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açar (reaksiyon 2) (141).



Alkoksil radikalinin oluşumu (Şekil 2.5, reaksiyon h ve g) peptid bağının diamid veya α -amidasyon metabolik yolları ile ayrılmasına neden olur.

Şekil 2.6’de diamid ve α -amidasyon metabolik yollarının ayrılması görülmektedir. Diamid metabolik yoluyla ayrılma sonucunda, diamid ve izosiyanat yapısı, α -amidasyon metabolik yolunda ise amid ve N- α -ketoaçil yapısına sahip peptid fragmentleri oluşur. Diamid ve α -amidasyon metabolik yolları dışında polipeptid zincirinin serbest radikal aracılı ayrılması; prolil, glutamil ve aspartil bakiyelerinin oksidasyonu ile de gerçekleşebilmektedir. Bununla birlikte Tablo 1’ de görüldüğü gibi, lizin, arginin ve prolin direkt oksidasyon ile karbonil türevlerini verir (141, 142).



Şekil 2.6. Peptid bağının diamid (a) ve α -amidasyon (b) metabolik yolları ile ayrılması (141).

2.5.3. Glutasyon ve NAC

Non-enzimatik endojen antioksidanların en önemlilerinden biri glutasyon (GSH)’dur (144-147). Glutasyon, sistein içeren bir tripeptid olup glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Glutasyon hücrelerde en çok bulunan protein dışı endojen tiyoldür. Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında disülfid ve sülfidril grupları arasındaki karşılıklı dönüşümler, hücresel hasara neden olmadan önce hücreden H_2O_2 ’yi yok etmek için kullanılır. Bu karşılıklı dönüşümler, sülfür içeren bileşik GSH’yi redükte ve okside ederek sağlanır. Doku GSH düzeyi sadece senteze katılan enzimler tarafından düzenlenmez, tiyol içeren aminoasitlerin yeterince olması da oldukça önemlidir (43, 145, 147, 148).

Tiyol(-SH) içeren aminoasitlerden biri olan sisteinin türevi olan N-asetilsistein(NAC), sistenin GSH’ye çevrilmesinde bir ara kademe veya üründür. Endojen olarak yapılabilen ve besinlerde bulunan NAC, serbest radikalleri temizleyebilen sülfidril gruplarına sahiptir. Ayrıca, hücresel redükte GSH konsantrasyonunu arttırarak doğal antioksidan savunmayı güçlendirir (145, 148).

NAC antioksidan olarak in vivo ve in vitro yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Detoksifikasyonda rol oynadıkları gibi, oksidatif strese karşı hücreyi ve komponentlerini korurlar. NAC canlı organizmalardan üretildiğinden ve doğal sülfür içeren amino asit türevi olduğundan güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir (14).

NAC nitrit ve peroksinitrit oluşumunu azaltabilir. Bu etkisi, NAC tiyol grubu ve NO'nun direkt reaksiyonuna bağlı olabilir. Bu olayda, nitrotiyol bileşiklerinin oluşumu, NO'nun biyolojik aktif formda kalarak birikimini sağlayabilir. NAC, peroksinitrit oluşumunu azalttığından sistemik skleroz tedavisinde yararlı olabilir (145).

NAC, detoksifikasyonda (ağır metaller, asetaminofen içeren ilaçlar, herbisitler, CCl₄ ve ürethane içeren çevresel temizleyiciler, aflatoksin içeren organizmalar), akciğer hastalıklarının tedavisinde mukolitik ve antioksidan özelliğinden dolayı, kanser tedavisinde, AIDS tedavisinde ve kardiyovasküler alanda lipoprotein a düzeyinin azaltılmasında kullanılabilir (149).

NAC uyarılmış insan T hücrelerinde membran TNF alfa ve TNF-R ekspresyonunu artırır NAC, TNF-alfa ve TNF-RII ekspresyonunu hem transkripsiyon öncesi hem de transkripsiyon sonrası seviyelerini ayarlar. NAC hem in vivo hem de in vitro ortamda T hücrelerinin antitümör aktivitesini artırır. Bu özelliklerinden dolayı NAC, TNF alfa duyarlı kanser hücrelerine uygulanmasıyla antitümör potansiyeline sahiptir (150).

Yukarıda bahsedilen tiyoller antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere olduğu için kanseri önlemede gelecek vaadeden ilaçlar olarak görülmektedir (151). Bu tiyoller aynı zamanda metastazi ve invazyonu da sınırlamaktadır (152).

2.5.4. Kanser Tedavisinde Antioksidan Kullanımı İle İlgili Çelişkili Görüşler

ROS'un, kemoterapötik ilaçların indüklediği apoptoziste rolü olduğundan, antioksidanların ROS'u inhibe ederek kanser hücrelerinde apoptozisi önleyebilecekleri düşünülebilir. Kanser tedavisi sırasında antioksidanların kullanımı ile ilgili günümüzde yoğun tartışmalar ve çelişkili yayınlar vardır. Birçok hasta tamamlayıcı antioksidan tedavisine yönelirken, birçok onkolog buna zıt olarak antioksidanlardan kaçınmakta ve hastalarını kanser tedavisi sırasında antioksidan kullanmamaları için uyarmaktadır (153, 154). Bu tartışmanın temelinde, radyasyon terapisinin ve bazı kemoterapötik ilaçların ROS oluşturması ve antioksidanların kanser hücrelerinin ROS tarafından öldürülmesini önlemeleri ihtimali yatmaktadır. Bu şekilde düşünenler, kanser tedavisi sırasında antioksidanların kullanılmamasını önermektedir (155).

Bu tartışma günümüzde, sadece bilimsel ortamlarda değil, medyada da devam etmektedir (153). Antioksidanlarla kanser tedavisi arasındaki ilişkiyi araştırmak için geniş bir literatür taraması yaparak yayınladığımız derlemede, sadece 3 antioksidanla kanser ilaçları arasında (tangeretin ile tamoxifen, NAC ile doksorubisin, ve beta-karoten ile 5-florourasil), negatif etkileşim belirledik (156). Bunun dışındaki tüm araştırmalarda, antioksidanların kemoterapötik ajanların etkisini artırdığı ve yan etkilerini azalttığı bildirilmektedir (156, 157).

Kanser hastalarında antioksidan alınımının uygun olmadığı durumlar olabilir, fakat bu konu oldukça komplekstir. Birçok kemoterapötik ilaç serbest radikal oluşturur, ancak bu ilaçların, antikanser etkileri sadece serbest radikaller üzerinden değildir. Antioksidanların, kemoterapötik ajanların etkisini artırdığına ve toksik yan etkilerini azalttığına dair pek çok yayın mevcuttur (153, 157-164).

Antikanser ilaçlar uygulandığında, oluşan ROS'un tedavinin etkinliğini azaltabileceği iddia edilmektedir (104, 157, 165, 166). Oksidatif stres, antineoplastik

ajanların, kanser hücreleri üzerinde optimal sitotoksik etkilerini göstermesi için gerekli hücrel prosesle etkileşebilir. Orta düzeydeki oksidatif stresin, antikanser ilaçlarının sitotoksik etkilerini azalttığı gösterilmiştir (104, 157).

Antineoplastik ajanların oluşturduğu yan etkilerin, antioksidanlarca önlendiği gösterilmiştir. Antioksidan uygulaması, kemoterapinin yan etkileri azaltabilir ve terapiye cevabı güçlendirebilir (104). Antioksidanların, kanser tedavisindeki etkilerini araştıran klinik çalışmalar sınırlı olmasına rağmen, bazı deneysel çalışmalarda antioksidan vitaminlerin, sadece kanser hücrelerinde selektif olarak apoptozisi indüklediği, anjiogenez ve metastatik yayılmayı önledikleri bildirilmiştir. Bu bulgular, antioksidanların kanser tedavisinde yardımcı (adjuvant) rol oynayabileceğini düşündürmektedir (116).

Antioksidanların kanser tedavisindeki etkinliği, kullanılan ilaca bağlıdır. Bütün tedavilerde, kemoterapötik ilaçların etki mekanizması serbest radikallere bağlı olmasa bile, antioksidanlar normal hücreleri korumaktadır. Antioksidanlar, kanser hastalarında serbest radikal oluşturan sitokinlerin toksik etkilerinden normal dokuları korurlar (116).

NAC, toksisiteyi azalttığı için birkaç kemoterapi ajanıyla da uygulanmıştır (167). İki ayrı in vitro çalışmasında, NAC cisplatinin sitotoksik aktivitesi inhibe etmiştir (168, 169). Kötü huylu glioma insan hücrelerinde yapılan bir çalışmada antioksidanlar Cisplatin'li hücre kültürlerinde keskin sitotoksik ve kolojenik hücre ölümünü önlemiştir (168).

Yapılan in vitro çalışmalarda antioksidan tedavisi ile BLM'ye bağlı DNA ve hücre hasarının inhibe olduğu gösterilmiştir (170, 171). Bleomisin toksisitesi, otokatalitik bir mekanizma ile hücrel membranların hasarına yol açan lipid peroksidasyonu ile ilişkilidir ve membran yıkımı toksik, reaktif metabolitlerin üretimi ve hücre ölümüne yol açabilir. Yapılan çalışmalarda BLM'nin bir antioksidan olan vitamin E ile farklı dokularda kombine uygulamalarının lipid peroksidasyonu artışını önemli oranda azalttığı literatürde mevcuttur (172). Bir diğer çalışmada ise BLM'nin neden olduğu akciğer hasarında ROS ve nitrojen türlerinin ilişkisi bilindiğinden beri ambroksol ve NAC gibi antioksidanlar BLM'nin indüklediği akciğer hasarını önlemek için kullanılmıştır (40, 173, 174).

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Testis Kanseri Hücre Kültür Çalışmaları

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen çalışmamızda Prof. Dr. Tomris ÖZBEN Hücre Kültürü Laboratuvarı, Moleküler Biyokimya Laboratuvarı ve Merkezi Araştırma Laboratuvarı kullanılmıştır.

3.1.1. Hücre Dizileri ve İlaçlar

Malign Pluripotent İnsan Testis Emriyonik Karsinoma hücre dizisi olan NTERA-2 cl.D1 hücresi İngiltere'deki Sheffield Üniversitesinden Dr. Peter Andrews tarafından temin edildi. Bu hücre grubunun ismi tez yazımı sırasında NTERA olarak kısaltılmıştır. Bleomisin 15 mg/ml olacak şekilde steril PBS içinde çözülerek kısımlara ayrıldı ve -80°C 'de saklandı. Uygulanması gereken bleomisin dozları bu stoktan hesaplanarak flasklara eklendi. N-asetil sistein 1 M konsantrasyonunda steril PBS ile hazırlanacak ve tekrar steril edilecektir. N-asetil sistein besiyerine farklı konsantrasyonlarda mM biriminde eklenmiştir.

3.1.2. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Deneylere Hazırlanması İçin Gerekli Çözeltiler

a) RPMI (Roswell Park Memorial Institute): ATCC (American Type Culture Collection)'den alındı. Kullanılacağı zaman 50 ml steril, inaktive edilmiş FBS (Fetal Sığır Serum) ve 5 ml steril penisilin-streptomisin çözeltisi eklendi. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

b) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): ATCC'den alındı. Kullanılacağı zaman 50 ml steril, inaktive edilmiş FBS (Fetal Sığır Serum) ve 5 ml steril penisilin-streptomisin çözeltisi eklendi. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

c) FBS (Fetal Sığır Serum): Sigma'dan inaktive edilmiş olarak temin edildi. 10 ml'lik tüplere bölünerek -20°C 'de saklandı.

d) Penisilin-Streptomisin: Biological Industries'den alındı. Kullanılmadığı sürece -20°C 'de saklandı.

e) DMSO (Dimetil Sülfoksit): Sigma'dan alındı. Oda ısısında saklandı.

f) Hücre Dondurma Çözeltisi: %5 DMSO içeren medyum steril bir tüpte hazırlandı ve hücre pelleti üzerine 1 ml eklendi. Bu solusyon hücreler dondurulacağı zaman taze olarak hazırlandı.

g) Tripan Mavisi Çözeltisi (%0.5'lik): Biological Industries'den hazır olarak alındı. Oda ısısında saklandı.

h) Accutase: Millipore'den hazır olarak alındı. Çözülerek 13 ml'lik kısımlara ayrıldı ve -20°C 'de saklandı.

ı) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Magnezyumsuz ve kalsiyumsuz), (PBS): Biological Industries'den hazır olarak alındı. 50 ml'lik tüplerde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

i) **Bleomisin Sülfat:** Bleocin-s ticari adıyla eczanede satılan 15 mg liyofilize toz içeren flakon Nippon Kayaku firmasından alındı. Buzdolabında +4°C'de saklandı.

j) **N-Asetil L-Sistein:** Sigma firmasından alındı. Buzdolabında +4°C'de saklandı.

3.1.3. Hücrelerin Çoğaltılması

Hücreler %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren, kullanılan hücrelere uygun steril besiyerinde, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek çoğaltıldı.

Hücreler çok yoğunlaştıkları zaman, yapıştıkları flasktan kaldırılarak yeni flasklara pasajlandı. Bunun için hücre tipine göre iki farklı hücre pasajlanması uygulandı. Birinci tip pasajlama işleminde accutase enzimi ile kaldırma yapıldı, enzimin kullanılmadığı durumlarda kullanılan ikinci tip pasajlama işlemi ise kazıyıcı (scraper) denilen bir malzeme kullanılarak hücrelerin flasktan kazınması ile kaldırma yapıldı.

NTERA hücrelerinin pasajlanması accutase kullanılarak yapıldı. Yeterli yoğunluğa ulaşmış flasklardan hücreler kazınarak pasajlandı. İlk olarak DMEM medyumunu flaskdan uzaklaştırıldı ve atıldı. Accutase'ın daha iyi etki gösterebilmesi için birkaç ml PBS eklendi. Hücre içi artıkların PBS ortamına geçebilmesi için birkaç dakika inkübatörde bekletildi. Bu işlemin ardından atık PBS atıldı ve 25 cm²'lik flask yüzeyi için 500 µl accutase eklendi. 75 cm² için ise 1500 µl accutase eklendi. Accutase eklenmesi akabinde 3-4 dakika inkübatörde bekletildikten sonra hücrelerin yapıştıkları flasktan ayrıldıkları gözlenir gözlenmez taze medyum (DMEM) eklenerek pipetaj yapıldı ve hücreler yeni flasklara dağıtıldı. Hücreler, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe, uygun medyum (DMEM) içinde inkübe edilerek üretildi.

3.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı stoklandı. Bunun için hücreler uygun şekilde donduruldu. Hücreler flasktan uygun şekilde kaldırıldı ve medyum eklenerek 500xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pellet, %95 tam hücre medyumunu ve %5 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO)'den oluşan dondurma medyumunu içerisinde tekrar süspansiyonlandı. Hücre süspansiyonları, cryo tüplere dağıtıldı ve kademeli dondurma yapmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı (freezing container) içinde 4 saat -80°C'de tutuldu. Daha sonra cryo tüpler sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

3.1.5. Hücrelerin Çözülmesi

Dondurulan bu hücreler deneylerde kullanılmak üzere hücreye ihtiyaç olduğunda çözüldü. Bu işlem aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. Hücreleri içeren vial 37°C su banyosunda hafifçe sallanarak çözüldü. Kontaminasyon olasılığını azaltmak için suyun yüzeyinde tutuldu. Çözdürme işlemi hızlı bir şekilde (yaklaşık 2 dakika) yapıldı. İçeriği çözülür çözülmez vial su banyosundan uzaklaştırıldı ve dış yüzeyi alkolle temizlendi. Bu aşamadan sonraki işlemler sıkı aseptik koşullar altında yapıldı. Vial içeriği tüpe boşaltılıp üzerine damla damla medyum eklendi. 500xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre içeren pellet uygun medyumla tekrar

süspans edildi ve kültür flasklarına dağıtıldı. Hücreler, 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe üretildi.

3.2. Bleomisin ve NAC'in Sitotoksiste Çalışmaları

3.2.1. Ön Çalışmalar

NTERA hücrelerinde yapılan ön çalışmalara göre Bleomisin’in 1-600 µg/ml doz aralığı kullanıldı. Buna göre, NTERA hücrelerinde 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 µg/ml Bleomisin dozları uygulandı.

3.2.2. Hücrelerin %50’sini Öldüren Konsantrasyonun MTT Kiti İle Belirlenmesi

3.2.2.1. Prensip

Bleomisin’in hücrelerin %50’sini öldüren konsantrasyonu değeri, MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid) testi ile belirlendi. MTT, canlı hücreler tarafından parçalanarak koyu mavi renkte formazan ürünü veren açık sarı renkli bir maddedir. Oluşan mavi rengin yoğunluğu hücre canlılığının bir ölçütüdür.

3.2.2.2. Reaktifler

Kullanılan MTT kiti aşağıdaki 3 maddeyi içermektedir.

Reaktif A: MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid), 50 mg/vial.

Solüsyon B: PBS, pH 7.4, 15 ml.

Solüsyon C: 0.04 N HCl içeren izopropanol, 100 ml

3.2.2.3. Gruplandırma

Grup 1. Kontrol grubu; (bleomisin ve N-Asetil sistein ile inkübe edilmemiş) testis kanseri hücrelerinde “Plate Reader” cihazı ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar yapılarak canlılığın belirlenmesi.

Grup 2. Bleomisin farklı konsantrasyonlarıyla ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde “Plate Reader” cihazı ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar yapılarak canlılığın belirlenmesi.

Grup 3. N-Asetil sistein farklı konsantrasyonlarıyla ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde “Plate Reader” cihazı ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar yapılarak canlılığın belirlenmesi.

Grup 4. Bleomisinin sabit konsantrasyonu ve N-Asetil sistein farklı konsantrasyonlarıyla ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde “Plate Reader” cihazı ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar yapılarak canlılığın belirlenmesi.

3.2.2.4. Deneyin Yapılışı

Sitotoksiste deneyleri Bleomisin’in farklı zaman aralıklarındaki etkisinin gözlemlenebilmesi için 5 gün sürdürüldü. Deneyin birinci günü hücreler flasklara ekildi. Bunun için hücreler accutase ya da kazıyıcı ile kaldırıldı. Uygun medyum eklenerek 500xg’de 5 dakika santrifüj edilerek pellet 1 ml medyum ile tekrar süspans edildi. İstenilen konsantrasyona seyreltilen hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak hücreler inverted mikroskop altında hemositometrede sayıldı. 25000

hücre/kuyu olacak şekilde ayarlanarak hücreler kuyulara 100 µl (25000 hücre) ekildi. Yapışmaları için 24 saat beklendi. Hücrelerin kuyulara ekilmesinden 24 saat sonra medyum atılarak, belirlenen dozlardaki Bleomisin içeren medyum kuyulara uygulandı. Hücreler, belirlenen dozlardaki Bleomisin ile ayrı 96 kuyucuklu Plate'lerde 24, 48 ve 72 saat süresince 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra bu hücrelerde Bleomisin, NAC ve BLM+NAC hassasiyeti, MTT sitotoksitesite kiti çalışılarak belirlendi.

Çalışılacak her kuyucuğa 100 µl medyum ve 10 µl A+B solüsyonundan (MTT+PBS) eklendi. 4 saat 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon sürecinin sonunda, canlı hücre içeren kuyularda MTT'den oluşan MTT formazan, kuyunun dibinde siyah, ince kristaller olarak görüldü. 0.1 mL solüsyon C'den her kuyuya eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Solüsyon C'deki izopropanol, formazanı çözerek absorbans ölçümü için uygun homojen mavi bir solüsyon meydana gelmesini sağladı. Solüsyon C eklendikten sonra 1 saat içinde, dalga boyu olarak 570 nm ve referans dalga boyu olarak da 630 nm'de, ELISA plak okuyucusunda plağın okuması yapıldı.

Sadece hücre (kontrol) veya ilaç uygulanmış hücre içeren kuyuların absorbans değerlerinden, hücre içermeyen kuyuların absorbans değerleri çıkartıldı. Yaşayan hücre yüzdesi; kontrol grubunun absorbans değerlerinin ilaçla inkübe edilen hücrelerin absorbans değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar % canlılık olarak ifade edildi. Deneyler altı kere tekrarlandı ve her gruptan 6 örnek çalışıldı.

3.3. Apoptozisin Belirlenmesi

3.3.1. Anneksin V Kiti İle Belirlenmesi

Anneksin V ölçümleri ticari bir kit (katalog no. 850-020-KI02. Alexis Biochemicals) ile yapıldı.

3.3.1.1. Prensiptir

Apoptozis süreci sırasında bir membran fosfolipidi olan fosfatidilserin (FS) plazma membranının iç kısmından dış kısmına dönerek dış ortama sunulur. Anneksin V, Ca⁺² bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı proteindir (35-36 kDa). FS için yüksek afinitesi olması nedeniyle, hücre yüzeyinde FS sunulan erken apoptotik hücrelere bağlanır. FS translokasyonu apoptozisin erken evrelerinde gerçekleştiğinden, Anneksin V boyama, DNA fragmentasyonu gibi daha geç evrede gerçekleşen değişikliklere dayalı olan deneylere göre apoptozisi daha erken bir evrede belirleyebilir. Çalışmamızda FITC takılı insan Anneksin V proteinine karşı fare monoklonal antikoru kullanılmıştır. Ölü hücrelerin erken apoptotik hücrelerden ayırt edilebilmesi için, sadece ölü hücreleri boyayan Propidiyum İyodid (PI) boyası kullanılmıştır. Anneksin V bağlanması ve PI boyama, flow sitometrisi ile izlenecek ve apoptotik hücrelerin oranları belirlenmiştir.

3.3.1.2. Gruplandırma

Grup 1. Kontrol grubu; (bleomisin ve N-Asetil sistein ile inkübe edilmemiş) testis kanseri hücrelerinde FACS Canto II Flow sitometre cihazı ile Anneksin V ve PI ışıklarının belirlenmesi.

Grup 2. Bleomisin ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde FACS Canto II Flow sitometre cihazı ile Anneksin V ve PI ışıklarının belirlenmesi.

Grup 3. N-Asetil sistein ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde FACS Canto II Flow sitometre cihazı ile Anneksin V ve PI ışıklarının belirlenmesi.

Grup 4. Bleomisin ve N-Asetil sistein ile inkübe edilmiş testis kanseri hücrelerinde FACS Canto II Flow sitometre cihazı ile Anneksin V ve PI ışıklarının belirlenmesi.

3.3.1.3. Deneyin Yapılışı

Bir gün öncesinden $2-5 \times 10^5$ hücre 6 kuyucuklu plâtelere istenen gruplara uygun şekilde ekimi yapıldı. Yapışan hücreler kontrol, bleomisin, Nac ve bleomisin+nac grubu olarak dörde ayrıldı. Sitotoksikite çalışmalarında 24 saat sonuçlarına göre bleomisin konsantrasyonu 400 µg/ml, Nac için ise 5 mM olarak bulundu. Bu konsantrasyonlar Annexin V kit protokolü içinde kullanıldı. Gruplara göre uygulanan bu konsantrasyonlardan 6 saat sonra deney protokolü uygulandı. Aşağıdaki işlemler sırası ile uygulandı.

- ✓ Deney başlamadan bir gün önce her kuyuda 4×10^5 hücre toplam hacim 2 ml olacak şekilde 6 kuyulu plâte ekimi yapıldı.
- ✓ İnkübasyon 6 saat olacağı için deneyler erken saatte başlatıldı.
- ✓ Belirlenen ilaç konsantrasyonları hücre gruplarına uygulandı
- ✓ 6 saat sonunda medyumlar atıldı.
- ✓ Fazla bekletilmeden 0,5 ml PBS eklendi.
- ✓ Birkaç dakika PBS ile inkübatörde bekletildikten sonra PBS atıldı ve 200 µl Accutase eklendi.
- ✓ Accutase ile 5 dk inkübatörde bekletildikten sonra hücreler yapıştıkları kuyulardan ayrılmış oldu.
- ✓ Accutase'ın inhibisyonu için her kuyuya 1 ml medyum eklendi
- ✓ Elde edilen hücre süspansiyonu 500g 'de 3 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Santrifüjden çıkan tüplerin süpernatanı atıldı.
- ✓ Pellet ise 400 µl Binding Buffer ile süspanse edildi.
- ✓ Kontrol grubu hariç diğer tüm gruplara 1µl Annexin V antikoru eklendi. Oda sıcaklığında karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.
- ✓ 200 µl PBS ile yıkandı, hafifçe pipetajdan sonra aynı hız ve sürede santrifüj yapıldı.
- ✓ Elde edilen pelletlere kontrol grubu hariç 190 µl Binding Buffer 10 µl propidiyum iyodid (PI) (20 µg/ml) eklenir. Kontrol grubuna ise 200 µl Binding Buffer eklenir.
- ✓ Tüpler okutmak için FACS Canto II cihazına götürüldü.
- ✓ Elde edilen grafikler değerlendirildi

3.3.2. Kaspaz-3 Kiti İle Belirlenmesi

Kaspaz-3 aktivitesi ölçümleri ticari bir kit (katalog no. KHZ0022. Invitrogen Corporation) ile yapıldı.

3.3.2.1. Prensiip

Kaspaz-3, DEVD (asp-glu-val-asp) aminoasit sekansını tanıır. DEVD, kaspaz-3'ün, Poli (ADP Riboz) Polimeraz'ı (PARP) kırdığı yerdeki amino asit sekansdır. Substrat olan DEVD-*p*NA, *p*-nitroanilide (*p*-NA) kromoforu ve sentetik bir tetrapeptid olan DEVD amino asit sekansını (asp-glu-val-asp) içermektedir. DEVD-*p*NA (Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilide) substratının kaspaz-3 tarafından kırılması sonucu açığa çıkan serbest *p*NA, 405 nm'de absorbans artışına neden olur. Bu artışın kontrol ile karşılaştırılması, Kaspaz-3 aktivitesini verir.

3.3.2.2. Reaktifler

1. Hücre Lizis Tamponu (100 mL): deterjan içeren tris tamponlu serum fizyolojik.
2. Reaksiyon Tamponu (16 mL): serum fizyolojik, gliserol ve deterjan içeren tampon.
3. Substrat (1000 µL): DMSO içerisinde *p*NA kromoforuna konjuge edilmiş 4 mM sentetik peptid (sekans: DEVD).
4. Dilüsyon Tamponu (200 mL): HEPES, Tris ve NaCl içeren tampon solüsyonu.
5. DTT (800 µL): 1 M dithiothreitol.
6. Proteaz İnhibitör Kokteyl (1 ml): DMSO içeren proteinlerin parçalanmasını önleyen solüsyon.

3.3.2.3. Deneyin yapılışı

Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan NTERA testis kanser hücrelerinin 4 grubunda (kontrol + 3 farklı inkübasyon grubu), inkübasyonları takiben hücreler sayılarak her örnek peletinde 4×10^6 hücre olacak şekilde ayarlandı. Kontrol hücrelerinde apoptozis uyarımı yapılmadı. Her gruptan 6 örnek çalışıldı.

- Hücreler 50 µL soğutulmuş hücre lizis tamponu ve 1 µL proteaz inhibitör kokteyl ile tekrar süspansedilerek, 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- Ardından $10,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Sitolik ekstrakt olan süpernatant, yeni tüpe aktararak buz üzerine alındı.
- Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlendi.
- Her bir sitolitik ekstrakt, her 50 µL lizis tamponunda 50-200 µg konsantrasyonunda protein olacak şekilde (1-4 mg/mL) dilüe edildi.
- Çalışılacak her bir örnek için, reaksiyon tamponundan 50 µL cam tüplere aktarıldı ve üzerine kullanımdan hemen önce DTT eklendi (Son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde, 1.0 M DTT stok reaktifinden, reaksiyon tamponunun 1 ml'sine 10 µL eklendi).
- Her örneğe 10 mM DTT içeren reaksiyon tamponundan 50 µL aktarıldı. 4 mM DEVD-*p*NA substratından (son konsantrasyon 200 µM) 5 µL eklenerek 37°C de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon karanlıkta gerçekleştirildi. 405 nm'de mikropalak okuyucuda okuma yapıldı.

3.3.2.4. Kaspaz-3 Aktivitesinin Hesaplanması

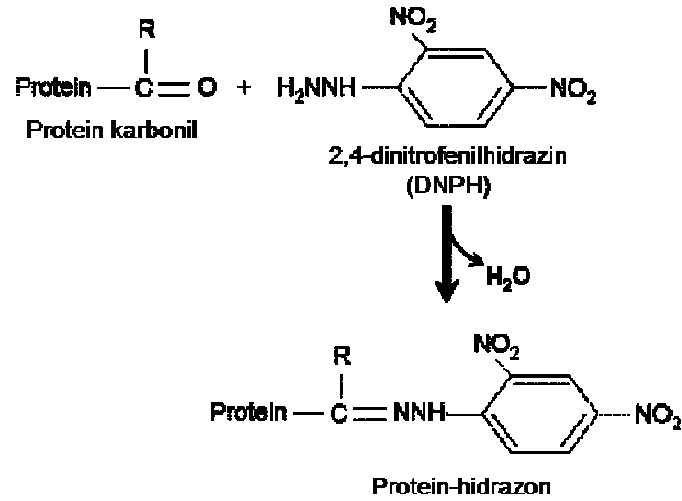
Kaspaz-3 aktivitesi her grup için 405 nm’de okunan değerlerin protein miktarlarına bölünmesiyle elde edilir. Kaspaz-3 aktivite seviyesindeki artış, apoptozis uyarımının yapılmadığı kontrol hücrelerinin kaspaz-3 aktive seviyesi ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.4. Oksidatif Stresin Belirlenmesi

Protein Karbonil ölçümleri ticari bir kit (Cat. #10005020. Cayman Chemical Ann Arbor, MI) ile yapılmıştır (Tietze F. Enzymic method for quantitative).

3.4.1. Protein Karbonil Kiti İle Oksidatif Stresin Belirlenmesi

Protein karboniller DNPH ile reaksiyona girerek Schiff bazı oluştururlar ve son ürün olarak gösterilen protein hidrazon bileşikleri meydana gelir (şekil). 360-385 nm’de absorbans veren bu bileşikler aracılığı ile protein karboniller spektrofotometrik olarak tayin edilir.



Şekil 3.1 : Protein karbonillerin DNPH ile oluşturdukları hidrazon

3.4.2. Reaktifler

- 1) Hidroklorik Asit (2.5 M)
- 2) DNPH (10 ml 2.5 M’lık HCl ile)
- 3) TCA Solüsyon (%20 ve %10’luk)
- 4) Guanidin Hidroklorit (hazır)
- 5) Etanol (hazır)
- 6) Etil Asetat (birebir etanol ile karıştırılır)

3.4.3. Deney Yapılışı

NTERA testis kanser hücrelerinin 4 grubunda (kontrol + 3 farklı inkübasyon grubu), inkübasyonları takiben hücreler sayılarak her örnek peletinde 4×10^6 hücre olacak şekilde ayarlandı. Kontrol hücrelerinde apoptozis uyarımı yapılmadı. Her gruptan 6 örnek çalışıldı.

Dondurulmuş halde bulunan gruplarına inkübe edilmiş hücreler 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K_2HPO_4 (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde homojenize edilip (PRO 200 Homogenizater, PRO Scientific Inc.,Connecticut, USA) 4^0C 'de 10,000 g'de 15 dak santrifüj edilerek süpernatanı buzda saklandı. Her numuneden alınan 200'er µl olacak şekilde bir tüp numune tüpü, diğer tüp kontrol tüpü olmak üzere iki ayrı tüpe aktarıldı. Numune tüpüne 800 µl DNPH, kontrol tüpüne 800 µl HCl ilave edilerek 1 saat inkübe edildi. Daha sonra bütün tüpler sırası ile %20 ve %10 TCA eklenerek 5 dak inkübe edilmiş ve her basamağın ardından $4 C^0$ 'de 10,000 g'de 10 dak santrifüj edildi. Pelet (1:1) etanol/etil asetat karışımı içerisinde resüspanse edilerek $4 C^0$ 'de 10,000 g'de 10 dak santrifüj edildi. Bu basamak iki kere daha tekrarlanıp son yıkamadan sonra protein peletleri 500 µl guanidin hidroklorit içerisinde vortekslenerek resüspanse edildi ve $4 C^0$ 'de 10,000 g'de 10 dak santrifüj edildi. Absorbanslar, 360-385 nm arasında bir dalga boyunda plate reader kullanarak ölçüldü.

Protein Karbonil miktarının hesaplanması: Kontrol örneklerinin ortalama absorbansı numune örneklerinin ortalama absorbansından çıkartılarak absorbans değeri elde edilmiş ve bu değerler dilüsyon faktörü ile çarpılıp Dinitrofenilhidrazin için 370 nm'de molar absorblama katsayısı ve (mg/ml) protein miktarına bölünerek karbonil miktarı (nmol/mg) olarak ifade edildi.

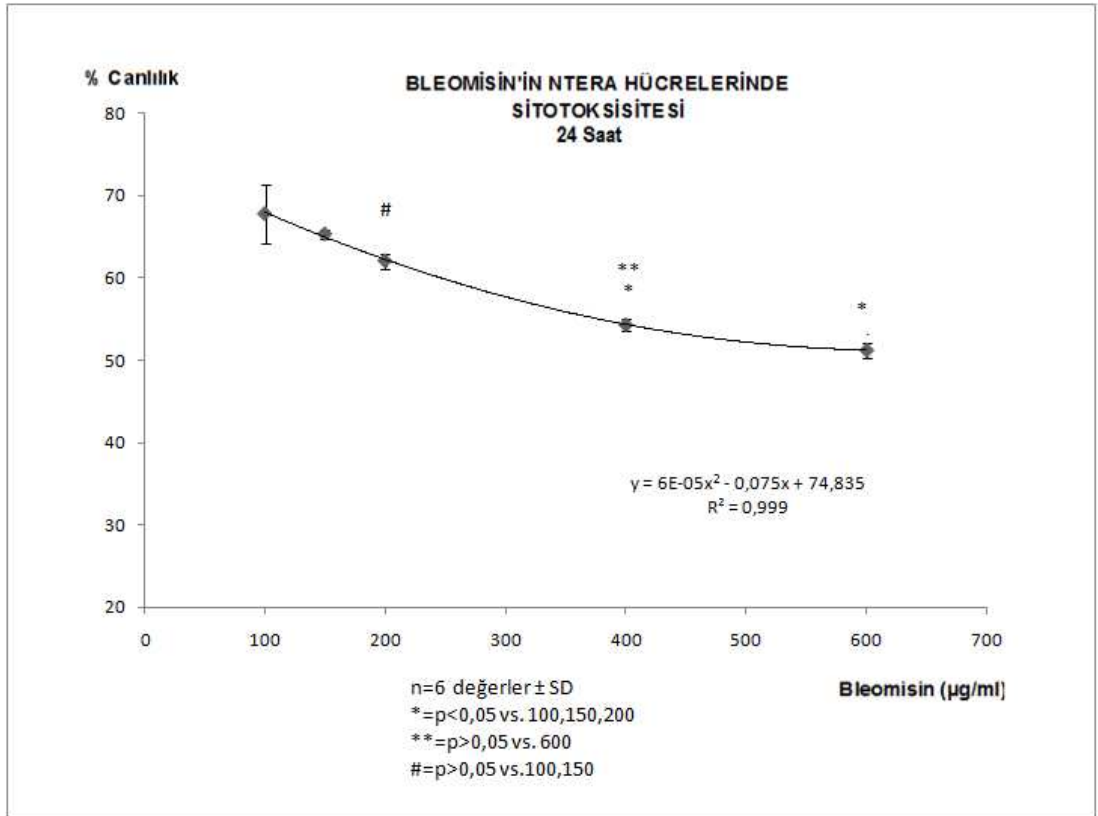
BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Bulguları

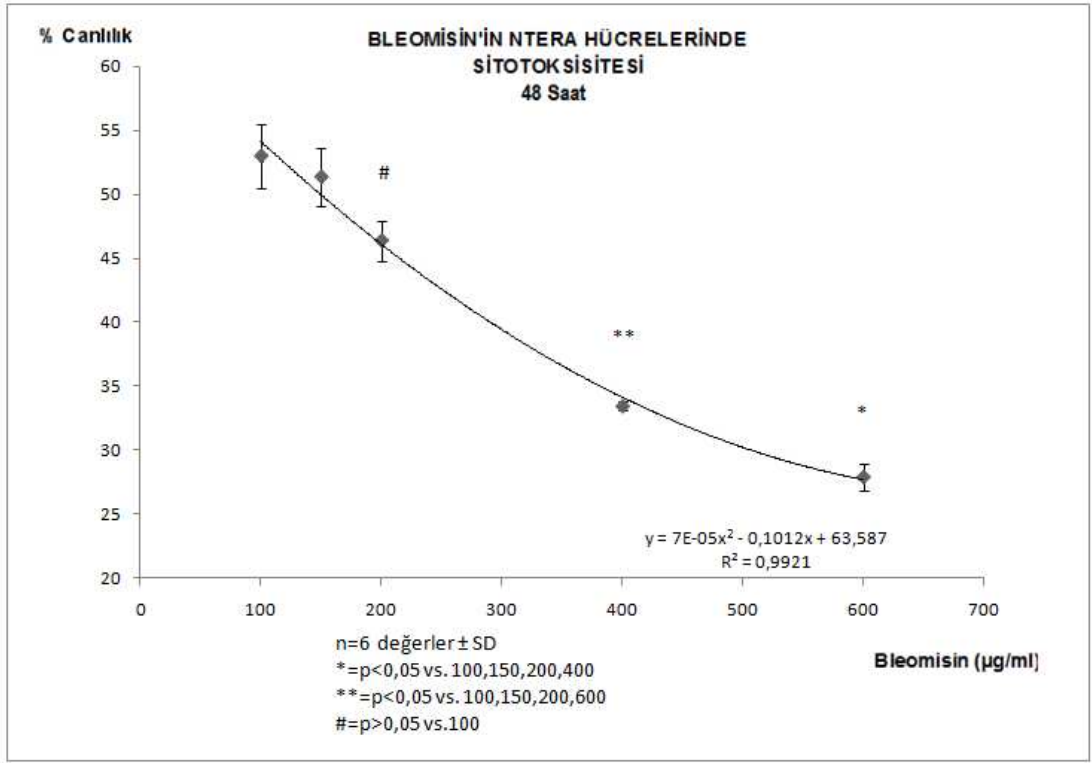
Bleomisin'in testis kanseri hücre dizilerindeki sitotoksik etkisi, MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid] deneyi ile belirlenmiştir. Bleomisin'in değişen konsantrasyonları ile hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi ve sitotoksosite testi ile hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu saptanmıştır.

4.1.1. NTERA Hücrelerinde Bleomisin'in Sitotoksitesisi

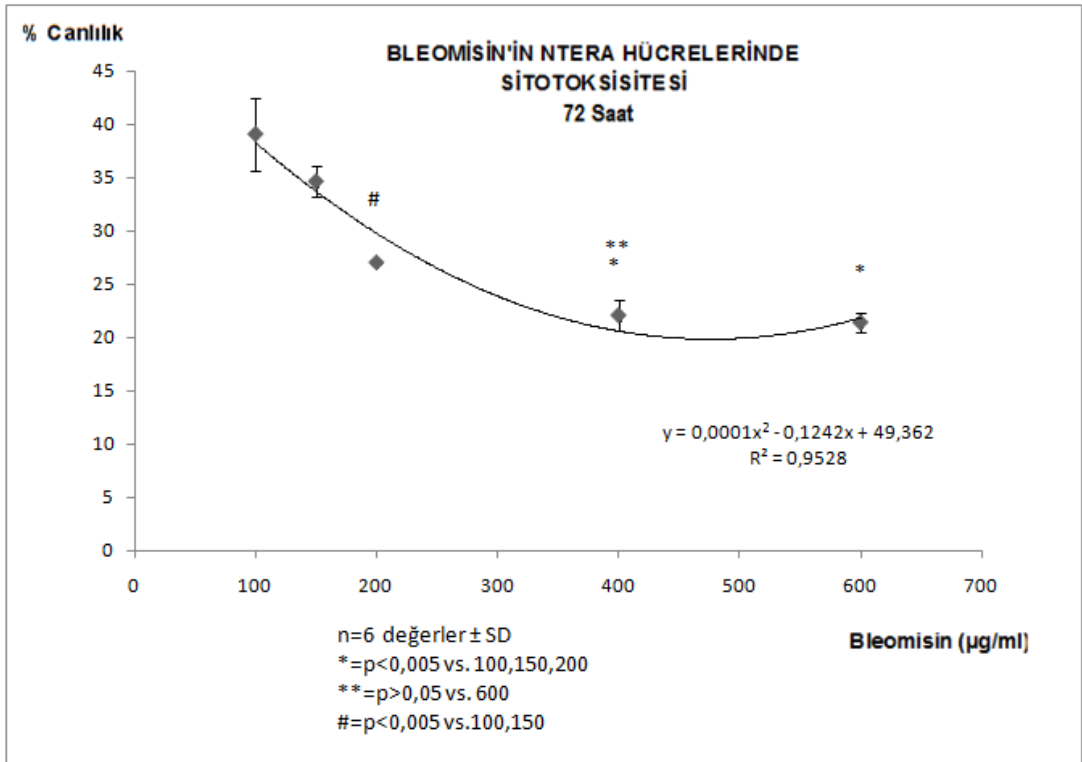
NTERA hücrelerinde bağımsız 6 deney yapıldı ve yapılan tüm deneylerin ortalaması alınmıştır. NTERA hücrelerinde yapılan ön çalışmalara göre Bleomisin'in 100-600 µg/ml doz aralığını kullanılmıştır. Buna göre, NTERA hücrelerinde 100, 200, 400, 500, 600 µg/ml Bleomisin dozlarını uygulanmıştır. Bu dozlar 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar ile uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar SPSS istatistik programı ile anlamlılık testleri yapılmıştır. Yapılan One Sample Kolmogorov Smirnov testleriyle grupların kendi içerisindeki veriler birbiriyle uyumlu çıkmıştır ($P>0,05$). Şekil 4.1'de 24 saat sonuçları, Şekil 4.2'de 48 saat sonuçları, Şekil 4.3'de ise 72 saat sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı dozlardaki Bleomisin'in NTERA hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisi

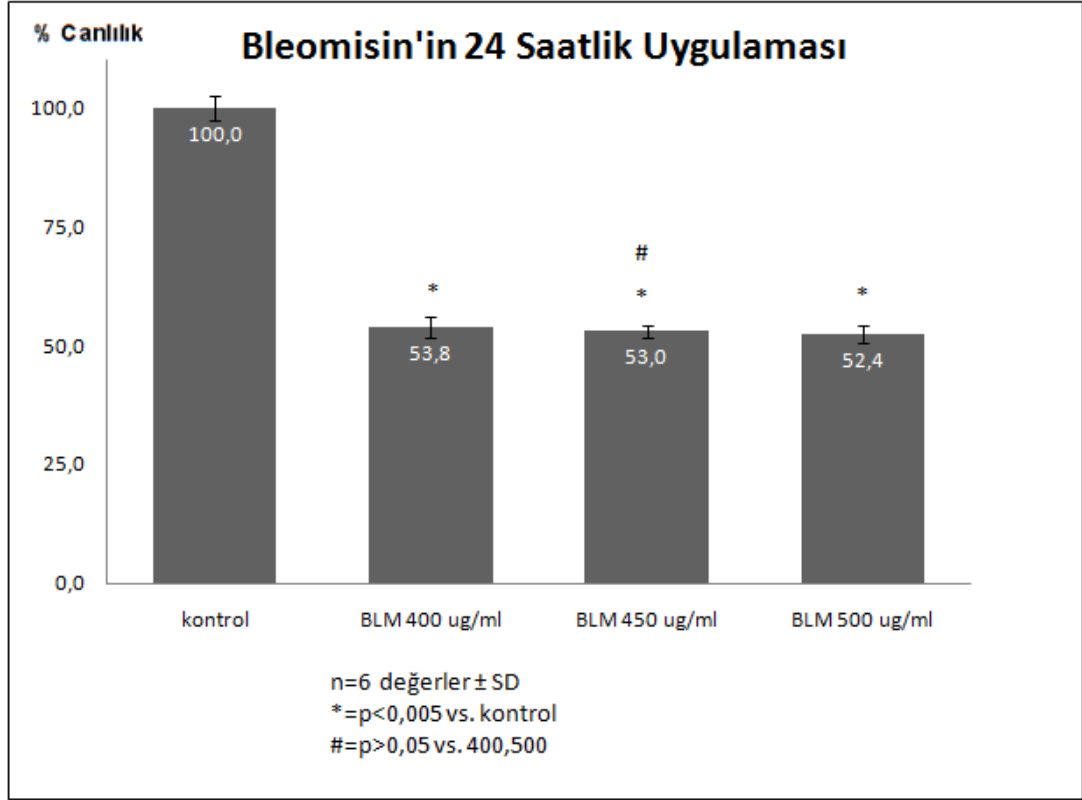


Şekil 4.2. Farklı dozlardaki Bleomisin'in NTERA hücrelerinde 48 saat için % canlılık üzerine etkisi

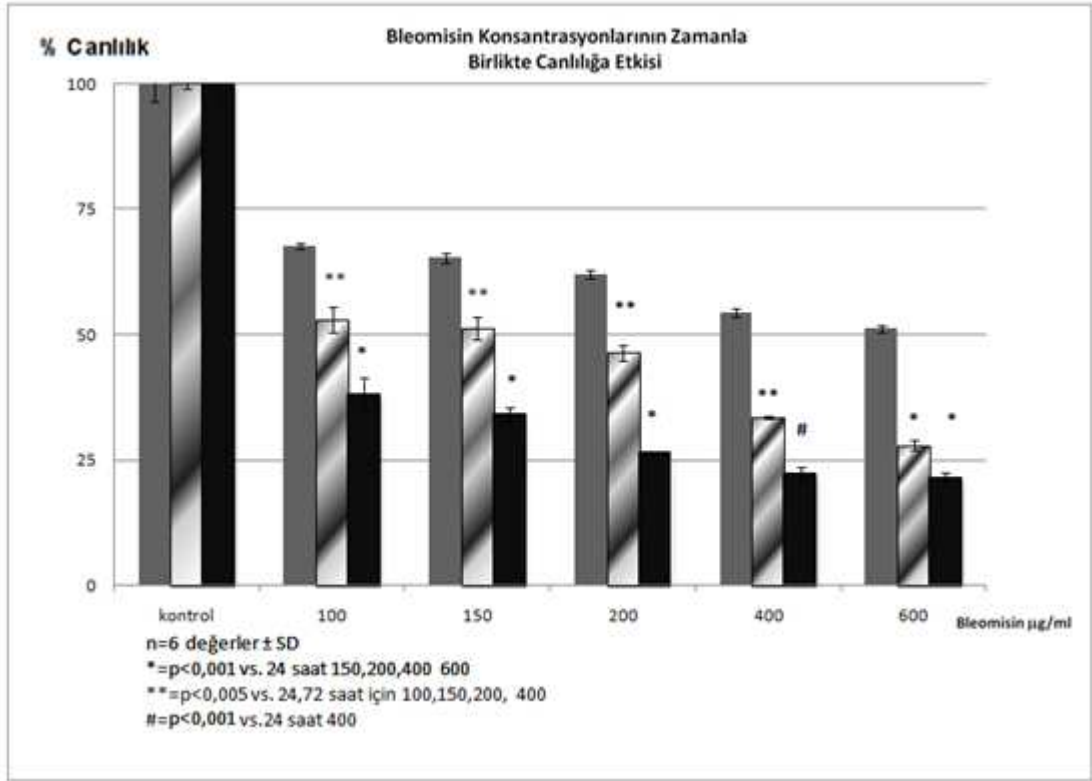


Şekil 4.3. Farklı dozlardaki Bleomisin'in NTERA hücrelerinde 72 saat için % canlılık üzerine etkisi

Doz aralığını daha da daraltmak için 400, 450 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarında Bleomisin uygulanmıştır. 24 saat sonuçları ise 400, 450 ve 500 µg/ml dozları için canlılığın %50 civarında olduğunu göstermektedir. Kruskal-Wallis Test ile yapılan istatistik sonucunda bu gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$). Ancak bu gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise $P<0,005$ 'dir.



Şekil 4.4. 400, 450 ve 500 µg/ml dozlarındaki Bleomisin'in NTERA hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisinin %50 civarında olduğu gözlenmektedir.

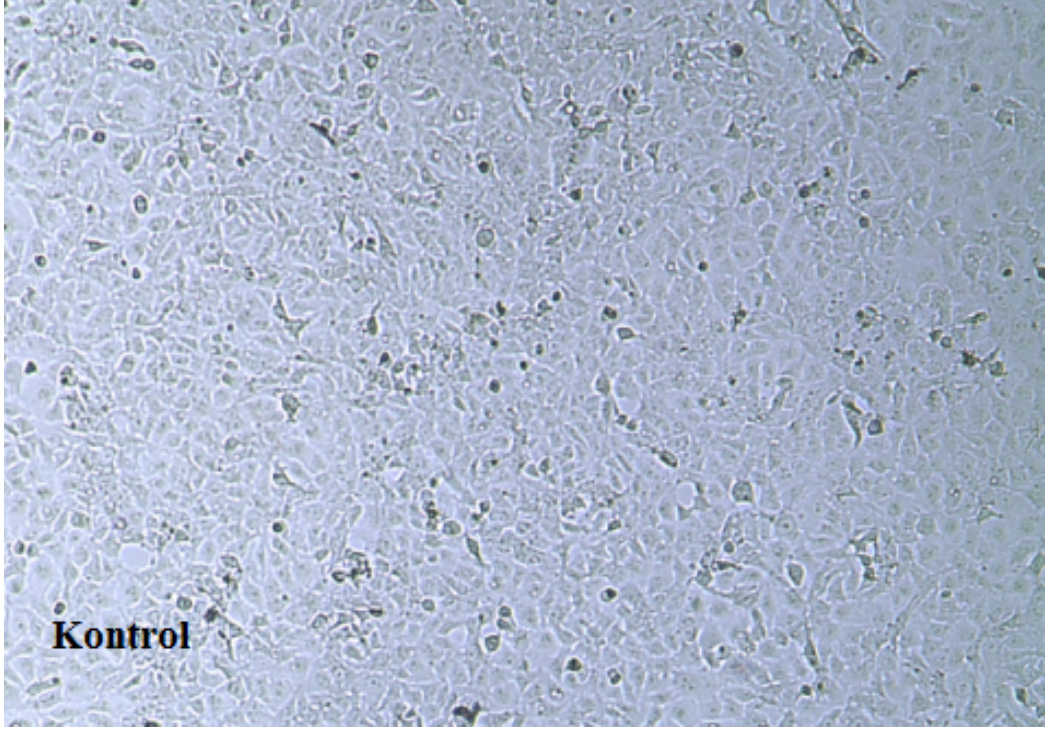


Şekil 4.5. Farklı dozlardaki Bleomisin'in NTERA hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat için % canlılık üzerine etkisinin süreye bağlı olarak arttığı gözlenmektedir.

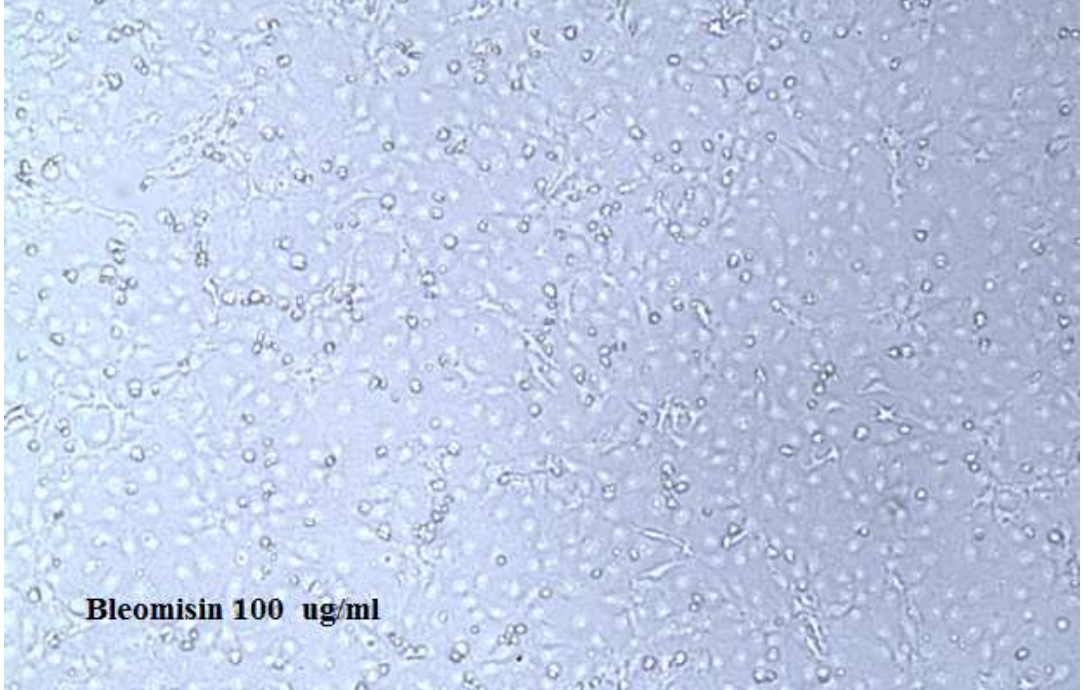
Bleomisin uygulamasının 48 ve 72 saat sonuçları ise 400, 450 ve 500 µg/ml dozları için canlılığın çok düşük olduğunu Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Zaman ilerledikçe aynı konsantrasyonun canlılığa etkisi daha da artmaktadır. Özellikle 48 saat için %50'yi öldüren değer 150 µg/ml olduğu görülmektedir. 72 saat içinse bu değer ise 100 µg/ml'nin de altına düşmektedir.

4.1.2. NTERA Hücrelerinde Bleomisin'in Etkisinin Mikroskopla Gözlenmesi

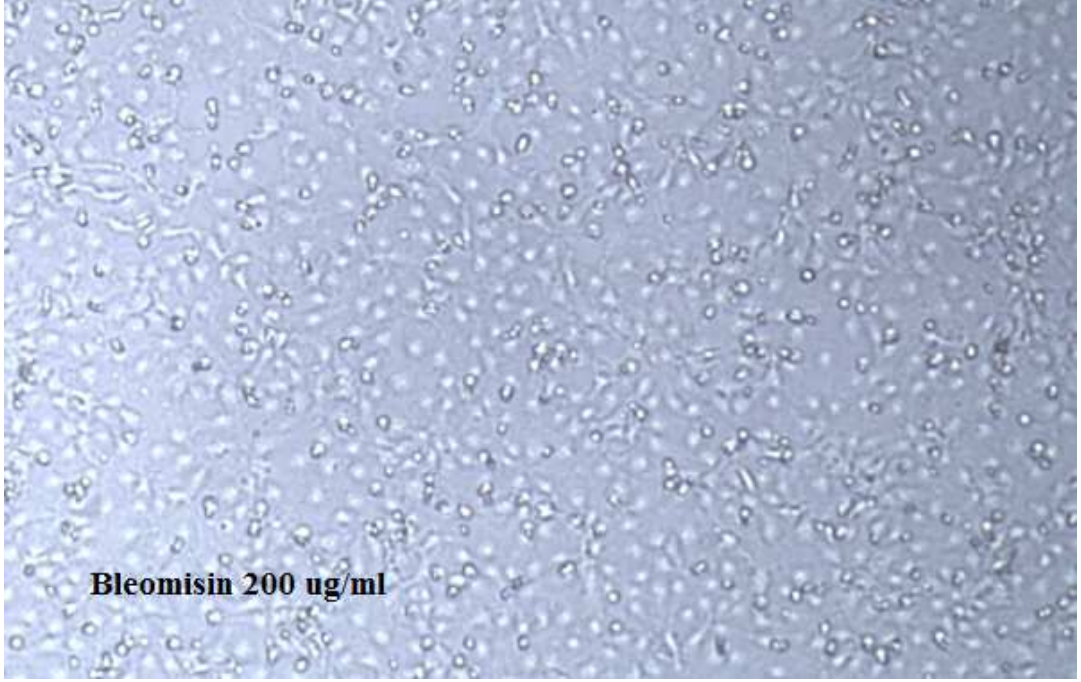
Yaptığımız çalışmada NTERA hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki Bleomisin'in etkilerini mikroskop görüntüleriyle kontrol grubu ile karşılaştırdık. İnkübasyonlar 24 saatlik olup Bleomisin grubu için 100, 200, 400 ve 600 µg/ml'lik konsantrasyonlar uygulanmıştır. Hücre gruplarının fotoğrafları Şekil 4.6,7,8,9,10'da gösterilmektedir.



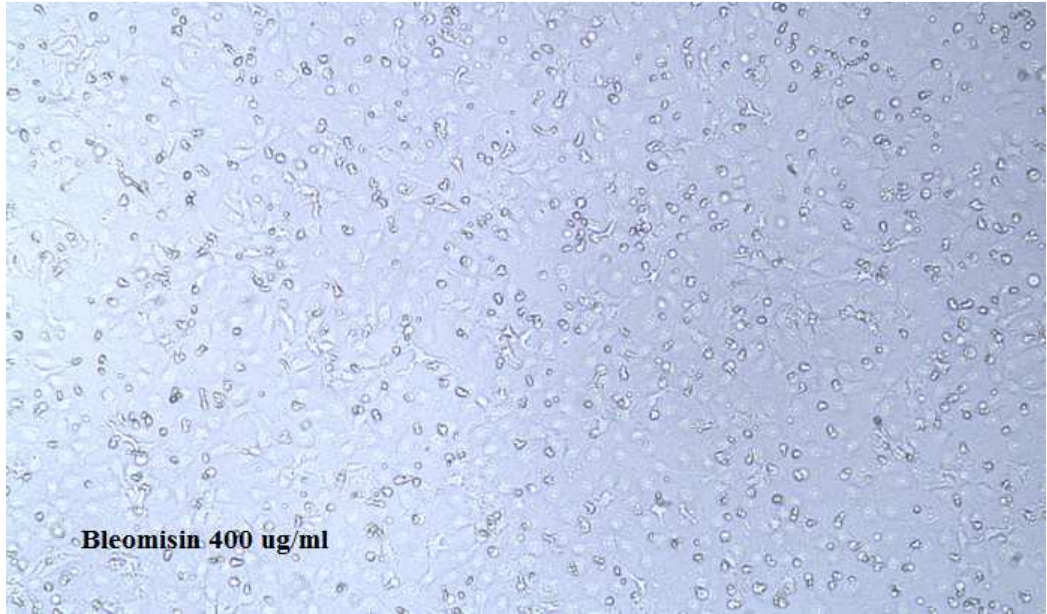
Şekil 4. 6. Hiçbir şekilde ilaç ile muamele edilmeyen Kontrol grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü .



Şekil 4.7. 100 µg/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 100 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.8. 200 µg/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 200 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.9. 400 µg/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 400 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.

Resimlerden de görüldüğü gibi Bleomisin konsantrasyonu arttıkça apoptozomların sayısında da bir artış gözlemek mümkündür. Kontrol grubundaki hücrelerin popülasyonunda tam bir doyumluk gözlemlendiği için yapışmayan hücrelerin nekroz olduğu ve siyah parçalar şeklinde görülmüştür.

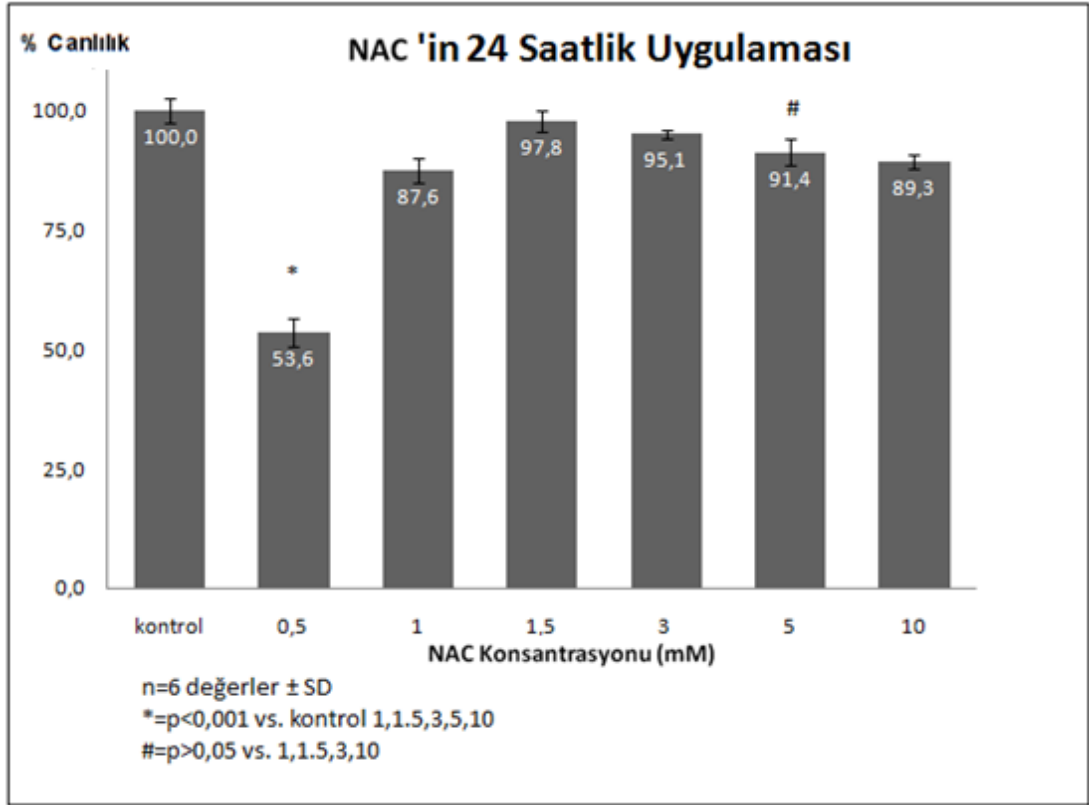
Bleomisinin 600 µg/ml olduğu hücre grubunda ise apoptozomların sayısının oldukça arttığı Şekil 4.10'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. 600 µg/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 600 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.

4.1.3. NTERA Hücrelerinde NAC'in Sitotoksik Etkileri

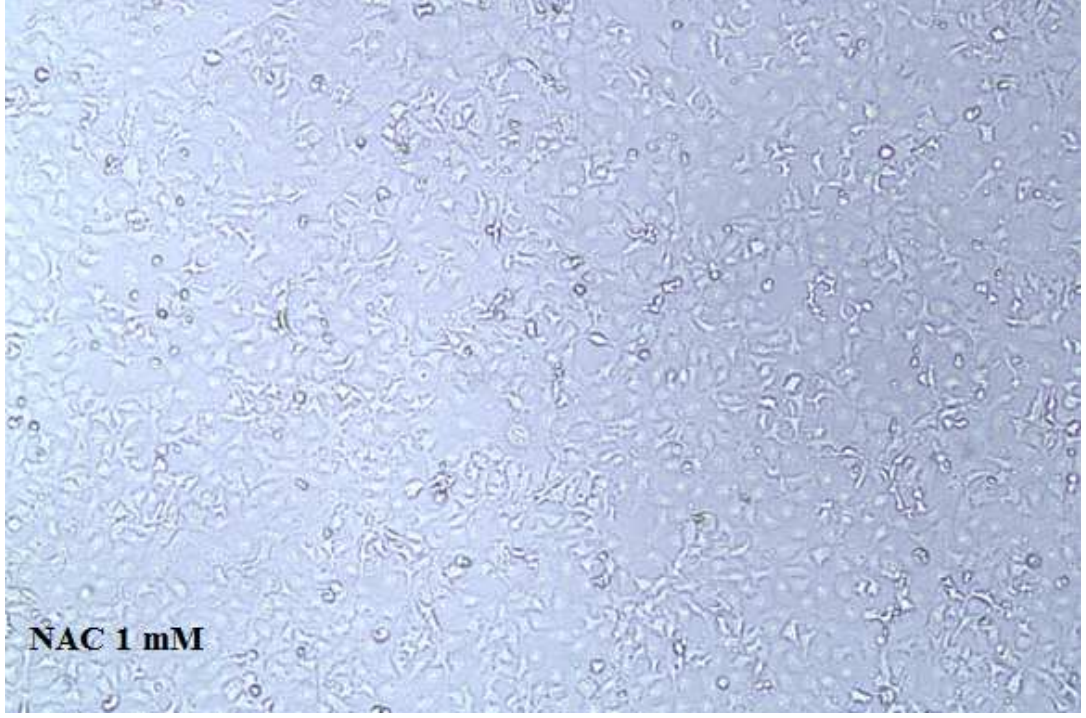
NTERA hücrelerinde bağımsız 6 deney yapıldı ve yapılan tüm deneylerin ortalaması alınmıştır. NTERA hücrelerinde yapılan ön çalışmalara göre NAC'in 0.5-10 mM doz aralığını kullanılmıştır. Buna göre, NTERA hücrelerinde 0.5, 1, 1.5, 3, 5, 10 mM NAC dozları uygulanmıştır. Bu dozlar Şekil 4.11'de gösterildiği gibi 24 saatlik inkübasyonlar ile uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar SPSS istatistik programı ile anlamlılık testleri yapılmıştır. Yapılan One Sample Kolmogorov Smirnov testleriyle grupların kendi içerisindeki veriler birbiriyle uyumlu çıkmıştır ($P>0,05$). Kruskal-Wallis Test ile yapılan istatistik sonucunda bu gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,001$). 24 saatte 5 mM dozu 0.5 ve 1, dozlarından anlamlı; 1.5, 3, 10 mM dozu 5 mM dozundan anlamlı olarak farklı bulunmadı ($P>0,05$). Elde edilen değerlerle çizilen grafikten yüzde canlılık değerleri hesaplandı.



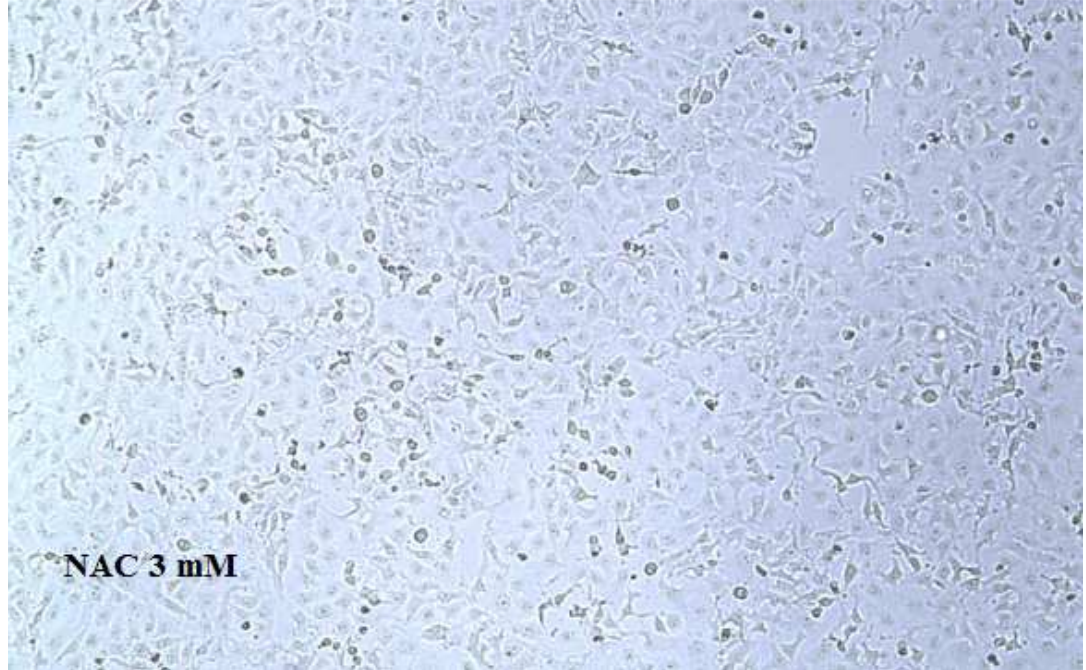
Şekil 4.11. Değişen dozlarındaki NAC'in NTERA hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisi

4.1.4. NTERA Hücrelerinde NAC'in Etkisinin Mikroskopla Gözlenmesi

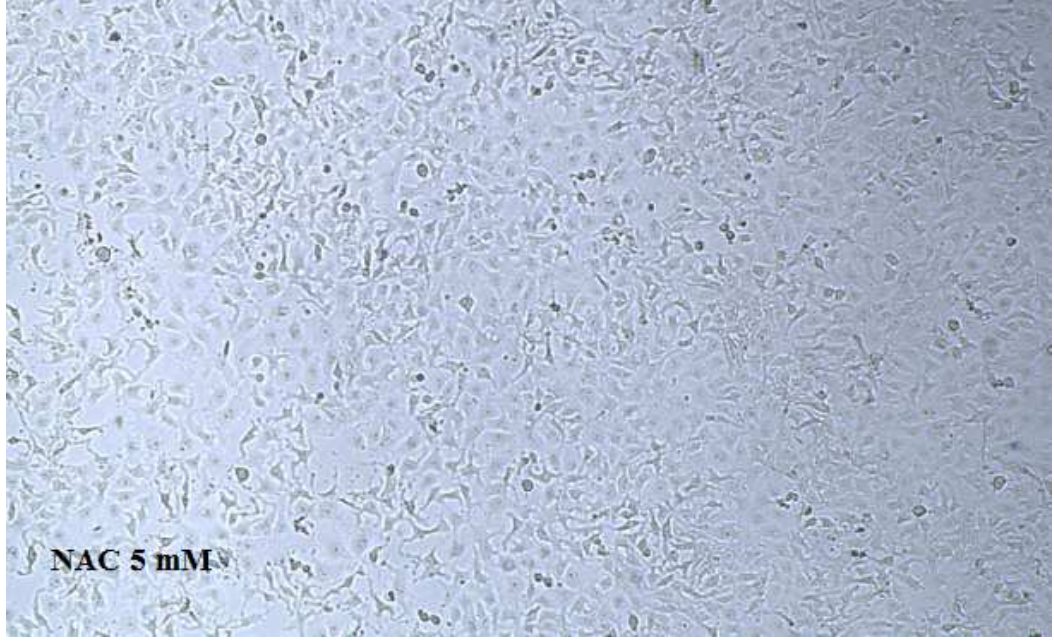
Yaptığımız çalışmada NTERA hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki NAC'nin etkilerini mikroskop görüntüleriyle kontrol grubu ile karşılaştırdık. İnkübasyonlar 24 saatlik olup NAC grubu için 1, 3, 5 ve 10 mM'lik konsantrasyonlar uygulanmıştır. Hücre gruplarının fotoğrafları Şekil 4.12,13,14,15'da gösterilmektedir.



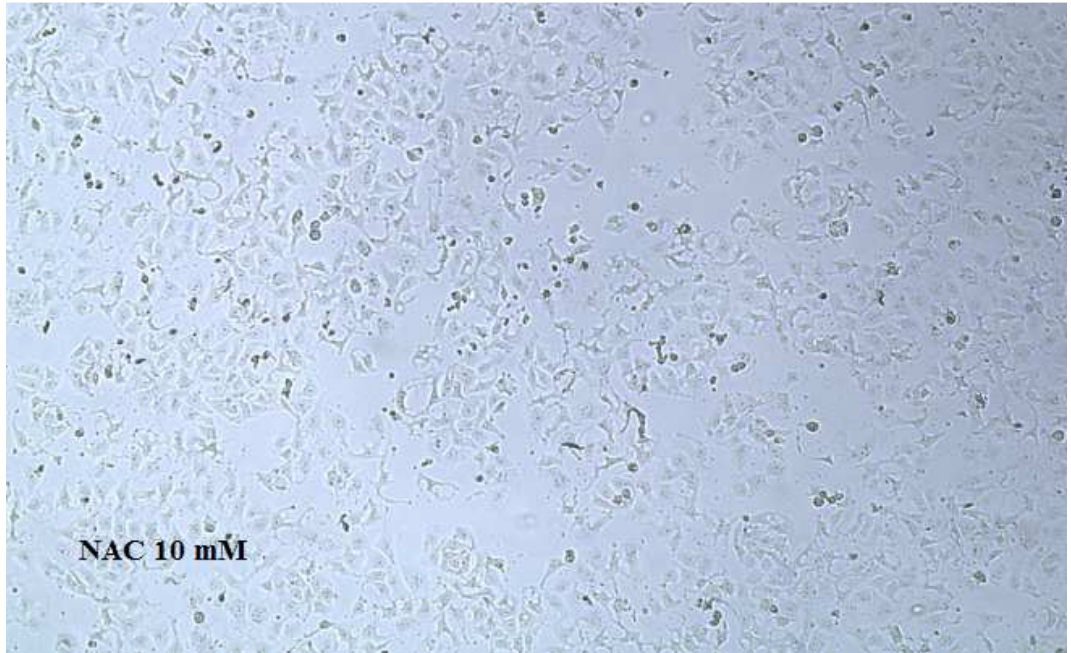
Şekil 4.12. 1 mM NAC ile muamele edilen NAC 1 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.13. 3 mM NAC ile muamele edilen NAC 3 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.14. 5 mM NAC ile muamele edilen NAC 5 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.



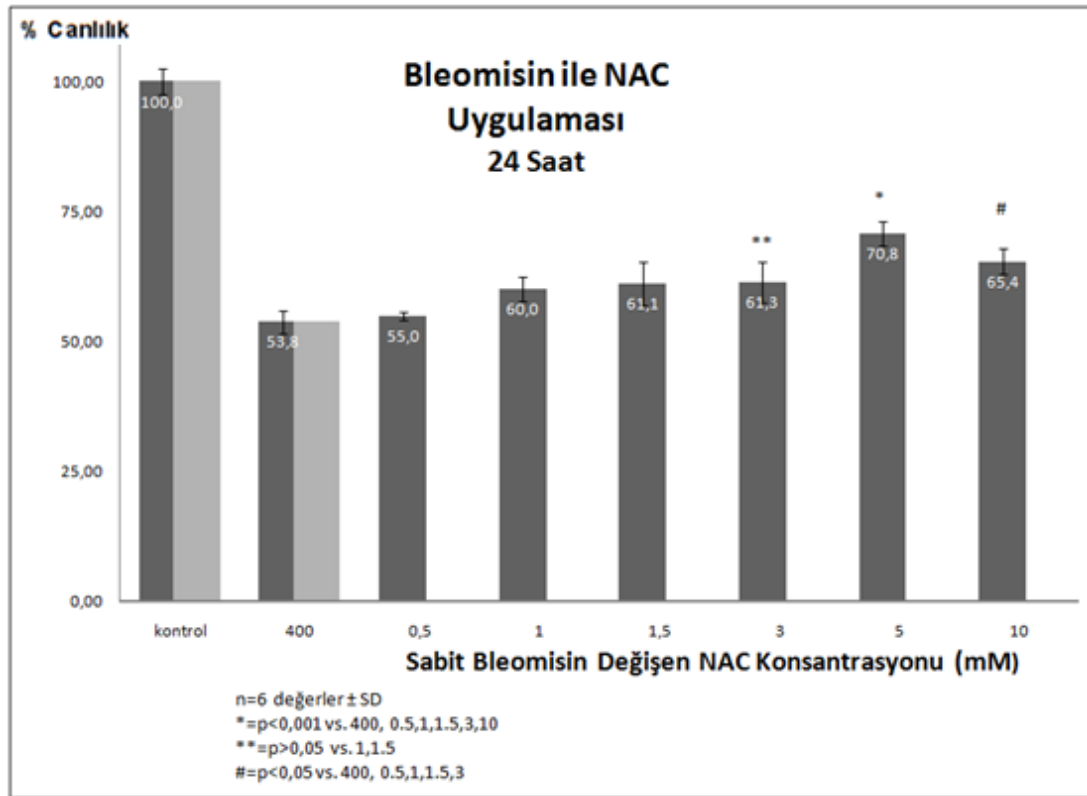
Şekil 4.15. 10 mM NAC ile muamele edilen NAC 10 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.

Resimlerden de görüldüğü gibi NAC konsantrasyonu arttıkça ve azaldıkça nekrotik hücre sayısında da bir artış gözlemek mümkündür. Kontrol grubundaki hücrelerin popülasyonunda tam bir doyumluk gözlemlendiği için yapışmayan hücrelerin nekroz olduğu ve siyah parçalar şeklinde görülmüştür.

NAC'in 10 mM olduğu hücre grubunda NAC'in yüksek dozda toksik olduğu sitotoksite testlerinde ve mikroskop görüntülerinde belirlenmiştir.

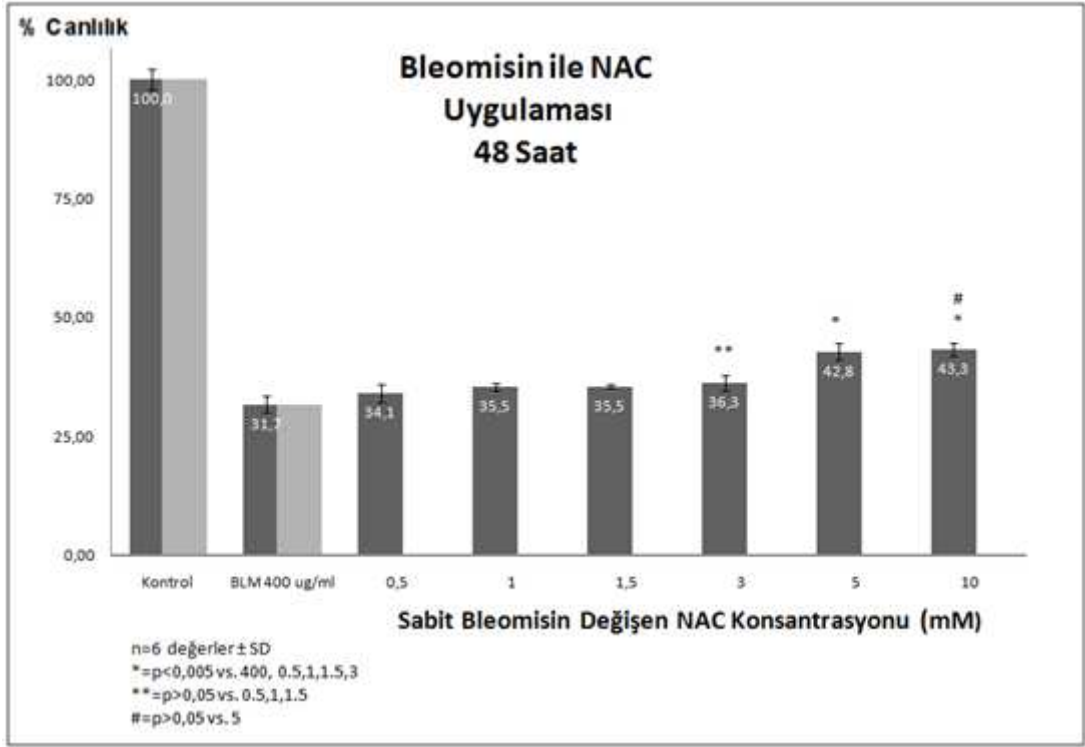
4.1.5. NTERA Hücrelerinde Bleomisin ile Birlikte NAC'in Sitotoksik Etkileri

NTERA hücrelerinde bağımsız 6 deney yapıldı ve yapılan tüm deneylerin ortalaması alınmıştır. NTERA hücreleri için Bleomisin'in IC₅₀ dozunu 400 µg/ml olarak bulunmuştur. Bulunan bu doz NTERA hücrelerini lizis yapmayan NAC'in 0.5-10 mM doz aralığını kullanılmıştır. Buna göre, NTERA hücrelerinde 0.5, 1, 1.5, 3, 5, 10 mM NAC dozları uygulanmıştır. Bu dozlar 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar ile uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar SPSS istatistik programı ile anlamlılık testleri yapılmıştır. Grupların kendi içerisindeki veriler birbiriyle uyumlu çıkmıştır (P>0,05). 24 saatte 5 mM dozu 0.5 ve 1, dozlarından anlamlı; 1.5, 3, 10 mM dozu 5 mM dozundan anlamlı olarak farklı bulundu (P<0,001). Elde edilen değerlerle çizilen grafikten yüzde canlılık değerleri hesaplandı. Grupların karşılaştırılması ise Şekil 4.16'da ki gibi kontrol grubuna karşı Bleomisin'in 400 µg/ml olduğu ve bu dozun farklı konsantrasyonlarda NAC muamelesi ile yapıldı.

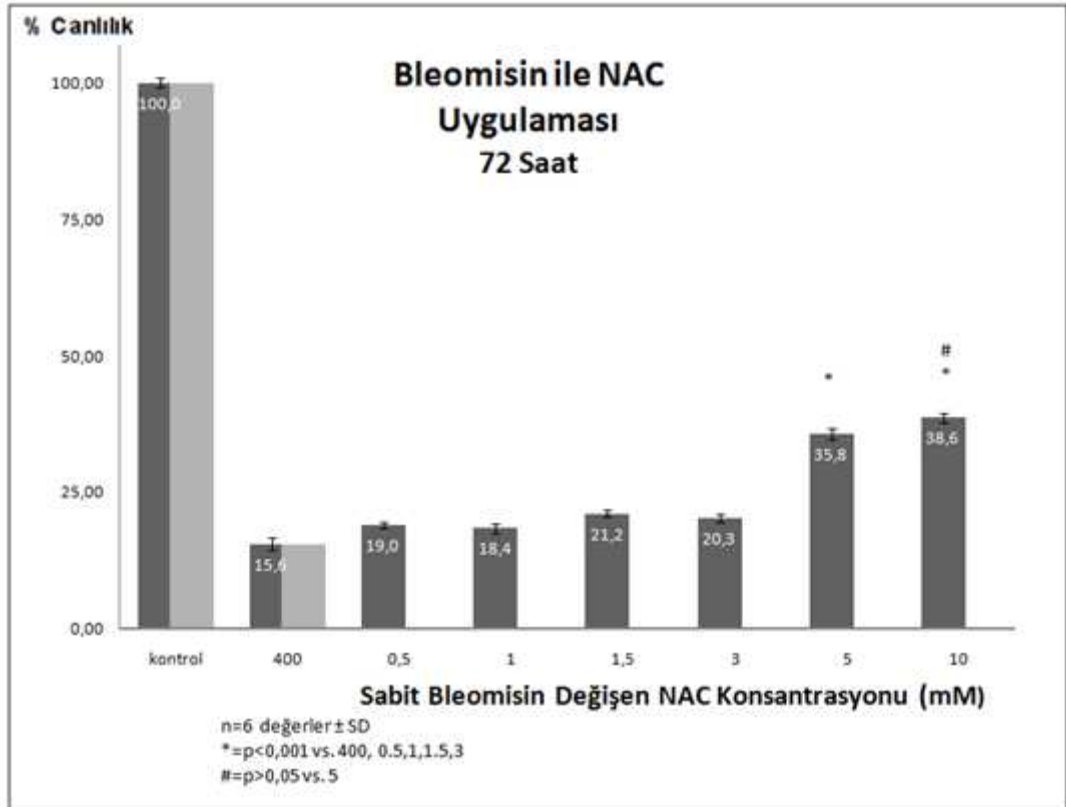


Şekil 4.16. Değişen dozlarındaki NAC'in sabit Bleomisin ile birlikte NTERA hücrelerinde 24 saat için % canlılık üzerine etkisi.

Şekil 4.11'de 5 ve 10 mM'lık NAC konsantrasyonlarının daha düşük konsantrasyonlara göre daha etkili olduğu gözlenmektedir.

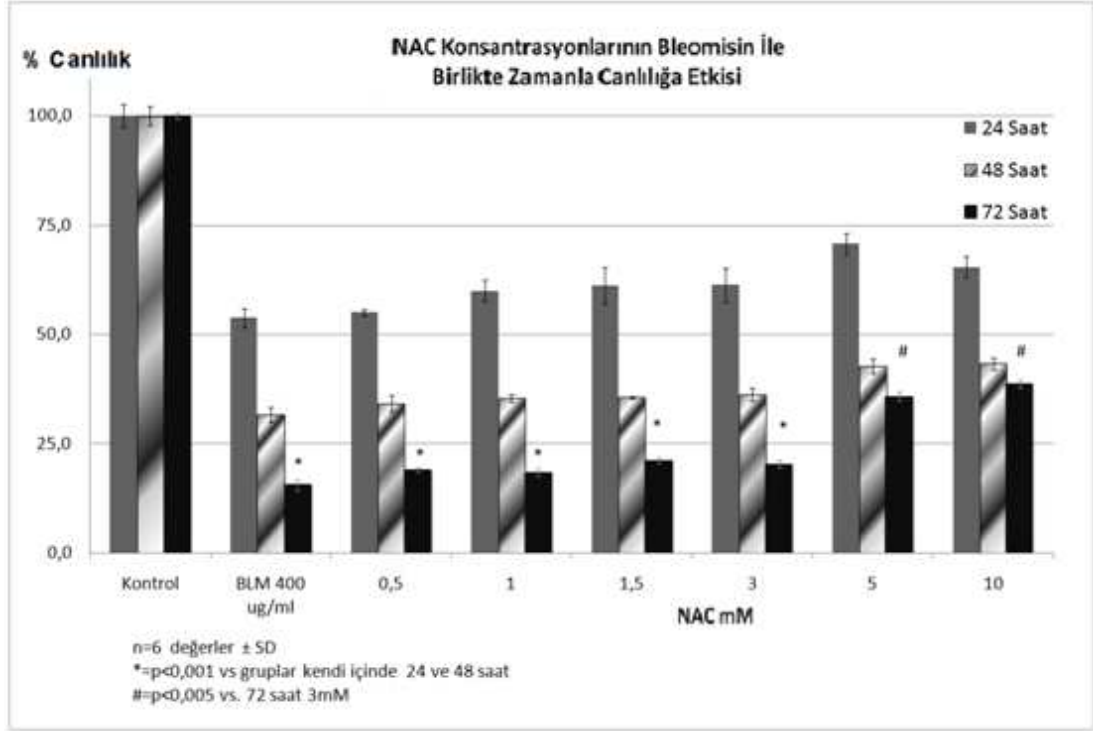


Şekil 4.17. Değişen dozlarındaki NAC'in sabit Bleomisin ile birlikte NTERA hücrelerinde 48 saat için % canlılık üzerine etkisi



Şekil 4.18. Değişen dozlarındaki NAC'in sabit Bleomisin ile birlikte NTERA hücrelerinde 72 saat için % canlılık üzerine etkisi

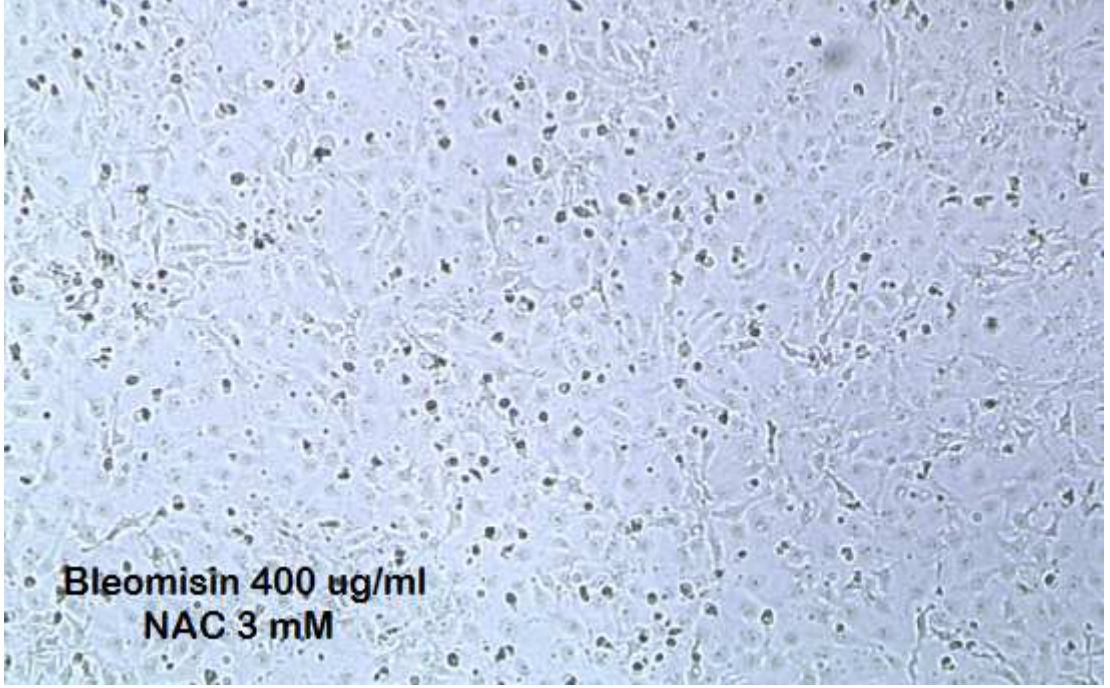
Farklı dozlardaki NAC'nin Bleomisin ile birlikte NTERA hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat için % canlılık üzerine etkisini gözleyebilmek için oluşturulan grafikde NAC'in 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarının daha düşük konsantrasyonlara göre etkili olduğu görülmektedir. Zamana bağlı değişimlerde ise Şekil 4.19'da da görüldüğü gibi 48 ve 72 saat için 5 ve 10 mM canlılığa daha fazla etkisi vardır. İstatistiksel olarak da anlamlıdır ($P<0,005$).



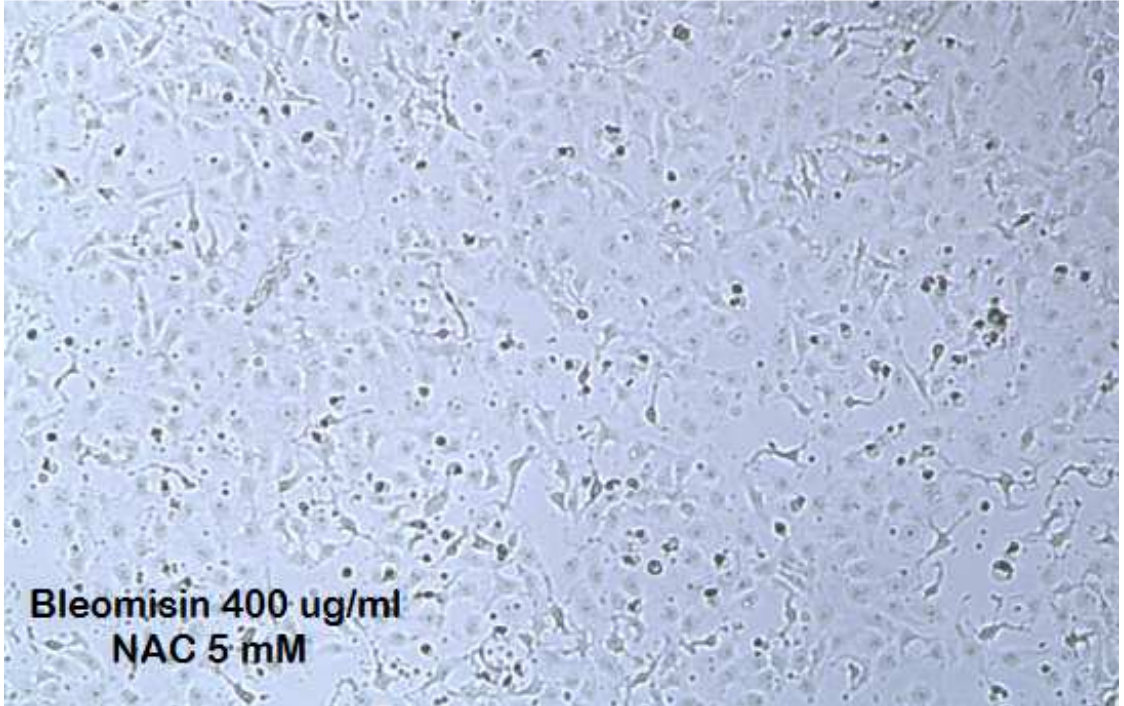
Şekil 4.19. Farklı dozlardaki NAC'nin Bleomisin ile birlikte NTERA hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat için % canlılık üzerine etkisi en fazla 5 ve 10 mM'lık NAC kombinasyonunda görülmektedir.

4.1.6. NTERA Hücrelerinde NAC'in Bleomisin ile Birlikte Etkisinin Mikroskopla Gözlenmesi

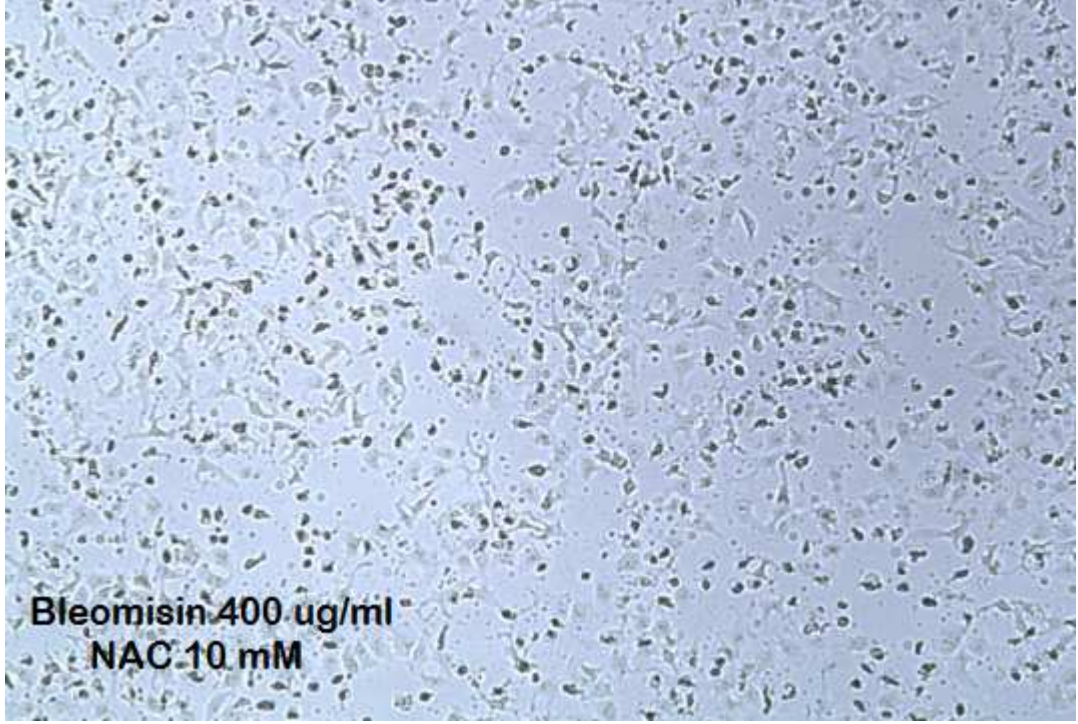
Yaptığımız çalışmada NTERA hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki NAC'nin 400 µg/ml sabit dozlu Bleomisin ile birlikte etkilerini mikroskop görüntüleriyle kontrol grubu ile karşılaştırdık. İnkübasyonlar 24 saatlik olup NAC grubu için 3, 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlar uygulanmıştır. Hücre gruplarının fotoğrafları Şekil 4.20, 21, 22'da gösterilmektedir.



Şekil 4.20. 3 mM NAC ve 400 µg/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 400 NAC 3 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.21. 5 mM NAC ve 400 µg/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 400 NAC 5 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.22. 10 mM NAC ve 400 µg/ml Bleomisin ile muamele edilen BLM 400 NAC 10 grubunun 4X büyütülmesiyle elde edilen mikroskop görüntüsü.

Yaptığımız inkübasyonlar sonucunda NTERA hücrelerinde Bleomisin ile birlikte NAC verilerek sitotoksosite hem biyokimyasal hem de görsel olarak belirlenmiştir.

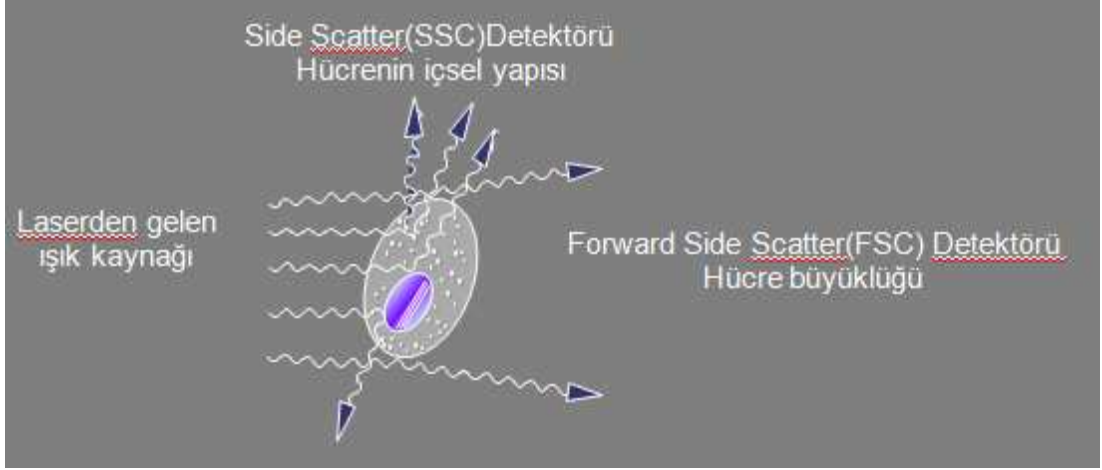
4.2. Apoptozis Deney Bulguları

Apoptozisin ve oksidatif stresin belirlenmesi deneylerinde, 24 saatte MTT sonuçlarına göre Bleomisin için 400 µg/ml, NAC için ise 5 mM'lık konsantrasyonlar kullanılmıştır.

4.2.1. Ntera Hücre Dizisinde Anneksin V Deney Sonuçları

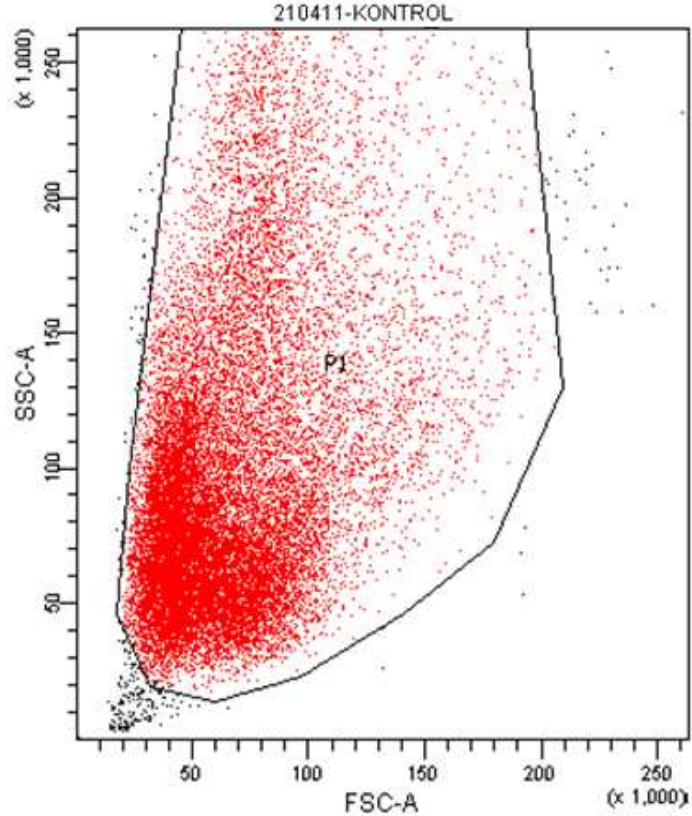
1. Grup: Kontrol Grubu

Anneksin V Kiti prosedürüne uygun yapılan deneyler sonuçları aşağıda belirtilecek olan grafiklerle analiz edilmektedir. Birinci grafik türünde hücreler boyutlarına ve granületisine göre dağılmaktadır. Şekil 4.23'de lazer ışığı ile hücrenin etkileşmesi ve bu etkileşme sırasında hücreden saçılan ışıktan elde edilen bilgi gösterilmektedir. Burada FSC (Forward Side Scatter ya da İleri Bölge Saçılması) olarak gösterilen eksen değeri, Flow sitometre kapilerinden akmakta olan hücrelere gönderilen lazer ışığının ileri doğru saçılması ve FSC dedektörleri tarafından toplanıp veri dönüştürücüde analiz edilmesi sonucunda ne kadar çok ileri saçılma varsa hücrenin o kadar büyük olduğunu gösterir. Grafikteki her bir nokta bir hücreyi göstermektedir.



Şekil 4.23. Lazer ışığının hücreden saçılması ve dedektörlerden toplanması.

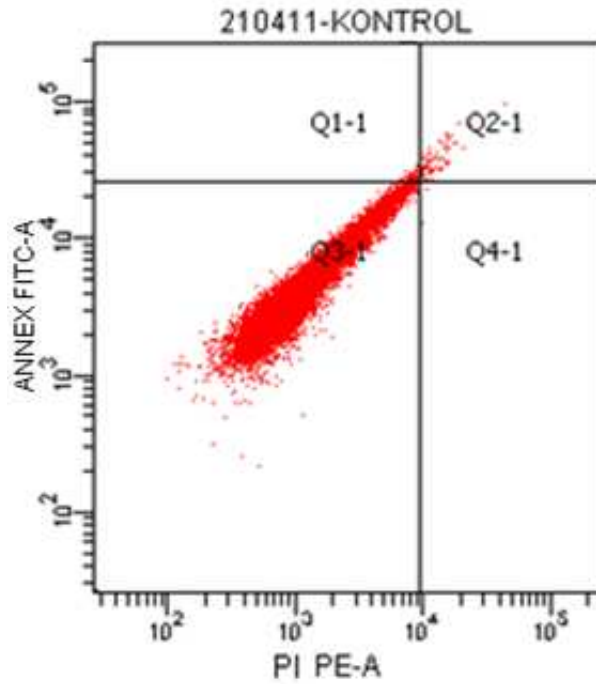
Benzer şekilde SSC (Side Scatter ya da Bölge Saçılması) olarak gösterilen eksen değeri ise, Flow sitometri kapilerinden akmakta olan hücrelere gönderilen lazer ışığının etrafa saçılması ve SSC dedektörleri tarafından toplanıp analiz edilmesi sonucunda ne kadar çok etrafa saçılma varsa hücrenin de o kadar granüllü olduğunu göstermektedir. Şekil 4.24’de de görüldüğü gibi hücreler Flow sitometresi kapilerinden geçerken gönderilen lazer ışığı eş zamanlı çalışan bu dedektörler sayesinde FSC ve SSC değerlerine göre grafikte nokta şeklinde belirlenmektedir.



Şekil 4.24. Kontrol grubunun FSC ve SSC analizi.

Anneksin V Kiti prosedürüne göre yapılan deneyin analizinde kullanılan ikinci grafik ise birinci grafik türünden farklı olarak hücre süspansiyonuna floresans bir

belirteç eklenmesidir. Bu floresans madde bir antikora bağlı olabilir ya da kendisi floresans verebilir. Anneksin V Kitinde bu iki floresans özellik kullanılmıştır. Apoptozis sırasında hücre zarının dış kısmına çıkan fosfatidilserin Anneksin V antikoruyla bağlanmaktadır. Floresans FITC molekülü ile konjuge olan Anneksin V antikoru fosfatidilserine bağlı olduğunda lazer ışığının bu hücreye çarpması sonucu farklı dalga boyunda ışımaya yapar. Bu da hangi hücrelerin apoptozis olduğunu gösterir. Bu kit prosedüründe kullanılan diğer floresans özellikli kimyasal ajan ise propidyum iyodid (PI) boyasıdır. Bu boya ise nekroz olmuş ya da erken apoptozis olan hücrelerin DNA'sına bağlanır ve ölü hücrenin bir göstergesidir. Şekil 4.25'deki grafik üzerinden açıklayacak olursak Q3-1 bölgesi Anneksin V-FITC ve PI ile ışımaya yapmamıştır. Zaten kontrol grubuna hiçbir apoptotik ya da nekrotik bir ajan verilmemiştir. Q1-1 bölgesi Anneksin V-FITC bağlayan ve ışımaya yapan hücreleri göstermektedir, ancak kontrol grubunda yoktur. Q4-1 bölgesi de nekroz olmuş hücrelerin PI ile boyanmasını göstermektedir. Kontrol grubunda bu bölgede de hücre yoktur. Q2-1 bölgesi ise apoptozis sonrası ölen hücreleri göstermektedir. Bu bölgede hem Anneksin V-FITC ışımaya hem de PI ışımaya mevcuttur, ancak kontrol grubunda bu bölgede de hücre yoktur. Bölgelere göre hücrelerin yüzdesi de her grup için Şekil 4.26 gibi gösterilecektir.



Şekil 4.25. Kontrol grubu Flow grafiği

Şekil 4.25'de Q1-1, Q2-1 ve Q4-1 bölgelerinde çok az hücre bulunmaktadır. Q3-1 bölgesindeki hücrelerin yüzdesi 99,4'dür. Bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olması için hücre sayımının en az 20000 olması gerekmektedir. Kontrol grubunda bu sayı Tablo 4.1'de de görüldüğü gibi 23940'dır.

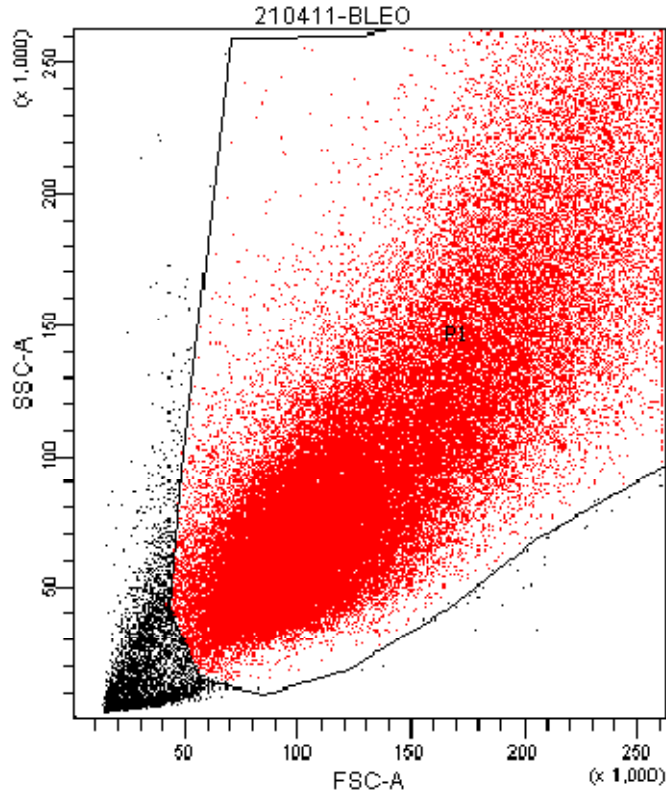
Tablo 4.1. Kontrol grubu bölge yüzdeleri.

Tube: KONTROL_001			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	23,940	###	100.0
P1	23,574	98.5	98.5
Q1-1	23	0.1	0.1
Q2-1	67	0.4	0.4
Q3-1	23,439	99.4	97.9
Q4-1	15	0.1	0.1

2. Grup: 400 µg/ml Bleomisin Uygulanan BLM 400 Grubu

Bu grupta bulunan hücelere 400 µg/ml Bleomisin uygulandıktan 6 saat sonra yapılan kit prosedürü sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda analiz edilmiştir.

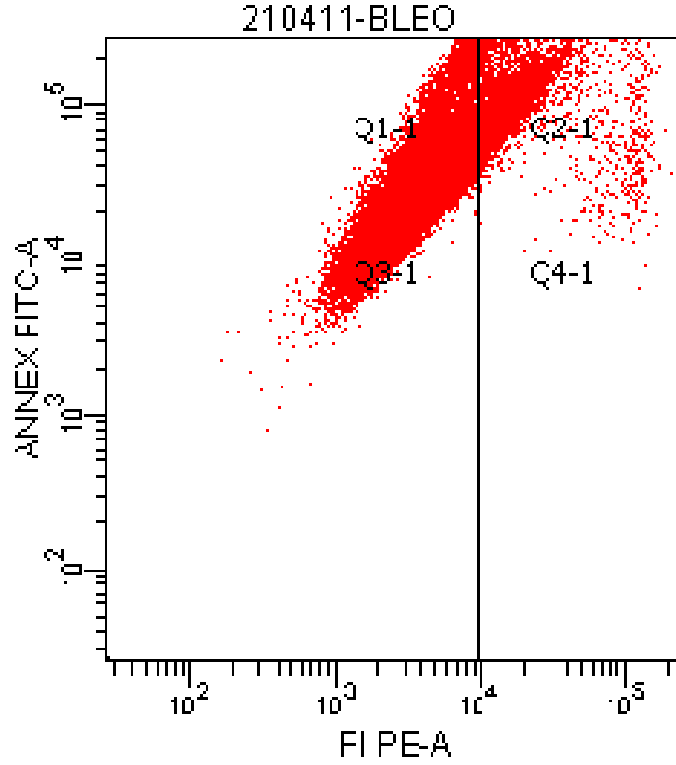
Şekil 4.26'de FSC ve SSC eksenli grafik kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Bleomisin uygulamasında hücrelerin boyutlarında ve granületesinde bir atış gözlenmektedir. Apoptozis sırasında hücrede bu türden morfolojik değişimler gerçekleştiği bilinmektedir.



Şekil 4.26. Bleomisin grubunun FSC ve SSC analizi.

Şekil 4.27'deki grafik üzerinden açıklayacak olursak Q3-1 bölgesi Anneksin V-FITC ile birlikte PI bağlamamıştır ve oranı % 49,1'dir. Bu sonuç MTT kiti Kaspaz-3 ve Protein Karbonil Kiti sonuçları ile uyumlu bir sonuçtur. Q1-1 bölgesi Anneksin V-FITC bağlayan ve ışımaya yapan hücreleri göstermektedir. Bu bölgedeki hücrelerin oranı ise %30'dur. Q4-1 bölgesi de nekroz olmuş hücrelerin PI ile boyanmasını göstermektedir. Bleomisin grubunda bu bölgedeki hücre oranı ise %0,1'dir. Q2-1

bölgesi ise apoptozis sonrası ölen hücreleri göstermektedir. Bu bölgede hem Anneksin V-FITC ışması hem de PI ışması mevcuttur, ancak Merkezi Araştırma Laboratuvarındaki Flow sitometri cihazındaki rutin yoğunluk nedeniyle beklemeden dolayı bu bölgede hücre görülmüştür. Ama bu hücreler AnneksinV-FITC bağladığı için Q1-1 bölgesine dahil edilmiştir. Bölgelere göre hücrelerin yüzdesi ve sayıları bleomisin grubu için Tablo 4.2’de gösterilmektedir.



Şekil 4.27. Bleomisin grubu Flow grafiği.

Tablo 4.2’de Apoptotik Q1-1 bölgesinde %30, erken apoptotik Q2-1 bölgesinde %18 civarında ve Q4-1 bölgelerinde çok az hücre bulunmaktadır. Q3-1 bölgesindeki hücrelerin yüzdesi 49,1’dir. Bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olması için hücre sayısının en az 20000 olması gerekmektedir. Bleomisin grubunda bu sayı Tablo 4.2’de de görüldüğü gibi 100000’dir.

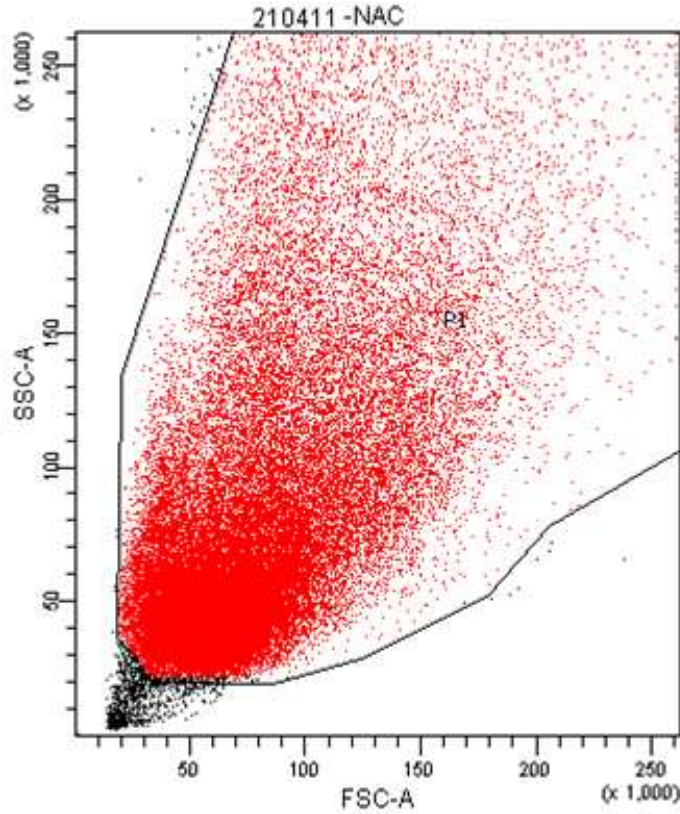
Tablo 4.2. Bleomisin grubu bölge yüzdeleri.

Tube: BLEO			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	100,000	###	100.0
P1	95,599	95.6	95.6
Q1-1	28,683	30.0	28.7
Q2-1	17,777	18.6	17.8
Q3-1	49,055	51.3	49.1
Q4-1	84	0.1	0.1

3. Grup: 5 mM NAC uygulanan NAC 5 Grubu

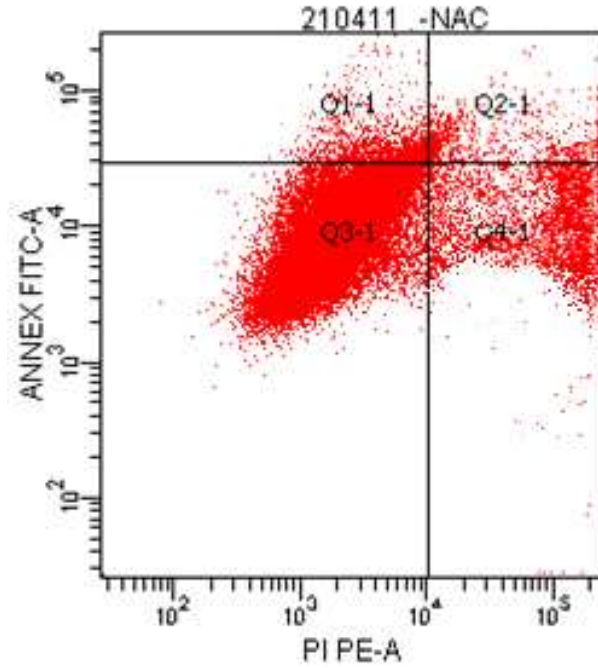
Bu grupta bulunan hücelere 5 mM NAC uygulandıktan 6 saat sonra yapılan kit prosedürü sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda analiz edilmiştir.

Şekil 4.28’de FSC ve SSC eksenli grafik kontrol grubuyla karşılaştırıldığında NAC uygulamasında hücrelerin boyutlarında ve granületesinde bir artış görülmektedir. Ancak nekroz olan hücre sayısında bir artış vardır. Bunu düşük FSC değerine denk gelen hücre yoğunluğundan söyleyebiliriz. Zaten nekroz sırasında hücre granületesi ve parçalanmadan dolayı boyutunun azaldığı bilinmektedir.



Şekil 4.28. NAC grubunun FSC ve SSC analizi.

Şekil 4.29’deki grafik üzerinden açıklayacak olursak Q3-1 bölgesi Anneksin V-FITC ile birlikte PI bağlamamıştır ve oranı %82,4’tür. Bu sonuç MTT kiti Kaspaz-3 ve Protein Karbonil Kiti sonuçları ile uyumlu bir sonuçtur. Q1-1 bölgesi Anneksin V-FITC bağlayan ve ışımaya yapan hücreleri göstermektedir. Bu bölgedeki hücrelerin oranı ise %2,6’dır. Q2-1 bölgesi ise apoptozis sonrası ölen hücreleri göstermektedir. Bu bölgede hem Anneksin V-FITC ışınması hem de PI ışınması mevcuttur ve oranı % 2’dir. Q4-1 bölgesi de nekroz olmuş hücrelerin PI ile boyanmasını göstermektedir. NAC grubunda bu bölgedeki hücre oranı ise % 10,3’tür, ancak Merkezi Araştırma Laboratuvarındaki Flow sitometri cihazındaki rutin yoğunluk nedeniyle beklemeden dolayı bu bölgede hücre görülmüştür. Ama bu hücreler Anneksin V-FITC bağlamadığı için Q3-1 bölgesine dahil edilmiştir. Bölgelere göre hücrelerin yüzdesi ve sayıları bleomisin grubu için Tablo 4.3’de gösterilmektedir.



Şekil 4.29. NAC grubu Flow grafiği

Tablo 4.3’de Apoptotik Q1-1 bölgesinde %2,6, erken apoptotik Q2-1 bölgesinde %2 civarında ve Q4-1 bölgelerinde ise % 10,3 hücre bulunmaktadır. Q3-1 bölgesindeki hücrelerin oranı % 82,4’dür. Bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olması için hücre sayımının en az 20000 olması gerekmektedir. NAC grubunda bu sayı Tablo 4.3’de de görüldüğü gibi 50000’dir.

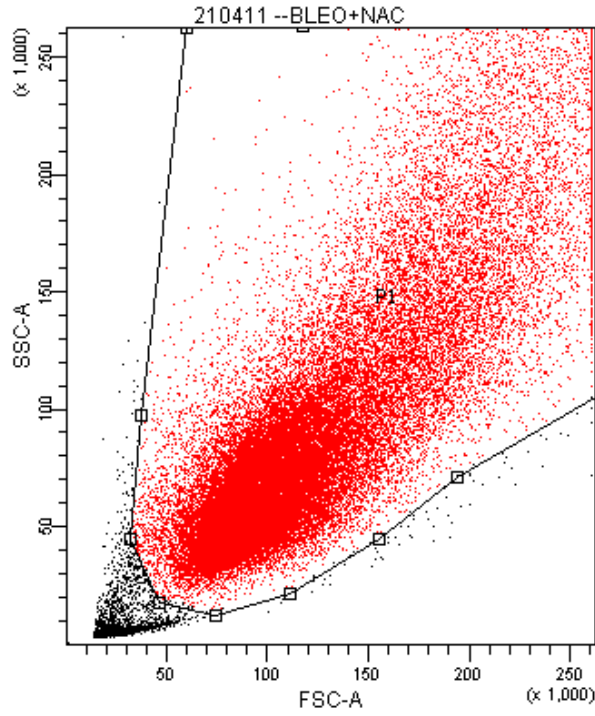
Tablo 4.3. NAC grubu bölge yüzdeleri.

Tube: NAC			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	50,000	###	100.0
■ P1	48,665	97.3	97.3
☒ Q1-1	1,325	2.7	2.6
☒ Q2-1	996	2.0	2.0
☒ Q3-1	41,186	84.6	82.4
☒ Q4-1	5,158	10.6	10.3

4. Grup: 400 µg/ml Bleomisin ile birlikte 5 mM NAC uygulanan BLM + NAC Grubu

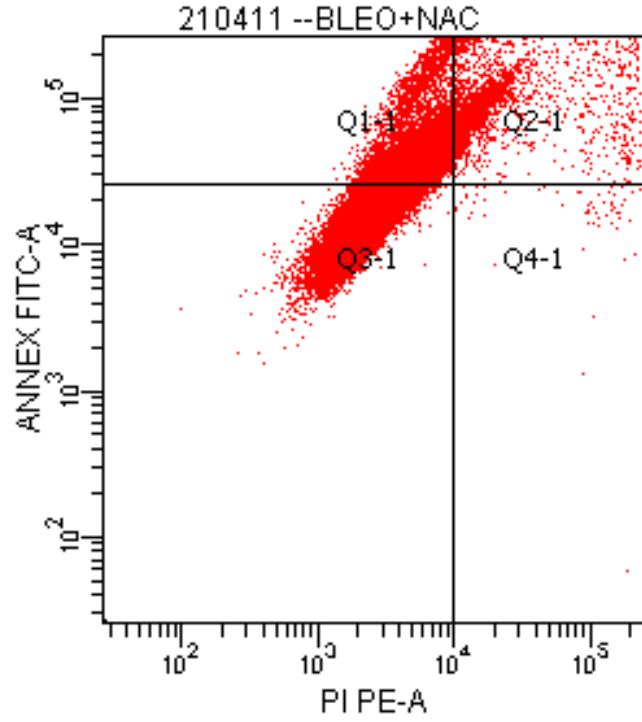
Bu grupta bulunan hücrelere 400 µg/ml Bleomisin ile birlikte 5 mM NAC uygulandıktan 6 saat sonra yapılan kit prosedürü sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda analiz edilmiştir.

Şekil 4.30’da FSC ve SSC eksenli grafik kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Bleomisin+NAC uygulamasında hücrelerin boyutlarında ve granületesinde bir artış görülmektedir. Ancak bu artış sadece bleomisin ile inkübe edilmiş gruba göre biraz azdır. Bunu yüksek FSC ve SSC değerine denk gelen hücre yoğunluğundan söyleyebiliriz. Hücreler ortalama 50-100 aralığında SSC ve 50-150 aralığında FSC değerlerinde toplanmışlardır.



Şekil 4.30. Bleomisin + NAC grubunun FSC ve SSC analizi.

Şekil 4.31'deki grafik üzerinden açıklayacak olursak Q3-1 bölgesi Anneksin V-FITC ile birlikte PI bağlamamıştır ve oranı %59,2'tür. Bu sonuç MTT kiti Kaspaz-3 ve Protein Karbonil Kiti sonuçları ile uyumlu bir sonuçtur. Buna ek olarak bleomisin grubunun Q3-1 bölgesine göre daha fazla bir orandır. Q1-1 bölgesi Anneksin V-FITC bağlayan ve ışına yapan hücreleri göstermektedir. Bu bölgedeki hücrelerin oranı ise %24,2'dir. Q2-1 bölgesi ise apoptozis sonrası ölen hücreleri göstermektedir. Bu bölgede hem Anneksin V-FITC ışınması hem de PI ışınması mevcuttur ve oranı % 12,9 'dur. Ancak Merkezi Araştırma Laboratuvarındaki Flow sitometri cihazındaki rutin yoğunluk nedeniyle beklemeden dolayı bu bölgede hücre görülmüştür. Ama bu hücreler AnneksinV-FITC bağladığı için Q1-1 bölgesine dahil edilmiştir. Q4-1 bölgesi de nekroz olmuş hücrelerin PI ile boyanmasını göstermektedir. Bleomisin + NAC grubunda bu bölgedeki hücre oranı ise % 0,1'dir, Bölgelere göre hücrelerin yüzdesi ve sayıları Bleomisin + NAC grubu için Şekil 4.31'de gösterilmektedir.



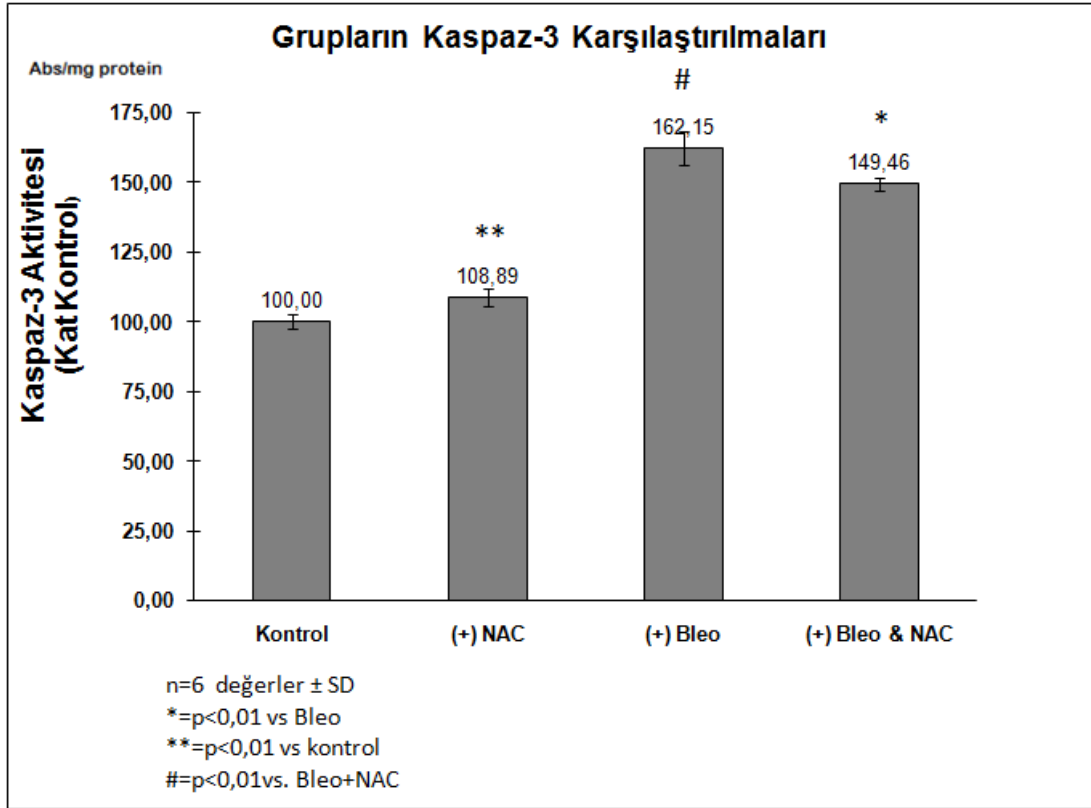
Şekil 4.31. Bleomisin + NAC grubunun Flow grafiği.

Tablo 4.4’de Apoptotik Q1-1 bölgesinde % 24,2, erken apoptotik Q2-1 bölgesinde % 12,9 civarında ve Q4-1 bölgelerinde ise % 0,1 hücre bulunmaktadır. Q3-1 bölgesindeki hücrelerin oranı % 59,2’dir. Q3-1 bölgesindeki bu oran bleomisin grubuna göre % 20 daha fazladır. Bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olması için hücre sayımının en az 20000 olması gerekmektedir. Bleomisin+ NAC grubunda bu sayı Tablo 4.4’de de görüldüğü gibi 50000’dir.

Tablo 4.4. Bleomisin + NAC grubu bölge yüzdeleri.

Tube: BLEO+NAC			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	50,000	###	100.0
■ P1	48,216	96.4	96.4
☒ Q1-1	12,110	25.1	24.2
☒ Q2-1	6,447	13.4	12.9
☒ Q3-1	29,589	61.4	59.2
☒ Q4-1	70	0.1	0.1

4.2.2. Ntera Hücre Dizisi Kaspaz-3 Deney Sonuçları



Şekil 4.32. Kontrol ve diğer deney gruplarında Kaspaz-3 deney sonuçları

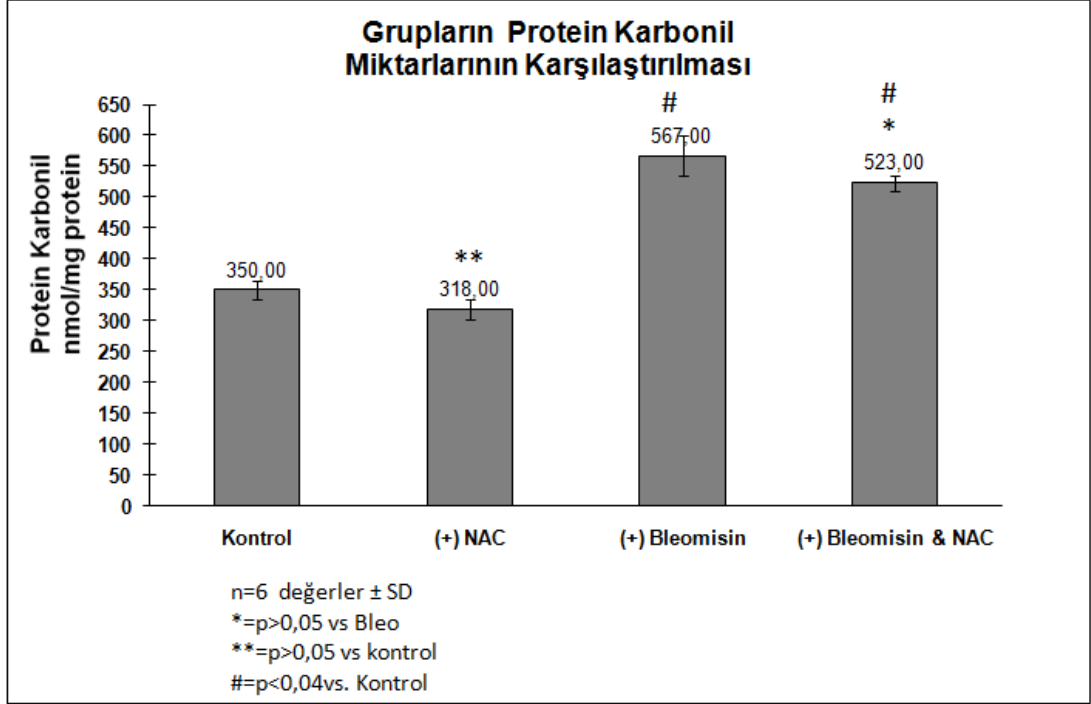
Kontrol, NAC, Bleomisin ve Bleomisin+NAC deney gruplarında kaspaz-3 ölçümü yapıldı. Kaspaz-3 deneyi için inkübasyonlar 24 saatlik yapıldı. Her gruptan 6 petri çalışıldı ve her petride ortalama 4×10^6 hücre vardı. Elde edilen ölçüm değerleri Şekil 4.32’de gösterildi. Kontrol ve 3 deney grubundaki kaspaz-3 düzeyleri Mann-Whitney Testi ile karşılaştırıldığında; Bleomisin, Bleomisin+NAC gruplarının kaspaz-3 içeriğinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde arttığı NAC grubunda ise %10’luk bir artış gözlenmiştir. NAC ve Bleomisin ile birlikte inkübe edilmiş grupta ise sadece Bleomisin ile inkübe edilmiş gruba göre kaspaz-3 aktivitesi azaldığı görülmektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda Kontrol ile NAC grubu için P değeri 0,009’dir. Aynı istatistiksel sonuç kontrol ile Bleomisin+NAC içinde geçerlidir (P:0,009). Her iki karşılaştırmada $P < 0,01$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlıdır. Kontrol ile Bleomisin için ise P değeri 0,002’dir. Bu da $P < 0,05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuçtur.

4.3. Oksidatif Stres Deney Sonuçları

4.3.1. NTERA Hücre Dizisi Protein Karbonil Deney Sonuçları

Kontrol, Bleomisin, NAC, Bleomisin+NAC, deney gruplarında protein karbonil gruplarının ölçümü yapıldı. Protein karbonil deneyi için inkübasyonlar 24 saatlik yapıldı. Her gruptan 6 petri çalışıldı ve her petride ortalama 4×10^6 hücre vardı. Elde edilen ölçüm değerleri Şekil 4.33’de gösterildi. Mann-Whitney testi ile yapılan istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre, NAC ile inkübe edilen deney gruplarında kontrol grubuna göre protein karbonil sonuçlarında kaspaz-3

sonuçlarıyla tutarlı bir azalma gözlenmektedir, fakat azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$). Bleomisin, Bleomisin+NAC ile inkübe edilen deney gruplarında ise, protein karbonil sonuçlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur ($P<0.04$). NAC ile beraber inkübe edilmiş Bleomisin, sadece Bleomisin ile inkübe edilen gruba göre küçük de olsa bir azalma gözlenmiştir, fakat protein karbonil düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmemiştir ($P>0.05$).



Şekil 4.33. NTERA hücre dizisi kontrol ve diğer deney gruplarında protein karbonil 24 saat deney sonuçları

TARTIŞMA

Testis kanseri 15-35 yaşları arasındaki erkeklerde en sık görülen kanserdir ve erkeklerde görülen tümörlerin %1'ini oluşturmaktadır. Testis kanseri geçmişte ölüme neden olan bir hastalık olarak bilinirken, günümüzde testis kanser hastalarının %80'inden fazlası tedavi edilebilmektedir. Erken evredeki hastalarda ise tedavi oranı %100'e ulaşmaktadır (19). Tedavi edilen testis kanserli hastaların, tedavi sonrası beklenen sağlıklı yaşam süreleri, oldukça uzundur (20).

Bleomisin, Etoposid ve Sisplatin (BEP) kombinasyonu, metastatik non-seminomatöz tümörlerde tercih edilen en etkili tedavi kürüdür (1). Testis kanserinde, anti-kanser ilaçlar, genellikle hastalığın vücudun başka kısımlarına metastaz yapması durumlarında tercih edilirler. Bu ilaçlar bazen tümörün cerrahi girişim öncesine kadar küçülmesini sağlamak amacıyla ve 1.evre testis tümörü için uygulanan orşiektomi sonrasında, tümör dokusunda saptanan vasküler invazyonun yaratabileceği yüksek nüks ihtimalinin önlenmesi için de kullanılabilir (1, 30). Bleomisin gibi kanser tedavisinde kullanılan ilaçların birçok yan etkisi vardır. Bleomisin'in uygulanması bazen ölümcül yan etkiler meydana getirebilmektedir. Bleomisin'i inaktive eden bir enzim olan Bleomisin hidrolazın eksikliğinden dolayı ortaya çıkan Bleomisin indüklü toksisite, başlıca akciğer ve deride oluşur (31, 175).

NTERA testis kanseri hücrelerinde, testis kanserinin tedavisinde kullanılan Bleomisin'in, NAC ile birlikte kullanımının araştırıldığı in vivo ya da in vitro bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda testis kanser hücrelerinde daha önce araştırılmamış olan NAC'ın terapötik potansiyelini araştırılmıştır. Bleomisin'in sitotoksitesi, oksidatif stres ve apoptozis üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Antioksidanların, kanser tedavisi sırasında kullanılıp kullanılmamaları konusundaki paradoksları aydınlatmak için, yalnız NAC veya Bleomisin ile birlikte, oksidatif stres ve apoptozis üzerinde oluşturdukları etkiler araştırılmıştır.

Bilindiği üzere Bleomisin, testis kanserinin tedavisinde sıklıkla kullanılan bir kemoterapötiktir. Bleomisin, DNA'ya direkt bağlanarak, tek ve çift zincir kırılmalarına yol açarak, hücrelerde apoptozisi tetikler. Bleomisin, süperoksid ve hidrojen peroksid gibi reaktif oksijen türlerini üretir. Oluşan bu reaktif oksijen türlerinin, DNA'ya atak yaparak zincirleri koparması, Bleomisin'in kanser hücrelerine toksisitesinde rol oynamaktadır (37). NAC ise antioksidan olarak in vivo ve in vitro yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Detoksifikasyonda rol oynadıkları gibi, oksidatif strese karşı hücreyi ve komponentlerini korurlar. NAC canlı organizmalardan üretildiğinden ve doğal sülfür içeren amino asit türevidir olduğundan güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir (14). Bu yüzden bizim çalışmamızda Bleomisin'in oluşturduğu hücre hasarına NAC'ın nasıl tepki verdiğini belirlemek amaçlanmıştır.

Testis kanserinde NAC ve Bleomisin'in etkileri üzerine yayınlanmış çalışma bulunmaması nedeniyle, çalışmamızda NTERA testis kanser hücre dizisini seçtik. Bu hücre hattı, malign non-seminomatöz germ hücre tümörlerinden köken alır. Bunun yanı sıra, NTERA hücreleri fonksiyonel p53 bulunduran hücrelerdir (176).

Testis kanseri tedavisinde kullanılan bleomisin'in hücre dizileri üzerinde hangi dozun kullanılacağını çalışmamız için belirlememiz gerekmektedir. Yapılan literatür

araştırmaları sonucunda çeşitli Bleomisin dozları bulunmuştur. Bleomisinin NTERA hücreleri dizileri üzerinde hangi apoptotik yolları aktive ettiğini belirlemek için yapılan bir çalışmada, Bleomisin konsantrasyonu 250 µg/ml kullanılmıştır (177). Bizde alışmamızda Bleomisin'in testis kanseri hücre dizilerindeki sitotoksik etkisini MTT deneyi ile belirleyip, hücrelerin yaklaşık %50'sine sitotoksik olan konsantrasyonunu (IC₅₀ değeri) bulduk. NTERA hücrelerini 100-600µg/ml arasında değişen Bleomisin konsantrasyonları ile inkübe ederek MTT testi ile IC₅₀ değerini saptanmıştır. Ancak belirlenen dozlardaki Bleomisin, NTERA hücre dizilerinde sitotoksik etkisini yüksek dozlarda gösterdi. Bu nedenle orta derecede bir doz denemesine karar verilerek, 400 µg/ml, 450 µg/ml ve 500 µg/ml dozları seçilmiştir. Seçilen bu dozlar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldüğü için NAC ile kombine denemelerde NTERA hücreleri için deneylerde kullanılacak olan Bleomisin'in IC₅₀ dozu 400 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte çeşitli çalışmalarda farklı parametrelere bakıldığı için Bleomisin dozu farklı kullanılmıştır. 2009 yılında karaciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada da Bleomisin dozu 3 µg/ml kullanılmıştır (178). Testis kanser hücreleri için bulduğumuz Bleomisin dozu, bu dozun çok üstündedir. Bu farklılık çalıştığımız hücre dizilerinin farklılığından kaynaklanmaktadır.

Testis kanserinde daha önce NAC ile ilişkili çalışma yapılmadığından, testis kanser hücrelerinin NAC'e duyarlı olup olmadığı, duyarlı iseler hangi dozlarda hassasiyet gösterecekleri bilinmiyordu. Literatürde prostat, meme kanseri hücre dizileri gibi farklı hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda belirli dozlarda NAC kullanılmıştır. NAC ile yapılmış çeşitli hücre kültürlerinde apoptozisi azalttığı belirlenmiştir. MCF-7 meme kanseri hücre dizilerinde Surfactin'in oluşturduğu apoptozisi önlediği bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan NAC dozu ise 1 mM'dır (179). Bizde çalışmalarımızda 0,5 mM'dan 10 mM'a kadar değişen dozlarda NAC denedik. Ancak belirlenen dozlardaki NAC, NTERA hücre dizilerinde sitotoksik etkisini düşük ve yüksek dozlarda gösterdi. Bu nedenle orta derecede bir doz denemesine karar verilmiştir, 1 mM, 3 mM ve 5 mM dozlarını seçilmiştir. NAC sitotoksitesini, MTT testi ile belirlenmiştir. MTT testinde belirlenen 5 mM'lık doz, Anneksin V, Kaspaz-3 ve Protein Karbonil kitlerinde NAC dozu olarak kullanılmıştır ve elde edilen sonuçlar birbiriyle tutarlıdır. Bu testte Bleomisin ile birlikte NAC uygulamasında; canlılığın 24 saatte %70'lere kadar çıktığı gözlenmiştir. Ancak 48 saat sonunda bu canlılığın %40'lara kadar düşmesi NAC'in Bleomisinin toksisitesini azaltamadığı görülebilir ama tek başına kullanılan Bleomisinin canlılığı ise %30 seviyelerindedir. 72 saatte canlılıktaki düşüşün azalması 48 saatle karşılaştırıldığında ise önemli bir fark görülebilir (şekil 4.19). Çünkü glutatyonun öncüsü olan NAC antioksidan mekanizmayı harekete geçirmiş ve Bleomisinden kaynaklanan oksidasyonu dolayısıyla apoptozisi azaltmıştır. Bu da kanser hücreleri için istenen bir durum değildir.

2009 yılında yapılan bir çalışmada, Bleomisin'in hem ekstrinsik hem de intrinsik yollarla apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir (178). Bleomisin uygulanmasından sonra kaspaz-2, -3, -6, -8 ve -9 artmıştır. Çalışmamızda apoptozis belirteci olan kaspaz-3 kiti kullanılmıştır. İntrinsik ve ekstrinsik yollardaki başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, -9, -10) tarafından aktive edilen Kaspaz-3, en önemli uygulama kaspazıdır. Hem aktif kaspaz-8, hem de kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktive ederler ve apoptozise yol açarlar. Kaspaz-3, apoptozisde meydana gelen endonükleaz

aktivasyonuna, kromatin kondensasyonuna ve membran cepciklerinin oluşumuna aracılık eder. (180)

Çalışmamızda, NAC'nin testis kanseri hücre dizilerinde apoptozis üzerine olan etkilerini araştırılmıştır. ROS oluşturarak apoptozise yol açtığı bilinen Bleomisin, çalışmamızda NTERA hücrelerinde, kaspaz-3 düzeylerini arttırmıştır. Yüksek serbest radikal temizleyici özelliğe sahip olan NAC ise, NTERA hücre dizisinde Bleomisinin neden olduğu kaspaz-3 artışlarını %8 oranında baskılamıştır. Bulgularımız NAC'in apoptozis üzerinde zıt etkiler oluşturduklarını, NAC'nin anti-apoptotik etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Antioksidanların apoptozis üzerinde zıt etkileri olabileceğini göstermesi açısından bu bulgularımız son derece önemlidir. Ancak kaspaz-3 aktivitesinin, kontrol grubuna göre sadece NAC uygulanan grupta %10'luk artışı da çok ilginçtir. Bulgularımız da Bleomisin ve NAC ile birlikte Bleomisin kullanımında apoptozise yol açtığını göstermiştir.

Mungunsukh ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, bizim bulgularımıza benzer şekilde, Bleomisin'in pulmoner epitelyal hücrelerde, kaspaz-3'ü aktive ederek, ekstrinsik apoptotik yolağı indüklediği gösterilmiştir(180).

Thiol içeren bir antioksidan olan NAC'in testis de ve bazı kanser türlerinde apoptozis üzerine olan etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Song ve arkadaşları, kültüre edilmiş rat sertoli hücrelerinde, toksik etkilere sahip dichlorodiphenoxytrichloroethane (DDT)'nin bir metaboliti olan p,p'-DDE'nin yol açtığı apoptotik değişimlerin, NAC tarafından bloke edildiğini bildirmişlerdir (181). Erkkilä ve arkadaşları, NAC'nin insan germ hücreleri üzerinde apoptozisi inhibe edici etkilerinin bulunduğunu rapor etmişlerdir (182). Yapılan birçok çalışmada, NAC'in antioksidan özelliğinden dolayı, uygulanan birçok toksik maddenin meydana getirdiği reaktif oksijen metabolitlerini ortadan kaldırarak, apoptozisi baskıladığı ileri sürülmüştür (183-185). Kim ve arkadaşları tarafından MDA-231 meme kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada, ROS aracılığı ile apoptozis meydana getiren Sanguinarine kullanılmıştır (186). MDA-231 meme kanseri hücrelerinin NAC ile ön muamelesi, Sanguinarine'in indüklediği apoptozis oluşumunu önlemiş ve Bcl-2 düzeylerini arttırmıştır (186). Kaminsky ve arkadaşları tarafından, insan CEM T-lösemi hücrelerinde, kaspaz-3 artışının NAC tarafından engellendiği gösterilmiştir (187). HL-60 lösemi hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada, NAC'nin, kaspaz-3 aktivitesini ve DNA fragmentasyonunu baskıladığı rapor edilmiştir (188). ASTC-a-1 insan akciğer adenokarsinom hücrelerinde NAC'nin, kaspaz-3 aktivasyonunun blokasyonuna yol açmasının yanı sıra, ROS oluşumunu inhibe ettiği ve Bax translokasyonunu engellediği bildirilmiştir (189).

Testis kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan Bleomisin'in, yüksek düzeyde ROS oluşturduğu gösterilmiştir (2). NTERA testis kanseri hücrelerinde yapılan deney sonuçlarımıza göre, Bleomisin uygulamasının oksidatif stresi indüklediğini tespit ettik. Oksidatif stres parametresi olarak protein oksidasyonu düzeyleri ölçülmüştür. Bleomisin'le inkübe edilen hücre dizisinde, protein karbonil düzeylerinde bulduğumuz artış protein oksidasyonunun arttığını; Bleomisin indüklü artmış oksidatif stresi belirgin olarak ortaya koymuştur.

Çalışmamızda NTERA hücre dizisinde Bleomisin'in apoptozise yol açtığını bulunmuştur. Bu bulgularımız literatürle paralellik göstermektedir. Bulgularımıza

dayanarak, Bleomisin'in testis kanser hücrelerinde ROS seviyelerini ve oksidatif stresi artırarak apoptozisi indüklediği yargısına varabiliriz.

Kanser tedavisinde antioksidanların kullanımı çok yaygındır (105, 106, 153, 157-164, 190). Çalışmamızda kullandığımız N-asetil sistein'in, değişik kanser tiplerinde etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur (191, 192). Fakat NTERA testis kanser hücre dizilerinde N-asetil sistein'in oksidatif stres üzerine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda N-asetil sistein uygulamasının, Bleomisin indüklü oksidatif streste, istatistiksel olarak anlamlı azalışa sebep olduğunu bulunmuştur. NTERA testis kanseri hücre dizilerinin (5 mM'lık NAC dozu) NAC ile 24 saatlik inkübasyonu, protein oksidasyon düzeylerinde azalmaya neden olmuştur. Bu bulgularımız NAC'in güçlü antioksidan özellik gösterdiğini vurgulamaktadır. Bu yükseklik, bir tiyol olan NAC'ın antioksidan özelliğinin yanı sıra, GSH öncüsü olması ile ilişkilidir. Bu özellikleri ile NAC hücreyi korumaktadır.

Yaptığımız tüm deney sonuçlarının testis kanseri olan hastalara yapılacak olan kemoterapötik tedavinin hastalığın prognozu açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü ROS üreterek hücre hasarına sebep olan Bleomisinin tedavisi sırasında antioksidanların kullanılması tedavi sürecini olumsuz yönde etkileyeceğini düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Bu çalışma, reaktif oksijen türleri üreten ilaç olan Bleomisin'in testis kanseri hücrelerinde; apoptozis, mekanizmaları üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak; oksidatif stres ve antioksidanların apoptozis üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı. Testis kanser tedavisinde bugüne kadar araştırılmamış olan NAC'in sitotoksik etkinliği belirlendi ve yeni bir tedavi stratejisi ortaya çıkarmak amacıyla Bleomisin ile etkileşimi araştırıldı.

Bulduğumuz deneysel verilere göre sonuçlarımızı şu şekilde özetleyebiliriz:

- 1) Bleomisin'in testis kanseri (NTERA) hücrelerindeki sitotoksik etkisi belirlendi ve letal dozları (LD₅₀, IC₅₀) saptandı. Saptanan değer ise 400 µg/ml'dir.
- 2) 24 saatte 400 µg/ml, 450 µg/ml ve 500 µg/ml'lik konsantrasyonlardaki bleomisin inkübasyonları sonucunda bu dozlar arasında canlılık değerleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Canlılık oranı %50 civarında bulundu. Bu yüzden NAC ile birlikte inkübasyon deneylerinde 400 µg/ml'lik doz kullanılması kararlaştırıldı.
- 3) 48 saatlik bleomisin inkübasyonunda 100 ve 150 µg/ml'de canlılık %50'ye düştü. Bu iki konsantrasyon arasında anlamlı bir fark yoktu. 48 saatte IC₅₀ dozu 100 µg/ml'dir.
- 4) 48 saatte 400 µg/ml'de bleomisin inkübasyonunda canlılık % 35 seviyesine, 72 saatte ise % 25'in altına düştü.
- 5) 72 saatlik bleomisin inkübasyonunda 100 µg/ml'de canlılık %40'ın altına düştü.
- 6) 72 saatte 400, 600 µg/ml'lik konsantrasyonlardaki bleomisin inkübasyonları sonucunda bu dozlar arasında canlılık değerleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Her iki konsantrasyonda da canlılık %25'in altında idi.
- 7) Yukarıdaki ve literatür bulgularından hareketle MTT canlılık deneylerinin, kaspaz-3 apoptozis ve protein karbonil oksidatif stres deneylerinin 24 saatlik inkübasyondan sonra, anneksin V apoptozis deneyinin 6 saatlik inkübasyondan sonra yapılması uygun görüldü.
- 8) 24 saatte N-asetil sistein'in testis kanseri (NTERA) hücrelerindeki sitotoksik etkisi belirlendi. 1 mM, 3 mM, 5 mM ve 10 mM dozların canlılığı %10 civarında düşürdüğü bulundu.
- 9) 24 saatte N-asetil sistein'in testis kanseri (NTERA) hücrelerindeki sitotoksik etkiyi belirlemek için 5 mM'lık dozun kullanılması uygun görüldü.
- 10) 24 saatte 5 mM N-asetil sistein Bleomisin'in sitotoksik etkisini %30 civarında azalttığı belirlendi. 400 µg/ml bleomisin inkübasyonunda canlılık %54 iken, 400 µg/ml Bleomisin ile 5 mM NAC inkübasyonunda canlılık %70'dir.
- 11) 48 saatte 5 mM N-asetil sistein Bleomisin'in sitotoksik etkisini %35 civarında azalttığı belirlendi. 400 µg/ml bleomisin inkübasyonunda canlılık %32 iken, 400 µg/ml Bleomisin ile 5 mM NAC inkübasyonunda canlılık %43'dür.
- 12) 72 saatte 5 mM N-asetil sistein Bleomisin'in sitotoksik etkisini %130 civarında azalttığı belirlendi. 400 µg/ml bleomisin inkübasyonunda canlılık %15,6 iken, 400 µg/ml Bleomisin ile 5 mM NAC inkübasyonunda canlılık %35,8'dir.
- 13) 400 µg/ml Bleomisin ile 5 mM NAC inkübasyonunda, NAC etkisini 24 saatte göstermeye başlamıştır. Etki 48 saatte de artarak devam etmiş ve özellikle 72 saatte en yüksek seviyeye çıkmıştır.

- 14) Bleomisin ile antioksidanların (N-asetil sistein), testis kanser hücrelerinde gerçekleştirmiş olduğu apoptozis Flow sitometri cihazında Anneksin V kiti ile yüzde olarak belirlendi. N-asetil sisteinin, Bleomisin'in sitotoksik etkisini azalttığı belirlendi.
- 15) Anneksin V kitinde 400 µg/ml Bleomisinin 6 saatlik inkübasyonu sonucunda FSC ve SSC değerlerinde bir artış gözlemlendi. Bu değer hücrelerin granüllüğünün ve boyutlarının arttığını gösterdi. Bu grafik ile apoptozis morfolojik olarak belirlenmiş oldu. Apoptozise giden ve apoptozisten ölen hücrelerin miktarı %51'dir. 24 saatlik MTT sonucuyla paraleldir.
- 16) NAC grubunun FSC ve SSC analizinde kontrol grubu ile benzerdir. Ancak %10 civarında hücre nekroz olmuştur. Bu sonuç MTT, Kaspaz-3 ve Protein karbonil sonuçları ile benzerdir.
- 17) Anneksin V kitinde 400 µg/ml Bleomisin ile birlikte 5 mM NAC 6 saatlik inkübasyon sonucunda apoptozise giden ve apoptozisten ölen hücrelerin miktarı %37'dir. 24 saatlik MTT sonucuyla paraleldir ve NAC, Bleomisinin etkisini %25 civarında azaltmıştır.
- 18) Bleomisin ile NAC'in testis kanser hücrelerinde, apoptozis, mekanizmaları ve yolları üzerindeki etkileri ortaya çıkarmak üzere kaspaz-3 ölçümleri yapıldı.
- 19) 24 saatlik inkübasyondan sonra yapılan Kaspaz-3 deneyi sonucunda NAC grubunda kontrole göre kaspaz-3 aktivitesi %8 artmıştır. Zaten Flow sitometri sonucuna göre de %5'lik bir apoptozis oluşumuna sebep olmaktadır.
- 20) 24 saatte Bleomisin grubunda Kaspaz-3 aktivitesi %62 artmıştır.
- 21) 24 saatte Bleomisin+ NAC grubunda Kaspaz-3 aktivasyonu %62'den %49'a düşerek %21 azalmıştır.
- 22) Reaktif oksijen türleri üreten ilaç olan Bleomisin'in, testis kanseri hücrelerinde, oksidatif stres markırları üzerindeki etkileri belirlemek için protein karbonil ölçümleri yapıldı.
- 23) Protein Karbonil sonuçları kaspaz-3 sonuçları ile paralellik göstermektedir.
- 24) NAC grubunda protein karbonil miktarı kontrol grubuna göre %10 azalmıştır.
- 25) Bleomisin grubunda protein karbonil miktarı kontrol grubuna göre %62 artmıştır.
- 26) Bleomisin + NAC grubunda protein karbonil miktarı kontrol grubuna göre %49 artmıştır.
- 27) Bleomisin + NAC grubunda protein karbonil miktarı Bleomisin grubuna göre %62'den %49'a düşerek %21 azalmıştır. Bu sonuç kaspaz-3 sonuçları ile birebir uyumludur.
- 28) Bu çalışmada başka kanser türlerinde negatif ve pozitif etkileri gösterilmiş olan N-asetil sistein'in, testis kanserinde, apoptozis ve oksidatif stres üzerindeki etkileri araştırıldı ve bu antioksidanın Bleomisin ile yapılan testis kanser tedavisine olumsuz etkisi olabileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Jones, R. H., and Vasey, P. A. (2003) Part I: testicular cancer--management of early disease, *Lancet Oncol* 4, 730-737.
2. Manoury, B., Nenan, S., Leclerc, O., Guenon, I., Boichot, E., Planquois, J. M., Bertrand, C. P., and Lagente, V. (2005) The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Respir Res* 6, 11.
3. Alexandre, J., Batteux, F., Nicco, C., Chereau, C., Laurent, A., Guillevin, L., Weill, B., and Goldwasser, F. (2006) Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo, *Int J Cancer* 119, 41-48.
4. Cejas, P., Casado, E., Belda-Iniesta, C., De Castro, J., Espinosa, E., Redondo, A., Sereno, M., Garcia-Cabezas, M. A., Vara, J. A., Dominguez-Caceres, A., Perona, R., and Gonzalez-Baron, M. (2004) Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain), *Cancer Causes Control* 15, 707-719.
5. Shacter, E., Williams, J. A., Hinson, R. M., Senturker, S., and Lee, Y. J. (2000) Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis, *Blood* 96, 307-313.
6. Lee, Y. J., and Shacter, E. (1999) Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells, *J Biol Chem* 274, 19792-19798.
7. Fulda, S., and Debatin, K. M. (2006) Modulation of apoptosis signaling for cancer therapy, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 54, 173-175.
8. Jacobson, M. D. (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death, *Trends Biochem Sci* 21, 83-86.
9. Jacobson, M. D., and Raff, M. C. (1995) Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen, *Nature* 374, 814-816.
10. Yildiz, M., Celik-Ozenci, C., Akan, S., Akan, I., Sati, L., Demir, R., Savas, B., Ozben, T., Samur, M., Ozdogan, M., Artac, M., and Bozcuk, H. (2006) Zoledronic acid is synergic with vinblastine to induce apoptosis in a multidrug resistance protein-1 dependent way: an in vitro study, *Cell Biol Int* 30, 278-282.
11. Ozben, T. (2006) Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer, *FEBS Lett* 580, 2903-2909.
12. Oh, S. H., and Lim, S. C. (2006) A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation, *Toxicol Appl Pharmacol* 212, 212-223.
13. Engel, R. H., and Evens, A. M. (2006) Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer, *Front Biosci* 11, 300-312.

14. Eklund, A., Eriksson, O., Hakansson, L., Larsson, K., Ohlsson, K., Venge, P., Bergstrand, H., Bjornson, A., Brattsand, R., Glennow, C., and et al. (1988) Oral N-acetylcysteine reduces selected humoral markers of inflammatory cell activity in BAL fluid from healthy smokers: correlation to effects on cellular variables, *Eur Respir J* 1, 832-838.
15. Yalcin, A., Nevruz, O., and Arpacı, F. (2002) Evaluation of the patients with malignant diseases at the GMMMA Hospital in the year of 2000, *Gülhane Tıp Dergisi* 44, 6-12.
16. (2004) www.seer.cancer.gov.
17. Garner, M. J., Turner, M. C., Ghadirian, P., and Krewski, D. (2005) Epidemiology of testicular cancer: an overview, *Int J Cancer* 116, 331-339.
18. Mizutani, Y., Nakamura, T., Nomoto, T., Kawauchi, A., and Miki, T. (2006) [Progress in therapy for testicular tumors], *Gan To Kagaku Ryoho* 33, 183-187.
19. Gilligan, T. (2007) Testis cancer: rare, but curable with prompt referral, *Cleve Clin J Med* 74, 817-825.
20. Huddart, R. A., Norman, A., Moynihan, C., Horwich, A., Parker, C., Nicholls, E., and Dearnaley, D. P. (2005) Fertility, gonadal and sexual function in survivors of testicular cancer, *Br J Cancer* 93, 200-207.
21. Kawai, K., Hinotsu, S., Oikawa, T., Sekido, N., Hattori, K., Miyanaga, N., Hasegawa, Y., Kojima, H., Shimazui, T., and Akaza, H. (2006) Treatment outcome of metastatic testicular cancer at a single institution in Japan, a country with low incidence of germ cell tumor, *Jpn J Clin Oncol* 36, 723-730.
22. Delbes, G., Hales, B. F., and Robaire, B. (2007) Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity, *J Androl* 28, 241-249; discussion 250-241.
23. Huyghe, E., Plante, P., and Thonneau, P. F. (2007) Testicular cancer variations in time and space in Europe, *Eur Urol* 51, 621-628.
24. Rukstalis, D. B. (1996) Molecular mechanisms of testicular carcinogenesis, *World J Urol* 14, 347-352.
25. Carver, B. S., and Sheinfeld, J. (2005) Germ cell tumors of the testis, *Ann Surg Oncol* 12, 871-880.
26. Zunino, F., Pratesi, G., (2002) *Scientific Basis of Cancer Treatment*, Vol. 1, 2nd edition ed., Oxford University Press, New York.
27. di Pietro, A., Vries, E. G., Gietema, J. A., Spierings, D. C., and de Jong, S. (2005) Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemo-sensitive solid tumours, *Int J Biochem Cell Biol* 37, 2437-2456.
28. Chaganti, R. S., and Houldsworth, J. (2000) Genetics and biology of adult human male germ cell tumors, *Cancer Res* 60, 1475-1482.
29. Lutke Holzik, M. F., Rapley, E. A., Hoekstra, H. J., Sleijfer, D. T., Nolte, I. M., and Sijmons, R. H. (2004) Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours, *Lancet Oncol* 5, 363-371.

30. Shabbir, M., and Morgan, R. J. (2004) Testicular cancer, *J R Soc Promot Health* 124, 217-218.
31. Sleijfer, S. (2001) Bleomycin-induced pneumonitis, *Chest* 120, 617-624.
32. Ertuğrul, F., Kayacan, N., Çete, N., Karşlı, B., and Erdoğan, T. Bleomycin and Anesthesia: Two Case Reports.
33. Claussen, C. A., and Long, E. C. (1999) Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin, *Chem Rev* 99, 2797-2816.
34. Sugiyama, M., Kumagai, T., Hayashida, M., Maruyama, M., and Matoba, Y. (2002) The 1.6-Å crystal structure of the copper(II)-bound bleomycin complexed with the bleomycin-binding protein from bleomycin-producing *Streptomyces verticillus*, *J Biol Chem* 277, 2311-2320.
35. Abraham, A. T., Zhou, X., and Hecht, S. M. (2001) Metallobleomycin-mediated cleavage of DNA not involving a threading-intercalation mechanism, *J Am Chem Soc* 123, 5167-5175.
36. Petering, D. H., Byrnes, R. W., and Antholine, W. E. (1990) The role of redox-active metals in the mechanism of action of bleomycin, *Chem Biol Interact* 73, 133-182.
37. Day, R. M., Suzuki, Y. J., Lum, J. M., White, A. C., and Fanburg, B. L. (2002) Bleomycin upregulates expression of gamma-glutamylcysteine synthetase in pulmonary artery endothelial cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L1349-1357.
38. Sausville, E. A., Stein, R. W., Peisach, J., and Horwitz, S. B. (1978) Properties and products of the degradation of DNA by bleomycin and iron(II), *Biochemistry* 17, 2746-2754.
39. Söğüt, S., Songur, A., Yılmaz, Y., and Özyurt, H. (2004) İntratrakeal bleomisin uygulanmış sıçan akciğer dokusunda metabolik enzim aktiviteleri üzerine E vitamini ve erdosisteinin etkisi, *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2, 13-18.
40. Hagiwara, S. I., Ishii, Y., and Kitamura, S. (2000) Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice, *Am J Respir Crit Care Med* 162, 225-231.
41. Chabner, B. A. ((2008)) *Bleomycin in Harrison's Manual of Oncology* McGraw-Hill Companies Inc., New York,.
42. Chen, J., and Stubbe, J. (2004) Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues, *Curr Opin Chem Biol* 8, 175-181.
43. Chen, H. J., Wu, S. B., and Chang, C. M. (2003) Biological and dietary antioxidants protect against DNA nitration induced by reaction of hypochlorous acid with nitrite, *Arch Biochem Biophys* 415, 109-116.
44. Kessinger, A., and Wigton, R. S. (1987) Intracavitary bleomycin and tetracycline in the management of malignant pleural effusions: a randomized study, *J Surg Oncol* 36, 81-83.
45. Cummings, M. C., Winterford, C. M., and Walker, N. I. (1997) Apoptosis, *Am J Surg Pathol* 21, 88-101.

46. Kiechle, F. L., and Zhang, X. (2002) Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications, *Clin Chim Acta* 326, 27-45.
47. Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C., and Beckman, B. (2003) Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system, *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 995-1003.
48. Carmody, R. J., and Cotter, T. G. (2001) Signalling apoptosis: a radical approach, *Redox Rep* 6, 77-90.
49. Öktem, S., Özhan, M., and Özol, D. (2001) Apoptozisin Önemi., *Toraks Dergisi* 2, 91-95.
50. Hung, R. W., and Chow, A. W. (2004) Dissecting the "end game": clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assessment of apoptosis, *Clin Invest Med* 27, 324-344.
51. Chandra, J., Samali, A., and Orrenius, S. (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress, *Free Radic Biol Med* 29, 323-333.
52. Haddad, J. J. (2004) Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment, *Int Immunopharmacol* 4, 475-493.
53. Thornberry, N. A. (1998) Caspases: key mediators of apoptosis, *Chem Biol* 5, R97-103.
54. Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within, *Science* 281, 1312-1316.
55. Aslan, M., and Freeman, B. A. (2002) Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses, *Immunol Res* 26, 107-118.
56. Mates, J. M., and Sanchez-Jimenez, F. M. (2000) Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy, *Int J Biochem Cell Biol* 32, 157-170.
57. Blatt, N. B., and Glick, G. D. (2001) Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death, *Bioorg Med Chem* 9, 1371-1384.
58. Guchelaar, H. J., Vermes, A., Vermes, I., and Haanen, C. (1997) Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy, *Pharm World Sci* 19, 119-125.
59. Hunot, S., and Flavell, R. A. (2001) Apoptosis. Death of a monopoly?, *Science* 292, 865-866.
60. Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation, *Science* 281, 1305-1308.
61. Kataoka, S., and Tsuruo, T. (1996) Physician Education: Apoptosis, *Oncologist* 1, 399-401.
62. Curtin, J. F., and Cotter, T. G. (2003) Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis, *Cell Signal* 15, 983-992.

63. Nunez, G., Benedict, M. A., Hu, Y., and Inohara, N. (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway, *Oncogene* 17, 3237-3245.
64. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., and Berneman, Z. N. (2005) Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer, *Ann Hematol* 84, 627-639.
65. Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
66. Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., and Henson, P. M. (1997) Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase, *J Biol Chem* 272, 26159-26165.
67. Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 267, 1456-1462.
68. Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy, *Exp Cell Res* 256, 42-49.
69. MacFarlane, M. (2003) TRAIL-induced signalling and apoptosis, *Toxicol Lett* 139, 89-97.
70. Yang, X., Stennicke, H. R., Wang, B., Green, D. R., Janicke, R. U., Srinivasan, A., Seth, P., Salvesen, G. S., and Froelich, C. J. (1998) Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7, *J Biol Chem* 273, 34278-34283.
71. Sanlioglu, A. D., Aydin, C., Bozcuk, H., Terzioglu, E., and Sanlioglu, S. (2004) Fundamental principals of tumor necrosis factor-alpha gene therapy approach and implications for patients with lung carcinoma, *Lung Cancer* 44, 199-211.
72. Sanlioglu, A. D., Dirice, E., Aydin, C., Erin, N., Koksoy, S., and Sanlioglu, S. (2005) Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells, *BMC Cancer* 5, 54.
73. Sanlioglu, A. D., Koksall, I. T., Ciftcioglu, A., Baykara, M., Luleci, G., and Sanlioglu, S. (2007) Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues, *J Urol* 177, 359-364.
74. Sanlioglu, A. D., Koksall, I. T., Karacay, B., Baykara, M., Luleci, G., and Sanlioglu, S. (2006) Adenovirus-mediated IKKbeta expression sensitizes prostate carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis, *Cancer Gene Ther* 13, 21-31.
75. Yagita, H., Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., and Okumura, K. (2004) TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy, *Cancer Sci* 95, 777-783.
76. Thorburn, A. (2004) Death receptor-induced cell killing, *Cell Signal* 16, 139-144.
77. Dejosez, M., Ramp, U., Mahotka, C., Krieg, A., Walczak, H., Gabbert, H. E., and Gerharz, C. D. (2000) Sensitivity to TRAIL/APO-2L-mediated apoptosis

in human renal cell carcinomas and its enhancement by topotecan, *Cell Death Differ* 7, 1127-1136.

78. Kelley, S. K., and Ashkenazi, A. (2004) Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL, *Curr Opin Pharmacol* 4, 333-339.
79. Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor, *Cell* 88, 355-365.
80. Call, J. A., Eckhardt, S. G., and Camidge, D. R. (2008) Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment, *Lancet Oncol* 9, 1002-1011.
81. Kim, R. (2005) Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy, *Cancer* 103, 1551-1560.
82. Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors, *Curr Opin Cell Biol* 11, 255-260.
83. Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
84. Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature* 391, 96-99.
85. Yamaguchi, H., and Wang, H. G. (2002) Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL, *J Biol Chem* 277, 41604-41612.
86. Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis, *J Cell Biol* 144, 891-901.
87. Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Dive, C., and Hickman, J. A. (1999) Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis, *J Cell Biol* 144, 903-914.
88. Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., and Salvesen, G. S. (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing, *J Biol Chem* 274, 8359-8362.
89. Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R., and Martin, S. J. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner, *J Cell Biol* 144, 281-292.
90. Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H., and Debatin, K. M. (1996) Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells, *Nat Med* 2, 574-577.
91. Muller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E. M., Walczak, H., Hofmann, W. J., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Galle, P. R. (1997) Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas)

receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53, *J Clin Invest* 99, 403-413.

92. Kaufmann, S. H., and Gores, G. J. (2000) Apoptosis in cancer: cause and cure, *Bioessays* 22, 1007-1017.
93. Curtin, J. F., Donovan, M., and Cotter, T. G. (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis, *J Immunol Methods* 265, 49-72.
94. Abdel-Latif, M. M., Raouf, A. A., Sabra, K., Kelleher, D., and Reynolds, J. V. (2005) Vitamin C enhances chemosensitization of esophageal cancer cells in vitro, *J Chemother* 17, 539-549.
95. Wolf, B. B., and Green, D. R. (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases, *J Biol Chem* 274, 20049-20052.
96. Graf, D., Bode, J. G., and Haussinger, D. (2007) Caspases and receptor cleavage, *Arch Biochem Biophys* 462, 162-170.
97. Hill, M. M., Adrain, C., and Martin, S. J. (2003) Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows, *Mol Interv* 3, 19-26.
98. D'Amelio, M., Tino, E., and Cecconi, F. (2008) The apoptosome: emerging insights and new potential targets for drug design, *Pharm Res* 25, 740-751.
99. Chang, H. Y., and Yang, X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 821-846.
100. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature* 391, 43-50.
101. Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. (1999) Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation, *Nature* 401, 168-173.
102. Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P. (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications, *Drug Resist Updat* 7, 97-110.
103. Mantovani, G., Maccio, A., Madeddu, C., Mura, L., Gramignano, G., Lusso, M. R., Massa, E., Mocci, M., and Serpe, R. (2003) Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress, *J Mol Med* 81, 664-673.
104. Conklin, K. A. (2004) Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness, *Integr Cancer Ther* 3, 294-300.
105. Lamson, D. W., and Brignall, M. S. (1999) Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies, *Altern Med Rev* 4, 304-329.
106. Akan, I., Akan, S., Akca, H., Savas, B., and Ozben, T. (2004) N-acetylcysteine enhances multidrug resistance-associated protein 1 mediated doxorubicin resistance, *Eur J Clin Invest* 34, 683-689.

107. Quiles, J. L., Huertas, J. R., Battino, M., Mataix, J., and Ramirez-Tortosa, M. C. (2002) Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity, *Toxicology* 180, 79-95.
108. Davies, K. J. (1999) The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress, *IUBMB Life* 48, 41-47.
109. Kong, Q., Beel, J. A., and Lillehei, K. O. (2000) A threshold concept for cancer therapy, *Med Hypotheses* 55, 29-35.
110. Higuchi, Y. (2003) Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress, *Biochem Pharmacol* 66, 1527-1535.
111. Kroemer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis, *Annu Rev Physiol* 60, 619-642.
112. Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000) Mitochondrial control of cell death, *Nat Med* 6, 513-519.
113. Kehrer, J. P. (2000) Cause-effect of oxidative stress and apoptosis, *Teratology* 62, 235-236.
114. Kannan, K., and Jain, S. K. (2000) Oxidative stress and apoptosis, *Pathophysiology* 7, 153-163.
115. Johnson, T. M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Lowenstein, R. A., and Finkel, T. (1996) Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11848-11852.
116. Borek, C. (2004) Dietary antioxidants and human cancer, *Integr Cancer Ther* 3, 333-341.
117. Moss, R. W. (2001) The concurrent use of antioxidants and cytotoxic cancer treatments, in 7th International Symposium for Biologically Closed Electric Circuits in Biomedicine, Marienlyst Conference Centre, Helsingor, Denmark.
118. Çavdar, C., Sifil, A., and Çamsarı, T. (1997) Reactive Oxygen Particles And Antioxidants In The Pathogenesis And Treatment Of Diseases, *Office Journal of the Turkish Nephrology* 3, 96-101.
119. Baykal, Y., and Kocabalkan, F. (2000) Serbest radikaller ve hücre hasarı.
120. Sikka, S. C. (1996) Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function, *Front Biosci* 1, e78-86.
121. Günaydın, B., and Çelebi, H. (2003) Genel anesteziyelerin serbest radikal ve antioksidanlarla ilişkisi. , *Anestezi Dergisi* 11, 87-98.
122. Freeman, B. A., and Crapo, J. D. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury, *Lab Invest* 47, 412-426.
123. Stahl W, S. H. (2002) Reactive oxygen species., *Research Monographs.*, 1-2.
124. Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev* 59, 527-605.

125. Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., and Flohe, L. (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide, *FEBS Lett* 42, 68-72.
126. Fantone, J. C., and Ward, P. A. (1982) Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions, *Am J Pathol* 107, 395-418.
127. Babior, B. M., Lambeth, J. D., and Nauseef, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase, *Arch Biochem Biophys* 397, 342-344.
128. Yu, B. P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiol Rev* 74, 139-162.
129. Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajewski, E., and Dizdaroglu, M. (1991) Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide, *Biochem J* 273 (Pt 3), 601-604.
130. Nikjoo, H., O'Neill, P., Terrissol, M., and Goodhead, D. T. (1994) Modelling of radiation-induced DNA damage: the early physical and chemical event, *Int J Radiat Biol* 66, 453-457.
131. Park JL, L. B. (1999) Mechanisms of myocardial reperfusion injury, *Ann Thorac Surg.* 689, 1905-1912.
132. Spiteller, G. (2006) Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radic Biol Med* 41, 362-387.
133. Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic Biol Med* 11, 81-128.
134. Kanner, J., German, J. B., and Kinsella, J. E. (1987) Initiation of lipid peroxidation in biological systems, *Crit Rev Food Sci Nutr* 25, 317-364.
135. Spiteller, G. (2002) Do changes in the cell membrane structure induce the generation of lipid peroxidation products which serve as first signalling molecules in cell to cell communication?, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 67, 151-162.
136. Dobashi, K., Ghosh, B., Orak, J., Singh, I., and Singh, A. (2000) Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses.
137. Vernet, P., Aitken, R. J., and Drevet, J. R. (2004) Antioxidant strategies in the epididymis, *Mol Cell Endocrinol* 216, 31-39.
138. Sudheesh, S., and Vijayalakshmi, N. R. (2005) Flavonoids from *Punica granatum*--potential antiperoxidative agents, *Fitoterapia* 76, 181-186.
139. Sanocka, D., and Kurpisz, M. (2004) Reactive oxygen species and sperm cells, *Reprod Biol Endocrinol* 2, 12.
140. Yüce, A., and Aksakal, M. (2007) *Ratların Karaciğer ve Testis Dokusundaki Antioksidan Aktivite Üzerine Nar Suyunun Etkisi*, 21, 253-256.

141. Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *J Biol Chem* 272, 20313-20316.
142. Kayalı, R., and Çakatay, U. (2004) Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları, *Cerrahpaşa J Med* 35, 83-90.
143. Shacter, E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples, *Drug Metab Rev* 32, 307-326.
144. Slusser, S. O., Grotyohann, L. W., Martin, L. F., and Scaduto, R. C., Jr. (1990) Glutathione catabolism by the ischemic rat kidney, *Am J Physiol* 258, F1546-1553.
145. Kim, Y. G., Kim, S. K., Kwon, J. W., Park, O. J., Kim, S. G., Kim, Y. C., and Lee, M. G. (2003) Effects of cysteine on amino acid concentrations and transsulfuration enzyme activities in rat liver with protein-calorie malnutrition, *Life Sci* 72, 1171-1181.
146. Meister, A., and Anderson, M. E. (1983) Glutathione, *Annu Rev Biochem* 52, 711-760.
147. Komarnisky, L. A., Christopherson, R. J., and Basu, T. K. (2003) Sulfur: its clinical and toxicologic aspects, *Nutrition* 19, 54-61.
148. Parcell, S. (2002) Sulfur in human nutrition and applications in medicine, *Altern Med Rev* 7, 22-44.
149. Kelly, G. S. (1998) Clinical applications of N-acetylcysteine, *Altern Med Rev* 3, 114-127.
150. Delneste, Y., Jeannin, P., Potier, L., Romero, P., and Bonnefoy, J. Y. (1997) N-acetyl-L-cysteine exhibits antitumoral activity by increasing tumor necrosis factor alpha-dependent T-cell cytotoxicity, *Blood* 90, 1124-1132.
151. Martinez, E., and Domingo, P. (1991) N-acetylcysteine as chemoprotectant in cancer chemotherapy, *Lancet* 338, 249.
152. Albini, A., D'Agostini, F., Giunciuglio, D., Paglieri, I., Balansky, R., and De Flora, S. (1995) Inhibition of invasion, gelatinase activity, tumor take and metastasis of malignant cells by N-acetylcysteine, *Int J Cancer* 61, 121-129.
153. Moss, R. W. (2006) Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants?, *Integr Cancer Ther* 5, 63-82.
154. Salganik, R. I. (2001) The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population, *J Am Coll Nutr* 20, 464S-472S; discussion 473S-475S.
155. D'Andrea, G. M. (2005) Use of antioxidants during chemotherapy and radiotherapy should be avoided, *CA Cancer J Clin* 55, 319-321.
156. Ozben, T. (2007) Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy, *J Pharm Sci* 96, 2181-2196.
157. Conklin, K. A. (2000) Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects, *Nutr Cancer* 37, 1-18.

158. Lamson, D. W., and Brignall, M. S. (2000) Antioxidants and cancer, part 3: quercetin, *Altern Med Rev* 5, 196-208.
159. Lamson, D. W., and Brignall, M. S. (2000) Antioxidants and cancer therapy II: quick reference guide, *Altern Med Rev* 5, 152-163.
160. Lamson, D. W., and Brignall, M. S. (2001) Natural agents in the prevention of cancer, part two: preclinical data and chemoprevention for common cancers, *Altern Med Rev* 6, 167-187.
161. Lamson, D. W., and Brignall, M. S. (2001) Natural agents in the prevention of cancer. Part 1: human chemoprevention trials, *Altern Med Rev* 6, 7-19.
162. Pathak, A. K., Bhutani, M., Guleria, R., Bal, S., Mohan, A., Mohanti, B. K., Sharma, A., Pathak, R., Bhardwaj, N. K., Prasad, K. N., and Kochupillai, V. (2005) Chemotherapy alone vs. chemotherapy plus high dose multiple antioxidants in patients with advanced non small cell lung cancer, *J Am Coll Nutr* 24, 16-21.
163. Pathak, A. K., Singh, N., Khanna, N., Reddy, V. G., Prasad, K. N., and Kochupillai, V. (2002) Potentiation of the effect of paclitaxel and carboplatin by antioxidant mixture on human lung cancer h520 cells, *J Am Coll Nutr* 21, 416-421.
164. Drisko, J. A., Chapman, J., and Hunter, V. J. (2003) The use of antioxidant therapies during chemotherapy, *Gynecol Oncol* 88, 434-439.
165. Conklin, K. A. (2002) Dietary polyunsaturated fatty acids: impact on cancer chemotherapy and radiation, *Altern Med Rev* 7, 4-21.
166. Conklin, K. A. (2004) Cancer chemotherapy and antioxidants, *J Nutr* 134, 3201S-3204S.
167. Slavik, M., and Saiers, J. H. (1983) Phase I clinical study of acetylcysteine's preventing ifosfamide-induced hematuria, *Semin Oncol* 10, 62-65.
168. Roller, A., and Weller, M. (1998) Antioxidants specifically inhibit cisplatin cytotoxicity of human malignant glioma cells, *Anticancer Res* 18, 4493-4497.
169. Miyajima, A., Nakashima, J., Tachibana, M., Nakamura, K., Hayakawa, M., and Murai, M. (1999) N-acetylcysteine modifies cis-dichlorodiammineplatinum-induced effects in bladder cancer cells, *Jpn J Cancer Res* 90, 565-570.
170. Galvan, L., Huang, C. H., Prestayko, A. W., Stout, J. T., Evans, J. E., and Crooke, S. T. (1981) Inhibition of bleomycin-induced DNA breakage by superoxide dismutase, *Cancer Res* 41, 5103-5106.
171. Cunningham, M. L., Ringrose, P. S., and Lokesh, B. R. (1984) Inhibition of the genotoxicity of bleomycin by superoxide dismutase, *Mutat Res* 135, 199-202.
172. Armutçu, F., Söğüt, S., Gürel, A., Kart, L., and Coşkun, Ö. (2004) Bleomisin Verilen Ratlarda Plazma Ve Eritrositlerin Oksidan Ve Antioksidan Durumu: Erdostein Ve Vitamin E'nin Koruyucu Rolü, *International Journal of Hematology and Oncology* 14, 205-213.

173. Tamagawa, K., Taooka, Y., Maeda, A., Hiyama, K., Ishioka, S., and Yamakido, M. (2000) Inhibitory effects of a lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *Am J Respir Crit Care Med* 161, 1279-1284.
174. Hong, J. S., Ko, H. H., Han, E. S., and Lee, C. S. (2003) Inhibition of bleomycin-induced cell death in rat alveolar macrophages and human lung epithelial cells by ambroxol, *Biochem Pharmacol* 66, 1297-1306.
175. Abdollahi, T., Robertson, N. M., Abdollahi, A., and Litwack, G. (2005) Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by IL-8 is mediated by the p38-MAPK pathway in OVCAR3 cells, *Apoptosis* 10, 1383-1393.
176. Schweyer, S., Soruri, A., Heintze, A., Radzun, H. J., and Fayyazi, A. (2004) The role of reactive oxygen species in cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines, *Int J Oncol* 25, 1671-1676.
177. Kent, A. (2001) Altered Expression of Ape1/ref-1 in Germ Cell Tumors and Overexpression in NT2 Cells Confers Resistance to Bleomycin and Radiation, American Association for Cancer Research.
178. Seitz, S. J., Schleithoff, E. S., Koch, A., Schuster, A., Teufel, A., Staib, F., Stremmel, W., Melino, G., Krammer, P. H., Schilling, T., and Muller, M. (2009) Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway, *Int J Cancer*.
179. Cao, X. H., Zhao, S. S., Liu, D. Y., Wang, Z., Niu, L. L., Hou, L. H., and Wang, C. L. ROS-Ca(2+) is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis, *Chem Biol Interact* 190, 16-27.
180. Mungunsukh, O., Griffin, A. J., Lee, Y. H., and Day, R. M. Bleomycin induces the extrinsic apoptotic pathway in pulmonary endothelial cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298, L696-703.
181. Song, Y., Liang, X., Hu, Y., Wang, Y., Yu, H., and Yang, K. (2008) p,p'-DDE induces mitochondria-mediated apoptosis of cultured rat Sertoli cells, *Toxicology* 253, 53-61.
182. Erkkila, K., Hirvonen, V., Wuokko, E., Parvonen, M., and Dunkel, L. (1998) N-acetyl-L-cysteine inhibits apoptosis in human male germ cells in vitro, *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2523-2531.
183. El-Najjar, N., Chatila, M., Moukadem, H., Vuorela, H., Ocker, M., Gandesiri, M., Schneider-Stock, R., and Gali-Muhtasib, H. Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling, *Apoptosis* 15, 183-195.
184. Chiu, T. H., Lai, W. W., Hsia, T. C., Yang, J. S., Lai, T. Y., Wu, P. P., Ma, C. Y., Yeh, C. C., Ho, C. C., Lu, H. F., Wood, W. G., and Chung, J. G. (2009) Aloe-emodin induces cell death through S-phase arrest and caspase-dependent pathways in human tongue squamous cancer SCC-4 cells, *Anticancer Res* 29, 4503-4511.

185. Cao, X. H., Wang, A. H., Wang, C. L., Mao, D. Z., Lu, M. F., Cui, Y. Q., and Jiao, R. Z. Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway, *Chem Biol Interact* 183, 357-362.
186. Kim, S., Lee, T. J., Leem, J., Choi, K. S., Park, J. W., and Kwon, T. K. (2008) Sanguinarine-induced apoptosis: generation of ROS, down-regulation of Bcl-2, c-FLIP, and synergy with TRAIL, *J Cell Biochem* 104, 895-907.
187. Kaminsky, V., Kulachkovskyy, O., and Stoika, R. (2008) A decisive role of mitochondria in defining rate and intensity of apoptosis induction by different alkaloids, *Toxicol Lett* 177, 168-181.
188. Hou, D. X., Tong, X., Terahara, N., Luo, D., and Fujii, M. (2005) Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway, *Arch Biochem Biophys* 440, 101-109.
189. Sun, L., Chen, T., Wang, X., Chen, Y., and Wei, X. (2009) Bufalin Induces Reactive Oxygen Species Dependent Bax Translocation and Apoptosis in ASTC-a-1 Cells, *Evid Based Complement Alternat Med*.
190. Akbas H.S., T. M., Ozben T. (2006) Concurrent Use of Antioxidants in Cancer Therapy: An Update *Expert Review of Clinical Immunology* 2, 931-939.
191. Zheng, L., Tong, Q., and Wu, C. (2004) Growth-inhibitory effects of curcumin on ovary cancer cells and its mechanisms, *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 24, 55-58.
192. Chauhan, D. P. (2002) Chemotherapeutic potential of curcumin for colorectal cancer, *Curr Pharm Des* 8, 1695-1706.

ÖZGEÇMİŞ

Ertan KÜÇÜKSAYAN, 1983 yılında Denizli' de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Denizli' de tamamladı. 2003 yılında üniversite eğitimine başladığı Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2007 yılında ikincilikle mezun oldu. 2008 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.