

**İNSAN LÖSEMİ (HL-60) HÜCRE DİZİSİNDE
PİRİDİN 2-KARBALDOKSİM LİGANDI
ve
PT(II) KOMPLEKSİNİN
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mediha ALKAN
Yüksek Lisans Tezi

**İNSAN LÖSEMİ (HL-60) HÜCRE DİZİSİNDE
PİRİDİN 2-KARBALDOKSİM LİGANDI ve
PT(II) KOMPLEKSİNİN APOPTOTİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mediha ALKAN
Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Anabilim Dalı
Eskişehir, Ekim 2009

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Miriş DİKMEN

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Mediha ALKAN
Doğum tarihi ve yeri : 1983, BULGARİSTAN
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : Çankaya Mah. Göçmen Evleri 8. Blok
Daire: 8 Eskişehir
Telefon : 0 222 219 05 29
e-posta : medihaalkan@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlköğretim : Kutipoğlu İlköğretim Okulu, 1990 - 1995
Ortaokul : Atatürk İlköğretim Okulu, 1995 - 1998
Lise : Eskişehir Anadolu Lisesi 1998 - 2002
Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-
Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümü, 2002 -
2006
Yüksek Lisans : Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, 2006 –
Yabancı Diller : İngilizce (orta düzeyde)

Mesleki Deneyim

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kan Merkezi: 13 Aralık 2006 tarihinden itibaren halen burada görev yapmaktayım.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, insan lösemi (HL-60) hücre dizisinde sentez maddeleri olan Piridin-2-Karbaldoksim Ligandı ve Platin(II) Pt(II)]kompleksinin apoptotik ve sitotoksik etkileri, sisplatinin etkileri ile karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır. Özellikle sisplatinin antikanserojenik etki mekanizması örnek alınarak, platin(II) kompleksinin HL-60 hücre dizisi üzerinde antiproliferatif bir etkiye sahip olup olacağı düşünülmüş, apoptotik ve sitotoksik etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddelerden Piridin-2-Karbaldoksim Ligandı ve Platin (II) Kompleksi, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Kadriye BENKLİ tarafından sentez edilmiştir.

Hücre kültüründe sitotoksik etkiler 3 farklı inkübasyon süresine göre değerlendirilmiştir. Apoptotik etki de hem hücre akış sitometresi ve agaroz jelde DNA fragmentasyon yöntemi ile araştırılmıştır. Ancak hücre akış sitometresi (flow sitometri) de apoptotik etki 24. saatlik inkübasyon ile değerlendirildiği için, agaroz jel elektroforezi ile DNA fragmentasyonu analizi de aynı inkübasyon süresinde araştırılmıştır.

Tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) Hücre Kültürü Laboratuvarı ve Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Tezim süresince, bilgisi ve desteği ile bana her zaman yardımcı olan, yoğun mesailer harcadığımız, kendisinden çok şey öğrendiğim, benimle birlikte benim kadar uğraşan danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Miriş DİKMEN' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma boyunca bana her türlü olanağı sağlayan ve yüksek lisans dönemim süresince bana vermiş olduğu destekten dolayı Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK hocama, tezime sağladığı katkılardan dolayı sayın hocam Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Kadriye BENKLİ' ye, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Zerrin CANTÜRK' teşekkürlerimi sunarım.

Deney çalışmalarında benden yardımını hiç esirgemeyen arkadaşım Sinem SAĞIROĞLU' na ve ayrıca Zeynep BOR' a, her zaman beni yüreklendiren canım annem ve biricik babama, beni daima anlayışla karşılayan ve destek olan Fahri GÜNEŞ' e teşekkürü bir borç bilirim.

Mediha ALKAN

İNSAN LÖSEMİ (HL-60) HÜCRE DİZİSİNDE PİRİDİN-2-KARBALDOKSİM LİGANDI ve PT(II) KOMPLEKSİNİN APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Sisplatin, sisplatinyum ya da **cis-diamindikloroplatinyum(II) (CDDP)**, lenfomalar, bazı karsinomlar, sarkomalar dahil pek çok kanser tipinde kullanılan platin kökenli bir kemoterapi ilacıdır. Karboplatin ve oksaliplatinin de dahil olduğu anti-kanser ilaçlarının ilk üyelerindendir. Bu platin kompleksleri, DNA ile çapraz bağlantılar yaparak, apoptozisi tetiklemektedir. Akut miyelositik lösemi, (AML), lösemik öncül hücrelerin (miyeloid), kontrolsüz olarak çoğalmalarının yanı sıra olgunlaşma ve farklılaşma özelliklerini kaybetmeleri ile ortaya çıkmaktadır. Biz bu çalışmada, insan lösemi HL-60 hücre dizisinde, piridin-2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksinin sitotoksik ve apoptotik etkilerini sisplatinle karşılaştırmalı olarak araştırmayı amaçladık. Sitotoksik etki MTT, apoptotik etki de flow sitometrik ve DNA fragmentasyon yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Kültür ortamında çoğaltılan insan HL-60 hücrelerine sisplatin, piridin-2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) Kompleksi'nin 5, 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonları uygulanmış ve 24, 48 ve 72. saatlerdeki sitotoksik etkileri belirlenmiştir. ApopNexinTM FITC apoptozis belirleme kiti kullanılarak, flow sitometri cihazında 25, 50, 100 µM sisplatin, piridin-2-karbaldoksim ligandı ve Pt(II) Kompleksi konsantrasyonlarının, HL-60 hücrelerinde 24 saatlik apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Yine sisplatin, piridin-2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) Kompleksi'nin 5, 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarının HL-60 hücrelerinde, 24 saatlik inkübasyon sonrası apoptotik etkileri, agaroz jel DNA fragmentasyon yöntemi ile araştırılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, sisplatin ve platin (II) kompleksi konsantrasyon ve zamana bağlı olarak HL60 hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir. Flow sitometri ve agaroz jel fragmentasyonu sonuçlarına göre, sisplatin, piridin-2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksinin HL60 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonunda, önemli bir apoptotik etki belirlenmemiş olup nekrotik hücre ölüm mekanizmasının apoptoza göre daha fazla kullanıldığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: HL-60, platin, MTT, apoptozis, flow Sitometri, DNA fragmentasyonu

A RESEARCH OF APOPTOTIC

EFFECTS OF PYRIDINE 2-CARBALDOKSIM LIGAND and PT(II) COMPLEX IN HUMAN LEUKEMIA CELL LINE (HL-60)

ABSTRACT

Cisplatin, cisplatinum, or *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (CDDP) is a platinum-based chemotherapy drug which is used to treat various types of cancers including sarcomas, some carcinomas, lymphomas. It is the first member of a class of anti-cancer drugs which also includes carboplatin and oxaliplatin. These platinum complexes react *in vivo*, binding to and causing crosslinking of DNA which triggers apoptosis. In the light of this information, Pyridine-2-Carbaldoksim Ligand and Platin(Pt)(II) complex was synthesized. Acute myelocytic leukemia(AML) emerges by means of not only uncontrolled reproduction of the leukemic precursor cells(myeloid) but also the lose of maturation and differentiation characteristics of these cells. HL-60 cells which are the cell line of human cells are reproduced through being implanted to the cell culture plate in the culture medium RPMI-1640. MTT method was applied to these reproduced cells. Cisplatin, Pyridine-2-Carbaldoksim Ligand and Platin(Pt)(II) complex was given at 5 doses as followed 5, 10, 25, 50, 100 μ M, after 24, 48 and 72 hours incubation, experiment results were examined at 570nm wavelength and its noxious(cytotoxic) effect on the cells were observed. Cisplatin, Pyridine-2-Carbaldoksim Ligand and Platin(Pt)(II) complex was given at five doses as followed; 5, 10, 25, 50, 100 μ M, and the cells were kept in a 5% of incubator at 37 °C. After the incubation, the cells were taken out of their culture plates and by using MILLIPORE ApopNexinTM FITC Apoptosis Detection Kit, measurements were carried out by the flow cytometry device. Apoptosis rate and cell activity rate were determined according to the results of the measurements. The cells, cultured as 1×10^6 cell/ml, were transferred to 2 ml 6-well plates, then cisplatin, pyridine 2-carbaldoksim ligand and Pt (II) complex were given at determined doses. After 24h treatment, each 2 ml cell-substance mixtures were taken from wells and pelleted. The obtained cell pellet was used to study DNA fragmentation. Isolation of pure DNA is followed by separation of DNA by electrophoresis (80 mV) in agarose gel.

In this study, cisplatin the complex of Pyridine-2-Carbaldoksim Ligand and Platin(Pt)(II) was observed to show cytotoxic effect on the cells after 24, 48 and 72 hours of MTT results. While on average there was 1.5% rate of apoptosis, with its highest rate in cisplatin cell, 7,2% of necrosis was observed in HL-60 cell, according to the obtained flow cytometry. These agents that were given at a limited concentrations to the HL-60 cells were caused to nacrosis at the HL-60 cells rather than leading the cells to the systematical death. DNA fragmentation(DNA ladder sight) that were carried out showed that apoptosis was not observed at the cells.

Key Words: HL-60, platin, MTT, apoptosis, flow cytometry, DNA fragmentation

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	1
Kanser	1
<i>Kanserin Oluşumu</i>	2
<i>Hücre Siklusu (Döngüsü)</i>	2
Apoptozis	4
<i>Apoptozisin Mekanizmaları</i>	6
<i>Ölüm Reseptörü Yolağı</i>	6
<i>Mitokondriyal Yolak</i>	6
<i>Apoptozise Karsı Mekanizmalar</i>	6
Kanser ve Apoptozis İlişkisi	7
Lenfositler	8
<i>B lenfositler</i>	8
<i>T lenfositler</i>	9
<i>CD-4 Yardımcı T Lenfositleri (T Helper</i>	10
<i>CD-8 T Lenfositleri</i>	10
<i>Sitotoksik T Lenfositleri (CTL)</i>	10
<i>Regülatör T Lenfositleri</i>	11
<i>Doğal Öldürücü (NK = Natural Killer) Hücreler</i>	11
Lösemi	11
<i>Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)</i>	12
<i>Kronik Miyelositik Lösemi (KML)</i>	12
<i>Akut Lenfositik Lösemi (ALL)</i>	13
<i>Akut Miyelositik Lösemi (AML)</i>	13

HL-60 Hücreleri ve Özellikleri	15
Platin	15
Sisplatin	16
Sisplatinin Kimyasal Özelliği	17
Sisplatin ve Kanser	17
<i>Platin Bileşenlerinin Hücre İçine Girişi</i>	19
<i>Sisplatinin Etki Mekanizması</i>	19
Hücre Kültüründe Sitotoksik Etkilerin Değerlendirilme Yöntemleri	19
Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Sitotoksik Ölçüm Yöntemi (MTT)	20
Hücre Kültüründe Apoptotik Etkilerin Değerlendirilme Yöntemleri	20
Flow Sitometri (Akış Hücremetre) Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi	21
<i>Flow sitometri kullanım alanları</i>	21
DNA Fragmentasyon Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi	22
Agaroz Jel Elektroforezi	22
GEREÇLER	23
Kullanılan Maddeler	23
Kullanılan Cihazlar	25
YÖNTEMLER	26
HL-60 Lösemi Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık	26
HL-60 hücrelerini stoklama	26
Stoktan hücre çıkarma	27
Hücre sayımı	27
HL-60 Hücre Dizisinin Pasajlanması	27
Maddelerin Hazırlanışı	28
Piridin 2-Karbaldoksim Ligandı	28
Piridin 2-karbaldoksim Pt(II) Kompleksi	28
Sitotoksikite ve Apoptoz Yöntemleri	29
Mitokondriyal Aktivite Testi (MTT)	29
Annexin V - Fıtc/PI İle Akış Hücremetrede (Flow Sitometri)	30
Apoptotik Etkinin Saptanması	30

<i>DNA Fragmentasyon Yöntemi İle Apoptotik Etkinin</i>	
<i>Agaroz Jel Elektroforezinde Belirlenmesi</i>	31
İstatistiksel Analizler	32
BULGULAR ve TARTIŞMA	32
Morfolojik Bulgular	32
MTT Sonuçları	36
<i>Sisplatinin HL-60 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri</i>	36
<i>Piridin 2-Karbaldoksim Ligandının HL-60 Hücreleri Üzerine</i>	
<i>Sitotoksik Etkileri</i>	39
<i>Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksinin HL-60 Hücreleri</i>	
<i>Üzerine Sitotoksik Etkileri</i>	41
<i>Flow Sitometri Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi</i>	43
<i>DNA Fragmentasyon Yöntemi İle Apoptotik Etkinin</i>	
<i>Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenerek Değerlendirilmesi</i>	48
SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO VE ADI	SAYFA
Çizelge 1	Nekroz ve Apoptozis Arasındaki Farklar 5
Çizelge 2	Apoptozis ve Genler 7
Çizelge 3	Sisplatinin HL-60 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirilmesi 38
Çizelge 4	Piridin 2-Karbaldoksim Ligandının HL-60 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirilmesi 40
Çizelge 5	Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksinin HL-60 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirilmesi 42
Çizelge 6	25 μ M, 50 μ M ve 100 μ M Sisplatin, Piridin-2-Karbaldoksim Ligandı ve Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksi Verilen Hücrelerin, 24 Saat Sonrasında Elde Edilen Flow Sitometri Sonuçları 47

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1. Hücre Siklusu	4
Şekil 2. HL-60 (İnsan AML Hücre Dizisi)	15
Şekil 3. Sisplatinin Yapısı	16
Şekil 4. Sisplatinin Kimyasal Sentezi	17
Şekil 5. Nekrozis ve Apoptozis Arasındaki Bağlantılarla Beraber, Sisplatin Tarafından İndüklenen Biyokimyasal Hücre Ölüm Yolları	18
Şekil 6. Piridin 2-Karbaldoksim Ligandının Kimyasal Yapısı	28
Şekil 7. Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksi' nin Kimyasal Yapısı	29
Şekil 8. Sisplatin konsantrasyonları uygulanan HL-60 hücrelerinin 72 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400) [a: Kontrol, b: DMSO Kontrol, c: 5 µM Konsantrasyon Sisplatin, d: 10 µM Konsantrasyon Sisplatin, e: 25 µM Konsantrasyon Sisplatin, f: 50 µM Konsantrasyon Sisplatin, g: 100 µM Konsantrasyon Sisplatin]]	33
Şekil 9.	34
Şekil 9. Piridin-2-karbaldoksim Ligandı (PKL) Uygulanan HL-60 Hücrelerinin 72 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400) (a: Kontrol, b: DMSO-kontrol, c: 5 µM PKL, d: 10µM PKL, e: 25 µM PKL, f: 50µM PKL, g: 100 µM PKL)	
Şekil 10. Piridin-2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksi (PKPt(II)) Uygulanan HL-60 Hücrelerinin 72 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400) (a: Kontrol, b: DMSO-kontrol, c: 5 µM PKPt(II), d: 10 µM PKPt(II), e: 25 µM PKPt(II), f: 50 µM	35

PKPt(II), g: 100 μ M PKPt(II))

Şekil 11.	Sisplatinin, HL-60 Hücre Dizisinde 24, 48 ve 72 Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	37
Şekil 12.	Piridin 2-Karbaldoksim Ligandının, HL-60 Hücre Dizisinde 24, 48 ve 72. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	39
Şekil 13.	Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksinin, HL-60 Hücre Dizisinde 24, 48 ve 72. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri	41
Şekil 14.	Flow Sitometri Yöntemi ile Kontrol ve DMSO-Kontrol Grubunun Apoptotik Sonuçları (a: Kontrol (FSC-A) , b: Kontrol (Annexin V Fıtc- A) , c: DMSO-Kontrol Annexin V Fıtc- A)	43
Şekil 15.	Flow Sitometri Yöntemi ile Sisplatinin 25, 50, 100 μ M Konsantrasyon Gruplarının Apoptotik Sonuçları (a: 25 μ M, b: 25 μ M, c: 25 μ M)	44
Şekil 16.	Flow Sitometri Yöntemi ile Piridin 2-Karbaldoksim Ligandının 25, 50, 100 μ M Konsantrasyon Gruplarının Apoptotik Sonuçları (a: 25 μ M, b: 25 μ M, c: 25 μ M)	45
Şekil 17.	Flow Sitometri Yöntemi ile Piridin-2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksinin 25, 50, 100 μ m Konsantrasyon Gruplarının Apoptotik Sonuçları (a: 25 μ M, b: 25 μ M, c: 25 μ M)	46
Şekil 18.	Sisplatin Verilen HL-60 Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunda Sırasıyla 100, 50, 25, 10, 5	48

μM , DMSO-Kontrol ve Kontrol Gruplarının
Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

- Şekil 19.** Piridin 2-Karbaldoksim Ligandı Verilen HL-60 Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunda Sırasıyla, Kontrol, 5, 10, 25, 50, 100 μM , DNA Belirtecinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi 49
- Şekil 20.** Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksi Verilen HL-60 Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunda Sırasıyla DNA Belirteci, Kontrol, DMSO-Kontrol, 5, 10, 25, 50 ve 100 μM Konsantrasyon Gruplarının Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi 50

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AML	: Akut Miyeloid Lösemi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
Pt	: Platin
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin Dependent Kinase)
CDI	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü(Cyclin Dependent Kinase Inhibitor)
rb	: Retinoblastoma Protein
p53	: Tümör Protein 53
UV	: Ultraviyole
TNFR	: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü
TRAIL	: Tümör Nekrozis Faktör- α -İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand
GADD45	: Büyümenin Engellenmesi ve DNA hasarı (Growth Arrest and DNA Damage - Gadd-İnduced Gene)
c-myc	: Kuş Gribi Miyelositomlarının Hücrel Değişimini Belirleme (Cellular Transforming Determinant of Avian Myelocytomatosis)
Bcl-2	: B Hücre Lenfoma (Cell Lymphoma)
HPV	: İnsan Polip Virüsü (Human Papilloma Virus)
μ M	: Mikromolar
BCR	: B hücre reseptörü
GCR	: Üreme Hücreleri ile ilgili Merkez Reaksiyonu (Germinal Center Reaction)
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
TCR	: T Hücre Reseptörü (Cell Receptor)
PFP	: Delik Yapıcı Protein (Pore Forming Protein)
NK	: Doğal Öldürücü (Natural Killer)
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
Ph*	: Philadelphia Kromozomu
BK	: Beyaz Küre
ALL	: Akut Lenfositik Lösemi
AML	: Akut Miyelositik Lösemi
inv	: İnvazyon

DMSO	: Dimetilsülfoksit
TPA	: 12-O-Tetradekanoilforbol-13-Asetat
GM- CSF	: Granülosit Makrofaj - Koloni Uyarıcı Faktör
topo	: Topoizomeras
HCL	: Hidroklorik Asit
HNO ₃	: Nitrik Asit
H ₂ PtCl ₆	: Kloroplatinik Asit
(NH ₄) ₂ PtCl ₆	: Amonyum Hekza Kloroplatin
K ₂ [PtCl ₄]	: Potasyum tetrakloroplatinat(II)
NH ₃	: Amonyak
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
DCHA	: Dokohekzaenoik Asit
NY3170	: 1-Propargil - 5 – Kloropirimidin- 2- Bir
W-7	: Kalmodulin İnhibitörleri
AmB	: Amfoterisin B
PKA	: Proteinkinaz A
PKC	: Proteinkinaz C
TFIIH	: Transkripsiyon Faktörü (Transcription Factor) II H
XPA	: Xeroderma Pigmentosum, Tamamlayıcı Grup A
XPG	: Xeroderma Pigmentosum, Tamamlayıcı Grup G
XPF	: Xeroderma Pigmentosum, Tamamlayıcı Grup F
RPA	: Replikasyon Proteini A
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid
XTT	: 4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3 benzen disülfonat
ELISA	: İmmünoenzimatik Yöntem
TUNEL	: Terminal Deoksittransferaz Mediated Bio-dUTP Nick End Labeling
ITP	: Nötrofil Fonksiyon Defektleri
RPMI	: Roswell Park Memorial Enstitü
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
nm	: Nanometre (dalga boyu)
PBS	: Fosfat Tuzlu Tampon

FITC : Floresein İzotiyosiyanat
PI : Propidyum İyodit
EDTA : Etilenediaminetetraasetik Asit
SDS : Sodyum dodesil sülfat
Mit.Absor.Değ.: Mitokondriyal Absorbans Değerleri

GİRİŞ VE AMAÇ

AML (Akut Miyeloid Lösemi) lösemi çeşitleri içerisinde % 27.5 görülme sıklığı ile oldukça sık görülen bir lösemi tipidir. AML' nin tedavisi evresine göre değişmekle beraber, tedavide başarı şansı ortalama % 70–75 arasındadır (http-1 ve http-2) . Lösemi tedavisinde kullanılan ilaçların büyük bir çoğunluğunun etken maddesi sisplatindir veya sisplatin diğer kemoterapi ilaçlarıyla (karboplatin ve okzaliplatin gibi) kombine şekilde kullanılmaktadır (Kayıran ve Özbek, 2003; Cortes ve Kantarjian, 2000; Cantürk, 2006). Sisplatin, genel şekli $cis-(Pt A_2 X_2)$, A ' da amin ligandı ve X ' de anyonik grubu bulunan nötral bir moleküldür. Sisplatin anyonik grupları (örneğin klor iyonları) ile, DNA' ya komşu guaninler arasındaki 1,2 bantlarda çapraz bağlar yaparak, transkripsiyon ve replikasyonun meydana gelmesini önler (inhibe eder). Böylece, DNA ve RNA sentezini bloke eder (Klein ve Hambley, 2006; marzano ve ark., 2002; Zaludova ve ark., 1997).

Bu çalışmada, sisplatinin yukarıdaki özelliği model alınarak, kimyasal olarak sentez edilen piridin 2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksinin de sahip olduğu metal kompleksi nedeniyle DNA' nın bantlarında çapraz bağlar yaparak, kanser hücrelerinde hücre çoğalmasını önleyici (antiproliferatif) ve hücreyi programlı ölüme götürebilecek (apoptotik) etki oluşturabileceği düşünülmüştür.

Yapılan literatür taraması sonucu, Piridin 2-Karbaldoksim Ligandı ve Pt (II) kompleksinin kanser hücreleri üzerindeki farmakolojik ve biyolojik etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu tez çalışmasıyla, insan lösemi HL-60 hücre dizisinde *in vitro* yöntemler kullanılarak, piridin 2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksinin antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

KAYNAK BİLGİSİ

Kanser

“Neoplazi” nin sözcük anlamı “yeni büyüme” dir. Esas olarak bütün neoplazmların kökeni, normal büyüme kontrollerine verilen cevabın kaybı olarak yorumlanır. Onkolojide (Lat. *Onkos*, şişlik ve *logos* çalışma) neoplazmların benign ve malign olarak ayrılması çok önemlidir. Bu sınıflama neoplazmin (tümörün) potansiyel klinik davranışının değerlendirilmesine dayanır. Bir tümörün belirli bir bölgede kalacağı, diğer bölgelere yayılmayacağı ve bu nedenle bu bölümün çıkarılarak alınmasından sonra hastanın sağ kalacağı düşünülürse, bu neoplazm “benign” olarak sınıflandırılır. “Malign” olarak sınıflandırılan neoplazm, komşu yapılara yayılarak harabiyet yaratan (invazyon), uzak doku veya organlara ulaşarak (metastaz) ölüme yol açan lezyondur. Malign tümörler topluca “kanser” olarak adlandırılır. Latince “*yengeç*” kelimesinden gelmektedir ve vücudun herhangi bir parçasına inatçı bir şekilde yapışması nedeniyle bu şekilde isimlendirilmiştir (Onataslan, 2006).

Kanser, gelişmiş ülkelerde kalp-damar hastalıklarından sonra, ikinci sıklıkta görülen ölüm nedenidir. Amerika Bileşik Devletleri' nde 2002 yılı içinde, 1.3 milyon yeni kanser olgusunun görüleceği ve 550 000 kişinin de kanserden öleceği tahmin edilmektedir. Melanom dışı cilt kanserleri hariç, yaşam boyu kanser olma olasılığı, erkekte % 43 ve kadında % 38 olarak bildirilmektedir. Erkeklerde en sık

görülen kanser türleri, prostat, akciğer ve kolorektal kanser, kadında ise meme, kolrektal ve akciğer kanseridir. Kanserden ölüme bakıldığında hem erkek hem de kadın için, akciğer kanseri birinci sırada yer almaktadır. Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan çalışmalarda, Türkiye ' de yıllık kanser insidansı (belirli bir nüfusta belirli bir zaman dilimi içerisinde belirli bir hastalık veya hastalıkların yeni olgularının sayısı) yaklaşık olarak, yüzbinde 150 olduğu ve her yıl 90.000 – 100.000 dolayında yeni kanser olgusunun görüleceği bildirilmiştir (S.B. Kanser Savaş Derneği Başkanlığının 6.10.1993 gün ve 681 sayılı yazısı). Bu veriler, kanserin bir halk sağlığı sorunu olduğunu ortaya çıkarmaktadır (Kayaalp, 2009).

Kanserin Oluşumu

Malign (kötü huylu) hücreler, komşu dokuları sarabilir ve metastaz yapabilir (yani, vücudun diğer yerlerine göç ederek buralarda ikincil gelişme alanları yaratır). Bu anormal gelişme kalıbının nedeni, çok hücreli bir organizmada, hücrelerin üreme, çoğalma, farklılaşma ve hayatta kalmalarını düzenleyen genlerdeki mutasyonlar olabilir. Bu genetik değişiklikler nedeniyle, kanser hücreleri artık normal hücrelerin gelişmesini yöneten işaretlere yanıt vermezler (Smith ve ark., 2007).

Kanserin gelişmesine katılan genler onkogenler veya tümör supresör genleri olarak bilinir. Onkogenler, işlevleri hücrenin üremesi veya hayatta kalmasını teşvik olan normal genlerin (protoonkogenler) mutasyona uğramış türevleridir. Bu genler gelişme faktörlerini, gelişme faktör almaçlarını, işaret iletim proteinlerini, hücre içi kinazları ve transkripsiyon faktörlerini şifreleyebilir. Malign bir hücreye dönüşüm, bir proto-onkogenin sadece tek bir kopyasında meydana gelen bir 'işlev kazanma' mutasyonu ile başlayabilir. Mutasyona uğramış hücrenin çoğalması ile, ek mutasyonlar görülebilir. Tümör supresör genleri (normal gelişmeyi suprese eden genler) çoğalmayı inhibe eden, hücre ölümünü veya DNA onarımını teşvik eden proteinleri şifreleyen genlerdir; transformasyon için her iki allelin inaktive (işlev kaybı) olması gerekir. Gelişmeyi suprese eden genlere hücrenin koruyucuları da denmektedir (Smith ve ark., 2007).

Hücre Siklusu (Döngüsü)

Sürekli bölünen hücrelerde, mitozdan sonra siklus $G_1 - S - G_2$ (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde tekrarlanır. Bu süreçte hücre uyarımı ve büyüme meydana gelmekte veya bölünme sinyali alamadıkları sürece, istirahat fazı G_0 da durmaktadırlar. G_1 , S, G_2 fazları (interfaz) hücre siklusunun % 90 ' ını kapsar ve 16-24 saat sürer. Mitoz bölünme ise, 1-2 saat sürmektedir. Hücre bölünmesi G_1 fazında kısıtlayıcı nokta (R point) tarafından koordine edilir. Kısıtlayıcı noktada hücre duracak veya hücre siklusunu tamamlayacaktır. G_1 fazında hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır ve büyümeyi indükler. Bu fazda DNA sentezi (replikasyonu) için hazırlık yapılır. RNA ve protein sentezi olur. S fazında ise DNA sentezlendikten sonra, G_2 fazında hücre büyümeye devam eder, aynı zamanda RNA sentezi, protein sentezi gerçekleşir ve hücre mitozu hazırlanır. Mitoz; profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşmaktadır. Telofazda sitoplazmik bölünme tamamlanır ve aynı genetik materyalli iki yeni hücre meydana gelir (Cabadak, 2008)

Hücre siklusunda bir faz tamamlanmadan sonraki faza geçilirse, genetik materyal tam ve doğru kopyalanamadığı için, hücrede hasar meydana gelebilmektedir.

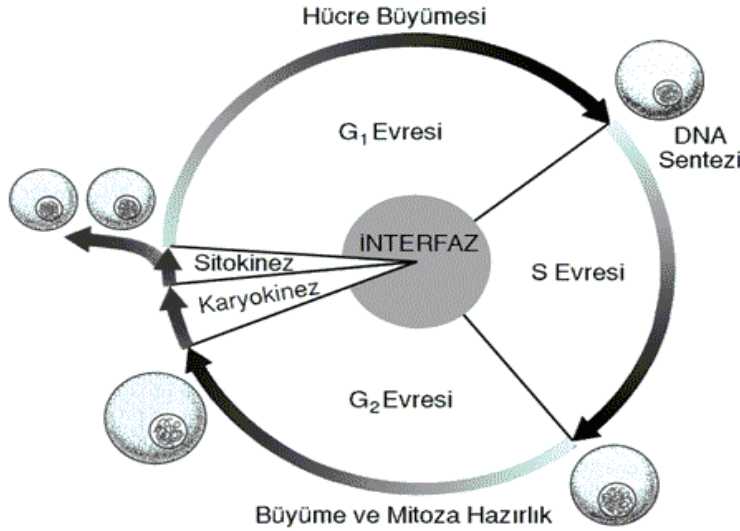
Hücre siklusunda $G_1 - S$ geçişinde, $G_2 - M$ geçişinde ve metafaz – anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır. Bu kontrol noktalarında hücrenin sıklusa devam edip etmeyeceğinin kararı verilir (Cabadak, 2008).

Hücre siklusu, sıklusa özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CDI' lerinin düzeyleri hücre siklusunun çeşitli aşamalarında değişiklik gösterir ve oldukça karmaşık bir düzen içinde siklusun ilerlemesini düzenlerler. CDK' lar kendi başlarına bulunduklarında aktif değildirler. Ancak, siklin'e bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri ortaya çıkar. Siklinler bu komplekslerin regülatör subüniteleri, CDK' lar ise katalitik subüniteleridir. Siklinler (A, B1, D ve E) siklusun çeşitli fazlarında periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken, diğer taraftan da yıkılırlar. Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, dolayısıyla ilişkide bulundukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25) ' ların aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar. CDK' ların aktiviteleri sadece siklinlerle düzenlenmez, ayrıca özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenir. CDI' leri (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinler, ya CDK'ların kendisi yada siklin-CDK komplekslerine bağlanarak, CDK' ların aktivitelerini baskırlar. Siklinlerin seviyeleri transkripsiyonla düzenlenir. D tip (D1, 2, 3) siklinler başlama siklinleri olarak isimlendirilir ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak düzenlenirler. Mitojenler ortamdan uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar. Hangi tip siklin D'nin eksprese edileceği doku tipine özgüdür. Örneğin, T lenfositler, özellikle D3 (bir miktar da D2) tipini eksprese ederler. D tip siklinler CDK4 ve CDK6'yı düzenlerler. Siklin E, G_1/ S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılır. Siklin A, S fazı boyunca sentez edilir ve anafaz sırasında da yıkılır. Siklin A, CDK2 ile kompleks yapar ve bu kompleksin DNA replikasyonunda direkt rolünün olduğu düşünülmektedir. Siklin B1 ise S fazının geç döneminde sentez edilir ve G_2 fazından M fazına geçerken sentezi maksimal düzeye erişir, ardından anafazda yıkılır. Siklin B, CDK2 ile etkileşime girer ve anafazda yıkılmasıyla birlikte hücre mitozisden çıkar ve G_1 'e tekrar geri döner (http-3). Bölünme yeteneğine sahip çoğu normal hücre, büyüme faktörleri, bazı hormonlar ve hücre yüzey reseptörlerini etkileyen antijen – histokompatibilite kompleksleri gibi dış uyarılara karşı yanıt olarak bölünür. Bu hücre yüzey reseptörleri alınan sinyalleri iletir ve hücre bölünür. Tirozin kinazlar, hücre dışı büyüme faktörlerinden nükleusa kadar olan bir kaskad (arka arkaya gelen bir dizi süreç) şeklinde ilerleyen proliteratif sinyal sürecinin önemli bir parçasıdır. Siklinler, kendilerine özgü olan ve siklin – bağımlı kinazlar (cdk) olarak adlandırılan tirozin kinazlarla kombine olurlar, onları aktifleştirirler ve etkilerini düzenlerler (Lowitz ve ark., 2007).

Normal durumda G_1 süresince hücrede growth faktör (büyüme faktörü) mevcuttur ve CDK/ siklin kompleksi hücre siklusunun R noktasını geçmesini sağlar. Eğer growth faktör, hücre siklusu R noktasına gelmeden önce ortamdan uzaklaştırılacak olursa, hücre G_1 ' den S evresine geçemez ve dinlenme durumuna (G_0) girer. Siklinler, büyüme faktörü hedefinin uyarısı olduğundan siklin düzenlenmesindeki herhangi bir hata, kanser hücrelerinin bir karakteristiği olan

büyüme faktör düzenlenmesinin bozulmasına neden olur. Hücre siklusundaki bu hata sonucu bazı insan kanserlerinin arttığı bulunmuştur (Topal ve ark., 2009).

Hücre dönüğüsünü doğrudan düzenleyen tümör supresör genleri, retinoblastoma (rb) geni (G_1 ' den S evresine geçişte, görev yapar) ve p53 (hücre döngüsü ve programlanmış hücre ölümü olan apoptozu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü) proteindir (Smith ve ark., 2007).



Şekil 1. Hücre Siklusı (<http-3>)

Apoptozis

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (Kerr ve ark., 1972; Hockenbery, 1995; Akşit ve Bildik, 2008).

Her hücre, doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer gider. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Hasarlı DNA' da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA' sında meydana gelen mutasyonlar, kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (Akşit ve Bildik, 2008).

Apoptozisde ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. İmmun elektroforez yapıldığında, DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internükleozomal bölgelerden) kırıldığı için 'ladder pattern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur. Normalde bir hücrede, DNA' da birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300 000 kırılma meydana gelir ve DNA tamamen onarılamaz. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, bir kaç

dakikada hacimlerinin 1/3' ünü kaybederler. Bu görünüm muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler, ışıklı mikroskobunda incelendiğinde, hücreler etrafında açık bir parlama görülmektedir (Öktem ve ark. 2001).

Apoptozisde, hücresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskobunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır (Yang ve ark. 2007).

Diğer bir hücre ölüm şekli olan nekroz ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir. Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu, hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir (Öktem ve ark., 2001). Oysa apoptozda hücre parçalanmadığı, kendi membranı içinde yok olup içindeki iltihap tetikleyicisi bileşenleri etrafa saçmadığı için apoptoza iltihabi reaksiyon eşlik etmez (Kayaalp, 2009).

Çizelge 1. Nekroz ve Apoptozis Arasındaki Farklar (Tomatır, 2003).

Özellikler	Nekroz	Apoptozis
Uyaran	Toksinler, ciddi hipoksi, ağır yara ve ATP tüketimi	ATP tüketimi olmaksızın fizyolojik ve patolojik koşullar
Enerji gereksinimi	Yok	Yok ATP'ye bağlı
Histoloji	Hücresel şişme, organel bozukluğu, doku parçalarının ölümü	Kromatin kondensasyonu, apoptotik cisimcikler, izole tek hücrenin ölümü
DNA kırık modeli	Düzensiz rastgele kırıklar şeklinde	185 baz çiftlik kırıklar şeklinde "ip merdiven" görüntüsünde
Plazma	Parçalanmış	Moleküler değişikliklerle birlikte parçalanmamış
Hücrelerin fagositozu	Fagositlerin göçüyle	Komşu hücrelerle
Doku reaksiyonu	İnflamasyon	İnflamasyon yok

Apoptozisde oluşan ‘ladder pattern’, apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekrozisde görülmez. Bu nedenle DNA’ yı fragmentlerine ayırmak apoptozisi nekrozisden ayırmada önemli yöntemlerden birisidir (Ulukaya, 2003).

Apoptozisin Mekanizmaları

Apoptoz, hücre içinde ölümle sonuçlanan iki ölüm yolağının aktive edilmesi ile oluşur:

Ölüm reseptörü yolağı: Ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) süperailisine ait, birçok hücre tipinde bulunan reseptör proteinleridir. Bunların hücre dışındaki tümör nekroz faktörleri veya TRAIL maddesi (tumor necrosis factor- α - related apoptosis inducing ligand) tarafından aktivasyonu sitoplazmik bir enzim olan kaspaz (cysteine-aspartic-acid-proteases) 8’ i aktive eder. Bu enzimin aktivasyonu da yolağın distal alt kısmında yerleşmiş ortak efektör kaspazları (kaspaz 3 gibi) uyarır.

Mitokondriyal Yolak: Bu yolak hücre içinde çeşitli uyarılar (onarılamayan DNA zedelenmesi gibi) tarafından aktive edilir. Aracı proteinler (p53 gibi) tarafından sitoplazmik bir protein olan apoptozu önleyici (antiapoptotik) Bcl-2 gibi proteinler aktive edilir. Bunlar mitokondrilardan sitokrom c’ yi salıverir. Bu madde apoptozom kompleksinin içine girerek onun aracılığı ile kaspaz 9 enzimini aktive eder. O da ortak efektör kaspazları aktive eder ve aktif duruma gelen bu enzimler genomik DNA’ nın parçalanmasına, hücre içindeki enzimlerin ve yapısal proteinlerin kopup inaktive olmalarına, sonuçta apoptotik hücre ölümüne yol açar (Kayaalp, 2009).

Apoptozise Karşı Mekanizmalar

Bcl-2 proteini, hücre ölümünü inhibe ederek hücreyi apoptozise karşı korumaktadır. Bu ailenin diğer üyelerinden *Bcl-xL*, *mcl* ve *bag 1* hücre ölümünün inhibitörleri iken *bad*, *bax* ve *bik* apoptozisi ilerletirler. *GADD45* (a growth arrest and DNA damage-gadd-induced gene), hücre siklusunun G -M kontrol noktasında önemli rolü olan nükleer proteindir. Bu protein *cdc2* proteini ile etkileserek *cdc2* kinaz aktivitesini inhibe etmektedir. *cMyc*, *GADD45* ve *cki* genleri *p15*, *p21*, *p27*’yi baskılayarak hücre büyümesini sağlar. Yaşam faktörleri olmadığında *c-Myc* onkogeni hücreleri apoptozise götürür. Apoptozis öncesi ve sonrası olaylar tamamen açık değildir. Bcl-2 mitokondrinin dış zarında bulunur ve mitokondriden sitokrom c salınımını bloke eder. Sitokrom c, kaspazları aktive ederek apoptozisi indüklemektedir. Bcl-2’ nin ekspresyon düzeyi apoptozisi belirleyen faktörlerden birisidir. Bcl-2 ekspresyonu fazla olan hücreler, hücre ölümünden kaçabilir. Antiapoptotik Bcl-2 üyeleri kaspaz aktivasyonunu önleyerek antiapoptotik etki gösterirler. Bazı çalışmalarda Bcl-2 çok yüksek bulunmasına rağmen hücre ölümünün arttığı da gösterilmiştir. NF-kB transkripsiyon faktörünün Bcl-2 ailesini up-regüle (düzenlediği) ettiği bilinmektedir. Bcl-2 aynı zamanda, Ras2’ nin antiapoptotik aktivitesini de düzenler. Bcl-2’ nin diğer düzenleyici mekanizması, *bax* gibi büyüme düzenleyicilerinin aktivitesini inhibe ederek apoptozisi engellemektedir (Cabadak, 2008).

Çizelge 2. Apoptozis ve Genler (Cabadak, 2008)

Apoptozisi baskılayan genler

Apoptozisi indükleyen genler

Bcl-2 grubundan;

Bcl-2 grubundan;

BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1,
mcl-1, A1

Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik,
Hrk1

c-abl geni

c-myc

ras onkogeni

p53, p21

çözünebilir fas

fas (CD95/APO1)

p35

FADD/MORT, RIP, FAST

A20

interlökin dönüştürücü
enzim benzeri proteinler
(ICE)

LOH (MTS1/CDK41)

Kanser ve Apoptozis İlişkisi

Apoptoz ve kanser arasında doğru orantılı olmayan bir ilişki vardır. Apoptoz, kanser hücrelerinin oluşumunu engelleyen bir mekanizmadır. Fakat, genetik kontrol mekanizmalarını kontrol eden genlerde herhangi bir hatanın meydana gelmesi, hücrenin apoptoza girmesini sağlamaktadır (Cohen, 1993; Soeiro ve Souza, 2008).

Apoptozis mekanizmasının bozulması, kanser oluşumunun önemli bir nedenidir. Bcl-2'nin aşırı salınması lenfoma'nın spesifik bir tipinde saptanmıştır. P53 gen ürünü, DNA hasarında apoptozise geçişte önemli bir rol üstlenir. İnsanlarda görülen birçok kanserde P53 geninin normal fonksiyonlarını yapmadığı saptanmıştır (Soeiro ve Souza, 2008; Hockenbery, 1995; Mene ve Amore, 1998).

Apoptozis mekanizmasının bozulması ile kanserin arasında yakın bir ilişki olduğu gibi, apoptozisin aşırı olduğu zamanlarda da birçok hastalık görülebilir (Soeiro ve Souza, 2008).

Kansere neden olan bazı virüsler enfekte ettikleri hücrelerde fizyolojik apoptozisi engellerler. Bu şekilde davranan iki tip Human papilloma virüsü (HPV)' nun serviks kanseri oluşturdukları saptanmıştır. HPV virüslerinden biri E6 adında protein üreterek apoptozisi başlatan P53'e bağlanır ve apoptozisi inaktive eder (Smith ve ark., 2007).

Burkitt lenfoma ve mononükleosize neden olan Epstein-Barr virüsü de Bcl-2' ye benzer bir protein salgılar veya salgıladığı bir diğer proteinle hücrenin Bcl-2 protein üretimini arttırmasını indükler. İki olay da hücreyi apoptozise karşı daha dirençli kılar. Bu şekilde çoğalmaya devam eden hücre kanser hücresi haline gelir.

B-hücre lösemilerinin ve lenfomaların bazı tiplerinde (özellikle AML) Bcl-2 proteini yüksek seviyede eksprese edilir. Bu apoptozis uyarılarını bloke eder (Cohen, 1993; Kumamoto ve ark. 2001).

Melanoma (deri kanserlerinden en tehlikelisi) apoptozise, Apaf-1' i kodlayan genin ekspresyonunu engelleyerek direnç gösterir. Bazı kanser hücreleri (özellikle akciğer ve kolon) sitotoksik T-hücrelerinin Fas Ligand kısımlarını bağlayan bir molekül salgılayarak T-hücrelerinin apoptozis mekanizmalarını başlatmalarına izin vermezler. Dolayısıyla bozulan bu mekanizma kanser hücrelerinin fizyolojik apoptozisini engeller (Cohen, 1993, Kumamoto ve ark. 2001).

Lenfositler

Lenfositler, kanda veya bağışıklık sisteminin lenfoid doku ve organlarında (lenf bezi, dalak, timus gibi) bulunan, özgül immun cevabı oluşturan hücrelerdir. 9-12 μ M çapında, büyük ve yuvarlak bir nükleusa, dar bir sitoplazmaya ve azurofilik (lizozomal) granüllere sahiptirler. Ribozomların bol oluşu nedeniyle, güçlü bir bazofili gösterirler. İnsan vücudunda yaklaşık 2 milyon yeni T hücresinin bulunduğu ve her gün yaklaşık 2 milyon yeni T hücresinin ve 20 milyon yeni B hücresinin yapıldığı hesaplanmıştır. Vücuttaki total lenfosit sayısının, %2 kadarını periferik kan lenfositleri oluşturur. Periferik kanda, lökositlerin % 20 – 30 kadarını lenfositler oluşturur (Cantürk, 2006; Turgay, 2003). Lenfositlerin en önemli özelliği, eritrosit, granülosit, trombosit gibi birer uç (son) hücre olmamalarıdır. Lenfositler bölünebilen ve yeni lenfositler verebilen hücrelerdir. İmmunojenik (antijenik) bir uyarı ile karşılaştıklarında, morfolojik dönüşüm gösterir, farklılaşır ve çoğalırlar. Dönüşüm sırasında ortaya blastik tipte hücreler çıkar (Serter, 2006).

Genel olarak, viral hastalıklarda, bazı bakteriyel hastalıklarda, enfeksiyon hastalarının iyileşme döneminde ve nötropeni (akyuvar sayısının anormal derecede az olması) ile gidiş gösteren durumlarda mutlak sayıları veya lökositler içindeki dağılım oranları artar (Cantürk, 2006; Turgay, 2003).

Morfolojik olarak birbirine çok benzememekle beraber, birbirinden farklı gelişim çizgileri izleyen, görevleri ve antijen yapıları birbirinden farklı iki lenfosit tipi bulunmaktadır.

B lenfositler

Memelilerde B lenfositler, fetal karaciğerde ve yetişkinde kemik iliğinde üretilirler. Bu hücreler, embriyoda paraaortik splankno-plevra bölgesinde yer alan ortak bir multipotent öncü (prekürsör) olan hematopoietik kök hücrelerden gelişirler (Cantürk, 2006; Turgay, 2003).

B lenfositlerin gelişimi, kemik iliğinde pro-B hücreleri ile başlar, antijenle temastan sonra, ya plazma hücrelerine dönüşür veya bu hücrelerden bellek hücrelerinin oluşmasıyla sona erer. Bellek B lenfositleri, antijenle yeniden temasa geçtiklerinde antijene karşı daha şiddetli cevap verirler (Müftüoğlu, 1995). B lenfositlerin farklılaşma yoluna giren hücrelerinin çoğu bu yolu tamamlayabilecek kadar yaşamazlar. Gelişim aşamalarını tamamlayabilmeleri, self-tolerans için gerekli kontrol noktalarından başarıyla geçmelerine bağlıdır. Bu kontrol noktaları, B hücre reseptörünün (BCR) aracılık ettiği ve hücrelerin yaşam ve ölümlerini belirleyen ve IgV (D) J gen rekombinaz sistemlerini düzenleyen pozitif-negatif

sinyallerin katıldığı bir fonksiyonel mekanizmadır. Bu kontrollerden geçen hücrelerin daha azı da antijenle yönlendirilen germinal merkez reaksiyonuna (GCR) katılabilirler ve çoğalabilirler (Cantürk, 2006; Turgay, 2003).

B lenfositlerinin olgunlaşması, pozitif sinyal almaları sayesinde gerçekleşir. Bu sinyallerin antijen-spesifik olmalarına gerek olmadığı düşünülmektedir. BCR bazal sinyali (B lenfositlerinin kendilerinden salınan anti-apoptotik sinyal) B hücre gelişiminin meydana gelebilmesi için yeterlidir ve antijenik ligand' dan alınan bir sinyal olmaksızın B lenfosit periferik göç eder (Cantürk, 2006; Turgay, 2003).

Olgunlaşmamış B hücreleri, apoptozla ortadan kaldırılırlar. Böyle hücreler apoptoza ve tolerans mekanizmasına daha duyarlıdır. Apoptozu baskılayıcı protein Bcl-2' nin aşırı ekspresyonu, in vivo otoantijen varlığında çok sayıda B lenfositini 'reseptör ekleme' yapmaya mecbur bırakır. Geçici evredeki, B hücreleri Ig M, Fas, Bcl – 2, Ig D karakter taşırlar ve apoptozu uyaran antijen temasına çok duyarlıdır. Ig M ile birlikte Ig D eksprese eden olgun hücreler ise ekleme yapma yeteneklerini kaybederler ve dolayısıyla self-antijen temasında apoptoza uğrarlar. BCR ile güçlü sinyal iletimi, kemik iliğinde olgunlaşmamış B hücrelerinin 'ekleme' sini; fakat geçici ara evre hücrelerinde klonal eliminasyonu tetikler (indükler) (Cantürk, 2006; Turgay, 2003).

T lenfositler

Intrauterin yaşam sırasında, pro-timosit fenotipi, fetal karaciğer ve vitellüs kesesinde, gebeliğin 7. haftasından itibaren görülmeye başlar. 8-9. haftadan itibaren fetal timüs gelişmeye başlar. Gebeliğin 14. haftasından itibaren majör timositler oluşmaya başlar. Daha sonra T hücrelerinin sayısı, kanda artmaya başlar. Bu artış, altı aya kadar devam eder, daha sonra yetişkindeki düzeye iner (Cantürk, 2006; Turgay, 2003).

T lenfosit stem hücreleri, kemik iliğinden timusa göç ederler. Orada gelişimini tamamladıktan sonra, periferik kana ve sekonder lenf organlarında gelirler. Timusta T hücreleri olgunlaşır ve yüzeylerinde efektif bir T hücre reseptörü meydana gelir. Ayrıca, timusta T hücreleri eğitilir ve kendi hücre antijenleri ile reaksiyona giren T hücreleri elemine edilir. Buna karşılık kendi Klas I ve Klas II HLA antijenleri ile birlikte olan yabancı antijenleri tanıyan T hücreleri gelişmesine devam ettirilir. Böylece, yabancı antijenleri kendi doku grupları ile beraber tanıyan T hücreleri oluşur (Müftüoğlu, 1995).

T lenfositlerin aktive olabilmesi için iki uyarı gerekmektedir. Birinci uyarı, TCR uygun MHC-bağlı antijenle birleştiğinde gerçekleşir. İkinci uyarı, T lenfositlerindeki CD28 molekülünün antijen sunan hücrelerdeki B7-1 (CD80) veya B7-2 (CD86) etkileşmesi ile olur. İkinci uyarı olmadığı takdirde T hücresi yanıt veremez. Aktive olan T hücreleri lokal etkili proteinler olan sitokinleri salar, antijen spesifik T hücreleri çoğalır, bunlardan efektör hücreler ve hafıza hücreleri gelişir. T lenfositler, immün sistemin en önemli hücreleridir ve doğrudan antikora bağımlı olmayan ve hücrelerin yönettiği ve katıldığı özgül immüniteyi oluştururlar. Bağışık yanıtındaki rolleri açısından T-hücre topluluğunun homojen (tek tip) olmadığı ve yapı ve işlev özelliği farklı olan alt grupların bulunduğu bilinmektedir. Tüm T lenfositlerde bulunan ortak yüzey molekülleri (CD2, CD3,

CD5 gibi) yanında bu alt gruplardaki farklı yüzey moleküller onların ayırt edilmesinde kullanılır (Serter, 2006).

T lenfositleri;

CD-4 yardımcı T lenfositleri (T helper)

CD-8 T lenfositleri ise, Sitotoksik T lenfositleri (CTL)

Regülatör T lenfositleri olmak üzere ikiye ayrılır.

CD-4 Yardımcı T Lenfositleri (T Helper)

Kandaki lenfositlerin %35-60 kadarını, heterojen bir popülasyona sahip CD-4 yardımcı T lenfositleri oluşturur. CD-4 yardımcı T lenfositleri, MHC Klas-II moleküller ile sunulan peptidleri tanırlar. Antikor yapıcı B hücrelerinin, sitotoksik T hücreleri ve supresör T hücrelerinin aktivitelerini şiddetlendirirler. Yardımcı hücrelerin azlığında, efektör T ve B hücrelerinin antijene cevabı zayıf olur. Bu hücreler ayrıca, çeşitli lenfokinler salgılayarak, T hücrelerinin, monosit ve makrofajların ve diğer bazı hücrelerin sayıca ve etkinlikçe güçlenmelerini sağlar. Bu nitelikleri ile, yardımcı hücreler, immün sistemin en güçlü hücreleridir (Turgay, 2003).

Normalde, CD-4 yardımcı T lenfositleri çoğunlukla sitotoksikite göstermezler. Ancak, bazı patolojik hallerde bu hücrelerin belirgin sitotoksikite gösterdikleri bildirilmiştir. Ayrıca, CD-4 molekülünün, kazanılmış immün yetmezlik virüsü için majör reseptör olduğu bilinmektedir. Virüs, gp 120 yüzey molekülü aracılığı ile CD-4 molekülüne bağlanır (Turgay, 2003).

CD-8 T Lenfositleri

CD-8 yüzey özelliği taşıyan hücrelerde, geç duyarlılık reaksiyonlarını ve antikor yapımını inhibe eden T supresör (baskılayıcı) hücreleri ile sitotoksik fonksiyon yapan, efektör T hücreleri bulunur. Bu hücreler, genel olarak MHC Klas-I molekülleri ile sunulan peptidleri tanırlar (Turgay, 2003).

Sitotoksik T Lenfositleri (CTL)

Bu hücreler, virüs, parazit ve bakteri ile enfekte hücreler, tümör hücreleri, doku ve organ transplante hücreleri gibi organizmaya zararlı ve yabancı hücrelere doğrudan saldırırlar. Hedef hücrelere, yüzeylerindeki spesifik reseptör moleküller aracılığı ile bağlanırlar ve onların membranlarının bütünlüğünü bozup, hücreyi lizise uğratarak öldürürler. Sitoliz olayının mekanizması şu şekildedir: Sitotoksik hücrelerin sitoplazmik granüllerinde 'perforin' (delik oluşturan protein; PFP) denen sitolitik bir faktör bulunmuştur. Bu sitolitik protein, sitotoksik hücre, hedef hücre ile temasa geçince, granüllerin ekzositozu ile hedef hücrenin membranına saldırır ve Ca^{++} aracılığı ile monomer polimerizasyonuna ve bu yolla da membranda, dış ortamla iç ortamı birleştiren kanallar oluşmasına ve dolayısı ile hücrenin ozmotik lizis sonucu ölümüne neden olur (Turgay, 2003).

Diğer taraftan, sitotoksik hücrenin litik granüllerinin ekzositozu, taşıdıkları sitotoksik faktörler aracılığı ile perforinle birlikte hedef hücreyi ölümcül biçimde hasarlayabilirler (Turgay, 2003).

Regülatör T Lenfositleri

Sitotoksik ve yardımcı T hücre etkinliğini baskılayarak, immün reaksiyonların aşırıya kaçmasına izin vermezler. IL-4, IL-10, TGF- β sentezleyerek, IL-2 sentezleyen T hücrelerini baskıladıkları düşünülmüştür (Serter, 2006).

Organizmada bağışık yanıtın düzenli bir şekilde işleyebilmesi için Tyardımcı/ Tsitotoksik/ Tsupresor lenfosit oranının belirli bir dengede olması gerekir. Normalde bu oran 1.7 civarındadır. Tyardımcı/ Tsitotoksik/ Tsupresor oranı, T yardımcı lenfosit sayısının artması sonucu bozulursa gereğinden fazla bağışık yanıt oluşumuna yol açabilir (Allerjik olaylar gibi). Tsitotoksik/ Tsupresor lenfosit sayısının artmasıyla bu oran bozulacak olursa bağışık yanıtta aşırı bir baskılanma olacağı için immünite düşüklüğü meydana gelir (Serter, 2006).

Doğal Öldürücü (NK = Natural Killer) Hücreler

Doğal öldürücü hücreler, kemik iliğinden köken alırlar. Bu hücrelerin büyük bir kısmını iri granüllü lenfositler, küçük bir kısmını da bazı T hücreleri meydana getirir. Normal insanlarda periferik kanda görülen lenfositlerin % 10- % 15' ini oluştururlar. Olgun NK hücreleri, çoğunlukla periferik kanda, kemik iliğinde ve dalakta bulunur (Müftüoğlu, 1995).

Doğal öldürücü hücreler, lenfoid hücreler arasında, infekte veya yabancı hücreleri öldüren, T ve B lenfositlerden farklı yapıda (yüzey immünglobulini olmayan) hücrelerdir. NK hücreleri, önceden tanıyıp, duyarlı hale gelmeden hedeflediği hücreleri doğrudan tahrip edebilme yeteneğindedirler. Hedef hücreleri genellikle mantar, parazit, bakteri özellikle de virüslerle infekte hücreler ile tümör ve transplante doku hücreleridir. NK hücreleri bu özellikleriyle özgül olmayan vücut savunmasında çok önemlidirler (Serter, 2006).

Lösemi

Lösemi terimi beyaz kan, yani akyuvarlar açısından zengin kan anlamına gelmektedir. Lösemi, bağışıklık sistemimizin önemli bir parçası olan beyaz kan hücrelerinin (akyuvarlar) kontrolsüz çoğalması sonucunda oluşan bir çeşit kanserdir. Hastalıktan etkilenen hücreler (granülositler, lenfositler, retikülohistiyositler ve plazma hücreleri) kontrolden çıkarak bağımsız hareket etmeye başlar ve kan hücrelerinin üretildiği organlara, ayrıca başka organ ve dokulara yerleşip yapısal yıkıma neden olurlar. 24 ülkede yapılan yeni bir araştırmaya göre kan kanserinden ölüm oranı 6/100.000' dir. Ama hastalığın görülme sıklığı toplumlara göre değişmektedir. Beyazlarda, Afrika ve Uzakdoğu kökenlilere göre 2 kat daha fazla görülmektedir. Kronik lenfositik lösemi (KLL), Japonlar' da ve Çinliler' de hiç görülmezken, Yahudiler' de son derece yaygındır. Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte ırk, kalıtım ve çevre etkenlerinin rolü tartışılmaktadır (http-4).

Lösemiler kendi içinde akut (hızlı ilerleyen) ve kronik (yavaş ilerleyen) olmak üzere iki ana sınıfta incelenmektedir. Etkilenen lökosit tipine göre ise miyeloid ve lenfoid olmak üzere sınıflandırılabilirler. Löseminin 4 önemli tipi vardır. Bunlar: Kronik Lenfositik Lösemi, Kronik Miyelositik Lösemi, Akut Lenfositik Lösemi, Akut Miyelositik Lösemi olmak üzere sıralanabilir (Özçimen, 2005).

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)

KLL batı dünyası ülkelerinde en sık görülen lösemi tipidir. Bu ülkelerde yaşayan 65 yaşının üstündeki kişilerde gelişen lösemilerin % 40' ını oluşturur. 30 yaşın altında çok nadir olmasına rağmen KLL' ye yakalanan kişilerin % 20-30 kadarı 55 yaşın altındadır. Ayrıca hastalık 75 yaşın üzerinde daha belirgin bir hal almaktadır (Call ve ark., 1994). Total senelik insidansı (bir zaman diliminde belirli sayıdaki bir popülasyonda belirli bir hastalığın yeni olgularının sayısının tıbbi istatistiği) yaklaşık 100 000' de 3 olduğu saptanmıştır. Irk ve coğrafik bilgilere dayalı olarak yapılan çalışmalara göre kuzey Amerika, Avustralya ve Avrupa ülkelerinde yaşayan beyaz ve siyah ırkın, Çin, Japon ve Hindistan' da yaşayan insanlara 20-30 kadar daha fazla bu lösemiden etkilendiği gösterilmiştir. Erkeklerin kadınlara göre 2 kat daha sıklıkta KLL olduğu bilinmektedir. Vaka-kontrollü olarak yapılan etiyolojik çalışmalarda kimyasal, radyasyon, diyet, virus enfeksiyonu ve otoimmün hastalıkların KLL gelişmesinde önemli bir risk olduğu kesin olarak bugüne kadar gösterilememiştir (http-5). KLL' ye yakalanan kişilerin, birinci ve ikinci dereceden olan akrabalarında KLL' nin gelişme olasılığı yüksektir. KLL' ye yakalanan ailelerin genetik yapılarında bir bozukluk bulunamamıştır ve genetik geçiş mekanizması tam olarak belirlenememiştir. KLL hastalarının %70-80' i genelde kan sayımı yapıldığında, fark edilir. Bazı hastalar kliniğe, yorgunluk, gece terlemesi, anemi, enfeksiyon, kilo kaybı gibi şikayetlerle gelebilir. Mikroskopik olarak tipik KLL hücreleri, çok az sitoplazması olan küçük yuvarlak veya oval nükleuslu lenfositlerdir. Kromatin yapısı biraz kabadır, kümeleşme veya mozaik görünüşü olabilir ve büyük bir çoğunluğun nükleolusu yoktur. KLL olgun B-lenfositlerin malign dönüşümünden oluşan bir kanserdir. Diğer B-lenfositlerin malign hücrelerinin aksine, KLL hücrelerinin büyük bir çoğunluğu proliferasyon (çoğalma) kapasiteleri olmadığından G0/G1 hücre döngüsü fazında kalır. Buradan anlaşılacağı gibi KLL hastalığı, B-hücrelerinin fazla çoğalmasından değil apoptozun az olmasından kaynaklanmaktadır (Alkan, 2006).

Kronik Miyelositik Lösemi (KML)

Kronik myeloid lösemi (KML), kronik granülositik lösemi olarak da adlandırılır. KML, gelişmesinin başlangıcında olan (primitif) tüm bir canlıyı oluşturabilme yeteneğine sahip olan (pluripotent) kök hücrenin klonal bir hastalığıdır. Kemik iliğinde aşırı miyeloid hiperplazi (Bir organ veya dokunun hücre sayınındaki artış nedeniyle büyümesi), çevre kanında olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı (bazofili ile birlikte) ve dalağın büyümesi (splenomegali) ile karakterizedir. Akut lösemide var olan patolojik çizelgenin aksine, lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir. KML, insanlarda spesifik bir kromozom anomalisi ile ilişkisi tespit edilen ilk hastalıktır. KML vakalarının % 90' dan fazlasında sitogenetik analizlerde Philadelphia (Ph*) kromozomu görülür. Ph* kromozomu (9:22) translokasyonu sonucu oluşur. Görülebilen KML semptomları arasında, halsizlik, cabuk yorulma, efor intoleransı, fonksiyonel kapasitede azalma, karında şişlik ve ağrı, dalağın mideye baskı uygulaması sonucu çabuk doyma, ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, gut sayılabilir. KML hastalarının laboratuvar incelemelerinde, beyaz küre (BK) değerleri yükselmiştir. Periferik yaymada trombosit şekil bozuklukları görülebilir. Bazofil sayısı belirgin şekilde artmıştır ve belirleyici (prognostik) öneme sahiptir. Lökosit alkalen fosfataz düzeyleri düşüktür (Haznedaroğlu, 2006).

Akut Lenfositik Lösemi (ALL)

Normal lenfoid hücre topluluğu, immüoglobulin ve T hücre reseptörü genlerinin farklı ve klonal yeniden yapılanma sürecini geçirerek, B ve T hücrelerine prolifer (çoğalma) olma ve farklılaşma sürecini tamamlar. Bu sürecin herhangi bir safhasında meydana gelen somatik genetik değişiklikler proliferasyonun bozulmasına, klonal olarak hücre popülasyonunda artışa ve ALL' ye neden olmaktadır. ALL' lerin yaklaşık % 75' inde kromozomal translokasyonlar mevcuttur. Bu translokasyonlar göz önünde bulundurularak yapılan moleküler çalışmalar, transkripsiyon faktör genlerinin özellikle, çift olarak transloke olan bölgelerde yer aldığını göstermiştir. Lenfoblastlardaki artış kemik-eklem ağrılarına, baş ağrısına, iştahsızlık, bulantı, kusma ve kilo kaybına sebep olmaktadır. Kan sayımında, kansızlık ve trombosit sayısında düşüklük sıklıkla saptanır. Lökosit sayısı yüksek, düşük veya nadiren normal olabilir. Periferik yaymada blastların görülmesi tanıyı belirlemede katkı sağlayabilir. Kesin tanı için, kemik iliği biyopsisi yapılması gerekmektedir. Biyopsi örneği özel boyalarla boyanır ve akım hücremetresi (flow sitometri) ile incelenmektedir. Kromozom anormalliklerinin tayini için genetik inceleme yapılır (Saydam, 2006).

Akut Miyelositik Lösemi (AML)

Akut myeloid lösemi (AML) fenotipik olduğu kadar, genotipik olarak da heterojenite gösteren kompleks bir hastalıktır. 100' den fazla sitogenetik sapma (aberasyon) ve çeşitli genlerdeki mutasyonlar bu hastalıkta tanımlanmıştır. Örneğin, AML' de t(8;21) translokasyonu yada inv(16) varlığı iyi prognozlu hastaları tanımlarken, t(9;22) translokasyonu varlığı kötü gidişli hastalıkla beraber kendini göstermektedir. Ailevi AML, çeşitli klinik sendromların bir bulgusu olarak ortaya çıkabilmekle beraber, AML olgularının çoğu hematopoetik progenitor hücrede olan sporadik (sık görülmeyen) mutasyonlar sonucu gelişmektedir. Bunların yanı sıra olguların yüksek bir bölümünde, çeşitli genlerdeki nokta mutasyonları bu sürece katkıda bulunmaktadır. Heterojen bir hastalık grubu olan AML' de görülen genetik değişiklikler de hastalığın bu karakterini ortaya koymaktadır. Genetik prognostik (hastalığın seyrini etkileyen) faktörler şunlardır:

Kötü prognoz için; 5, 7, 8. kromozom anomalileri, klonal kompleks karyotipik anomaliler t(9;22), t(6;9).

İyi prognoz için: Normal karyotip varlığı, inv(16), t(15;17), t(8;21) sayılabilir (Özbek, 2006).

AML' nin güncel tedavisi ile 60 yaş altı hastaların yaklaşık % 80' inin tam remisyona sağlanabilmektedir. Ancak yüksek orandaki hasta grubunda ilk 4 yılda ciddi oranda lösemi nüksü görülmektedir. Hasta yaşı ve löseminin genetik profili AML' de bugün için en önemli tedavi yanıt kriterleridir. Örneğin, iyi prognostik genetik profili olan olguların tam remisyona girme şansları % 90 ve sonrasında hastaliksız sağ kalımları % 70 iken, aynı yaş grubunda kötü prognostik genetik profili olan olgular için tam remisyon oranı % 60 ve nüks olasılığı ise % 70' dir. Benzer olarak 60 yaş üstü hastaların tedaviye tam yanıt oranı % 50 ve 4 yıllık sağ kalım olasılıkları ise % 10 civarındadır. Ancak AML' li olguların yaklaşık yarısında klonal kromozom anomalisi yoktur. Bu olgular orta

prognozlu grubu oluşturmakla beraber, bunların sadece % 40' ının uzun dönem sağ kalımı mümkün olabilmektedir (Saydam, 2006).

Akut lösemnin hastanın vücudunda yarattığı, olumsuz biyolojik etkilerinin yanı sıra, hastada ve yakın çevresinde olumsuz psikolojik etkilere de yol açmaktadır. Bütün bunlar göz önünde alındığında akut miyeloid lösemili hastalarda tedavi çok yönlü olarak ele alınmalıdır. Burada hastayı bilgilendirme ve tedavi için rızasını almak, tedavi ve uygulama planı, komplikasyonların önlenmesi ya da tedavisi ve gereken konsültasyonların belirlenmesi bu kondaki uzman kişinin bilgi ve deneyimini gerektirir. Akut miyeloid lösemnin tedavisine karar vermeden önce şu basamakların bilinmesi gereklidir:

AML tanısı mutlaka çevre kanı ve kemik iliğinin mikroskopik değerlendirilmesi ile koyulmalıdır. Bundan sonra immunofenotipleme, sitogenetik ya da moleküler biyolojik incelemeler için örnekler alınmalıdır. Bu ikinci incelemeler tanıya ve prognozu belirlemede yardımcı incelemelerdir. Hastalarda performans durumu ve risk değerlendirmeleri en başta yapılmalı, tedavi buna göre planlanmalıdır (Özbek, 2006).

AML tedavisinde karşılaşılabilecek bazı sorunlar;

Kanama (trombositopeni, yaygın damariçi pıhtılaşması)

İnfeksiyon

Tümör erimesi sendromu

Mukozitis (infeksiyon, beslenme zorluğu)

Hiperürisemi

Hiperpotasemi veya hipopotasemi

Karaciğer işlev bozuklukları (sitotoksik ilaçlar)

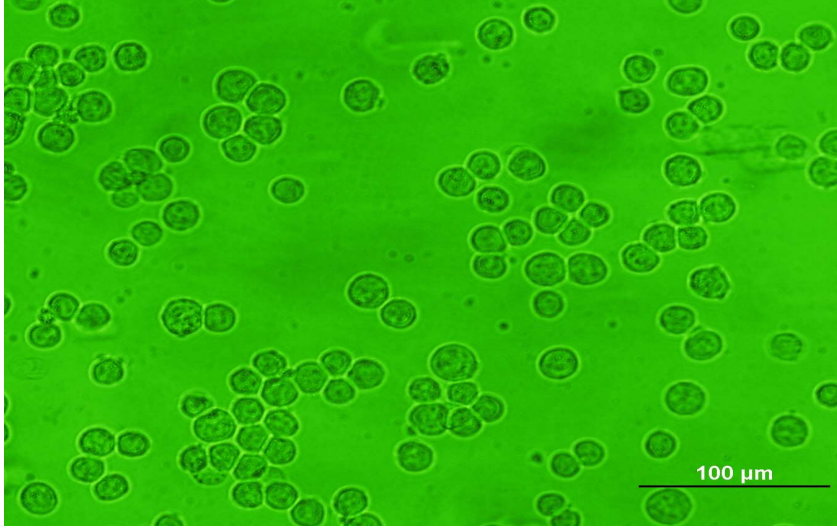
Böbrek yetersizliği (antimikrobiyal tedaviler)

Oral beslenememe

Ototoksisite

Nörotoksisite olarak sayılabilir (Tanyeli, 2003).

HL-60 Hücreleri ve Özellikleri



Şekil 2. HL-60 (İnsan AML hücre dizisi) Hücrelerinin Mikroskopik Görüntüsü

Bölünme süresi 36-48 saat arasında değişmektedir. Hücre dizisi ilk olarak Ulusal Kanseri Enstitüsü tarafından 36 yaşında AML hastası olan bir bayandan elde edilmiştir. Hücre dizisi, baskın olarak nötrofilik promiyelosid (öncü)' dir. HL-60 proliferasyonu, hücre yüzeyinde bulunan transferin ve insülin reseptörleri yoluyla meydana gelmektedir. Serumsuz kültür ortamından transferrin ya da insülinde herhangi birisi kaldırılrsa bile hücrenin proliferasyonu tamamıyla sona ermektedir. Bu nedenle, olgun granülositler kendiliğinden meydana gelen farklılaşma için, dimetil sülfoksit (DMSO) ya da retinoik asit gibi bileşenler tarafından indüklenebilir. Ayrıca, 1,25-dihidroksivitamin D3 , 12-O-tetradekanolforbol-13-asetat (TPA) ve granülosit makrofaj - koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi bileşikler de HL-60 hücre dizisinin monositik, makrofaj benzeri ve eozinofil fenotiplerinden kısmen de olsa ayırt edilmesini indükleyebilir (Gallagher ve ark., 1979).

HL-60 hücre dizisi, insan hücrelerinde miyeloid farklılaşmadaki olayları, fizyolojik, farmakolojik etkilerini, ve bu süreçteki virolojik elementleri belirlemede sürekli bir kaynak sağlamaktadır (Wang ve ark., 2009).

HL-60 hücre modeli, DNA topoizomera (topo) II α ve II β ' nin etkisini belirlemede, hücrelerde apoptozis çalışmalarında yaygın olarak kullanılmıştır (Ratanachoo ve ark., 2002).

Platin

Platin, 1735' te Kolombiya' daki altın madeni yataklarında İspanyol bilim adamı Antonio de Ulloa tarafından keşfedilmiştir. 1803' te İngiliz kimyacı William Wollaston tarafından ilk olarak saf platin olarak elde edilmiştir (http-6).

Sembölü Pt, atom numarası 78 ve atom ağırlığı 195,09' dur. Periyodik tabloda VIII-B grubunun içinde yer almaktadır. Bu grupta platin gibi altı tane kıymetli metal bulunmaktadır: Rutenyum, Rodyum, Palladyum, Osmiyum, İridyum ve Platin. Bunlar platin grubu metalleri veya kısaca platin metalleri olarak bilinir. Platin 1769°C' de erir, 3827°C' de kaynar. Oda sıcaklığındaki yoğunluğu, gümüşün yaklaşık iki katı, 21,46 g/cm³ tür. Platin, açık havada oksijen ve kükürt

bileşikleriyle kolaylıkla birleşmez ve bu yüzden mücevheratta gümüş gibi olan parlaklığını kaybetmez. Oda sıcaklığında kuvvetli asit ve alkalilerden etkilenmez ve aşınmaz, fakat sıcak altın suyunda (Üç hacim HCl ile bir hacim HNO₃’ ün karıştırılması ile elde edilir.) çözünür (Clarke, 2008).

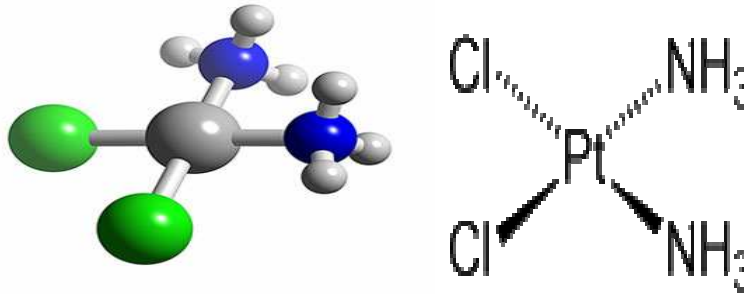
Yüksek sıcaklıklarda platin, klor, flor, fosfor, arsenik ve kükürtle reaksiyon verir. Platin, toz, yumuşak ve katı halde elde edilir. Platin siyahı denilen ve platinyum kloritin indirgenmesiyle elde edilen çok ince siyah bir toz katalizör olarak kullanılır. Geniş bir yüzey veren yumuşak platin güçlü bir katalizördür. Katı haldeki platin, mücevheratta olduğu gibi, yumuşak platinin eritilmesi suretiyle elde edilir (http-7).

Platin, iridyum, palladyum, rodyum, rutenyum, osmiyum, altın, nikel, kobalt ve tungsten gibi diğer metallerle faydalı alaşımlar teşkil edebilir. Platin, çok sayıda bileşikler de teşkil edebilir. Bunların çoğunda kendisi oksidasyon halinde ⁺² veya ⁺⁴ değerliklidir. En önemli bileşiklerinden biri hekza kloroplatinik asittir (H₂PtCl₆). Bu asit, platin metalinin altın suyunda çözünmesiyle elde edilir. Hekzakloro platinik asit, amonyum hekza kloroplatin, (NH₄)₂PtCl₆ yapımında kullanılır; bundan da yumuşak platin elde edilir. Hekza kloroplatinik asitle sodyum nitratın karıştırılıp 500°C’ de eritilmesiyle elde edilen ve katı halde siyah bir madde olan platin dioksit, birçok organik bileşiklerin hidrojenle birleştirilmesinde katalizör olarak kullanılır (Clarke, 2008).

Platin taşıyan ana mineraller olarak platin arsenit (sperilit), platik sülfite (kuperit), platin-palladyum monosülfite (bragit) ve yaklaşık % 80 platin ihtiva eden doğal platin sayılabilir. Tabiatta bulunan platinin çoğu stabil halde bulunan Pt-194, Pt-195, Pt-196 ve Pt-198 olarak bilinen dört izotop halindedir. Pt-190 ve Pt-192 izotopları ise radyoaktif izotoplardır (http-8).

Sisplatin

1965’ de Rosenberg, elektroliz deneyleri sırasındaki gözlemlerinde, E.coli’ de çok dikkat çekici bir etki oluşturduğunu görmüştür. E. coli normal uzunluğunun 300 katına kadar büyütülmüştür ve daha sonra hücre patlayarak normal hücre bölünmesine maruz kalmıştır. Deneylerde kullanılan platin elektrodunun solüsyonunda, çözülebilir platin bileşiklerinden çok küçük miktarlarda ürettiği görülmüştür (Gao ve ark. 2009; Lippert, 1999).

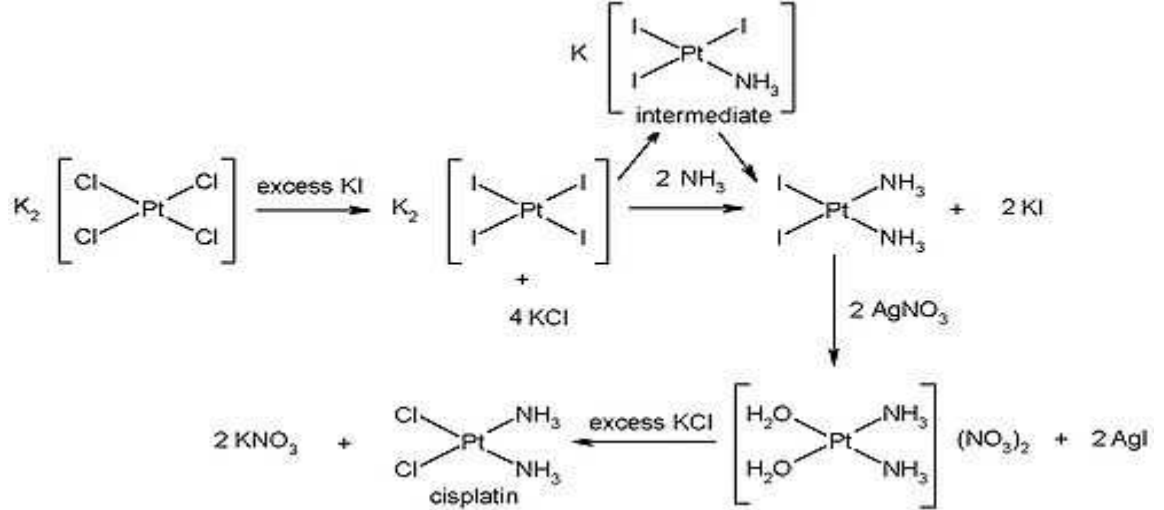


Şekil 3. Cisplatinin Yapısı (Lippert, 1999)

1970’ lerin başında bu çalışmayı takiben, belirli kanser tiplerinde sisplatinin hızlı hücre bölünmesinin gelişimini durdurduğu görülmüştür ve 1978’ de cisplatin, ilk önemli kemoterapi ilaçlarından birisi olmuştur (Gupta, 2008).

Sisplatinin Kimyasal Özelliği

Potasyum tetrakloroplatinat(II) , $K_2[PtCl_4]$ ’ dan başlayarak, ilk olarak NH_3 ligandını dört equivalent pozisyonunda eklenmektedir; fakat ikinci NH_3 amin ligandları sınırlamak için cis ya da trans şeklinde eklenmelidir. Çünkü Cl^- , NH_3 ’ den daha geniş trans etkiye sahiptir, ikinci amin tercihen klorid ligandına bağlanmalıdır, bu yüzden, orijinal amine cis şeklinde bağlanmaktadır. Halojenlerin trans etkisi, $I^- > Br^- > Cl^-$ sırasını takip etmektedir. Bu yüzden sentez, $[PtI_4]^{2-}$ kullanılarak hem daha verimli ürün elde edilmeli, hem de cis izomerin saflığı sağlanmalıdır (Lippard, 1987).



Şekil 4. Sisplatinin Kimyasal Sentezi (Lippard, 1987)

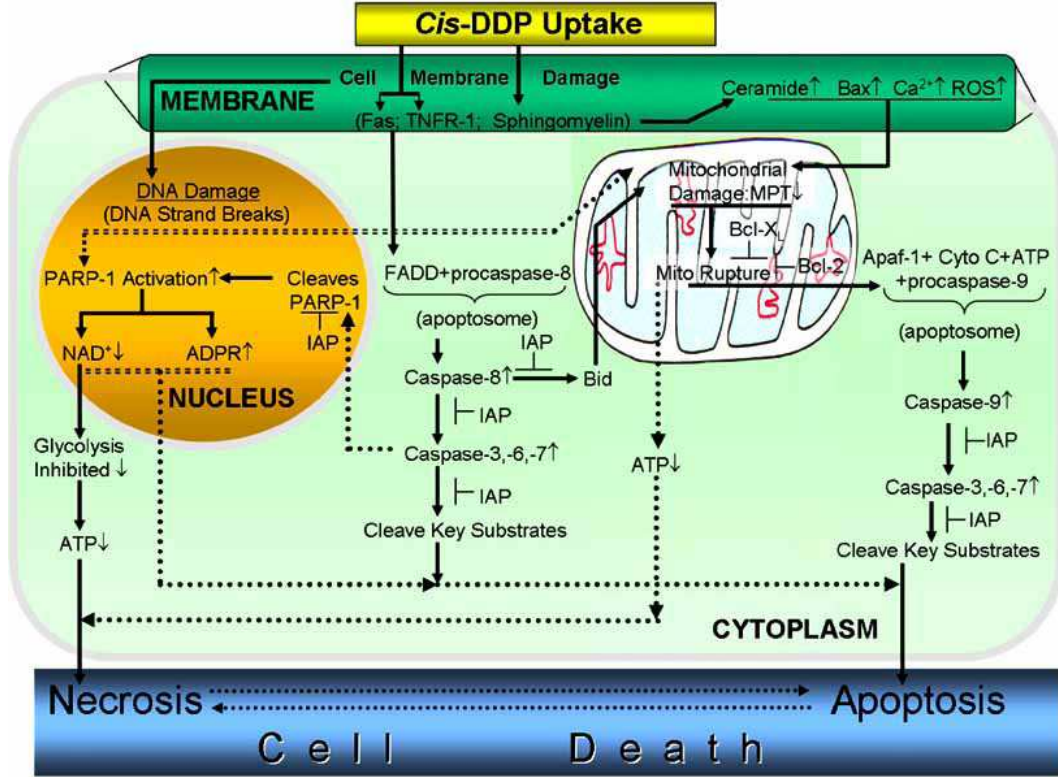
Sisplatin ve Kanser

1960’ larda, Michigan Devlet Üniversitesi’ nde, yapay olarak sarkomanın implante edildiği farelerde diğer platin kompleksleri ile beraber sisplatinin de birçok deneyi yapılmıştır. Bu çalışmada, sisplatin, diğer bileşiklerden daha etkili bulunmuştur. Böylece, sisplatinin medikal kariyeri başlamıştır. 1978’ de FDA (Food and Drug Administration) tarafından antikanser ajanı olarak onaylanmıştır. Sisplatinin binlerce analogu sentezlenmiş; fakat bunlardan sadece karboplatin ve oxaliplatin FDA tarafından onaylanmıştır (Capeda ve ark., 2007; Dietrich ve ark., 2008; Muggia, 2009).

1960 ve 1970’ ler zamanında araştırmacılar, antitümör aktivitesi ile ilgili birçok sitotoksik ajan üretmişlerdir. Bunlar arasında adriamisin (1970); sitoksan (1958); 5 FU (1957); sisplatin (1971) ve vinblastin (1960) bulunmaktadır. Bu periyod, kanser kemoterapisinde, sisplatinin altın çağı olarak ifade edilir (Lippert, 1999).

Sisplatinin hücreyi öldürmesi ile ilgili kesin bir mekanizma yoktur. Fakat bu konuda bazı görüşler bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi sisplatinin hücre içerisinde hidrolize uğramasıdır. Hidrolizis, hücre dışı sıvıdan çok, düşük konsantrasyonlardaki klorid iyonları sayesinde kolaylaşmaktadır. Sisplatinin klorid ligandı, hücre içerisindeki su molekülü tarafından yerleştirilmiştir. Hücre içinde hidrolizis, kompleks dengelerin ilerlemesini başlatır. Mono-sıvı kloroplatin (II) türevleri, sisplatin olmayan, hücre ölümüne sebep olan çeşitli hücresel hedefleri bağlayarak, hidrolizis sırasında aktiftir (Roberts ve ark. 1999).

Hidrolize olan sisplatin, DNA, RNA, proteinler, metalotionein ve glutatyon gibi sülfür içeren enzimler, mitokondri, membran fosfolipidleri ve mikrofilamentler gibi çeşitli hücrel hedeflerle reaksiyona girmektedir. Birçok hücrel bileşenin sisplatin ile etkileşime girmesine rağmen, birçok çalışma sitotoksiteden sorumlu birincil hedefin DNA olduğunu göstermiştir (Lippard, 1987; Gupta, 2008).



Şekil 5: Nekrozis ve Apoptozis Arasındaki Bağlantılarla Beraber, Sisplatin Tarafından İndüklenen Biyokimyasal Hücre Ölüm Yolları (Capeda ve ark. 2007).

Düzenlenen sisplatinin yaklaşık %1' inin genomik DNA' yı bağladığı tahmin edilmektedir. Sisplatinin, platin atomu, guanin ya da adenin bazlarının N7 pozisyonuna kovalent bağlarla bağlanmaktadır. Bu da iki komşu guanin bazını ilk olarak 1,2 çapraz bağ ve sonrasında 1,3 çapraz bağla bağlamaktadır. DNA' nın bozulmasıyla ortaya çıkan farklı Pt - DNA bileşenleri, tümör hücrelerinde çeşitli hücrel cevapların sebebiyle ortaya çıkmaktadır. Çeşitli hücrel cevaplar, sisplatin hasarlı DNA tarafından indüklenmektedir (Wang ve Giandomenico, 1999).

Sisplatin DNA bileşeni, transkripsiyon ve replikasyonun inhibisyonuna yol açmaktadır. Transkripsiyonun inhibisyonu, hücre döngüsünün G2 fazında yakalanmasına sebep olur. Sisplatin, birçok RNA polimerazı, kendi bloğu ile bağlayabilir. Bloke edilen RNA polimerazlar, TFIIH, XPA, RPA, XPG ve XPF tamir faktörlerinin temini için tetikleyici olarak rol oynamaktadır. Sonuç olarak, hücrenin ölümü, G2 fazında hücre döngüsünün durmasıyla DNA hasarından kaynaklanmaktadır. Eğer, hasar onarılamayacak boyutta ise hücreler apoptoza gider, hasar onarırsa hücreler yaşamlarına devam ederler (Gupta, 2008).

Platin Bileşenlerinin Hücre İçine Girişi

Sisplatine hassas ve duyarlı hücrelerde, sisplatinin akümüasyonu (birikmesi) ile ilgili bulunan birçok gözlemi düzenleyen çalışma modeli, Gately ve Howell tarafından yayınlanmıştır. Tarif edildiğinden daha karmaşık olabilen bu mükemmel model de, ilaç alım hızının yarısının pasif difüzyon, yarısının da kapılı kanallar yoluyla kolaylaştırılmış difüzyonla olduğu tasarlanmıştır. Bu model, protein kinaz A (PKA), protein kinaz C (PKC) ya da kalmodulin bağımlı kinaz aktivasyonu ile başlatılan fosforilasyon tarafından kanaldan akışın gerçekleştiğini gösterir (Pizaro ve Sadler, 2009; Kasparkova ve ark., 2006).

Kanallardan akış, dokoheksanoik asit (DCHA), dipiridomal, 1-propargil - 5 - kloropirimidin- 2- one (NY3170), kalmodulin inhibitörleri (W-7), amfoterisin B (AmB) ve PKA (proteinkinaz A) ya da PKC (proteinkinaz C) 'nin fosforilasyonu yoluyla düzenlenir. Kanallardan akış, ayrıca ekstraselüler osmolalite ve ekstraselüler pH, membran potansiyeli, fonksiyonel $Na^+ / K^+ ATPaz$ ' a bağlı gibi gözükse de, çeşitli aldehytler tarafından potansiyel olarak azalabilir. Bu model şu şekilde kuvvetlendirilebilir: 1- hücre içine alımı % 50 bloke etmek için, membranlardan geçemeyen aldehytlerin gücü. Kanalların kritik amino asit gruplarının hücrenin dış yüzeyinde olduğunu gösterir. 2- Hücre içi platin içeriği, artan membran nedeniyle daha yüksek sıcaklıkta artar. Önemli bir gözlem de, akümüasyonun %50 ' den fazla olduğunun hiçbir durumda rapor edilmemesidir. Sisplatin analoglarından daha lipofilik olanlar, dayanıklı hücrelerde, azalmış akümüasyon sergilemezler ve daha az çapraz dayanıklılık gösterirler (Gonzalez ve ark., 2001; Drobnik, 1983; Barı ve ark., 2003).

Sisplatinin Etki Mekanizması

Monofonksiyonel ilaçlar, DNA' ya bir noktadan bağlanırlar. Alkilleyici kanser ilaçlarının çoğu, bifonksiyonel niteliktedirler ve çift-sarmal DNA' ya iki noktadan bağlanırlar. Bu iki nokta, çift sarmalın ipliklerinden her biri üzerinde ise, iplikler arası (interstrand) çapraz bağlanmadan, aynı iplik üzerinde ise, iplik içi (intrastrand) bağlanmadan söz edilir. Aktif veya reaktif metabolitin bağlandığı noktalardan biri DNA, diğeri de histon üzerinde ise, DNA-protein bağlanmasından söz edilir. Alkillenme, DNA' nın replikasyon ve transkripsiyonunu bozar. Sisplatin, DNA çift-ipliğinde, iplikler-arası ve iplik-içi çapraz bağlanma yapar; bu nedenle etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ajanlarınkine benzer (Kayaalp, 2009).

Hücre Kültüründe Sitotoksik Etkilerin Değerlendirilme Yöntemleri

Sitotoksiste, bir kimyasal bileşiğin veya ajanın hücreleri öldürme özelliğidir. Nekroz veya apoptozun tersine sitotoksiste, belirli bir hücre öldürme mekanizmasını belirtmez. Hücrelere bağlı gelişen sitotoksiste (sitotoksik T hücreleri, NK hücreleri), bazı yönlerden hem nekroz ve hem de apoptozun bir kombinasyonu olabilir (Wang ve ark., 2009; Temizkan ve Arda, 1999).

Sitotoksik etki şu yöntemlerle değerlendirilebilir:

Membran bütünlüğüne dayanan yöntemler ve metabolik aktiviteye dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır.

Membran bütünlüğüne dayalı yöntemler, hücrelerin tripan mavisi, naftalin siyahı gibi boyalarla boyanarak, mikroskopta hemositometre ile sayımına dayanan, boya atılım yöntemidir. Diğer bir yöntem ise, Laktat Dehidrogenaz (LDH) salınım testidir. LDH, hücrelerin sitoplazmasında bulunan bir enzimdir ve hücre membran bütünlüğü bozulması sonucunda ortama salınır.

Metabolik aktiviteye dayalı yöntemler ise, canlı hücrelerin metabolik aktivitelerinin ölü hücrelerden daha fazla olduğu prensibine dayanır. Kültür ortamına tetrazolyum tuzları eklenerek MTT, XTT yöntemi metabolik aktivite ölçümü yapılabilir (Şahin ve ark., 2007).

Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Sitotoksik Ölçüm Yöntemi (MTT)

İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimethylthiazol-2) -2,5- diphenyl tetrazolium bromide (MTT) yöntemi hücrelerin uygulanabilirlik, verimlilik ve aktivasyonunu ölçen hassas, nicel ve güvenilir bir kolorimetrik yöntemdir (Twentyman ve Luscombe, 1987).

Yöntem, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine dayanmaktadır. Hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine canlılığı azaltan; fakat öldürmeyen özellikteki, sarı renkli, suda çözünebilir tetrazolium boyası (MTT) , hücrelere aktif olarak absorbe olur ve suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazana indirgenir. Formazan miktarı, direk olarak hücre hatlarındaki hücre sayısı ile orantılıdır. Yani; hücrelerin MTT indirgeme özelliği, hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda, tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Elde edilen boya yoğunluğu, canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir (Bernas ve Dobrucki, 2002). Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, presipite (tortu oluşturma) reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır (http-9).

MTT yöntemi, bölünmemiş fakat hala aktif olan hücreleri ortaya çıkarmada kullanışlı bir yöntemdir. Proliferasyon ve hücre aktivasyonunu ayırt edebilmektedir. Bu teknik üstün tarayıcı özelliğindeki spektrofotometre (micro-ELISA reader) kullanarak, sayıca çok olan örneklerin yüksek doğruluk derecesiyle okunmasına olanak sağlar (Hatok ve ark., 2009).

Hücre Kültüründe Apoptotik Etkilerin Değerlendirilme Yöntemleri

Hücrede Apoptozisin gözlenebilmesi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlar: Sitoplazmik değişikliklerin saptanması (örneğin kaspaz aktivitesinin, hücreye kalsiyum akışının veya mitokondri disfonksiyonunun ölçülmesi).

Membran değişikliklerinin belirlenmesi (membran geçirgenliğinin değişmesi).

Apoptozde görevli çeşitli proteinlerin kanda veya dokuda düzeyinin ölçülmesi (Bcl2/Bax oranı).

DNA parçalanmasının çeşitli özel immünohistokimyasal boyalarla saptanması.

Bütün bu yöntemler içinde en sık rastlanan yöntemler, DNA'daki değişikliklere dayalı olan; DNA agaroz jel elektroforezi ve TUNEL (terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP nick end labeling) boyası ile formalinde fikse edilmiş materyalde yapılan mikroskopik incelemedir.

Son dönemde kullanılan önemli ve güvenilir bir başka metod ise Annexin-V boyası uygulaması (Akış hücremetre) ve ELISA yöntemidir (Gorman ve ark., 1997).

Flow Sitometri (Akış Hücremetre) Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

"Flow" sitometri 1950' li yıllardan beri üzerinde sürekli çalışılan araştırma laboratuvarlarının en önemli tekniklerindendir. Birçok bilim dalında yaygın kullanıma sahiptir.

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik parçaların fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. "Flow" sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir. Akım sitometrinin major kullanım alanları subtiplerine kadar hücre tespiti (HLA CD = Human Leucocyte Antijen Cell Differentiation, İnsan Lökosit Antijeni Hücre Ayırımı Belirteci) ve biyolojik çalışmalar için epitop ekspresyonudur. "Flow" sitometri ışık mikroskopi ile kıyaslanınca çok daha fazla hücreyi daha kısa sürede inceleme fırsatı vermesiyle avantaj sağlamaktadır. "Flow" sitometrik teknik ile 1 saniyede 500 hücre sayılır ve ortalama 10 000 hücreyi 20 saniyede analiz edebiliriz. Bu analiz hücre süspansiyonunun hazırlanması, hücrelere monoklonal antikor eklenmesi, cihazın kalibrasyonu, kontrol ve örneklerin cihazda çalışılması, veri analizi ve veri yorumu ve raporu aşamalarından oluşur (Taneli, 2007).

"Flow" Sitometri analizi için hücre süspansiyonu hazırlamak amacıyla kan, kemik iliği, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveoler lavaj sıvısı, eklem sıvısı, plevral sıvı, asit sıvısı, doku biyopsi örnekleri, parafin bloktaki dokular ve hücre kültürü örnekleri kullanılabilir (Laerum ve Farsund, 1981).

Tam kan örneğinden ön işlemler ile elle (manuel) ya da otomatik ön işlem cihazları ile çalışılması istenen hücre süspansiyonu (eritrosit, lökosit ve trombosit gibi) hazırlanabilmektedir (Dalva, 2006). "Flow" sitometrede, hücrenin büyüklüğü, hücrenin iç yapısı (granülaritesi), ve hücrede incelemek istediğimiz antijene ait işaretlediğimiz monoklonal antikorun floresansı ölçülmektedir. "Flow" sitometri tekniği ile sıklıkla rutin laboratuvarlarda lökosit süspansiyonlarında analizler yapılmaktadır. Lökositlerin ayrılması ise hücre büyüklüğü ve granül yapısına göre yapılmaktadır (Gorman ve ark. 1997; Taneli, 2007).

Flow sitometri kullanım alanları

Ümmunofenotiplendirme analizinde, tüm hücrelerin yüzeyinde ve hücre içinde hücreye ve maturasyonuna spesifik antijenler mevcuttur. "Flow" sitometri ile hücrelerin eksprese ettikleri antijenlere karşı monoklonal antikorlar kullanılarak kan yada kemik iliği gibi karışık populasyonda belli bir hücrenin belirlenmesi ve ayrılması yapılabilir. İmmunofenotiplenmenin tıpta kullanım alanları: Lenfoma ve lösemi immünotiplenmesi (KLL, ALL, AML, KML), hematolojik hastalıkların belirlenmesi (ITP, nötrofil fonksiyon defektleri), immün yetmezliklerin teşhisi, kemoterapi etkinliğinin izlenmesi, otoimmün hastalıkların tanısı, transplantasyon

öncesi ve sonrası hasta durumunun gözlemlenmesi ve allerjik hastalıklarda kullanılmaktadır (Gorman ve ark., 1997). Günümüzde en sık lösemi, lenfoma ve myeloma hastalarında kullanılır. Lösemi immünofenotiplemesinde en sık kullanılan örnekler kan ve kemik iliğidir. Sağlıklı bir insanla lösemili bir insanın kan örnekleri arasında dramatik farklılıklar mevcuttur. Sağlıklı insanlarda kan profili kesindir ve bilinir ancak lösemili hastalarda profil çok değişkendir. Bu alanda kök hücre çalışmalarında özellikle "flow" sitometrik analizlerle tedaviler yönlendirilebilmektedir (Taneli, 2007).

DNA Fragmentasyon Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

Genetik olayların hücrede moleküler düzeydeki temeli, genetik materyal görevini yüklenen nükleik asitlerin yapı ve özelliklerine dayanır. Bu nükleik asitler deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA)'dır. DNA, hücre içerisinde serbest halde bulunmaz. Belli bir organizasyonu vardır. DNA'nın çok büyük bir kısmı nükleusta, bir miktarı ise mitokondri ve kloroplastta bulunur. DNA molekülleri nükleuslarda da serbest halde bulunmazlar. DNA kromatin iplikçikleri ve sonrada kromatinleri verecek şekilde özel bazı proteinler ve RNA ile bir kompleks yapı meydana getirir. Kromatin yapı taşı DNA, histon proteinler, histon olmayan proteinler, HMG proteinler ve RNA'dan meydana gelmiştir (Ioannou ve Chen, 1996).

Bazı kimyasal maddeler ve enzimler ile canlı hücelere ait hücre zarı veya canlı hücre duvarının yıkılıp DNA'nın ortaya çıkarılmasına DNA izolasyonu denir. Bir organizmanın toplam DNA'sı yani genomik, mitokondrial ve kloroplast DNA'sı fragmentlerine izole edilerek restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilir. DNA'nın bantlarını seçici olarak daha kısa fragmentlere ayırmak için sayısız restriksiyon enzimi kullanılmaktadır. Restriksiyon enzimi, DNA segmentlerini spesifik nükleotid dizilerinden kesmektedir. Bu tanımlama dizileri, tipik olarak 4, 6, 8, 10 ve 12 nükleotiddir. DNA'nın saflaştırılmasında DNA'sı izole edilecek hücreler çeşitli yöntemlerle parçalanır. Elde edilen özüt, santrifüjde çok hızlı döndürülerek DNA içeren bölümü ayrılır. Bu bölüm bir deterjan ve protein parçalayıcı enzim ile birlikte 37 °C de tutulur. Bu işlem sırasında DNA'ya bağlı proteinler parçalanır. Bu şekilde DNA, protein ve diğer moleküllerden ayrılır ve saf olarak elde edilir. Son olarak DNA etil alkol içerisinde çöktürülür. DNA yapısını koruyacak bir tampon çözelti içerisine alınarak 4 °C 'de saklanır. DNA fragmentasyonunda kullanılan DNA enzimleri: polimeraz, restriksiyon endonükleaz ve fosfotazlardır. Restriksiyon endonükleazlar DNA'yı belli dizimlerinden özgül olarak tanıyıp, kesen bakteriyel enzimlerdir (http- 10).

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz kırmızı bir alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen doğrusal bir polisakkarittir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Bu oluşum geri dönüşümlüdür. Ticari olarak üretilen agarozların saflık dereceleri farklı olabilmektedir. Bu durum DNA'nın göç hızını etkiler. Ayrıca kimyasal yapısı değiştirilerek düşük sıcaklıkta eriyebilen agaroz tipleri de geliştirilmiştir. Bu agarozların ayırım gücü çok fazladır. DNA jelden geri kazanılacaksa bu tip agaroz uygun olur (http- 11).

Agaroz konsantrasyonu % 0,5 – 1,5 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece, küçük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için ise düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA' nın jelde en uygun şekilde yürümesi sağlanır. DNA' nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm' de ışığı absorblaması sonucu flüoresan etki göstermesi ile olur (Taneli, 2007; Temizkan ve Arda, 1999).

İzole edilen DNA' nın genomik ya da plazmid DNA' sı olmasına göre jeldeki görünüşleri farklılık gösterir. Genomik DNA, keskin bir bant ile bu bantın aşağı yukarı kısmına doğru biraz yayılan bir görüntü verir. Plazmid DNA ise genellikle DNA' nın üç formun farklı şekilleri gözlenir. Plazmid DNA' sına ait süper sarmal biçim, gevşek sarmal biçim, ve doğrusal biçim görülebilir. Molekül ağırlıkları aynı olmasına karşın, bu üç formun jeldeki göçleri farklıdır. Bu farklılık agaroz konsantrasyonuna bağlı olmakla beraber, uygulanan akıma, tamponun iyonik kuvvetine bağlıdır. Optimize olmuş koşullarda genellikle süper sarmal biçim diğerlerine göre daha hızlı hareket eder. Jele fazla miktarda DNA yüklenmesi sonucunda kenar ve hız etkisi ile jelde yanlış yorumlara yol açabilecek görüntüler ortaya çıkabilir. Örneğin, eğer fazla DNA yüklenirse keskin bir bant yerine yaygın bir görünüm meydana gelebilir. Bazen de jelin tamamında elektrik akımının aynı olmaması nedeniyle, aynı DNA molekülleri jelin farklı bölgelerinde değişik hızda göç edebilir. Bu durum, düşük voltaj uygulamasıyla bir ölçüde ortadan kaldırılabılır. Ayrıca, örneğin içinde bulunduğu solüsyonun tuz konsantrasyonu da DNA' nın jelde yürümesini etkilemektedir (Gülçin ve ark., 2008).

GEREÇLER

Kullanılan Maddeler

Roswell Park Memorial İnstitute medyum : Sigma - Aldrich, Almanya
(RPMI-1640)

Absolü Etanol : Riedel-de Haen, Almanya

Agaroz (High Resolution) : Sigma - Aldrich, Almanya

Annexin V-PI apoptosis kit : Millipore, U.S.A

Annexin V-PI Apoptosis Kit : Millipore, U.S.A

Borik asit (H₃PO₄) : Applichem, Almanya

DimetilSülfoksit (DMSO) : Sigma – Aldrich, Fransa

Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) : Sigma – Aldrich, Darmstadt, Almanya

Etidyum bromid	: Applichem, Almanya
Etilenediaminetetraasetik asit	: Sigma – Aldrich, U.S.A
Fetal Sığır Serum (FBS)	: Sigma – Aldrich, Almanya
L-glutamin	: Sigma – Aldrich, Almanya
Yükleme Tamponu (Sigma)	: Sigma – Aldrich, Avustralya
Moleküler Ağırlık Belirleyici	: Sigma – Aldrich, Fransa
Penisilin-Streptomisin Solüsyonu	: Biochrom, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat(KH_2PO_4)	: Merck, U.S.A
Proteinaz K	: Sigma – Aldrich, Avustralya
RNase inhibitor	: Bio Basic, Kanada
Sisplatin	: Onco- TAIN, Avustralya
Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)	: Merck, U.S.A
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	: Merck, U.S.A
Sodyum hidroksit	: Reidel deHaen, Almanya
Sodyum klorür (NaCl)	: Merck, U.S.A
Sodyum Pirüvat	: Biochrom, Almanya
Tripan Mavisi Solüsyonu	: Biological industries, Kanada
Tris HCl	: Applichem, Almanya
Tritonx100	: Applichem, Almanya
Trizma base toz	: Sigma - Aldrich, Fransa
MTT	: Sigma - Aldrich, Avustralya
HL-60 insan lösemi hücre dizisi	: İstanbul Üniversitesi, Temel Tıp Bilimleri, Histoloji ve Embriyoloji ABD Prof. Dr. Ayhan BİLİR
Kriyotüp (2mL)	: TRP, İsviçre

Eldiven	: Breeze, Afyon, Türkiye
Filtre (0,22 µM milipor)	: TRP- Almanya
Kültür plakası (6 ve 96 kuyucuklu)	: TRP, İsviçre
Mezür (50, 100, 500, 1000mL'lik)	: Isolab, Almanya
Mikropipet ucu (silikonlu 10, 200, 1000 µl)	: Eppendorf, Kanada
Neubauer lamı	: Marienfeld, Almanya
Otoklavlanabilen kültür şişesi (50,100, 250mL, 500mL,1000mL)	: Isolab, Almanya
Parafilm	: Menasha, Amerika
Santrifüj tüpleri (15, 50 mL)	: TRP, Almanya
Hücre kültür flaskı (25 cm ² lik)	: TRP, Almanya
Hücre kültür flaskı (75 cm ² lik)	: TRP. Almanya
Tek kullanımlık dereceli pipet (5mL-10mL- 25mL)	: HBG, Almanya
12 kanallı otomatik pipet	: Eppendorf, Kanada
pH metre	: Merck, Almanya

Kullanılan Cihazlar

İnverted mikroskop	: Olympus, Hamburg
Sterilizatör	: Nüve FN 500, Türkiye
Buzdolabı	: Arçelik, Türkiye
CO2'li Etüv	: Hera Cell 240Thermo Scientific, Almanya
Derin dondurucu (-20 ° C)	: Vestel No Frost, Türkiye
Elektroforez	: BioRad, İtalya
Etüv	: Venticell, Almanya

Hassas terazi	: Ohaus, İsviçre
Otoklav	: Hirayama, HICLAVE HV-50 L, U.S.A
Laminar kabin (Steril Kabin)	: HERAsafe® Class II, U.S. A
Manyetik karıştırıcı	: Isolab, Almanya
Mikrodalga fırın	: Arçelik, Türkiye
Mikrosantrifüj	: Mikro 120- Hettich, Almanya
Su banyosu	: Nüve BM 302, Türkiye
Sarjlı Pipetör	: Isolab, Almanya
Vorteks	: Heidolph, Almanya
Akım Hücremetre (BD)	: BD FACSAria™ Flow Cytometri, Kanada
Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi	: UVP EC3 İmaging System, U. S. A
Santrifüj	: Eppendorf Santrifüj, 5810 R, Almanya

YÖNTEMLER

Tez çalışmasındaki deneyler, Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi ve Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmamızda HL-60 hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırıldığı, piridin-2-carbaldoksim ligandı ve platin(II) kompleksi ile sisplatin, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Kadriye Benkli’ den ve HL-60 hücre dizisi de İstanbul Üniversitesi Tıp fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr.Ayhan Bilir’ den temin edilmiştir.

HL-60 Lösemi Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık

Tez çalışması süresinde deneylerde kullanılmak üzere HL-60 hücre dizisi, içinde % 10 fetal bovine serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin, % 1 L-glutamin içeren RPMI-1640 besiyerinde, % 5 CO₂’li etüvde 37° C’de süspansiyon kültür ortamında çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı stoklanarak tez çalışmasının sonraki deneyleri için depolanmıştır.

HL-60 hücrelerini stoklama: Hücreler, ilk ekim zamanından sonra, yeterli miktarda çoğalmışsa, çoğalan hücreler, kültür kabından PBS yardımıyla kaldırılmış, santrifüj tüpü (falkon) içerisine aktarılıp, 1200 rpm’ de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp, pelet üzerine her bir kriyotüp (vial) için 1800 µL hücre besiyeri konulmuştur. Homojen şekilde

dağılıncaya kadar pipetleme yapılmıştır. Santrifüj tüpünde elde edilen bu hücre, besiyeri karışımı 30 dakika kuru buz üzerinde bekletilmiştir. 30 dakika sonrasında, hazırlanacak vial miktarına göre, her bir vial için 200 µL dimetilsülfoksit (DMSO) çözeltisi (hücrenin canlılığını uzun süre korumak için), santrifüj tüpüne aktarılmıştır. DMSO, karışım içine eşit dağılıncaya dek pipetleme yapılmıştır. Karışımın homojen hale geldiğinden emin olduktan sonra, santrifüj tüpündeki hücre, besiyeri ve DMSO çözeltisi karışımından her bir vial için 2 mL alınarak, viallere aktarılmıştır. Viallerin kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra, vialler -20 °C' ye konulmuştur. Yaklaşık 3-4 saat sonrasında viallerdeki hücre karışımının katı hale (donma) gelip gelmediği kontrol edilmiş ve hücre karışımı katı hale geldiğinde, sıvı azot tankına (-196° C), daha önceden belirlenen stok kutularına yerleştirilmiştir.

Stoktan hücre çıkarma: Azot tankından (-196° C) çıkarılan HL-60 hücrelerini içeren vial, 37°C' lik su banyosunda hızla eritildikten sonra hücre-medyum-DMSO karışımı, 1000 µL' lik otomatik pipet (Eppendorf, Kanada) yardımıyla alınarak, içinde 5 mL besiyeri (% 10 fetal bovine serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin, % 1 L-glutamin içeren RPMI-1640 besiyeri) bulunan santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Santrifüj tüpü, 1200 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, süpernatant atılmış, pelet üzerine 5-10 mL besiyeri eklenmiştir. Hücre peleti ve besiyerinin homojen şekilde karışmasını sağlamak amacıyla, pipetleme yapılmıştır. Elde edilen besiyeri-hücre karışımı otomatik pipet yardımıyla, santrifüj tüpünden alınarak, hücre kültür kaplarına aktarılmış, 37 °C ' de, %5 CO₂ içeren etüvde (Hera Cell 240 Thermo Scientific, Almanya), inkübasyona bırakılmıştır.

Hücre sayımı: Hücre sayımı, hücreler pasajlanmadan veya deneye alınmadan önce, mikroskop altında yapılmıştır. Bu işlemde, ilk olarak hücre kültür kabında bulunan ve çoğalan hücreler, santrifüj tüpüne aktarılmış ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve hücre peleti üzerine 1 mL (sayımlar 1 mL' deki hücre sayısı olarak çalışılmıştır.) besiyeri eklenmiş, homojen bir karışım elde edilene kadar pipetleme işlemi yapılmıştır. Elde edilen karışımdan 20 µL alınarak, 20 µL tripan mavi boyası ile karıştırılmıştır. Neubauer lamında, üzerine lamel kapatıldığı zaman 1 mm' lik derinlik meydana gelmektedir. Neubauer lamı, özelliğinden dolayı, kenarlarda 4 büyük kare, her bir karenin içinde 16 küçük kareden meydana gelmektedir. Bu karelerin kesiştiği alanda, 5 tane küçük kare bulunmaktadır ve bunların her birisi 16 küçük kareden oluşmaktadır. Üzerine 20 µL olmak üzere lamın her iki tarafından verilerek, mikroskop altında sayım işlemi yapılmıştır. Sayma işleminde kenardaki 4 büyük kare ve ortadaki 5 küçük kare sayılmıştır ve ortalama rakam elde edilmiştir. Elde edilen rakam neubauer lamının derinlik kuralı olarak 10⁴ ile çarpılmış ve canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Hücreler sayılırken, koyu renkli olan ölü hücreler dikkate alınmamış, parlak olan hücreler sayıma katılmıştır.

HL-60 Hücre Dizisinin Pasajlanması: Yukarıda anlatıldığı şekilde stoktan çıkarılan ve hücre kültür kaplarına ekilen hücreler, stoktan ilk çıktıkları günden 2-3 gün sonra, gerek besiyerlerinin kirlenmesi, gerekse zamanla bulundukları alanın çoğalan hücrelere yetmemeye başlayıp, yeterli oranda üreyemediklerinden dolayı, mikroskopta hücrelerin durumu incelenerek, başka bir hücre kültür kabına aktarılmalı gerekmektedir. Mikroskoptaki hücre yoğunluğuna göre hücreler,

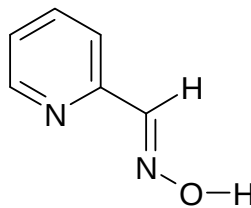
daha büyük bir hücre kültür kabına bölünür veya sadece besiyerleri değişir. Bunun için aşağıdaki işlemler uygulanarak pasajlama işlemi yapılmıştır. Hücre kültür kabındaki hücre medyum karışımı pipet yardımıyla santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Kültür kabında kalan hücreler göz önünde bulundurularak, hücrelerin hepsini almak, başka bir deyişle kültür kabını yıkamak için, daha önceden 37° C’ de sıcak su banyosunda ısıtılan PBS’ den (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi- 1 L distile suya 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄ eklenir.) 2-3 mL kültür kabına pipetle boşaltılmıştır. Kültür kabının köşeleri, yüzeyleri yıkanmış ve bu şekilde kalan hücreler de alınmış olur. Bu PBS ve hücre karışımı da, az önce santrifüj tüpüne konan hücre besiyeri karışımının üzerine ilave edilmiştir. Hücrelerin çökmesini sağlamak amacıyla, santrifüj tüpü, 1200 rpm’ de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, süpernatant atılmış, pelet üzerine kullanılan hücre kültür kabının büyüklüğüne göre 25 cm²’ lik ise 8-15 mL besiyeri, 75 cm²’ lik ise 12-20 mL besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılarak hücrelerin eşit oranda dağılması sağlanmıştır. Santrifüj tüpünde eşit olarak dağılan hücreler, hücre kültür kaplarına pipet yardımıyla alınarak, hücre kültür kabına konulmuştur. Bu yapılan işleme hücre kültüründe pasajlama adı verilmektedir.

Maddelerin Hazırlanışı

Sisplatinin, Piridin-2-karbaldoxim ligandı (PKL) ve Piridin-2-karbaldoxim Pt(II) kompleksi DMSO da çözünerek stok solüsyonlar hazırlanmıştır, -20°C de saklanmıştır. Bu stok solüsyonlar hücre besiyerinde seyreltme işlemlerinden geçerek, üç maddeninde 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Maddeleri DMSO’ da çözdüğümüz için, çalışmalarda normal kontrol grubu (besiyeri kullanılan) haricinde DMSO-kontrol (1 mL besiyeri içinde 0.001 mL DMSO) grubu da oluşturulmuştur. Konsantrasyonların seyreltilmesi işleminde, en yüksek konsantrasyonda DMSO oranının % 0.1 olmasına dikkat edilmiştir.

Piridin 2-Karbaldoxim Ligandı

Piridin2-karbaldoxim Aldrich ürünlerinden satın alınarak temin edilmiştir.



Şekil 6. Piridin2-Karbaldoxim Ligandının Kimyasal Yapısı

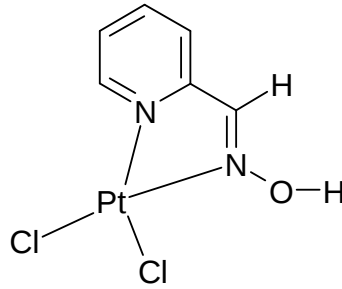
Piridin 2-karbaldoxim Pt(II) Kompleksi

Piridin 2-karbaldoxim’ in EtOH’ daki ve K₂PtCl₄’ ın H₂O’ daki çözeltileri oda ısısında 12 saat karıştırılmıştır. Çökelek süzölmüş, birkaç defa su ve dietileter ile yıkandıktan sonra vakumlu desikatörde kurutulmuştur.

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}) : 3425, 3148, 3110, 3080 (aromatik N-H, C-H gerilim bandları), 1615, 1453, 1413 (C=N ve C=C gerilim bandları), 321 (M-Cl), 299 (M-N).

^1H -NMR(300 MHz) (DMSO- d_6) δ (ppm) : 4.07-4.15 (1H, bs), 9.55-9.75 (4H, m), 10.50 (1H, bs).

MS (ES): m/z: 387 [M+1]



Şekil 7. Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksi' Kimyasal Yapısı

Sitotoksite ve Apoptoz Yöntemleri

Mitokondriyal Aktivite Testi (MTT)

2×10^4 hücre/ml yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan HL-60 hücre süspansiyonundan, 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına her kuyucukta 100 μL olacak şekilde aktarılmış ve madde konsantrasyonları hücrelere verilmeden önce, kültür plakalarındaki hücreler % 5 CO_2 ' li etüvde 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu şekilde sisplatin, PKL ve PKpt(II) için ayrı ayrı hücre kültür plakaları hazırlanmıştır. Daha sonra, her bir konsantrasyon için, 8 plaka kuyucuğu kullanılacak şekilde, kuyucuklara sisplatin, PKL ve PKpt(II) 5, 10, 25, 50, 100 μM konsantrasyonları verilmiştir. Yine her madde için, hücre içeren 8 kuyucuğa besiyeri ve 8 kuyucuğa da % 0.01 oranında DMSO içeren besiyeri verilmiştir (Maddelerin konsantrasyonları hazırlanırken en yüksek madde konsantrasyonu, % 0.01 oranında DMSO içerecek şekilde seyreltmeler yapılarak hücre besiyerinde hazırlanmıştır). Kontrol, DMSO-kontrol ve madde konsantrasyonlarını içeren hücre kültür plakaları % 5 CO_2 'li etüvde, 37°C 'de, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır.

Her bir inkübasyon süresi sonunda, kültür besiyeri ile taze olarak hazırlanmış MTT çalışma solüsyonundan ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$), plakaların her bir kuyucuğuna 10 μL ilave edilmiş ve plakalar 3-4 saat 37°C lik etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda etüvden plakalar alınmış ve süspansiyon HL-60 hücrelerini içeren kuyucuklardaki besiyerini dökemediğimiz için her bir kuyucuğa 1N HCl ile hazırlanmış 2-propanol'den 100 μL ilave edilmiş ve kuyucukların optik yoğunlukları (dansiteleri) ELIZA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu deneyde her bir maddenin her bir inkübasyon süreleri 3 tekrar olarak

çalışılmıştır. MTT boyası ışıktan bozulduğu için deneyde MTT boya ilavesi ve sonraki aşamaları karanlıkta yapılmıştır (Hatok ve ark., 2009; Cantürk, 2006).

Annexin V - Fıtc/PI İle Akış Hücremetrede (Flow Sitometri) Apoptotik Etkinin Saptanması

Apoptotik etkinin saptanmasında, hücre membran yüzeyinde ortaya çıkan değişikliklere göre, apoptotik hücrelerin ayırımını akım hücremetre (flow sitometre) cihazında belirleme özelliğine sahip olan ApopNexinTM FITC Apoptoz Belirleme Kiti (MİLLİPORE-chemichon, Billerica Massachusetts, U.S.A) kullanılmıştır. Bu kit, apoptozis olayında hücre membran yüzeyindeki biyokimyasal değişiklikleri algılamaktadır. Kantitatif değerlerin elde edilmesini sağlayan FITC ile konjuge olan Annexin V içermektedir. Karşıt boya olan propidyum iyodit (PI), apoptotik hücrelerin, nekrotik hücrelerden ayrılmasını, farklarının ortaya çıkmasını sağlamaktadır. PI, nekrozisde hücre zarının geçirgenliğini belirlemek için kullanılır. Hücre popülasyonu şu şekilde belirlenmektedir: Canlı hücreler ışığı geçirmez durumda olacaktır. Metabolik olarak apoptozisin aktif bölümünde olan hücreler annexin V ile boyanırken PI ile boyanmayacaktır. Nekrotik hücreler ise, hem ApopNexinTM hem de PI ile reaksiyona girecektir. Geç apoptoza giren hücreler, özellikle hücre kültüründe fagositoz tarafından yok edilmezse, ikinci nekroze girebilirler. İkinci kez nekroze giren hücreler hem ApopNexinTM hem de DNA bağlama boyasına bağlanırlar, boya ile boyanma apoptoz yoluyla da olan son nekrozisi göstermektedir. ApopNexinTM Kiti fiziksel olarak sağlam hücre örneklerine direkt uygulandığı zaman, apoptozisi belirlemek için kullanılmaktadır. Annexinler, hücre membranına spesifik olarak bağlanabilen proteinlerdir. Annexin V, 35.8 kDa moleküler ağırlığı olan monomer yapıda, antikoagulan aktivitesine sahip bir proteindir. Canlı, apoptotik ya da ölü hücreler karşıt boya olan PI ile ayrı ayrı boyanarak belirlenmektedir.

HL-60 hücre süspansiyonundan 6 kuyucuklu hücre plakasının her bir kuyucuğuna, hücre sayısı 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde 3 ml olarak ekilmiştir. MTT sonuçları temel alınarak, flow sitometri cihazında sisplatin, PKL ve PKpt(II) olarak uygulanan her bir madde için 3 konsantrasyonun (25, 50 ve 100 μ M) apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Belirli sayıda HL-60 hücre süspansiyonu içeren plakalar % 5 CO₂' li etüvde 37° C' de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra, HL-60 hücreleri kuyucuklardan alınıp, santrifüj tüpüne aktarılmış ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, süpernatant atılıp, pelet üzerine 3 mL soğuk PBS konulup, tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır. Santrifüj sonrası, pelet 200 μ L PBS içinde homojen halde dağıtılmış ve 100 μ L alınıp, flow tüpüne aktarılmıştır. Hücre bulunan her bir flow tüpüne, kit içinde bulunan 5 μ L Annexin, 5 μ L PI eklenip, 1-2 sn vortexlenmiştir (karıştırılmıştır). Bu süspansiyon 15 dakika karanlıkta bekletilip, üzerine 350 μ L bağlayıcı tampon (Binding buffer) ilave edilip, nazikçe çalkalanarak homojen bir karışım elde edilmiş ve BD marka FACS-ARIA (Kanada) flow sitometre cihazında belirlenen dalga boyunda 10 000 hücre olacak şekilde sayılmıştır.

DNA Fragmantasyon Yöntemi İle Apoptotik Etkinin Agaroz Jel Elektroforezinde Belirlenmesi

HL-60 hücre süspansiyonundan, 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna hücre sayısı 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde 3 mL olarak ekilmiştir. MTT sonuçları temel alınarak, flow sitometri cihazında sisplatin, PKL ve PKpt(II) ' ye ait her bir madde için 3 konsantrasyonun (25 μ M, 50 μ M ve 100 μ M) apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Belirli sayıda HL-60 hücre süspansiyonu içeren plakalar, %5 CO₂'li etüvde 37° C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda belirli kuyucuklara sisplatin, PKL ve PKpt(II) ' nin 5, 10, 25, 50, 100 μ M konsantrasyonları, besiyeri medyumunda hazırlanarak verilmiştir. Flow sitometri sonuçlarına paralel olacak şekilde, plakalar apoptotik etkinin değerlendirilmesi için % 5 CO₂'li etüvde 37° C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra, HL-60 hücreleri kuyucuklardan alınarak, santrifüj tüpüne aktarılmış ve her bir kuyucuğa 2 mL 1XPBS eklenerek, hücrelerin kuyucuk yüzeyinden tamamen alınması sağlanmıştır (kuyucuk yüzeyi yıkanmıştır). HL-60 hücre süspansiyonlarını içeren tüpler, 1200 rpm' de +4°C' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, süpernatant atılıp, pelet üzerine 500 μ L ekstraksiyon tamponu (100 mM Tris-HCL, pH 8.0; 0,1 M EDTA (100 mM) , % 10 Triton X-100) eklenerek pipetleme yapılmış ve tüpler 30 dakika buzda beklemeye bırakılmıştır.

Bekleme sonrası buzdan alınan tüpler, 1000 rpm' de 10 dakika +4°C' de santrifüj edilmiştir. Süpernatant temiz bir tüpe alınıp, üzerine 2 mg.mL⁻¹ RNase A' dan final konsantrasyonu 10 mg.mL⁻¹ olacak şekilde 5 μ L eklenip, hafifçe vortekslenmiştir. Daha sonra tüpler 56°C' de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası, tüplere final konsantrasyonu 200 mg.mL⁻¹ olacak şekilde, stok konsantrasyonu 20 mg.mL⁻¹ olan proteinaz K ' dan 10 μ L ve son konsantrasyonu % 1 SDS olacak şekilde stok konsantrasyonu % 10 olan SDS' den 110 μ L eklenerek 1 gece 37 °C ' de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında tüpler, 3000 rpm' de +4°C' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant temiz bir tüpe alınmıştır. Süpernatantın üzerine 1 mL fenol-kloroform-izoamil karışımı (25:24:1 oranında) eklenmiştir. Tüpler 13000 rpm' de +4 °C' de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Üstteki faz (süpernatant) temiz bir tüpe aktarılmış ve üzerine 3M sodyum asetattan 100 μ L ve % 100'lük soğuk etanolden 2 mL eklenerek tüpler alt üst edilmiş, - 20 °C' de 1 gece DNA çöktürülmeye bırakılmıştır.

Ertesi gün, tüpler 13000 rpm' de +4°C' de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar atılmıştır. Peletin (hücre çökeleği) üzerine % 70 soğuk etanol (1mL) ilave edilmiş ve tüpler 14000 rpm' de +4°C' de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

Etanol tüplerden uzaklaştırılmıştır. Tüplerdeki pelet(DNA) ağzı açık tutularak 5-10 dak. havada kurutulmuştur. Her bir tüpteki pelet üzerine, 30 μ L TE (Tris/EDTA) tampon solüsyonundan (pH:8) (1 M Tris, 0,5 M EDTA) eklenerek DNA çözdürülmüştür.

% 2' lik agaroz gel hazırlanmıştır. Bunun için 1 gr agaroz (high resolution-Sigma-Aldrich, Almanya) üzerine 50 ml 1XTBE tampon solüsyonu (10XTBE= Tris

base 108 gr, Borik asit 55 gr, 0,5 M EDTA 40 mL, pH 8.0, distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır) ilave edilerek mikrodalga fırında kaynatılıp, çözündürülmüştür. İçerisine DNA fragmentlerini gözlemleyebilmek amacıyla 5µL etidyum bromid ($0.5\mu\text{g.mL}^{-1}$) eklenmiştir. Bu karışım, jel küvetine dökülüp, sabitlenmiştir. Taraklar yerleştirilip, soğumaya bırakılmıştır. Jelin donduğundan emin oluncaya kadar beklenmiştir. Jel donduktan sonra, taraklar, kuyucukların bozulmamasını sağlayarak dikkatlice çıkarılmıştır. Yükleme küvetine yerleştirilmiş ve jelin üzerini kapatana kadar 1XTBE buffer eklenmiştir. Her bir kuyucuğa; büyük kuyucuk için, 5 µL jel yükleme tamponu (gel loading buffer-Sigma-Aldrich, Avustralya), 15 µL DNA örneği, küçük kuyucuk için 3 µL yükleme tamponu, 10 µL DNA örneği eklenmiş ve UVP EC3 Jel Görüntüleme Sistemi (İngiltere) cihazında görüntülenip, fotoğrafları çekilmiştir (Crawford ve ark., 1997; Giria ve ark., 2003; Enlong ve ark., 2008; Hsua ve ark., 2008; Ho ve ark., 2006).

İstatistiksel Analizler

Tüm absorbans sonuçları, SPSS 15 (Statistic Program for Social and Science) yazılım programında 'ortalama $\pm$ S.E (Standart hata)' olarak hesaplanmıştır. MTT absorbans değerleri tek yönlü ANOVA ve post hoc olarak Tukey s'b testi ile analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p>0,05$ fark yok, $p<0,05^*$ fark var, $p<0,01^{**}$ önemli derecede fark var, $p<0,001^{***}$ çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir.

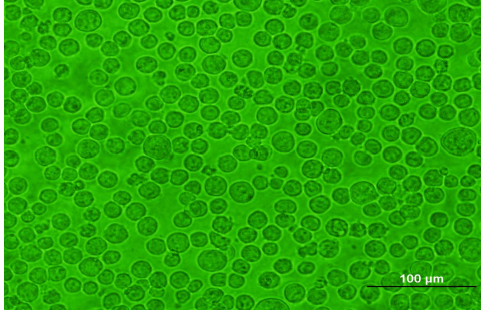
Akış hücremetre (Flow sitometre) sonuçları cihazdan elde edilen analiz sonuçlarına ve DNA fragmentasyon sonuçları da agaroz jel elektroforez görüntü sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

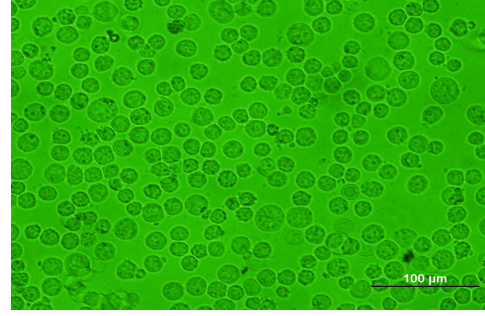
Morfolojik Bulgular

Şekil 8, 9 ve 10'da HL-60 hücre dizisinde sisplatinin, piridin 2-karbaldoksim ligandı (PKL) ve piridin 2-karbaldoksim Pt(II) kompleksinin 5, 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarının 72 saatlik inkübasyonun morfolojik görüntüleri verilmiştir.

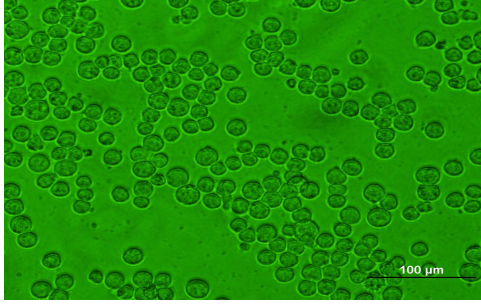
Şekil 8. Sisplatin Konsantrasyonları Uygulanan HL-60 Hücrelerinin 72 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400) [a. Kontrol, b. DMSO Kontrol, c. 5 μ M Sisplatin, d. 10 μ M Sisplatin, e. 25 μ M Sisplatin, f. 50 μ M Sisplatin, g. 100 μ M Sisplatin]



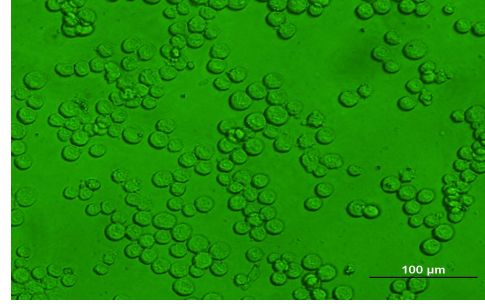
(a)



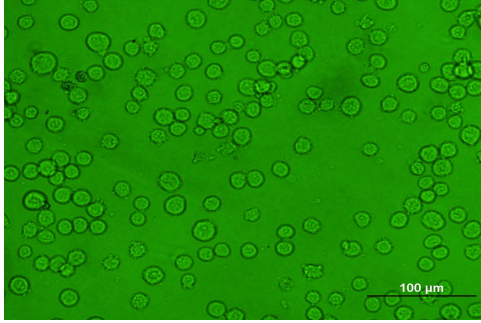
(b)



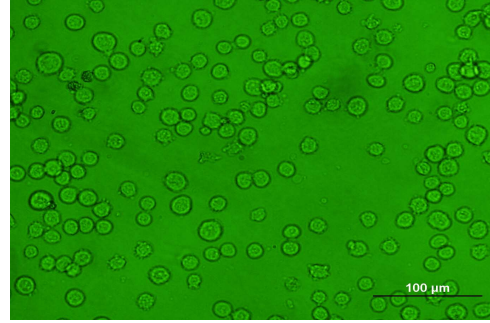
(c)



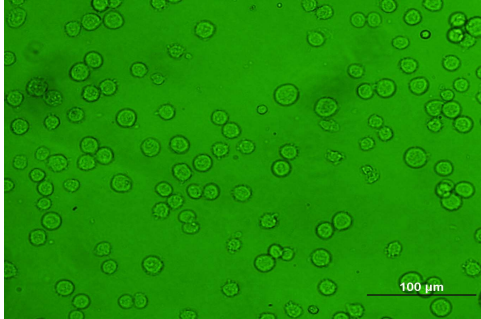
(d)



(e)

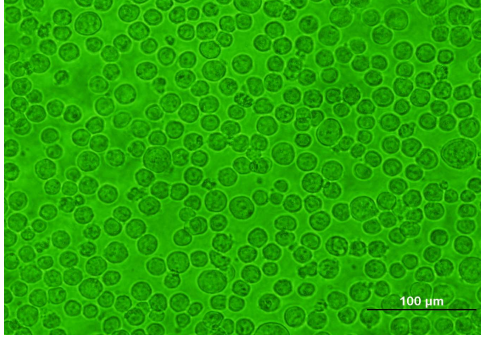


(f)

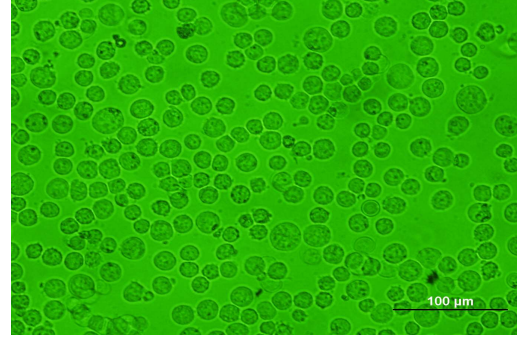


(g)

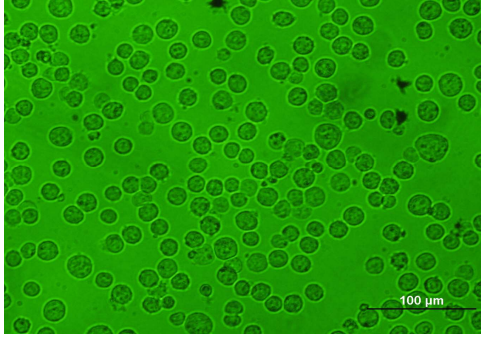
Şekil 9. Piridin-2-karbaldoksim Ligandı (PKL) Uygulanan HL-60 Hücrelerinin 72 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400) (a. Kontrol, b. DMSO-Kontrol, c. 5 μ M PKL, d. 10 μ M PKL, e. 25 μ M PKL, f. 50 μ M PKL, g. 100 μ M PKL)



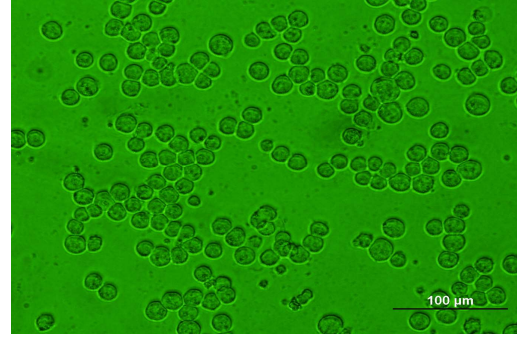
(a)



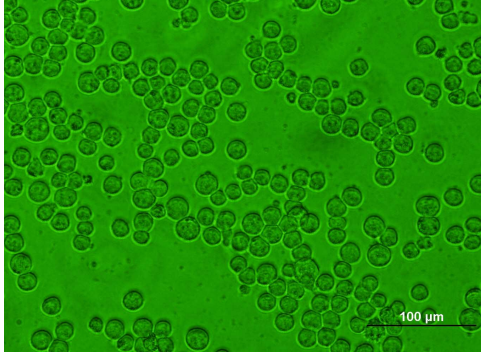
(b)



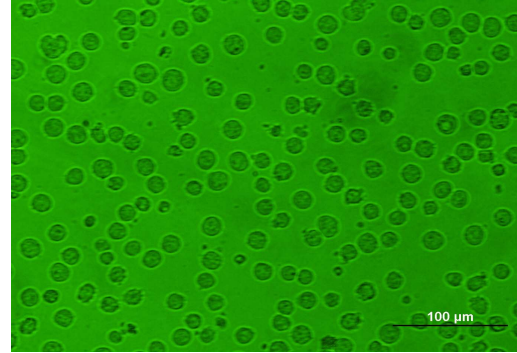
(c)



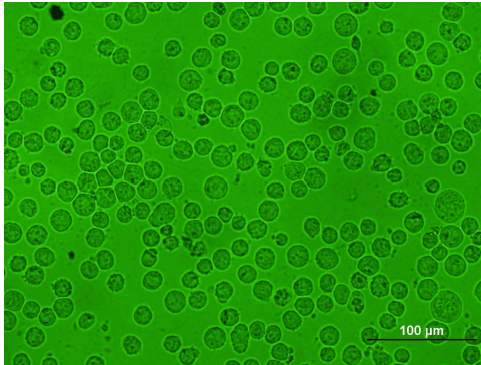
(d)



(e)

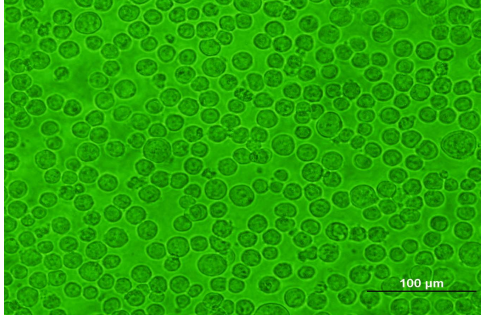


(f)

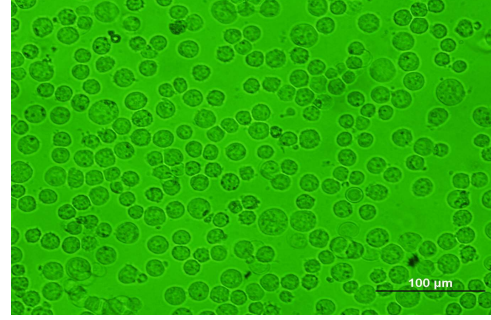


(g)

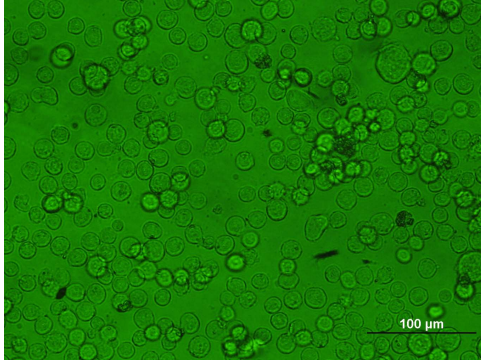
Şekil 10. Piridin-2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksi (PKPt(II)) Uygulanan HL-60 Hücrelerinin 72 Saatlik İnkübasyon Sonundaki Morfolojik Görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi X400) (a. Kontrol, b. DMSO-Kontrol, c. 5 μ M PKPt(II), d. 10 μ M PKPt(II), e. 25 μ M PKPt(II), f. 50 μ M PKPt(II), g. 100 μ M PKPt(II))



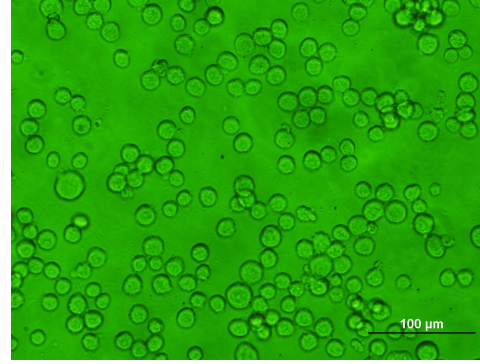
(a)



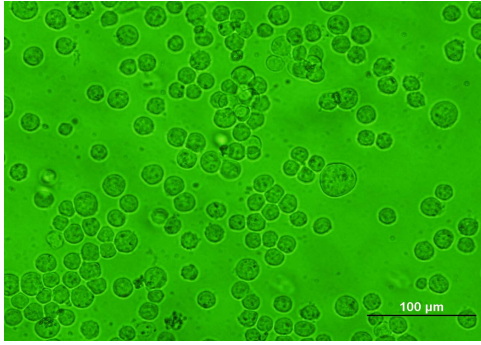
(b)



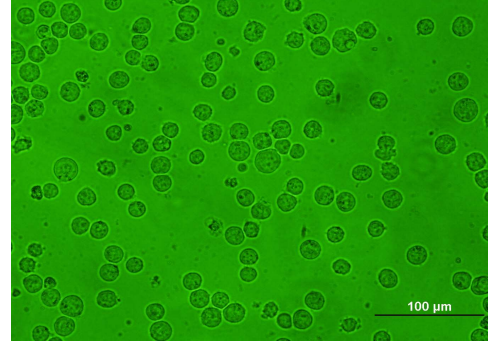
(c)



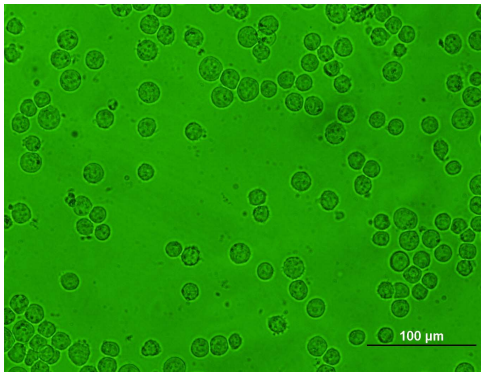
(d)



(e)



(f)



(g)

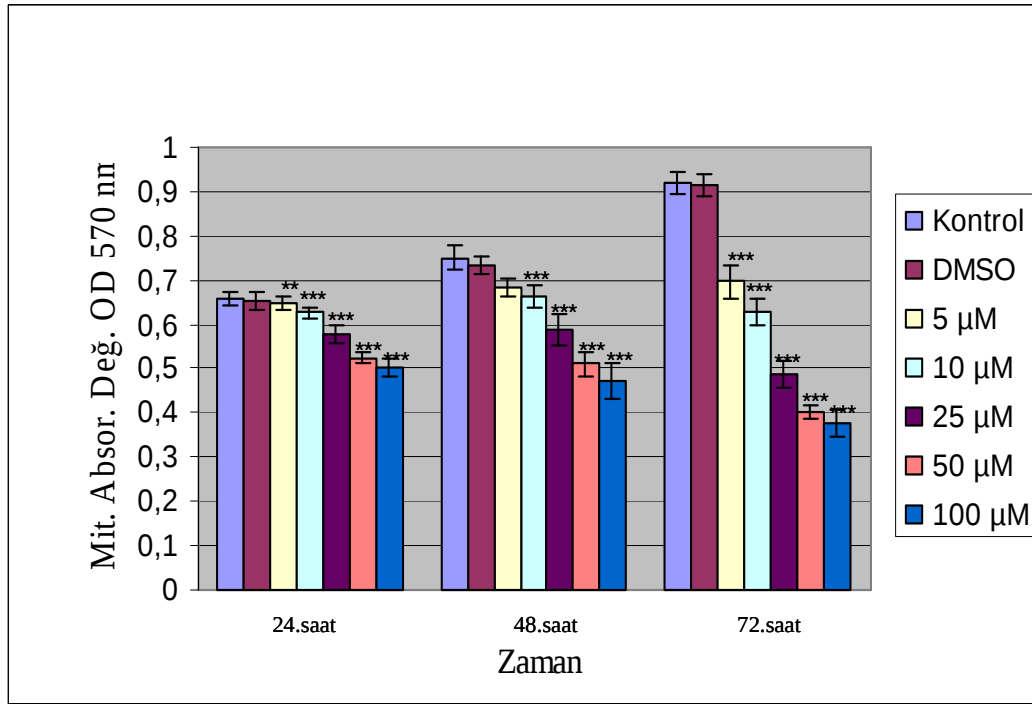
MTT Sonuçları

Sisplatin, PKL ve PKPt(II) için; ayrı ayrı kontrol, DMSO, 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyon olmak üzere toplam 7 grup kullanılmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonuçları eliza (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Yöntemi) cihazında okutulmuş ve her bir maddenin elde edilen sonuçları **Çizelge 3, 4, 5 ve Şekil 11, 12, 13'** de aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir.

Sisplatinin HL-60 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

HL-60 hücreleri üzerinde sisplatinin 24, 48 ve 72 saatlik MTT mitokondriyal absorbans (Mitokondriyal aktiviteyi göstermektedir.) sonuçlarına göre (**Şekil 11, Çizelge 3**); sisplatinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, elde edilen mitokondriyal absorbans değerlerinde, kontrol ve DMSO-kontrol gruplarında anlamlılık değeri $p > 0.05$ olarak bulunmuş ve önemsiz olarak değerlendirilmiştir. 10, 25, 50 ve 100 μ M sisplatin konsantrasyonlarında, kontrole göre, istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma meydana geldiği görülmüştür. Bu anlamlılık, 10 μ M sisplatin konsantrasyonunda $p < 0.01^{**}$; 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarında da $p < 0.001^{***}$ olarak bulunmuştur. HL-60 hücrelerinin sisplatin ile 48 saatlik inkübasyonu sonrasında, elde edilen sonuçlara göre; 10, 25, 50 ve 100 μ M sisplatin konsantrasyonlarında, istatistiksel olarak kontrole göre anlamlılık derecesi $p < 0.001^{***}$ olarak bulunmuştur. Diğer taraftan, kontrol, DMSO-kontrol ve 5 μ M sisplatin konsantrasyonlarında $p > 0.05$ olarak bulunmuş ve anlamsız olarak değerlendirilmiş, kontrol göre hücreler üzerinde bir değişiklik yapmadığı görülmüştür. Sisplatin ile 72 saatlik inkübasyon sonrasında ise, 24 ve 48 saatlik inkübasyondan elde edilen sonuçlarda olduğu gibi, kontrol ve DMSO-kontrol sisplatin konsantrasyon grubunda elde edilen sonuçlar anlamlı bulunmamış, istatistiksel olarak $p > 0.05$ sonucu elde edilmiştir. 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M sisplatin konsantrasyonlarında ise, kontrole göre, mitokondriyal absorbans değerleri istatistiksel olarak önemli derecede azalmıştır ($p < 0.001^{***}$)⁽¹⁾. Konsantrasyon ve zamana bağlı olarak, sisplatinin, HL-60 hücreleri üzerinde sitotoksik etki yaptığı, proliferasyonu azalttığı belirlenmiştir.

(1) MTT sonuçlarında elde edilen verilere göre; $p > 0.05$ anlamsız, $p < 0.05$ anlamlı(*), $p < 0.01$ önemli derecede anlamlı(**), $p < 0.001$ ise çok önemli derecede anlamlı(***) olarak belirlenmiştir.



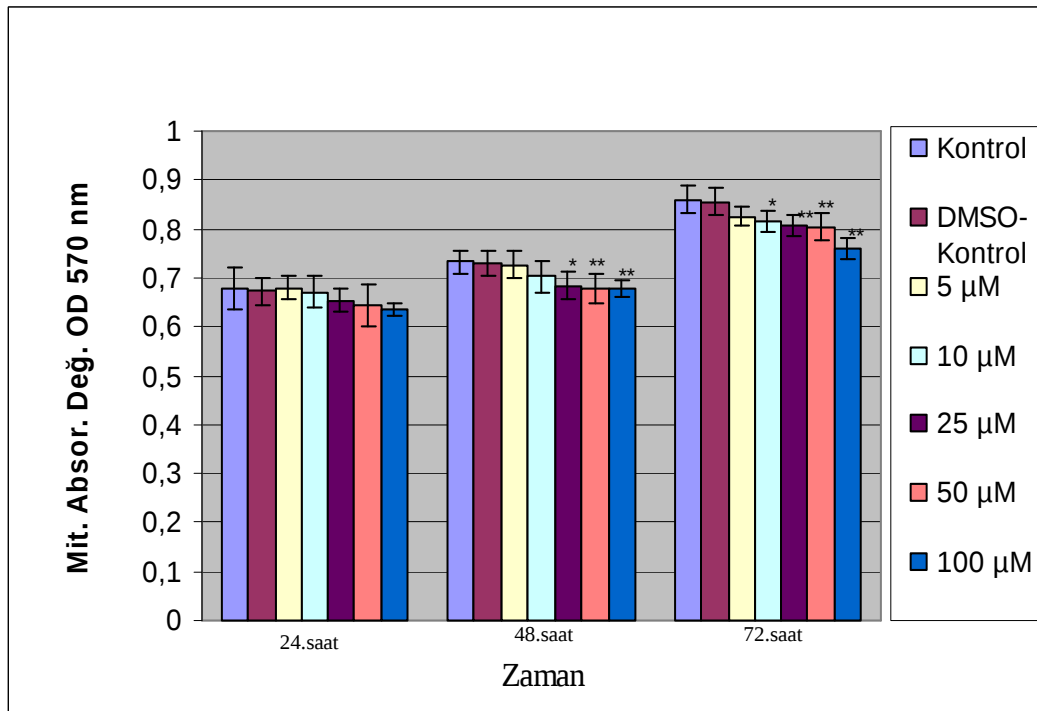
Şekil 11. Sisplatinin, HL-60 Hücre Dizisinde 24, 48 ve 72. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri

Çizelge 3. Sisplatin'in HL-60 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirilmesi

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT			72. SAAT		
	Ortalama	St.Sapma	Anlamlılık	Ortalama	St.Sapma	Anlamlılık	Ortalama	St.Sapma	Anlamlılık
Kontrol	0.659	0.015	$p > 0.05$	0.751	0.027	$p > 0.05$	0.920	0.026	$p > 0.05$
DMSO	0.653	0.018	$p > 0.05$	0.732	0.020	$p > 0.05$	0.915	0.025	$p > 0.05$
5 µM	0.649	0.015	$p > 0.05$	0.685	0.021	$p < 0.001^{***}$	0.696	0.035	$p < 0.001^{***}$
10 µM	0.627	0.013	$p < 0.01^{**}$	0.663	0.025	$p < 0.001^{***}$	0.627	0.031	$p < 0.001^{***}$
25 µM	0.580	0.020	$p < 0.001^{***}$	0.586	0.036	$p < 0.001^{***}$	0.486	0.030	$p < 0.001^{***}$
50 µM	0.525	0.014	$p < 0.001^{***}$	0.512	0.028	$p < 0.001^{***}$	0.404	0.014	$p < 0.001^{***}$
100 µM	0.502	0.020	$p < 0.001^{***}$	0.471	0.0410	$p < 0.001^{***}$	0.378	0.029	$p < 0.001^{***}$

Piridin 2-Karbaldoksim Ligandının HL-60 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

HL-60 hücrelerinde PKL' nin 24, 48 ve 72 saatlik MTT testine ait mitokondriyal absorbands sonuçları **Şekil 12** ve **Çizelge 4** ' de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, PKL ile HL-60 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrasında, kontrole göre, PKL' nin mitokondriyal absorbands değerleri, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). 48 saatlik inkübasyon sonrasında, 25 μ M PKL konsantrasyonunda $p < 0.05^*$; 50 ve 100 μ M konsantrasyonda da $p < 0.01^{**}$ anlamlılık değerinde mitokondriyal absorbands azalması görülmüştür. 72 saatlik inkübasyon sonrasında ise, mitokondriyal anlamlılık değerleri, 10 μ M PKL konsantrasyonunda $p < 0.05^*$; 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonda ise $p < 0.01^{**}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, PKL' nin, HL-60 hücreleri üzerinde sitotoksik ve dolayısıyla antiproliferatif etki göstermediği gözlenmiştir.



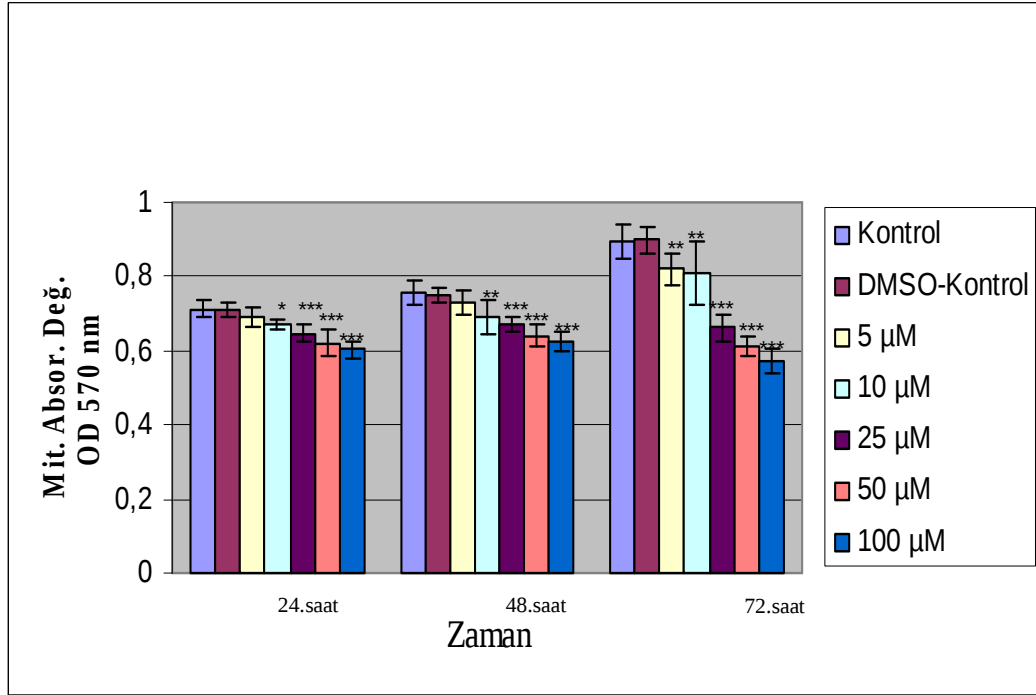
Şekil 12. Piridin 2-Karbaldoksim Ligandının, HL-60 Hücre Dizisinde 24, 48 ve 72. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri

Çizelge 4. Piridin 2-Karbaldoksim Ligandının HL-60 Hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirilmesi

GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT			72. SAAT		
	Ortalama	St.Sapma	Anlamlılık	Ortalama	St.Sapma	Anlamlılık	Ortalama	St.Sapma	Anlamlılık
Kontrol	0.679	0.043	$p > 0.05$	0.732	0.024	$p > 0.05$	0.860	0.028	$p > 0.05$
DMSO	0.673	0.027	$p > 0.05$	0.730	0.024	$p > 0.05$	0.856	0.029	$p > 0.05$
5 μM	0.679	0.023	$p > 0.05$	0.727	0.029	$p > 0.05$	0.825	0.028	$p > 0.05$
10 μM	0.671	0.031	$p > 0.05$	0.702	0.031	$p > 0.05$	0.815	0.021	$p < 0.05$
25 μM	0.654	0.023	$p > 0.05$	0.684	0.029	$p < 0.05$	0.807	0.019	$p < 0.01^{**}$
50 μM	0.643	0.042	$p > 0.05$	0.678	0.032	$p < 0.01^{**}$	0.804	0.028	$p < 0.01^{**}$
100 μM	0.635	0.014	$p > 0.05$	0.678	0.035	$p < 0.01^{**}$	0.761	0.022	$p < 0.001^{***}$

Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksinin HL-60 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

Aşağıdaki **Şekil 13** ve **Çizelge 5** ' de, PKPt(II) ' nin HL-60 hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik mitokondriyal absorbans sonuçları görülmektedir. PKPt(II) ' nin konsantrasyonları ile HL-60 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonucunda, konsantrasyon ve zamana bağımlı olarak, hücre dizisinde sitotoksik ve antiproliferatif etki görülmüştür. HL-60 hücrelerinin 24 saatlik PKPt(II) ile inkübasyonu sonrasında, 10 μ M PKPt(II) konsantrasyonunda, kontrole göre mitokondriyal absorbans değerlerindeki azalma, istatistiksel olarak, $p < 0.05$ * ; 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda ise, $p < 0.001$ *** olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, DMSO-kontrol ve 5 μ M konsantrasyonlarında $p > 0.05$ olarak bulunmuş ve anlamsız kabul edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda, kontrole göre mitokondriyal absorbans değerleri azalmış ve anlamlılık değerleri, 10 μ M konsantrasyonda $P < 0.01$ ** ; 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonda ise, $p < 0.001$ *** olarak bulunmuştur. Yine 72.saatlik inkübasyondan sonra da, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak mitokondriyal absorbans değerleri, kontrole göre önemli derecede azalmıştır. Bu azalma istatistiksel olarak, 5 ve 10 μ M PKPt(II) konsantrasyonlarında $p < 0.01$ ** ; 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarında ise, $p < 0.001$ *** olarak belirlenmiştir.



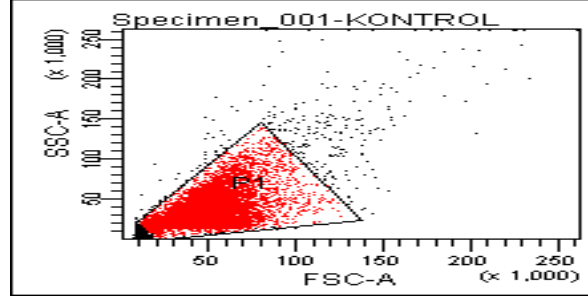
Şekil 13. Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksi' nin HL-60 Hücre Dizisinde 24, 48 ve 72. Saat Mitokondriyal Absorbans Değerleri

Çizelge 5. Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksinin HL-60 hücrelerinde Mitokondriyal Absorbans Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirilmesi

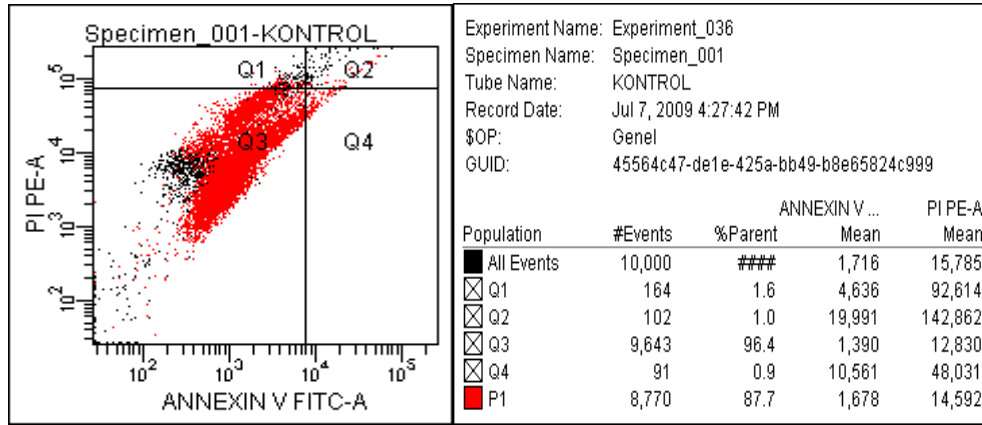
GRUPLAR	24. SAAT			48. SAAT			72. SAAT		
	Ortalama	St.Sapma	Anlamlılık	Ortalama	St.Sapma	Anlamlılık	Ortalama	St.Sapma	Anlamlılık
Kontrol	0.713	0.022	$p > 0.05$	0.756	0.032	$p > 0.05$	0.896	0.048	$p > 0.05$
DMSO	0.710	0.020	$p > 0.05$	0.751	0.019	$p > 0.05$	0.900	0.036	$p > 0.05$
5 μM	0.692	0.025	$p > 0.05$	0.731	0.031	$p > 0.05$	0.819	0.042	$p < 0.01^{**}$
10 μM	0.670	0.014	$p < 0.05^{*}$	0.689	0.045	$p < 0.01^{**}$	0.809	0.083	$p < 0.01^{**}$
25 μM	0.646	0.023	$p < 0.001^{***}$	0.671	0.019	$p < 0.001^{***}$	0.663	0.036	$p < 0.001^{***}$
50 μM	0.621	0.038	$p < 0.001^{***}$	0.641	0.028	$p < 0.001^{***}$	0.614	0.026	$p < 0.001^{***}$
100 μM	0.603	0.023	$p < 0.001^{***}$	0.627	0.025	$p < 0.001^{***}$	0.572	0.032	$p < 0.001^{***}$

Flow Sitometri Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

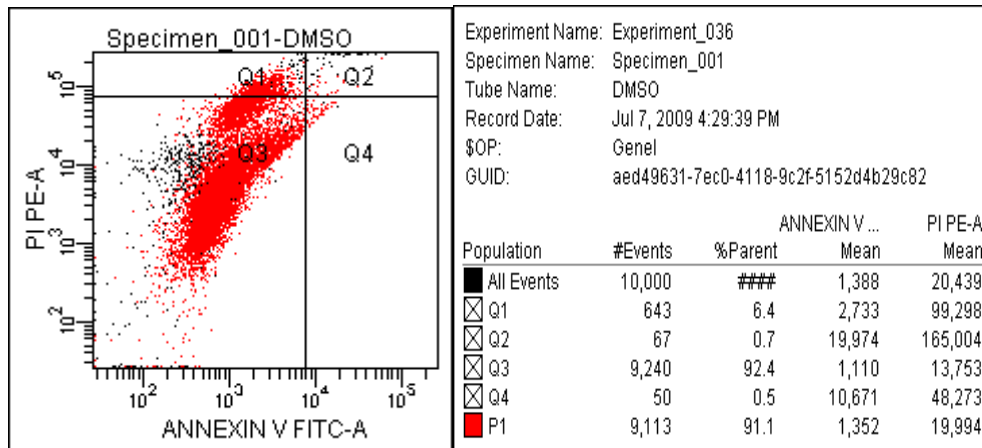
Sisplatinin HL-60 hücreleri üzerindeki, 24 saatlik apoptotik etkisi **Şekil 14 - 17** ve **Çizelge 6'** da görülmektedir. Sisplatinin (25, 50 ve 100 μ M konsantrasyon), HL-60 hücreleri üzerinde, Annexin V-PI boyaları ile, flow sitometri' deki değerlendirmesi yapıldığında, kontrolde canlı hücre yüzdesi % 96.4, apoptotik hücre yüzdesi %1.9 ve nekrotik hücre yüzdesi %1.6; DMSO-kontrol grubunda canlı hücre yüzdesi %92.4, apoptotik hücre yüzdesi %1.2, nekrotik hücre yüzdesi %6.4 olarak bulunmuştur (**Şekil 14 ve Çizelge 6**).



(a)



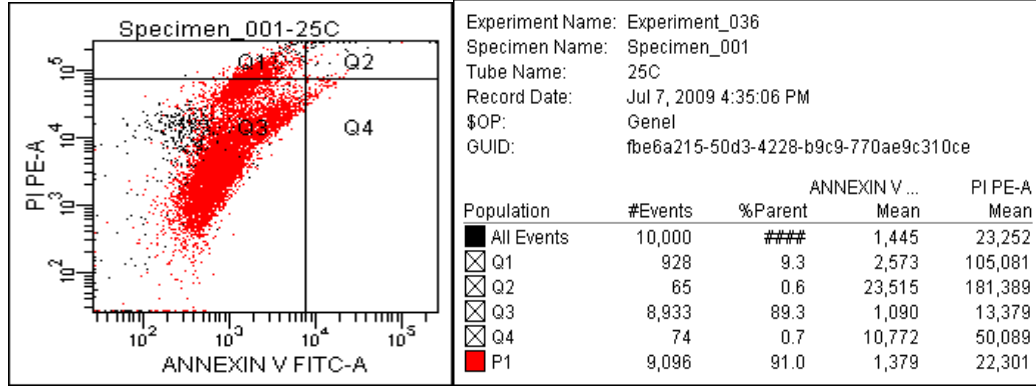
(b)



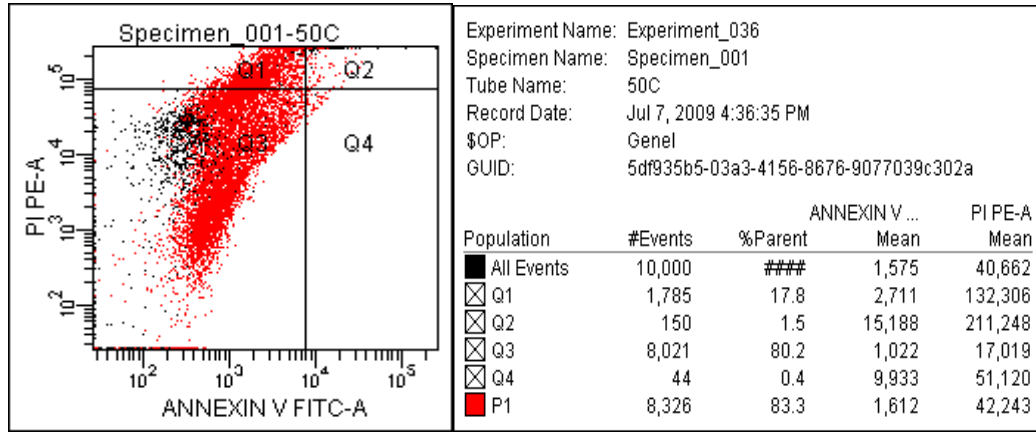
(c)

Şekil 14. Flow Sitometri Yöntemi ile Kontrol ve DMSO-Kontrol Grubunun Apoptotik Sonuçları (a. Kontrol (FSC-A) , b. Kontrol (Annexin V Fıtc- A) , c. DMSO-Kontrol Annexin V Fıtc- A)

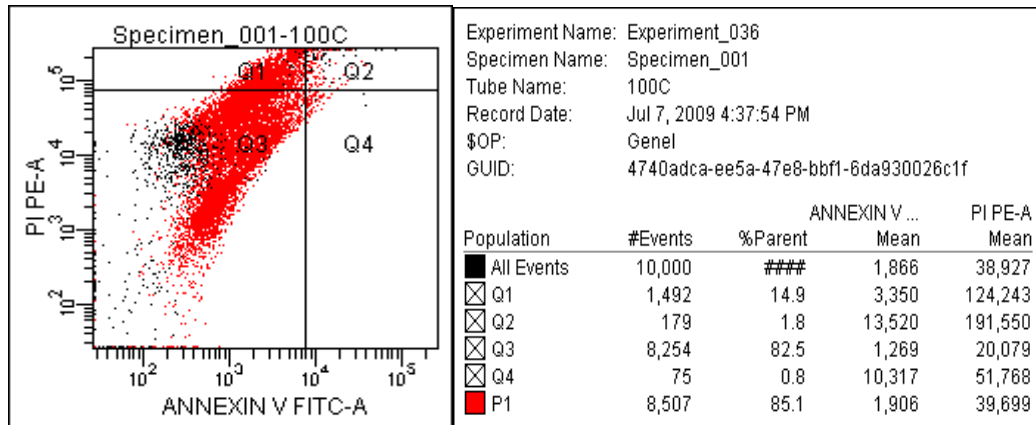
Akut lösemi hücre dizisine, sisplatinin 25 μM konsantrasyonunu uyguladığımız grupta, canlı hücre yüzdesi %89.3, apoptotik hücre yüzdesi %1.3, nekrotik hücre yüzdesi %9.3; 50 μM konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %80.2, apoptotik hücre yüzdesi %1.9, nekrotik hücre yüzdesi 17.8; 100 μM konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %82.5, apoptotik hücre yüzdesi %2.6, nekrotik hücre yüzdesi %14.9 olarak bulunmuştur (Şekil 15 ve Çizelge 6).



(a)



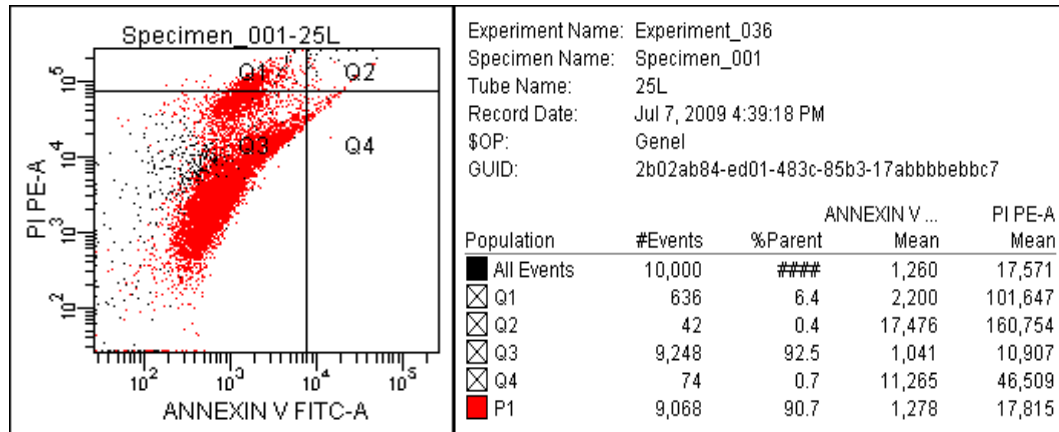
(b)



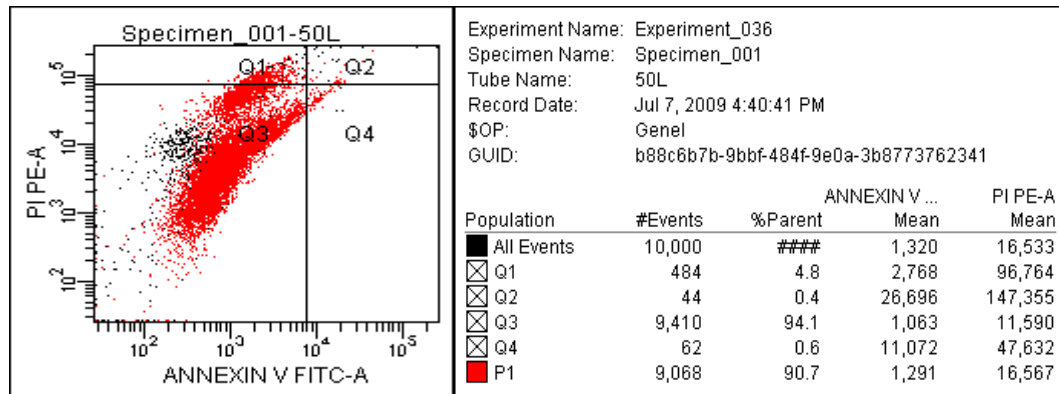
(c)

Şekil 15. Flow Sitometri Yöntemi ile Sisplatinin 25, 50, 100 μM Konsantrasyon Gruplarının Apoptotik Sonuçları (a. 25 μM , b. 50 μM , c. 100 μM)

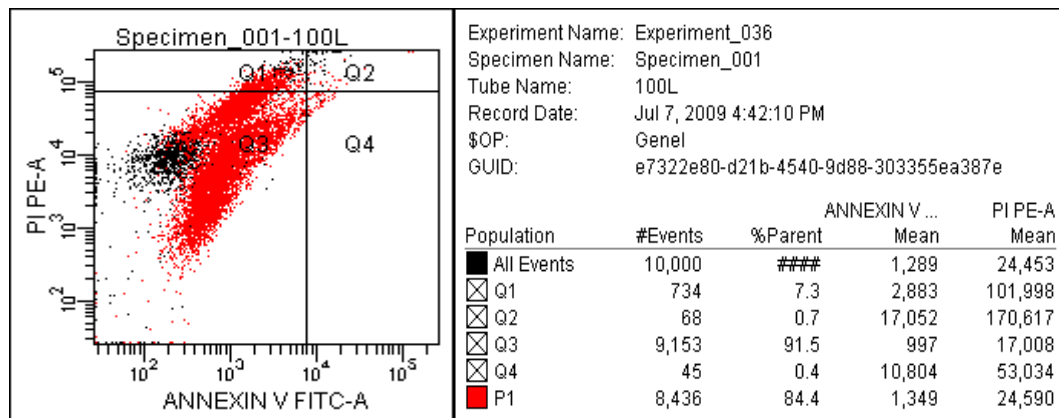
PKL' nin 25 μ M konsantrasyonunu uyguladığımız grupta, canlı hücre yüzdesi %92.5, apoptotik hücre yüzdesi %1.1, nekrotik hücre yüzdesi %6.4; 50 μ M konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %94.1, apoptotik hücre yüzdesi %1.0, nekrotik hücre yüzdesi 4.8; 100 μ M konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %91.5, apoptotik hücre yüzdesi %1.1, nekrotik hücre yüzdesi %7.3 olarak bulunmuştur (Şekil 16 ve Çizelge 6).



(a)



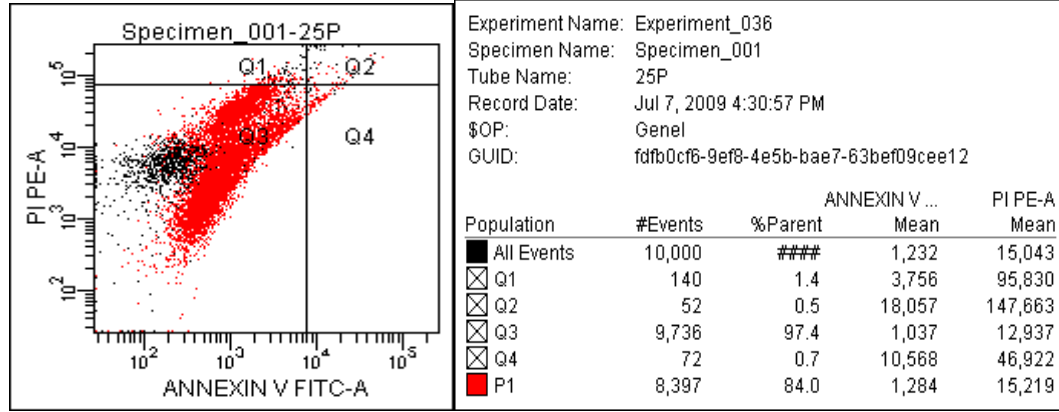
(b)



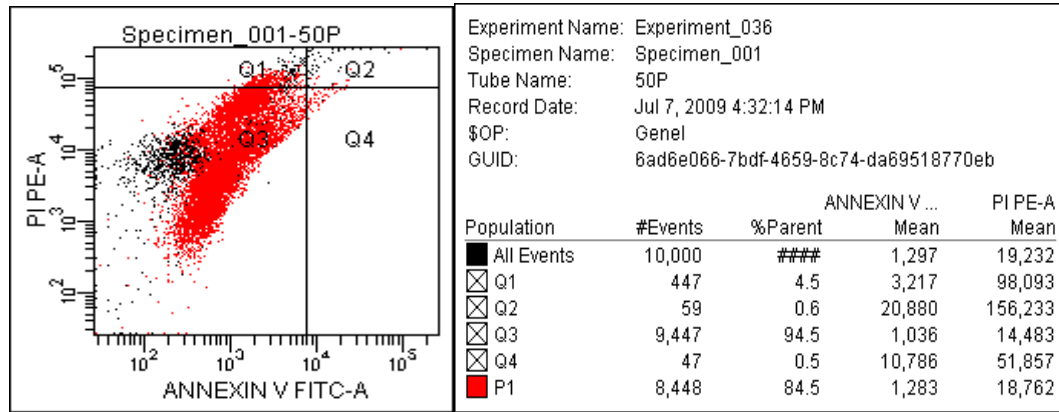
(c)

Şekil 16. Flow Sitometri Yöntemi ile Piridin 2-Karbaldoksım Ligandının 25, 50, 100 μ M Konsantrasyon Gruplarının Apoptotik Sonuçları (a. 25 μ M, b. 50 μ M, c. 100 μ M)

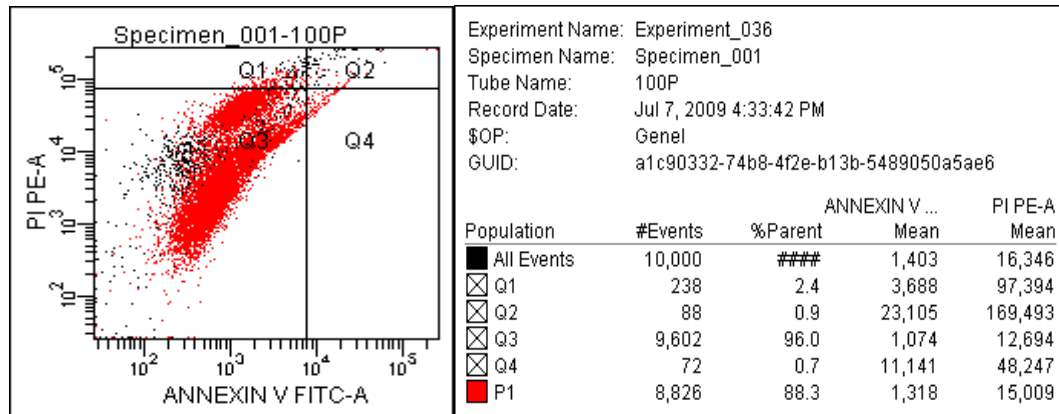
HL-60 hücre dizisinde, PKPt(II) ' nin 25 μ M konsantrasyonunu uyguladığımız grupta, canlı hücre yüzdesi %97.4, apoptotik hücre yüzdesi 1.2, nekrotik hücre yüzdesi %1.4; 50 μ M konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %94.5, apoptotik hücre yüzdesi %1.1, nekrotik hücre yüzdesi 4.5; 100 μ M konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi %96.0, apoptotik hücre yüzdesi %1.6, nekrotik hücre yüzdesi %2.4 olarak bulunmuştur (Şekil 17 ve Çizelge 6).



(a)



(b)



(c)

Şekil 17. Flow Sitometri Yöntemi ile Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksi' nin 25, 50, 100 μ M Konsantrasyon Gruplarının Apoptotik Sonuçları (a. 25 μ M, b. 50 μ M, c. 100 μ M)

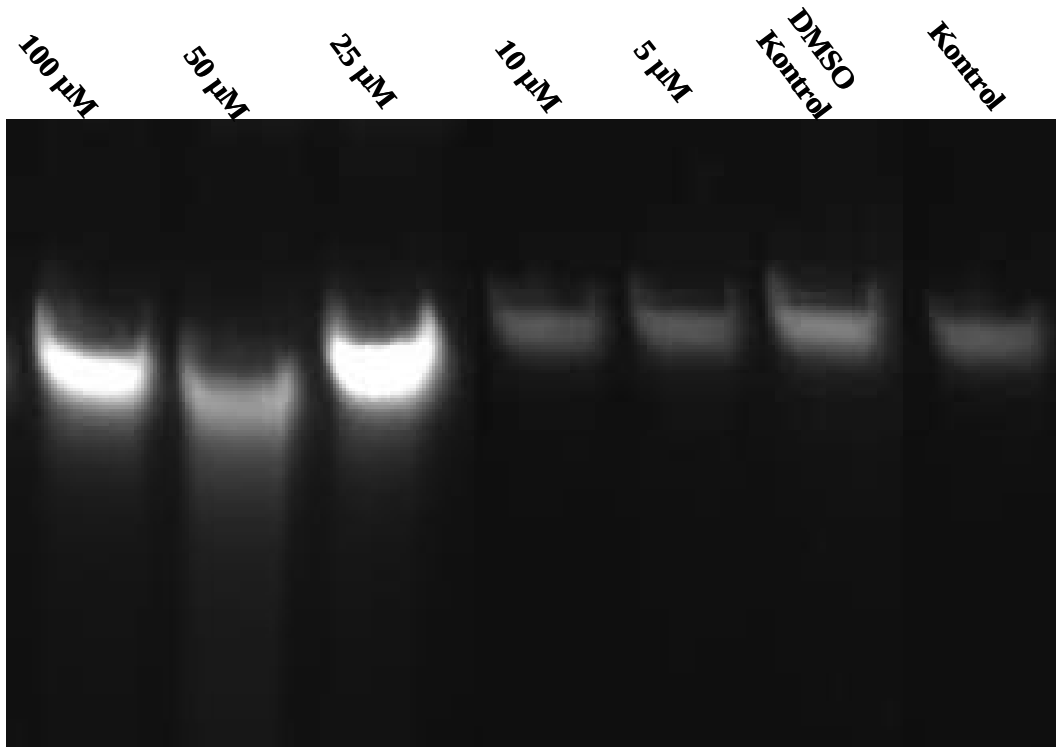
Çizelge 6. 25 µM, 50 µM ve 100 µM Sisplatin, Piridin 2-Karbaldoksim Ligandı ve Piridin-2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksi Verilen Hücrelerin, 24. saat Sonrasında Elde Edilen Flow Sitometri Sonuçları.

GRUPLAR	Canlı hücre yüzdesi	Apoptotik hücre yüzdesi	Nekrotik hücre yüzdesi
Kontrol	96.4	1.9	1.6
DMSO-Kontrol	92.4	1.2	6.4
25 µM sisplatin	89.3	1.3	9.3
50 µM sisplatin	80.2	1.9	17.8
100 µM sisplatin	82.5	2.6	14.9
25 µM piridin 2-karbaldoksim ligandı	92.5	1.1	6.4
50 µM piridin 2-karbaldoksim ligandı	94.1	1.0	4.8
100 µM piridin 2-karbaldoksim ligandı	91.5	1.1	7.3
25 µM piridin-2-karbaldoksim Pt(II) kompleksi	97.4	1.2	1.4
50 µM piridin-2-karbaldoksim Pt(II) kompleksi	94.5	1.1	4.5
100 µM piridin-2-karbaldoksim Pt(II) kompleksi	96.0	1.6	2.4

DNA Fragmentasyon Yöntemi İle Apoptotik Etkinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenerek Değerlendirilmesi

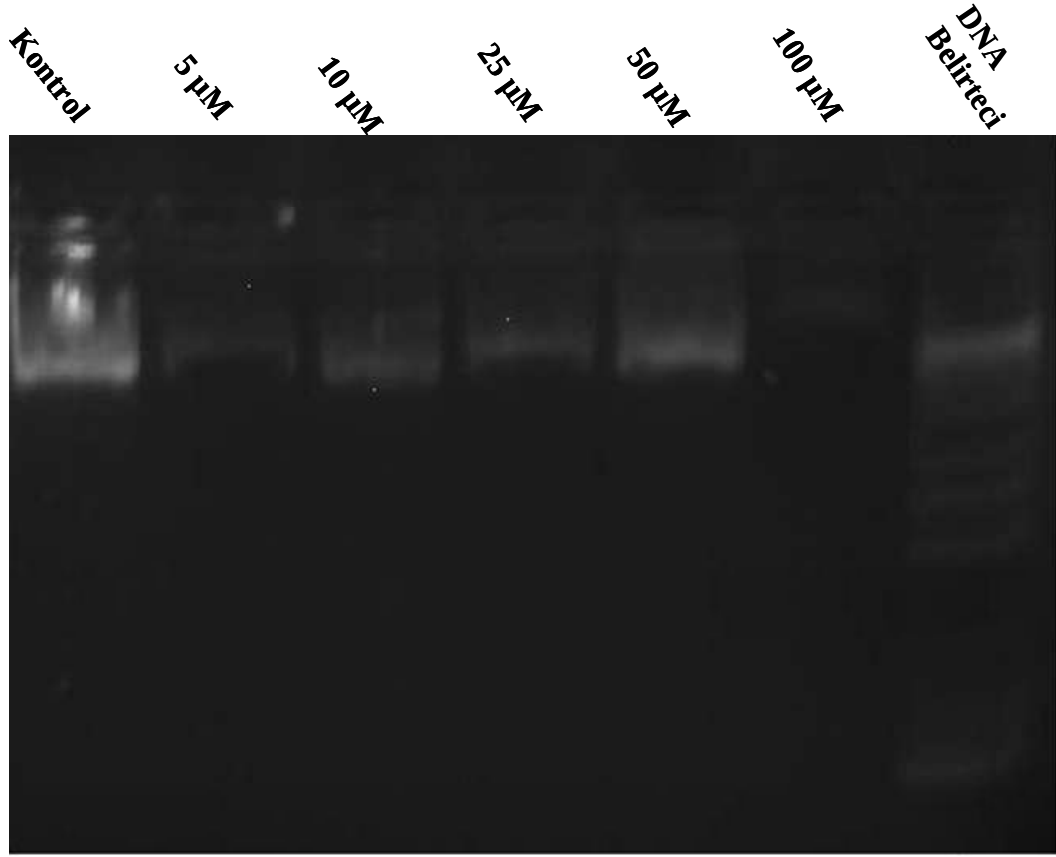
Sisplatin, PKL ve PKPt(II) ' nin 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarının uygulandığı HL-60 hücrelerinde, 24 saatlik inkübasyon sonrasında agaroz jel elektrofrez yönteminde (apoptoza özgü olan), DNA fragmentasyonu (DNA merdiven yapısı) görülmemiştir (**Şekil 18, 19 ve 20**). Bunun sebebi de flow sitometri sonuçlarıyla paralel olarak; çok az sayıda hücrede apoptotik etkinin ortaya çıkması olarak değerlendirilmiştir. DNA izolasyonu sırasında, bazı DNA bantlarının daha yoğun görüntüsü, o konsantrasyon grubuna ait hücre proliferasyonu ile değişkenlik göstermektedir.

Sisplatinin HL- 60 Hücreleri Üzerine Etkisinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi



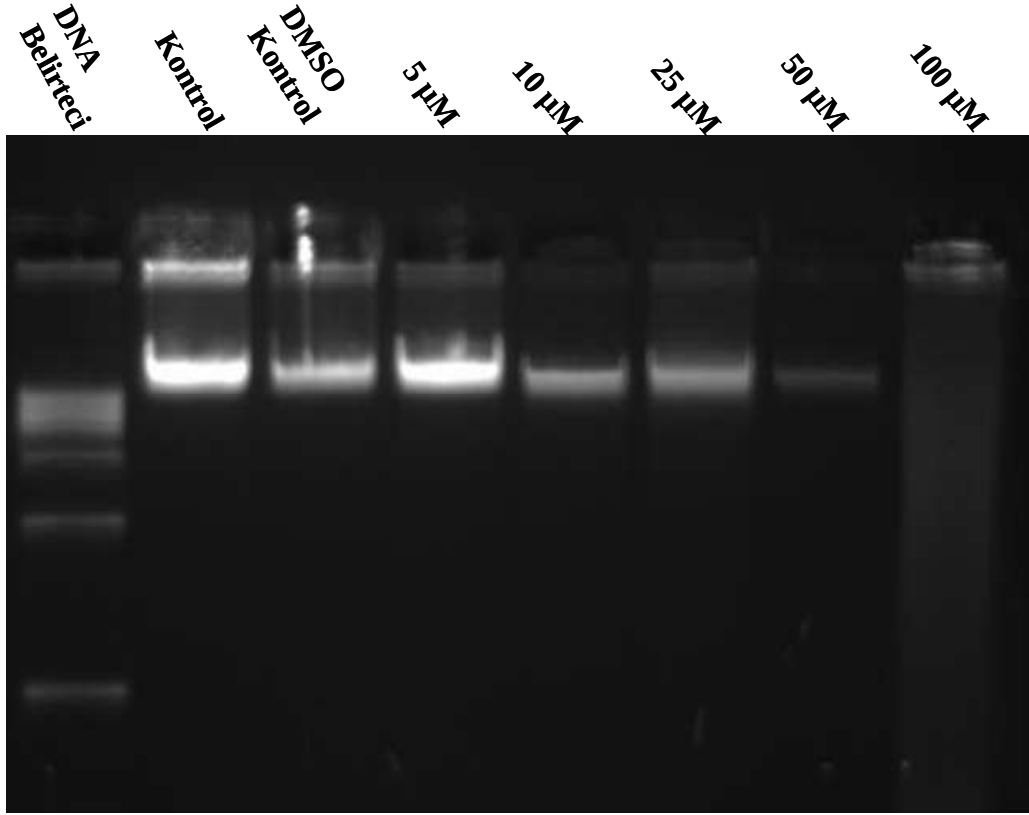
Şekil 18. Sisplatin Verilen HL-60 Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunda Sırasıyla 100, 50, 25, 10, 5 μ M, DMSO-Kontrol ve Kontrol Gruplarının Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi

Piridin 2-Karbaldoksim Ligandının HL- 60 Hücreleri Üzerine Etkisinin Agaroza Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi



Şekil 19. Piridin 2-Karbaldoksim Ligandı Verilen HL-60 Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunda Sırasıyla, Kontrol, 5, 10, 25, 50, 100 µM, DNA Belirtecinin Agaroza Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Piridin 2-Karbaldoksim Pt (II) Kompleksinin HL- 60 Hücreleri Üzerine Etkisinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi



Şekil 20. Piridin 2-Karbaldoksim Pt(II) Kompleksi Verilen HL-60 Hücrelerinde DNA Fragmentasyonunda Sırasıyla DNA Belirteci, Kontrol, DMSO-Kontrol, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM Konsantrasyon Gruplarının Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Sisplatinin keşfinden sonra, özellikle de *cis*-sisplatinin kanser hücrelerinde moleküler mekanizmalarının açıklanması ile, birçok farmakolojik etkili platinyum grubu antitümör ilaçlar sentez edilmiştir ve antitümör aktivitesi bakımından değerlendirilmiştir (Capeda ve ark., 2007; Dikmen ve Başaran, 2008). Sentez edilen bu bileşiklerin çoğu sisplatin, karboplatin ya da okzaliptatin gibi bileşiklerin analoglarıdır (yapıca benzerleri) (Capeda ve ark., 2007). Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların, apoptotik hücre ölümünü artırdığı bilinmektedir. Apoptosis, kanser hücrelerinin çoğalmasını dengeleyerek tümör büyümesinde önemli rol oynamaktadır (Budzisz ve ark., 2004) HL-60 insan promiyelositik hücre dizisi, *in vitro* olarak hücre büyümesi ve farklılaşması çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. HL-60 hücreleri, çoğalan miyeloblastların öncüsü olarak kabul edilmektedir. (Wang ve ark., 2009). Bizde bu çalışmada, daha önceki çalışmaları model alarak, insan lösemi HL-60 hücre dizisinde, piridin 2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksinin sitotoksik ve apoptotik etkilerini sisplatinle karşılaştırmalı olarak araştırdık. MTT yöntemi ile platin grubu içeren sisplatin ve Pt (II) kompleksinin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak HL-60 hücre dizisi üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkili olduğunu belirledik. Özellikle yüksek sisplatin konsantrasyonlarının (25, 50 ve 100 µM sisplatin) sitotoksik etkiyi

önemli düzeyde arttırdığı görüldü. Flow sitometride apoptotik etki bakımından değerlendirilen üç sisplatin konsantrasyonunda (25, 50 ve 100 μM), kontrol ve diğer konsantrasyon gruplarına göre canlı hücre yüzdesinde azalma, nekrotik hücre yüzdesinde de artış olduğu belirlendi. Kontrol ve diğer gruplara göre sisplatin konsantrasyonları arasında apoptotik hücre yüzdesinde önemli bir artış bulunmadı, ancak en büyük değer olarak apoptotik hücre yüzdesi 100 μM sisplatin konsantrasyonunda % 2.6 olarak analiz edildi.

Sisplatin, yüksek antitümöral aktivite gösteren ve oldukça geniş kullanım alanına sahip antineoplastik bir ajandır. Başta testis ve over kanserleri olmak üzere mesane prostat, baş ve boyun kanserleri, osteojenik sarkom ve nöroblastoma gibi solid tümörlerin tedavisinde sıklıkla kullanılır. Ancak doza bağlı olarak ortaya çıkan bazı yan etkileri, kullanım alanını sınırlamaktadır (Dikmen ve Başaran, 2008; Zhang ve Lippard, 2003; Kalayda ve ark., 2003). Sisplatinin etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Sisplatin hücreye pasif difüzyon ya da bakır taşıyıcıları (transporter) (CTR1) yardımıyla girmektedir. Sitoplazmaya giren sisplatin, ya glutatyon (GSH) ile birleşerek inaktif olur, ya da nüklear DNA da hücresel hedefine bağlanır. DNA molekülünde guanin ya da adenin bazlarına bağlanan platin grubu, zincir içi veya zincirler arası çapraz bağlantılar oluşturularak DNA replikasyonunu durdurarak antitümör etki göstermektedir (Cepeda ve ark., 2007; Klein ve Hambley, 2006; Shermann ve Lippard, 1987; Wang ve ark., 2009). Sisplatinin %5-10 'u genomik DNA ile bağlantı kurarken, % 75-85'i hücre içi protein ve diğer hücresel yapılarla bağlantı kurmaktadır. En önemli DNA olmayan hedefi de glutatyon (GSH) ' dur. GSH ve diğer tiol grubu içeren biyomoleküller platine çok çabuk bağlanırlar. GSH'a sisplatinin bağlanması, toksisite ve ilaca karşı direnç gelişimi gibi negatif farmakolojik etkileri ortaya çıkarmaktadır (Cepeda ve ark., 2007).

Sisplatinin hem nekroz hemde apoptozun içinde yer aldığı toksik aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir (Prevati ve ark., 2006; Cepeda ve ark., 2007). Yapılan bir çalışmada, sisplatinin HL-60 hücrelerinde zaman ve konsantrasyona bağımlı olarak hücre ölümüne neden olduğu, özellikle düşük mikromolar konsantrasyonlarda apoptotik etkinin daha çok görüldüğü ifade edilmiştir (Prevati ve ark., 2006). Maurizio ve ark., flow sitometride annexin V-PI sonuçlarına göre, HL-60 hücrelerinde sisplatinin toksik etkilerini araştırmışlar ve 5 ve 24 saatlik inkübasyonlar sonunda 50 ve 100 μM sisplatinin, doz ve zamana bağımlı olarak apoptotik ve nekrotik hücre sayısında artış yaptığını belirlemişlerdir (Prevati ve ark., 2006). Bazı çalışmalarda ise sisplatinin denenen on iki dozundan sadece onunda sitotoksik etki görülmüş ve anlamsız olarak değerlendirilmiştir (Krause-Heuer ve ark. 2009).

Sisplatinin tümör hücrelerinde hücre ölüm mekanizmaları ile apoptoz ve nekroz arasındaki bağlantılar açıklanmıştır. Sisplatin hücre ölüm mekanizmaları apoptoz ve nekrozdur. Hücrenin nükleusunda DNA ile bağlantı kuran sisplatin poli ADP riboz polimeraz-I (PARP-I) molekülünü aktive ederek NAD^+ ' yı, poli ADP riboz ve nikotinamide parçalar. Bunun sonucu, hücrede NAD^+ seviyesi azalır, bunu takiben tümör hücresinde ATP seviyesi de azalır ve hücre nekroz olarak ölür. Bu mekanizmaya zıt olarak, eğer ATP düzeyi hücrenin yaşaması için yeterli ise, kaspaz 3,6 ve 7 tarafından PARP-I parçalanır. Bunun sonucunda nekroz

mekanizması durur ve tümör hücresi apoptotik mekanizmayı kullanarak ölür(Capeda ve ark., 2007).

Çalışmada, flow sitometride apoptotik etki bakımından değerlendirilen piridin 2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksinin üç konsantrasyonunda (25, 50 ve 100 μ M), kontrol grubuna göre canlı, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdesinde önemli bir farklılık göstermemiştir. Piridin 2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksine ait nekrotik hücre yüzde değerleri, DMSO-kontrol hücre yüzde değerine göre farklı bulunmamıştır. Dolayısıyla, piridin 2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksine ait gruplar arasındaki nekrotik hücre yüzde değerlerindeki farklılığa da konsantrasyon farklılıklarının neden olabileceğini söyleyebiliriz.

Bu çalışmada, sisplatin, piridin 2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksinin 5 farklı konsantrasyonu HL-60 hücrelerinde 24 saat inkübe edilmiştir. Gruplara ait izole DNA' lar agaroz jel elektroforezine tabi tutulduğu, DNA fragmentasyon oluşumuna ait bir görüntüye rastlanılmamıştır. Flow sitometri sonuçlarımızda bu bulgumuzla paralellik göstermektedir. Maurizio ve ark. flow sitometri apoptoz bulgularına zıt olarak 24 saatlik sisplatin uygulamasından sonra, HL-60 DNA'sının fragmente olmadığını agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlemişlerdir. Hücre DNA'sında nükleozom içi parçalanmaların oluşmamasının nedenini de yüksek sisplatin konsantrasyonlarında, 24 saatlik inkübasyonda hücrelerde fragment olan DNA'nın tamamen kaybolmuş olabileceğini raporetmişlerdir (Previati ve ark., 2006).

Platin ilaçları ile ilgili çalışmalar, genellikle *in vitro* olarak yürütülür. Fakat, bu durum ilacın kan damarlarından difüze edilmesinden ve kanser hücresinin çevre yapısının heterojen olmasından dolayı çeşitli sorunlar yaratmaktadır. Platin (IV) ilaçları, örneğin platin (II) bileşikleri, hücre kültüründe artan stabilite ve lipofilite nedeniyle çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Fakat, *in vitro* çalışma ortamının sağladığı bu yararlar *in vivo* ortamda değişikliğe uğrayabilmektedir.

Platin ilaçlarının gelişimindeki en önemli konu, hücre içine alımı ve akümülyasyonunu sağlayan optimize özelliklerin, ilacı penetrasyonunu verimliliğini azaltmasından kaynaklanmaktadır (Klein ve Hambley, 2006).

Sisplatinin sadece cis-izomerleri antikanser aktivitesi göstermektedir. Trans izomerleri daima inaktiftir (Shermann ve Lippard, 1987). Platin (II) bileşikleri, (PtN₄) yapısı ile genellikle antikanser açısından inaktiftir. Çünkü bu bileşikler, Pt-N bağlarının yüksek termodinamik stabilitesinden dolayı, DNA'yı hazır olarak bağlayamazlar (Roy ve ark., 2009).

Sentez edilen piridin ve pirimidin türevleri, insan tümör hücre dizilerinde, denenmiştir. Sentez bileşikler içinde bulunan, nitrobenzosuberone halkası, antitümör aktivitesi için gereklidir. Ayrıca, hetetosiklik halkalarının varlığı, aktiviteyi arttıran nitril gruplarının varlığı için gereklidir (Amr ve ark., 2005). Platin kompleksi ve piridin arasındaki reaksiyon, amin ligandın doğal yapısına bağlı olarak, stereoisomerlerin karışımını üretir (Marzano ve ark., 2002). Platin kompleks sitotoksitesisi ve ligandın arasındaki ilişki, birçok öneri sunulmasına rağmen, hala kesin olarak bilinmemektedir (Tsutsumishita ve ark., 1998; Marzano ve ark., 2002). Yeni platin, komplekslerinin sitotoksitesisi ile ilgili çalışmalar, cis-Pt ile kıyaslandığında *in vitro* çalışma ortamında yüksek lipid peroksidasyonu

sebebiyle, yüksek sitotoksositeye sahip olduğu görülmüştür (Marzano ve ark., 2002; Roy ve ark., 2009).

Platin içeren komplekslerde uygulanan 5 μ M-100 μ M doz grubunun hücrenin apoptoza uğramasını engellediği, bu dozların hücreyi nekroza götürdüğü, ancak apoptotik etki için gerekli dozların 0,5 – 3 μ M arasında olması gerektiği bildirilmiştir (Krause-Heuer ve ark., 2009).

Sonuç olarak bu çalışmada, sispaltin ve platin (II) kompleksi konsantrasyon ve zamana bağılı olarak HL-60 hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir. Flow sitometri ve agaroz jel fragmentasyonu sonuçlarına göre, sispaltin, piridin 2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksinin HL-60 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonunda, önemli bir apoptotik etki belirlenmemiş olup nekrotik hücre ölüm mekanizmasının apoptoza göre daha fazla kullanıldığı görülmüştür. Özellikle DNA ya bağlanma özelliğine sahip platin içerikli maddelerde görmeyi hedeflediğimiz apoptotik etki, ya maddelerin hücre içerisine girememesinden (lipofilite azlığı) ya da HL-60 hücrelerinin sahip oldukları p53 gen delesyonundan dolayı apoptoza direnç kazanması ile açıklanabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada, sispaltin ve platin (II) kompleksi konsantrasyon ve zamana bağılı olarak HL-60 hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir. Flow sitometri ve agaroz jel fragmentasyonu sonuçlarına göre, sispaltin, piridin 2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksinin HL-60 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonunda, önemli bir apoptotik etki belirlenmemiş olup nekrotik hücre ölüm mekanizmasının apoptoza göre daha fazla kullanıldığı görülmüştür. Özellikle DNA ya bağlanma özelliğine sahip platin içerikli maddelerde görmeyi hedeflediğimiz apoptotik etki, ya maddelerin hücre içerisine girememesinden (lipofilite azlığı) ya da HL-60 hücrelerinin sahip oldukları p53 gen delesyonundan dolayı apoptoza direnç kazanması ile açıklanabilir.

Yapılan bu çalışma, *in vivo* ortamda da denenerek, piridin 2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksinin, *in vivo* ve *in vitro* etkilerinin karşılaştırılma şansı sağlanır. Bir başka öneri ise, hücre kültüründe, piridin 2-karbaldoksim ligandı ve Pt (II) kompleksi hücre dizisine verilmeden önce, lipofilitesi yüksek bir madde yardımıyla tamamen çözünerek, hücre içine verilebilir. Bu durumda, eğer varsa apoptotik etkinin gözlemlenmesi daha kolaylaşacaktır.

KAYNAKLAR

- Akşit, H., Bildik, A., Apoptozis, *Yyü Vet. Fak. Derg.*, 19 (1), 55-63 (2008).
- Alkan, S., Kronik Lenfositik Lösemi (KLL): Patogenezi ve Biyolojisi, Loyola University Medical Center, USA (2006).
- Amr, A.E., Mohamed, A.M., Mohamed, S.F., Hafez, N.A., Hamam, A.E.G., Anticancer Activities Of Some Newly Synthesized Pyridine, Pyrane, And Pyrimidine Derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 5481-5488 (2005).
- Barı, K., Petrik, J., Rumora, L., Biochemistry Of Apoptotic Cell Death, *Acta Pharm.*, 53, 151-164 (2003).
- Bernas, T., Dobrucki, J., Mitochondrial And Nonmitochondrial Reduction of Mtt: Interaction of MTT with Tmre, Jc-1, and Nao Mitochondrial Fluorescent Probes, *Cytometry*, 47, 236-242 (2002).
- Budzisz, E., Krajewska, U., Rozalski, M., Cytotoxic And Proapoptotic Effects Of New Pd(II) And Pt(II)-Complexes With 2-Ethanimidoyl-2-Methoxy-2h-1,2-Benzoxaphosphinin-4-O-2-Oxide, *Polish Journal Of Pharmacology*, 56, 473-478 (2004).
- Cabadak, H., Hücre Siklusu ve Kanser, *Adü Tıp Fakültesi Dergisi*, 9 (3), 51-61 (2008).
- Call, T.G., Phyliky, R.L., Noel, P., Habermann T.M., Beard, C.M., O' Fallon, W.M., Kurland, L.T., Incidence Of Chronic Lymphocytic Leukemia in Olmsted County, Minnesota, 1935 Through 1989, With Emphasis On Changes in Initial Stage At Diagnosis, *Mayo Clin Proc.*, 69 (4), 323-328 (1994).
- Cantürk, Z., Bor Bileşiklerinin Lösemi Hücrelerine ve Normal Lenfositlere Olan Etkisinin Hücre Kültüründe ve Transmission Elektron Mikroskopunda İncelenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, İmmunoloji-Hematoloji ABD, Türkiye (2006).
- Capeda, V., Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Perez, M. J., Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7, 3-18 (2007).
- Clarke, F.W., The Elements Of Biochemistry, *Bibliobazaar*, 280-284 (2008).
- Cohen, J.J., Programmed Cell Death And Apoptosis in Lymphocyte Development and Function *Chest* 103 (3), 99-101 (1993).
- Cortes, J., Kantarjian, H.M., Promising Approaches in Acute Leukemia, *Investigation New Drugs*, 18, 57-82 (2000).
- Dalva, K., Hematoloji'de Akım Sitometri Kullanımı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara (2006).
- Dietrich, A., Mueller, T., Paschke, R., Kalinowski, B., Behlendorf, T., Reipsch, F., Fruehauf, A., Schmoll, H. J., Kloft, C., Voigt, W., 2-(4-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-undecyl)-propane-1,3-diamminedichloroplatinum(II): a novel platinum compound that overcomes cisplatin resistance and induces apoptosis by

mechanisms different from that of cisplatin, J. Med. Chem., 51, 5413-5422 (2008).

Dikmen, M., Başaran, A., Cisplatin Toksisitesi Üzerine Kalsiyum Kanal Blokörlerinden Verapamil' in Etkileri, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 15-26 (2008).

Drobnik, J., Antitumor Activity Of Platinum Complexes, Cancer Chemother. Pharmacol., 10, 145-149 (1983).

Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., Akut Promiyelositik Lösemili Bir Hastadan Sürekli, Miyeloid Hücre Hattı Ayırıcı (HL-60 Karakterizasyonu), 54 (3), 713-33 (1979).

Gao, J., Liu, Y.G., Zingaro, R.A., Cytotoxic Activities, Cellular Uptake, Gene Regulation, And Optical Imaging Of Novel Platinum(II) Complexes (2009).

Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., Perez, M.J., Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced By Apoptosis?, Molecular Pharmacology, 59, 657-663 (2001).

Gorman, A.M., Samali, A., McGowan, A.J., Cotter, T.G., Use Of Flow Cytometry Techniques in Studying Mechanisms Of Apoptosis in Leukemic Cells, Wiley-Liss, Inc., (1997).

Gupta, S., Analysis Of Cytotoxicity Of Novel Platinum Complexes in Ovarian Cell Lines-Cho, A2780 And A2780/C30, Master Of Science, Northern Illinois University, Department Of Biological Sciences, Illinois, USA, August (2008).

Gülçin, İ., Özdemir, H., Şentürk, M., Su Ürünlerinde Moleküler Biyoloji Teknikleri, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 85 (2008).

Hatok, J., Babusikova, E., Matakova, T., Mistuna, D., Dobrota, D., Racay, P., In Vitro Assays For The Evaluation Of Drug Resistance in Tumor Cells, Clin. Exp. Med., 9, 1-7 (2009).

Haznedaroğlu, İ.C., Kronik Miyeloid Lösemi (KML), Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Ünitesi, Ankara (2006).

Hockenbery, D., Defining Apoptosis, American Journal Of Pathology, 146 (1), 176-189 (1995).

http-1 <http://www.cancer.org/docroot/cr1/content/> (13.08.2009).

http-2 <http://www.leukemia-net.org/content/home/> (01.08.2009).

http-3 <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf> (22.08.2009).

http-4 <http://www.webturkiyeportal.com/webforum/172349-mitoz-bolunme-sekilli.html> (10.09.2009).

http-5 <http://books.google.com.tr/books> (10.09.2009).

http-6 [http://en.wikipedia.org/Wiki/Platinum#Precious Metal](http://en.wikipedia.org/Wiki/Platinum#Precious_Metal) (11.09.2009).

http-7 <http://www.Bibilgi.Com/Platin> (11.09.2009).

http-8 <http://en.wikipedia.org/Wiki/Platinum> (07.006.2009)

http-9 <http://www.goldandsilvermines.com/Platinum.htm> (11.09.2009).

http-10 http://en.wikipedia.org/wiki/mtt_assay (15.05.2009).

http-11 http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_fragmentation (17.08.2009).

Ioannou, Y.A., Chen, F.W., Quantitation Of DNA Fragmentation in Apoptosis, Nucleic Acids Research, 24 (5), (1996).

Kalayda, G. V., Komeda, S., Ikeda, K., Sato, T., Chikuma, M., Reedijk, J., Synthesis, Structure and Biological Activity of New Azine-Bridged Dinuclear Platinum (II) Complexes- a New Class of Anticancer Compounds, Eur. J. Inorg. Chem., 4347-4355 (2003).

Kasparkova, J., Novakova, O., Vrana, O., Intini, F., Natile, G., Brabec, V., Moleculer Pharmacology, 70, 1708-1719 (2006).

Kayaalp O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., 315, Ankara (2009).

Kayiran, M.S., Özbek, N., Acute Monoblastic Leukemia As A Second Malignancy After Doxorubicin And Cisplatin Treatment For Osteosarcom, Turk J. Hematol., 20 (1), 39-42 (2003).

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Curriet, A.R.,: A Basic Biological Phenomenon With Wideranging Implications in Tissue Kinetics, Br. J. Cancer, 26, 239 (1972).

Klein, A.V., Hambley, T.W., Platinum Drug Distribution in Cancer Cells And Tumors, The University Of Sydney, School Of Chemistry, Australia (2006).

Krause-Heuer, A.M., Grünert, R., Künhe, S., Buczkowska, M., Wheate, N.J., Pevelen, D.D., Boag, L.R., Fisher, D.M., Kasparova, J., Malina, J., Bednarski, P.J., Brabec, V., Aldrich-Wright, J.R., Studies Of The Mechanism Of Action Of Platinum(II) Complexes With Potent Cytotoxicity in Human Cancer Cells, J. Med. Chem., 52, 5474-5484 (2009).

Kumamoto, H., Kimi, K., Ooya, K., Immunohistochemical Analysis Of Apoptosis-Related Factors (Fas, Fas Ligand, Caspase-3 And Single-Stranded DNA) in Ameloblastomas, J. Oral Pathol. Med., 30, 596-601 (2001).

Lareum, O.D., Farsund, T., Clinical Application Of Flow Cytometry: A Review, Society For Analytical Cytology, 2 (1), (1981).

Lippard, J.S., Chemistry And Molecular Biology Of Platinum Anticancer Drugs, Pure & Appl. Chem., 59 (6), 731-742 (1987).

Lippert, B., Cisplatin: Chemistry And Biochemistry Of A Leading Anticancer Drugs, Wiley Vch Press, Zürich, 32-25; 247-258 (1999).

Lowitz, B.B., Casciato, D.A., Medical Oncology & Principles Of Cancer Biology, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara (2007).

Marzano, A., Trevisan A., Giovagnini, L., Fregona, D., Synthesis Of A New Platinum(II) Complex: Anticancer Activity And Nephrotoxicity in Vitro, Toxicology in Vitro 16, 413-419 (2002).

Mene, P., Amore, A., Apoptosis: Potential Role in Renal Diseases, Nephrol Dial Transplant, 13, 1936-43 (1998).

Muggia, F., Platinum Compounds 30 Years After The Introduction Of Cisplatin: Implications For The Treatment Of Ovarian Cancer, *Gynecologic Oncology*, 112, 275-281 (2009).

Müftüoğlu, E., Klinik Hematoloji, Şahin Yayıncılık, 279-288, Diyarbakır (1995).

Olszewski, U., Ach, F., Ulsperger, E., Baumgartner, G., Zeillinger, R., Bednarski, P., Hamilton, G., In Vitro Evaluation Of Oxoplatin: An Oral Platinum(IV) Anticancer Agent, *Hindawi Publishing Corporation Metal-Based Drugs*, 11, (2009).

Onataslan, N.A., Akciğer Kanserinde Büyüme Faktörleri, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir (2006).

Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D., Apoptozisin Önemi, *Toraks Dergisi*, 2 (1), 91-95 (2001).

Özbek, U., Akut Lösemilerde Moleküler Genetik ve Prognoz, İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (Detae), İstanbul (2006).

Özçimen, A., Steroid' in HL-60(İnsan Akut Miyelosid Lösemi) Hücre Hattında, Apoptoz ve Farklılaşma Üzerindeki Etkisi, Hacettepe Üniversitesi, Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD, Ankara (2005).

Pizarro, A.M., Sadler, P.J., Unusual DNA Binding Modes For Metal Anticancer Complexes, *Biochimie*, 91, 1198-1211 (2009).

Prevati, M., Lanzoni, I., Corbaccella, E., Magosso, S., Guaran, V., Martini, A., Capitani, Silvano., Cisplatin-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia cells, *International Journal of Molecular Medicine*, 18, 511-516 (2006).

Ratanachoo, K., Gascoyne, P. R. C., Ruchirawat, M., Detection of Cellular Responses to Toxicants by Dielectrophoresis, *BBA*, 1564, 449-558 (2002).

Roberts, J.D., Peroutka, J., Farrell, N., Cellular Pharmacology Of Polynuclear Platinum Anti-Cancer Agents, *Journal Of Inorganic Biochemistry*, 77, 51-57 (1999).

Roy, S., Westmass, J.A., Hagen, K.D., Wezel, G.P., Reedjik, J., Platinum(II) Compounds With Chelating Ligands Based On Pyridine And Pyrimidine: DNA And Protein Binding Studies, *Journal Of Inorganic Biochemistry* 103, 1288-1297 (2009).

Saydam, G., Akut Lösemiler, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, İzmir (2006).

Serter, N., Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, Türkiye (2006).

Sherman, S.E., Lippard, S.J., Structural Aspects Of Platinum Anticancer Drug Interactions With DNA, *Chem. Rev.*, 87, 1153-1181 (1987).

Smith, C., Marks, A., Chansky, M., Mark' Temel Tıbbi Biyokimyası, Güneş Tıp Kitabevleri, 317, Ankara (2007).

Soeiro, M.N.C., Souza, E.M., Programmed Cell Death And Trypanosomatids: A Brief Review, *Springer Science* (2008).

Şahin, F., Avcı, Ç.B., Avcu, F., Ural, A.U., Sarper, M., Hışıl, Y., Omay, S.B., Saydam, D., Red Grape Seed Extract And its Compound Resveratrol Exert Cytotoxic Effect To Various Human Cancer Lines, Turk J Hematol, 24, 102-109 (2007).

Taneli, F., "Flow" Sitometri Tekniği Ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı, Türk Klinik Biyokimya Derg., 5 (2), 75-82 (2007).

Tanyeli, A., Akut Lenfoblastik L2 Morfolojisi İle Myeloid Antijen Pozitifliğinin İlişkisi, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana (2003).

Temizkan, G., Arda, N., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Kitap Evi, 236, Ankara (1999).

Tomatır, G. A., Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü, T Klin J Med Sci, 23, 499-508 (2008).

Topal, T., Öter, Ş., Korkmaz, A., Melatonin ve Kansere İlişkisi, Genel Tıp Dergisi, 19(3) (2009).

Tsutsumishita, Y., Onda, T., Okada, K., Takeda, M., Endou, H., Futaki, S., Niwa, M., Involvement of H₂O₂ Production in Ciplatin-Induced Nephrotoxicity, Biochemical And Biophysical Research Communications, 242, 310-312 (1998).

Turgay, K.K., İmmünoloji, Güneş Kitapevi, 23-44, Ankara (2003).

Twentyman, P.R., Luscombe, M., A Study Of Some Variables in A Tetrazolium Dye (Mtt) Based Assay For Cell Growth And Chemosensitivity, Br. J. Cancer, 56, 279-285 (1987).

Ulukaya, E., Apoptozis, Hücre Döngüsü ve Kansere, Uludağ Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı (2003).

Wang, E., Giandomenico, C.M., Current Status Of Platinum-Based Antitumor Drugs, Chem. Rev., 99, 2451-2466 (1999).

Wang, J., Fong, C., Tzang, C., Xiao, P., Han, R., Yang, M., Gene Expression Analysis Of Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cell Differentiation And Cytotoxicity Induced By Natural And Synthetic Retinoids, Life Sciences, 84, 576-583 (2009).

Yang, T., Vesey, D.A., Johnson, D.W., Wei, M.Q., Gobe, G.C., Apoptosis Of Tubulointerstitial Chronic Inflammatory Cells in Progressive Renal Fibrosis After Cancer Therapies, Elsevier, 150, 40-50 (2007).

Yang, T., Vesey, D.A., Johnson, D.W., Wei, M.Q., Gobe, G.C., Translational Research 150 (1), 1931-1998 (2007).

Zaludova, R., Zakovska, A., Kasparkova, J., Balcarova, Z., Kleinwachter, V., Vrana, O., Farrell, Brabec, V., DNA Interactions Of Bifunctional Dinuclear Platinum (II) Antitumor Agents, Eur. J. Biochem. 246, 508-517 (1997).

Zhang, C.X., Lippard, S.J., New Metal Complexes As Potential Therapeutics, Current Opinion in Chemical Biology, 7, 481-489 (2003).