

195714

**BAZI SENTETİK BİLEŞİKLERİN KANSERLİ
HÜCRE İÇİ PROTEİN AKTİVASYONUNA
VE APOPTOZİSE OLAN ETKİLERİ**

GÜLŞEN AKALIN
Yüksek Lisans Tezi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı
Eylül - 2004

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Proje No: 030345

**Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphanesi**

JURİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gülşen AKALIN'ın "Bazı Sentetik Bileşiklerin Kanseri Hücre İçi Protein Aktivasyonuna ve Apoptozise Olan Etkileri" başlıklı Biyokimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 01.09.2004 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yrd. Doç. Dr. Zerrin İNCESU	
Üye	: Doç. Dr. Engin ULUKAYA	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Asiye Meriç	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23.07.2004. tarih ve 20-2..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****BAZI SENTETİK BİLEŞİKLERİN KANSERLİ HÜCRE İÇİ PROTEİN
AKTİVASYONUNA VE APOPTOZİSE OLAN ETKİLERİ****GÜLŞEN AKALIN****Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı****Danışman: Yrd. Doç. Dr. Zerrin İNCESU****2004**

Bu çalışmada, 1,3-bis-(heteroaril süstitüe) benzen türevleri olan MBİS1, MBİS2 ve MBİS8, 3-süstitüe-2-tiyohidantoin türevleri olan Tiyo1, Tiyo2, Tiyo5 ve kekik bitkisinin doğal bileşeni olan Karvakrol'ün 5RP7 ve CO25 hücreleri üzerindeki sitotoksik, apoptotik ve hücre içi protein aktivasyonundaki etkisi araştırılmıştır. Aynı zamanda, kontrol hücreleri olan F2408 ve C2 hücreleri de karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. Sitotoksik etkileri araştırmak amacıyla MTT ölçümü ve tripan mavisi boyama yöntemi, apoptozisi araştırmak amacıyla akridin oranj / etidyum bromür boyama, akım sitometrisi, agaroz jel elektroforezi ve protein aktivasyonunu araştırmak amacıyla da western blot yöntemleri uygulanmıştır. Elde edilen bulgular 1,3-Bis-(heteroaril süstitüe) benzen türevlerinden -NO₂ yan grubu taşıyan MBİS8'in diğer türevlere göre hem H-ras aktif 5RP7 hem de N-ras aktif CO25 hücrelerinde daha fazla toksisite gösterdikleri ve apoptozise neden olduğunu göstermektedir ve 3-süstitüe-2-tiyohidantoin türevlerinden -4-metoksi fenil grubu taşıyan Tiyo5'in H-ras aktif hücrelerde, fenil grubu taşıyan Tiyo2'nin de N-ras aktif hücrelerde daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Doğal bileşen olan karvakrol'ün IC₅₀ dozunun altında da kanserli hücreleri apoptozise götürmesi ve hücre içi protein aktivasyonunda artış göstermesi bulgularımız dahilinde gözlenmiştir. Yukarıda sözü edilen bileşiklerin antineoplastik tedavide kullanılabileceğine dair ilk basamak araştırmalar yapılmıştır. Elde edilen bulguların yapılacak olan antineoplastik etki araştırmaları için de ışık tutacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Sitotoksisite, H-ras, N-ras, Karvakrol

ABSTRACT**Master of Science Thesis****THE EFFECTS OF SOME NATURAL AND SYNTHETIC COMPOUNDS ON
PROTEIN ACTIVATION AND APOPTOSIS IN CANCER CELLS****GÜLŞEN AKALIN****Anadolu University
Graduate School of Health Sciences
Department of Biochemisrty****Supervisor: Asst. Prof. Dr. Zerrin İNCESU****2004**

In this study, the effects of cytotoxic, apoptotic and protein activation of MBIS1, MBIS2, MBIS8 (1,3-bis-(heteroaryl substituted) benzene derivatives) and Tiyo1, Tiyo2, Tiyo5 (3-substituted-2-tiyohydantoin derivatives) and carvacrol, compound of thyme plant, were investigated on 5RP7 and CO25 cells. F2408 cells were used to compare the effects of compounds on 5RP7 cells and C2 cells were also used to compare the effects of compounds on CO25 cells. MTT measurement and trypan blue staining method were used to study cytotoxicity. Flow cytometry, agarose gel electrophoresis and acridin orange staining method were used to study apoptotic effects while western blotting was used to determine protein activation on cells. Findings obtained here showed that MBIS8 which was 1,3-bis-(heteroaryl substituted) benzene derivative carrying $-NO_2$ substituent was more effective on both 5RP7 and CO25 cells, causing more cytotoxicity and apoptosis. Tiyo5, 3-substituted-2-tiyohydantoin derivatives, carrying -4 -metoxyphenyl substituent was more effective on H-ras activated cells and Tiyo2 carrying phenyl substituent was more effective on N-ras active cells when compared with control cells. Also, carvacrol showed apoptotic effects on cancer cells and increased protein activation on cells at doses which were sublethal on normal cells. It is thought that the findings about the compounds mentioned above would light for the future investigations about using them in antineoplastic therapy.

Keywords: Apoptosis, Cytotoxicity, H-ras, N-ras, Carvacrol

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince yanımda bulunan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tezimin her aşamasında maddi ve manevi her türlü yardımda bulunan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Zerrin İncesu'ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Tezim'de kullandığım kimyasal maddelerden olan Tiyohidantoin türevlerini sentezleyen Sayın Doç. Dr. Kadriye Benkli ve Benzen türevlerini sentezleyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Asiye Meriç'e,

Hücre kültürü çalışmalarını yürüttüğüm, olanak ve desteklerinden yararlandığım BİBAM Müdürü Sayın Prof. Dr. Mustafa Şenyel'e başta olmak üzere tüm merkez çalışanlarına,

Akım Sitometrisi analizlerinin yapılmasını sağlayan Osmangazi Üniversitesi İç hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Zafer Gülbaş'a ve analizleri gerçekleştiren Biyolog Gülcihan Demirel'e,

Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı imkanlarını kullanmama yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Hülya Zeytinoğlu'na ve Araş Gör. Emel Ergene'ye, DNA görüntülerini almamda yardımcı olan Araş. Gör. M. Burçin Mutlu'ya,

Tezimin yazım aşamasında yardımcı olan Sayın Araş. Gör. Harun Böcük'e, deney aşamasında yardımcı olan Atilla Biçer'e ve tezim süresince manevi desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşım Araş. Gör. Rahşan Tamsü ve emeği geçen tüm arkadaşlarıma,

Ayrıca tezimin deney ve yazım aşamalarında verdikleri destek, gösterdikleri anlayış ve sabırdan dolayı Ailem'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Onkogenler	3
1.1.1. Ras proteini	4
1.2. Apoptozis	4
1.2.1. Apoptozis mekanizmasının modülatörleri	9
1.2.2. Bcl-2 ailesi	10
1.2.3. Kaspazlar	11
1.2.4. Apoptozis mekanizmasının hücre içi sinyal yolları ile etkileşimi	14
1.2.4.1. PKC ve apoptozis	14
1.2.4.2. PI3-Kinaz ve apoptozis	15
1.2.4.3. p53 ve apoptozis	15
1.3. Kanser Tedavi Yöntemleri	16
1.3.1. Kemoterapi	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM	20
2.1. Kullanılan Materyaller	20
2.1.1. Kimyasal maddeler	20
2.1.2. Sarf malzemeler	20
2.1.3. Cihazlar	21
2.2. Yöntemler	21

2.2.1. Hücre kültürü ve bileşiklerin hazırlanması	21
2.2.2. MTT ölçümü	22
2.2.3. Tripan mavisi ile boyama	23
2.2.4. Akridin oranj ile boyama	23
2.2.5. Akım sitometri analizi	23
2.2.6. DNA ekstraksiyonu ve elektroforetik analiz	24
2.2.7. Western blotlama	24
2.2.7.1. Stoplazmik protein ekstraksiyonu	24
2.2.7.2. Jel elektrofrezisi (SDS-PAGE)	24
2.2.7.3. Antikor ile işaretleme	25
2.2.8. İstatistiksel değerlendirmeler	26
3. BULGULAR	27
3.1. Sitotoksik Etkiler	27
3.1.1. Benzen türevlerinin sitotoksik etkileri	27
3.1.2. Tiyohidantoin türevlerinin sitotoksik etkileri	29
3.1.3. Karvakrol'ün sitotoksik etkileri	30
3.2. Doğal ve Sentetik Bileşiklerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri ...	39
3.2.1. Benzen türevlerinin hücre canlılığı üzerine etkileri	39
3.2.2. Tiyohidantoin türevlerinin hücre canlılığı üzerine etkileri	40
3.2.3. Karvakrol'ün hücre canlılığı üzerine etkileri	41
3.3. Apoptozisin Morfolojik Olarak Belirlenmesi	47
3.4. Bileşiklerin Erken Apoptozis Üzerine Etkileri	58
3.5. Bileşiklerin Geç Apoptozis Üzerine Etkileri	64
3.6. Bileşenlerin pro-apoptotik Bax protein ekspresyonu üzerine olan etkileri	71
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	72
5. KAYNAKLAR	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. Ras proteininin hücre içi sinyal yolu	7
1.2. Apoptozisin hücrel sinyal yolları	14
1.3. Maddelerin kimyasal formülleri	19
3.1. MBİS1'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisi	32
3.2. MBİS2'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	33
3.3. MBİS8'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	34
3.4. Tiyo1'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	35
3.5. Tiyo2'nin F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	36
3.6. Tiyo5'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	37
3.7. Karvakrol'ün F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi	38
3.8. MBİS1'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri	42
3.9. MBİS8'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri	43
3.10. Tiyo2'nin F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri	44
3.11. Tiyo5'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri	45
3.12. Karvakrol'ün F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri	46
3.13. MBİS1'in 5RP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	48
3.14. MBİS8'in 5RP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	49
3.15. Tiyo2'nin 5RP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	50

3.16. Tiyo5'nin 5RP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	51
3.17. Karvakrol'ün 5RP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	52
3.18. MBİS1'in CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	53
3.19. MBİS8'in CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	54
3.20. Tiyo2'nin CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	55
3.21. Tiyo5'in CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	56
3.22. Karvakrol'ün CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	57
3.23. Maddelerin F2408 hücreleri üzerine 24 saat inkübasyon sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları	59
3.24. Maddelerin 5RP7 hücreleri üzerine 24 saat inkübasyon sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları	60
3.25. Maddelerin 5RP7 hücreleri üzerine 48 saat inkübasyon sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları	61
3.26. Maddelerin C2 hücreleri üzerine 24 saat inkübasyon sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları	62
3.27. Maddelerin CO25 hücreleri üzerine 24 saat inkübasyon sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları	63
3.28. Zamana ve doza bağımlı DNA fragmentasyonu	67
3.29. Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi	68
3.30. Tiyohidantoin türevi olan Tiyo2'nin apoptosis üzerine etkisi	69
3.31. Tiyohidantoin türevi olan Tiyo5'nin apoptosis üzerine etkisi	70
3.32. Karvakrol'ün apoptosis üzerine etkisi	71
3.33. a. MBİS8'in (0,0006 mg/ml) 5RP7 hücre içi protein aktivasyonu, b. Tiyo2'nin (0,0075 mg/ml) 5RP7 hücre içi protein aktivasyonu, c. Karvakrol'ün (0,02 mg/ml) 5RP7 hücre içi protein aktivasyonu	74
3.34. a. MBİS1'in (0,05 mg/ml) CO25 hücre içi protein aktivasyonu b. Karvakrol'ün (0,05 mg/ml) CO25 hücre içi protein aktivasyonu	75
3.35. a. Karvakrol'ün PKC inhibitörü ve PLC inhibitörü varlığında 5RP7 hücre içi protein aktivasyonuna etkisi, b. Karvakrol'ün PKC inhibitörü ve PLC inhibitörü varlığında 5RP7 hücre içi protein aktivasyonuna etkisi	76

ÇİZELGELER DİZİNİ**Sayfa**

- 3.1. MTT deneyi sonuçlarına göre maddelerin 24 saat sonra hücreler
üzerindeki IC₅₀ değerleri konsantrasyon birimi: mg/ml 31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Apaf-1	: Apoptotic protease activating factor-1
CAD	: Kaspazla aktiveleşen deoksiribonükleaz (Caspase activated deoxyribonuclease)
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilen-diamin tetra asetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor)
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	: Fas associated death domain
GEF	: Guanin nükleotid değiştirme faktörü
GTP	: Guanin trifosfat
ICAD	: Kaspazla aktiveleşen deoksiribonükleaz inhibitörü (Inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease)
ICE	: Interlökin 1- β dönüştürücü enzim
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
PARP	: Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	: Fosfat tuz tamponu (phosphate buffer saline)
P-gp	: P-glikoprotein
PI3K	: Fosfotidil inozitol 3 kinaz
PKC	: Protein kinaz C
RAS-SSF1	: Ras bağımlı aile ünitesi
RTP	: Reseptör tirozin kinaz

1. GİRİŞ

Ölüm nedeni olarak, dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer alan kanser, her yaşta gelişme riskine sahip ve çeşitli organlarda fonksiyon ve yapı bozukluğuna neden olan önemli bir hastalıktır [Murray ve ark. 1998].

Kanser, bir seri genetik hasarın birikimi ile çevresel etmenlerin bağımsız ya da işbirliği sonucu ortaya çıkmaktadır. Genetik hasar olarak isimlendirdiğimiz mutasyonlardan bazıları, hücre çoğalmasının kontrolünü etkilerken, diğerleri tümör hücrelerinin buldukları noktalardan taşınmasını ve uzak mesafede yaşamalarını veya tümörün büyümesi için gerekli olan anjiyojenik işlemleri uyarmaktadırlar. Genomda meydana gelen tek nükleotid değişimi gibi küçük değişiklikler ya da kromozom kazanımı veya kaybı, viral genomun hücre genomuna katılımı, kromozomun yeniden düzenlenmesi gibi büyük ölçekli değişikliklerin kanser gelişimi ile birebir ilişkili olduğu bilinmektedir.

Birçok farklı kanser tipinde, mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelir ve bu mutasyonlar üreme hücreleri ile gelecek nesillere aktarılamazlar. Ancak kanser vakalarının %1'inde eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim yeni neslin kansere yatkınlığını arttırmış olur. Bazende kalıtsal mutasyonlar tek başlarına kanser oluşumunda etkili olmayabilirler. Kanser oluşumunun tamamlanması ve homozigot genlerin oluşması için homolog lokuslarda oluşan somatik mutasyonların meydana gelmesi gerekmektedir. Yukarıda söz edilen olasılıklardan hangisi etken olursa olsun, kanser hastalığı hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir [Klug ve Cummings 2000].

Genomda meydana gelen büyük ölçekli değişiklikler kanserin genel özelliğini oluşturduğundan bu değişiklikler, hastalığın teşhisi, seyri ve şiddeti hakkında doğru tahmin yapmak için kullanılırlar. Son yıllardaki sinyal aktarım yollarının anlaşılması, genomiklerin kullanılması ve insan genlerinin dizi analizleri sonucunda potansiyel kanser tedavi hedeflerinin sayısında artış görülmüştür [McMahon ve Wodds 2001].

Genetiksel yatkınlık dışında, iyonize radyasyon, kimyasallar ve virüsler gibi karsinojen olarak bilinen etkenler doğrudan ya da dolaylı olarak kansere neden olabilirler.

Mor ötesi, X ve γ ışınlarının karsinojenik oldukları bilinmektedir. Bu ışınların etki mekanizmaları farklılık göstermektedir. Örneğin, mor ötesi ışınlar bazen pirimidin dimerlerinin, bazen de bazların elenerek pürinsiz veya pirimidinsiz noktaların oluşumuna ya da tek veya çift ipliğin kırılarak iplikler arasında çapraz bağlanmanın oluşumuna neden olmaktadır. X ve γ ışınları ise, daha çok dokularda serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar. Sonuçta oluşan OH^\bullet süperoksit ve diğer radikaller, moleküler hasara yol açmak üzere DNA ve diğer makromoleküllerle etkileşerek kansere neden olmaktadır [Murray ve ark. 1998].

Kanser oluşumuna neden olan veya oluşumu indükleyen bir başka çevresel etmen kimyasal bileşenlerdir. Genel olarak bakıldığında kanser tiplerinin % 80'inin oluşum nedeni başlıca kimyasal maddeler olmak üzere çevresel etmenler olduğu saptanmıştır. Kanserojen olarak tanımlanan kimyasal maddelere insanlar farklı şekilde maruz kalabilirler, örneğin mesleğe bağlı olarak benzen, asbest gibi bileşenlere maruz kalındığı gibi, besin yolu ile de koruyucu amaçlı kanserojen nitelikli kimyasallar tüketilmektedir. Kimyasal karsinojenler ve türevleri DNA, RNA ve proteinlere kovalent olarak bağlanmaktadır [Murray ve ark. 1998] ve bu maddelerin transformasyonu karsinogenezde hem biyoaktivasyonun hem de detoksifikasyonun kazanılmasında önemlidir. Örneğin, nitropolisiklik hidrokarbonlar, polisiklik hidrokarbonlar, nitrözaminler ve diolleri, vinilhalidler ve dihaloalkenler transformasyonla aktivite kazanan kimyasal ajanlardır ve bu karsinojenlerin aktivasyon ve detoksifikasyonlarında bir seri enzimatik sistemler rol almaktadır [Guengerich 2000].

İyonize radyasyon ve kimyasallar gibi bazı DNA ve RNA virüsleri de kanser oluşturma yeteneğine sahiptirler. Örneğin, polyomavirüs ve SV40 virüslerinin uygun şartlarda hücrelere enfekte olduğu, hücre genomunu doğrudan ya da dolaylı olarak etkiledikleri ve kanser oluşumuna neden oldukları bilinmektedir.

Kanserli hücreler, sınırsız çoğalma, yerel dokuları işgal ve vücudun diğer bölümlerine yayılma ve metastaz oluşturma yeteneklerine sahiptirler. Buna bağlı olarak tümörleri 3 gruba ayırmak mümkündür:

1. Bening tümörler; herhangi bir dokudan köken alabilen bölgesel tümörlerdir. Bu nedenle bölgesel baskı ile hasara yol açabilirler. Ancak en genel özellikleri uzak bölgelere yayılamamalarıdır. Örneğin, skuamöz epitelyumdan türeyen bening tümöre “papilloma”, glandular dokuların bening tümörüne “adenoma” ve fibröz dokudaki tümöre ise “fibroma” adı verilmektedir.

2. In situ tümörler; genellikle epitelyumda gelişirler ve küçüktürler. Hücreler, kanser hücrelerinin morfolojik görüntülerine sahiptirler fakat epitelyal tabakada kalırlar, bazal tabakaya veya destek dokuya geçemezler [Franks ve Teich 1998].

3. Malignant tümörler; büyüebilmeleri için normal dokulardaki kan akımıyla sağlanan besinlere ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle bazı tümör hücreleri, kan damarlarının tümör içinde büyümesini uyaran proteinler üretirler ve damarlar düzensiz bir şekilde tümör içinde yayılırlar. Kanser hücreleri ise bu damarlara geçerek lokal lenf nodlarına veya ikincil tümörlerin oluşacağı uzak organlara taşınırlar. Örneğin, epitelyumda gelişen malignant tümörlere “karsinoma”, mezenşimdeki malignant tümörlere ise “sarkoma” adı verilmektedir [Franks ve Teich 1998].

1.1. Onkogenler

Onkogenlerin kanser gelişiminde etkili olabilecekleri ilk defa 1969’da Huebner ve Tadora tarafından ileri sürülmüştür [Tchia ve ark 1991]. Normal hücrel genler olarak bilinen protoonkogenlerin kodlanmış protein ürünleri genel olarak hücre sinyalizasyonu ve hücre büyümesinin regülasyonunda önemli rol oynarlar. Bu genler, mutasyon, kromozomal translokasyon, amplifikasyon veya transkripsiyonel disregülasyon ile fonksiyon değişikliğine uğrarlar ve bunun sonucu olarak da hücre içerisinde anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olurlar. Fonksiyon değişikliğine uğrayan protoonkogenlere “onkogen”, protein ürünlerine ise “onkoprotein” denir [Köktürk ve ark. 2003].

Protoonkogenler, hücre içi sinyal ileticileri, transkripsiyon faktörleri, hücre siklusunu kontrol eden proteinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörlerinden oluşmaktadır. Protoonkogenler değişik yollarla aktive olurlar ve onkogen haline dönüşürler. Genin yapısal bölgesinde mutasyon sonucu farklı fonksiyona sahip bir protein sentezlenir. Bu olay en çok ras onkogen ailesinde görülür. Bir başka mekanizma ise gen ekspresyonunu regüle eden bölgede değişiklik sonucu aşırı miktarda gen ürününün sentez edilmesidir. Kromozom translokasyonlarında ise kromozomun bir bölgesi koparak yer değiştirir ve yeni yerleştiği bölge sürekli uyarı alan bir genin düzenleyici bölgesinin kontrolü altındaysa sürekli uyarılmaktadır ve böylece translokasyon tümör oluşumuna neden olan değişmiş bir gen aktivitesine sahip olmaktadır. Gen amplifikasyonu ile de hücre içindeki DNA miktarı artmaktadır. Myc ailesi bu mekanizmaya örnek olarak verilebilir [Roth 1995].

1.1.2. Ras proteini

Ras proteini, 189 aminoasit uzunluğunda, hücre zarında lokalize olmuş ve guanozin tri fosfat (GTP) aktivitesine sahip bir proteindir. Bu proteinin ekspresyonu embriyogenezde, yara iyileşme mekanizmasında ve mitozun artmış olduğu durumlarda stimüle olmakla birlikte özellikle hücre dışından hücre içine sinyal aktarımında, hücre büyümesi ve farklılaşmasında da önemli role sahiptir [Ge ve ark. 1998].

Hücre, dışarıdan uyarıcı sinyaller aldığı zaman ras proteini GTP'ye bağlanır ve aktif hale geçerek uyarıcı sinyalleri nükleusa iletir. Bu tür sinyal iletimi sona erdiğinde ras proteini GTPaz enzimi aracılığı ile GTP'nin hidrolizi sonucu oluşan Guanozin di fosfat (GDP) proteinine bağlı inaktif formunu oluşturup istirahat fazına geçer ve bir sonraki uyarıyı bekler.

Ras geninde meydana gelen nokta ya da farklı tip mutasyonlar sonucunda oluşan ve kanser gelişiminde önemli role sahip mutant ras proteini ise, GTPaz aktivitesini inhibe ederek proteinin aktif GTP formunda tutulmasını sağlar [Groeger ve ark. 1997, Franks ve Teich 1998].

Memeli ras ailesinin 3 üyesi *H-ras*, *K-ras* ve *N-ras*'tır. Birbirlerine % 85 homoloji gösteren 21 kilodalton'luk (kd) birer protein kodlarlar [Barbacid 1987,

Bourne ve ark. 1991] ve bu genlerin protein ürünlerinin GTPaz aktivitelerini kaybetmelerinin nedeni bazı kodonlardaki mutasyonlardır [Downward 1992]. Farklı karsinoma tiplerinde ras proteininin aminoasit dizilimleri karşılaştırılmış ve bunun sonucunda ras mutasyonlarının özellikle 12. veya 61. pozisyonundaki tek bir aminoasitin değişimi sonucu ortaya çıktığı bulunmuştur [Klug ve Cummings 2000]. Bir ras protoonkogeninin 12. kodonunda glisin, 61. kodonunda glutamin aminoasiti bulunmaktadır. Mutasyon sonucu K-*ras* onkogeninin 12. kodonunda arjinine, H-*ras* onkogeninin de 61. kodonunda löisine ve N-*ras* onkogeninin ise 61. kodonunda arjinine dönüştüğü gözlenmiştir [Klug and Cummings 2000].

Ras onkogeni kanser gelişiminde hücre tipine ve hücre içi yardımcı proteinlere bağımlı olarak fonksiyon gösterir. Yapılan birçok çalışma, ras sinyal yollarının başlangıcında bulunan reseptör tirozin kinazların (RTK) inaktif monomerler halinde iken, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) gibi peptidlerin veya insülin gibi hormonların bağlanmasıyla dimerleştiklerini ve bu reseptörlerin otofosforilasyon sonucu kinaz aktivitesini kazandığını göstermiştir [Vojtek ve Der 1998, Karp 1996]. Bu reseptörlerin fosforilasyonu, Büyüme Faktör Reseptörüne bağlı protein 2 (GRB2) için bağlanma bölgeleri sağlamak ve Son of Sevenless proteininin (SOS) GRB2'ye bağlanarak bu proteinin aktifleşmesine neden olmaktadır. SOS bir guanin nükleotid değiştirme faktörüdür (GEF) ve GDP'nin salınımını indükleyerek GTP ile değişmesini sağlamaktadır. GTPaz aktive edici proteinler (GAPs) ras'ın içsel GTP hidrolitik aktivitesini hızlandırır. Böylelikle ras'ın GDP-bağlı inaktif formunun oluşumunu sağlarlar.

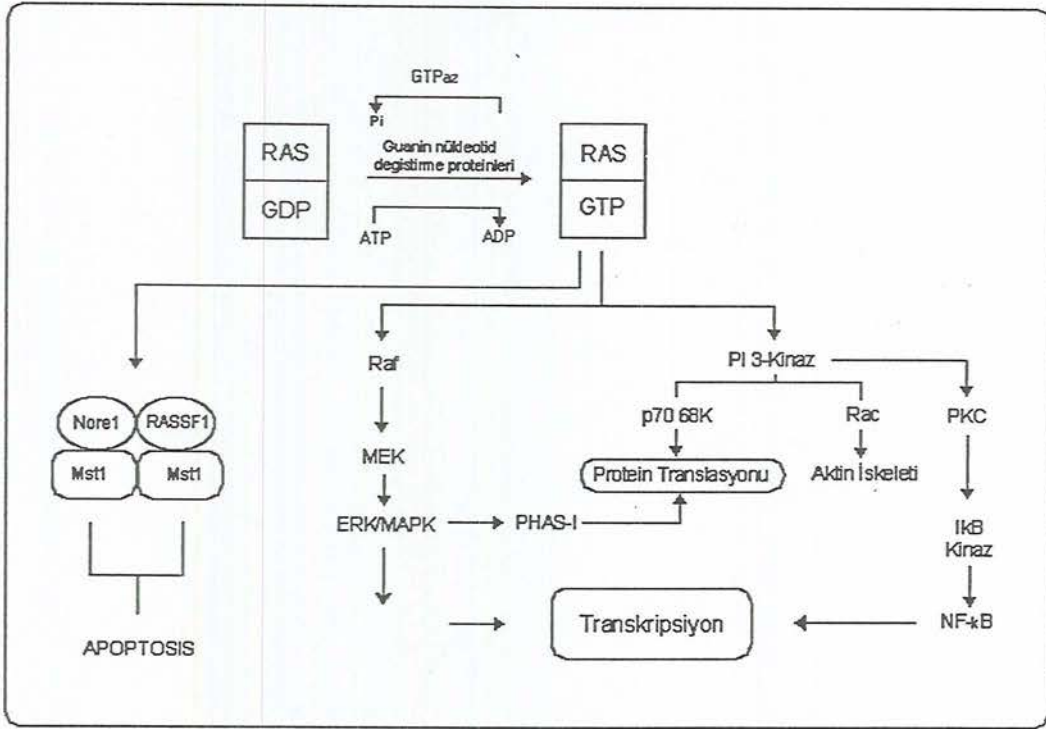
Aktif ras birçok efektör proteini uyarabilmekte ve böylece hücre içi sinyal yollarını etkileyebilmektedir [Feig ve Buchsbaum 2002]. Bu efektörler P120GAP, Ral GDS gibi GEFs ve fosfotidil inositol-3-kinaz [Marte ve ark. 1997a], protein kinaz C (PKC), mitojen aktiviteli protein kinaz kinaz (MEK), mitojen aktiviteli protein kinaz kinaz kinaz (MEKK) [Russel ve ark. 1995], c-Jun NH₂ terminal kinaz (JNK) [Adler ve ark. 1995] ve ekstraselüler sinyal düzenli kinazdır (ERK) [Xia ve ark. 1995, Vojtek ve Der 1998].

Ras proteini aracılıklı sinyal yolları hücre tipine göre bir yandan programlı hücre ölümü olan apoptozisi inhibe ederek hücre çoğalmasını artırırken, diğer taraftan da apoptozisi artırarak çoğalmayı inhibe edebilmektedirler [Downward

1998]. Hücrenin hangi yolu seçeceği, hücre tipine bağlı olarak ve ras proteininin hangi efektörü etkileyeceğine bağlı olarak değişmektedir. Büyüme faktörleri ve ekstraselüler matriks proteinleri, guanin nükleotid değiştirme faktörü ve adaptör proteinleri içeren yollarla endojen ras'ı uyarmaktadırlar. Bu yolla aktive olan ras ise PI3-kinaz aktivasyonu üzerinden PKB/Akt'ı (Proteinkinaz B/Protein Serin-Treonin kinaz) uyararak hücreyi apoptozise karşı korumaktadır [Marte ve ark. 1997b, Yao ve Cooper 1995]. PKB/Akt, Bad'ı fosforile eder ve kaspaz aktivasyonunu bloke eden apoptozis inhibitör proteini olan Bcl-2 ve Bcl-X ile etkileşmesini engelleyerek apoptozisi inhibe etmektedir [Zha ve ark. 1996]. PKB/Akt'ın diğer hedefleri yaşam sinyalindeki efektörlerdir. Ras aynı zamanda NF-KB aktivasyonu aracılığıyla da koruyucu sinyal sağlamaktadır. Bu sinyal NF-KB'in anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırmasıyla açıklanmaktadır [Mayo ve ark. 1997].

Ras'ın diğer bir efektörü ise Raf'tır ve ras hedeflerinin ilk belirlenenidir. Raf/MEK/ERK kinaz kaskadı ile ve birçok hücre hattının çoğalması ile onkojenik olarak transformasyonunu uyardıkları için onkojenik efektör olarak düşünülmektedir. Ancak Raf/ERK sinyali bazı hücrelerde apoptozisi baskımlarken fibroblast ve T lenfositleri gibi bazı hücrelerde de apoptozisi arttırmaktadır [Kauffmann ve ark. 1997].

Son zamanlarda ras GTPaz'ların yeni downstream hedefi olan Nore 1-Mst 1 protein kompleksinin tanımlanması ile ras'ın apoptozis yolu ile ilişkisinin aydınlatılması mümkün olmuştur [Feig ve Buchsbaum 2002]. Nore 1 proteini tümör baskılayıcı gen ürünü olmamasına rağmen RAS-SSF1 (Ras bağımlı aile ünitesi) ile etkileşerek tümör baskılayıcı aktiviteyi etkilemektedir [Vega ve ark. 2002]. Her iki protein de Mst 1'e bağlanarak apoptozis işlemini gerçekleştirmektedirler [Feig ve Buchsbaum 2002], (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Ras proteininin hücre içi sinyal yolu [Feig ve Buchsbaum 2002, Ras sinyal yolu]

1.2. Apoptozis

Apoptozis (programlı hücre ölümü) ve nekrozis memeli hücrelerini ölüme götüren iki önemli olaydır. Bunlardan apoptozis; gelişim, homeostaz ve patojenezde önemli rol oynayan hücre intihar mekanizmasıdır [Hu ve ark. 2001, Wyllie 1980]. Aşırı hücre bölünmesinden dolayı hücrelerdeki artış, fonksiyonel olmayan veya yaşlı olan hücrelerin eliminasyonu ile dengelenmektedir. Bu dengeyi sağlayan işlem apoptotik programdır ve bu programdaki hasarlar hücrelerde patolojik azalışa veya artışa neden olarak hastalıklara yol açmaktadır. Programdaki bozukluğun neden olduğu aşırı hücre artışı kanser ve otoimmün hastalıklara, hücre azalışı ise AIDS ve nörodejenaratif hastalıklara neden olmaktadır. Apoptozisin özellikle embriyonun gelişim ve farklılaşma işlemi de rolünün vazgeçilmez olduğu bilinmektedir [Krauss 2001]. Bunun yanı sıra bağışıklık sisteminde sitotoksik T lenfositleri tarafından virüs enfeksiyonlu hücrelerin ve otoreaktif B veya T lenfosit hücrelerinin eliminasyonun da apoptozis ile gerçekleştirildiği gösterilmiştir [Clermont ve ark. 2003].

Apoptozisin diğerk bir fonksiyonu hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin yıkımını sağlamasıdır. Bu tip hücreler mutasyon birikimine uğramadan ve bir tümör hücreğine dönüşmeden önce apoptotik program ile öldürölmektedirler [Krauss 2001]. Wyllie (1980) tarafından yapılan bir çalışmada bu mekanizmanın dört saat kadar kısa bir sürede tamamlandığı gösterilmektedir.

Hücre ölüm şekli olan apoptozis ve nekrozis mekanizmaları arasında belirgin farklar olduğu ilk kez Kerr ve arkadaşları (1972) tarafından anlaşılmıştır. Nekrotik hücrelerde şişme, sitoplazma organellerinin dağılması, hücre membranının bozulması ve patlaması karakteristik özelliklerdir. Dokunun nekroza verdiği cevap ise inflamasyon oluşumu tarzındadır [Dive ve ark. 1992].

Apoptotik hücrelerde görölen erken safha morfolojik değışimler ise şu şekilde sıralanabilir:

- Dokularda komşu hücreler ile kontakını kaybetmiş özel hücrelerin varlığı [Wyllie 1980],
- Kromatin materyalinin kondensasyonu ile ilişkili olarak çekirdeğın küçölmesi ve kırılması (karyoheksiz) [Saraste ve Pulkki 2000],
- Sitoplazmik hacmin kaybolmasından dolayı hücrenin küçölmesi,
- Sitoplazmik proteinlerin kondensasyonudur.

Bundan sonra gözlenen morfolojik değışimler, plazma ve hücre zarında 'blebbing' denen kabarcıkların oluşması, organellerin yer değıştirmesi, hücre zarına bitişik hücrelerarası ortama uzanan 'apoptotik bodies' adı verilen küçük cisimciklerin oluşmasıdır [Kaufmann ve ark 1997]. Bu değışimlerin tamamlanması ile apoptotik hücreler ve 'bodies' denen yapılar içeriklerini ekstraselöler ortama boşaltmadan önce fagositik hücreler (makrofajlar) ve komşu epitelyal hücreler tarafından tanınarak ortamdın uzaklaştırılırlar. Böylelikle inflamasyon oluşumu engellenmiş olur [Savill ve ark. 1993, Vaux ve Flavell 2000].

Apoptozisde görölen en önemli biyokimyasal özellik kromozomal DNA'nın hücrede morfolojik değışimlerle birlikte görölen internökleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti [Wyllie 1980] veya bunların katları boyutunda DNA kırıkları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır [Walker ve Sikorska 1994]. Ama bu durum hücre tipine bağılı olarak değışebilir ya da sadece

yaklaşık 50-300 kilo baz çifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir. DNA'yı parçalayan Ca^{+2}/Mg^{+2} bağımlı bir endonükleazdır [Wyllie 1980, Lucas 2001, Zhivotovski ve ark. 1994, Ulukaya 2003]. Bunun yanı sıra DNaz I ve II enzimleri de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir. White ve arkadaşlarının (2001) yaptığı bir çalışmada Tip II pnömositlerde 10 μ M etoposid ile 24 saat inkübasyon sonrası DNA merdiveninin oluştuğu gözlenmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada da 100 μ g/ml etoposide 18 saat maruz bırakılan bazı hücre türlerinde önemli DNA kırıklarının meydana geldiği gözlenmiştir [Shimoda ve ark. 2003].

Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden bir diğeri normalde hücre zarının iç yüzünde bulunan negatif yüklü fosfatidilserinin apoptozisin erken safhalarında hücre plazma zarının iç yüzeyinden dış yüzeyine doğru yer değiştirmesidir [Vermes ve ark. 1995]. Bu şekilde fosfatidilserin, apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını ve sindirilmesini sağlamaktadır [Miyato ve ark. 2001]. Hücrenin dış yüzeyine taşınan fosfatidilserin için yüksek afiniteye sahip olan Annexin V apoptozisin erken safhalarında teşhis için kullanılmaktadır [Vermes ve ark. 1995]. Uthaisang ve arkadaşlarının (2003) yaptığı bir çalışmada fosfatidilserin eksternalizasyonunun, mitokondriye bağımlı olaylar olduğu gözlenmiş ve fosfatidil serin redüstribüsyonunun ekstraselüler Ca^{+2} gerektirdiği tespit edilmiştir.

1.2.1. Apoptozis mekanizmasının modülatörleri

Apoptozis mekanizması çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli bir kalsiyum girişi gerçekleşir. Kalsiyumun, apoptotik mekanizmada endonükleaz aktivasyonunu, doku transglutaminaz aktivasyonunu, gen regülasyonunu, proteazların aktivasyonlarını ve hücre iskeleti organizasyonunu düzenlediği düşünülmektedir [Ulukaya 2003]. Buna rağmen hücreye Ca^{+2} girişi apoptozisin gerçekleşmesi için her zaman gerekli değildir.

Hücre içi proteinlerden olan Bcl-2 aile üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs) bilinirken bir kısmının ise bu mekanizmayı baskıladığı (Bcl-2, Bcl-Xl) bilinmektedir [Plas ve Thompson 2002]. p53 proteini de, radyasyon veya kemoterapi etkisiyle DNA hasarı oluştuğunda eğer hasar onarılabilecek düzeydeyse hücre döngüsünü G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 proteini Bax proteininin ekspresyonunu artırarak Bcl-2/Bax oranını değiştirmesine neden olarak apoptozisi indükler. Bir transkripsiyon faktörü olan mdm2, p53'e bağlanarak hem aktivitesini inhibe eder hem de yıkımını hızlandırır.

Sitokrom c ise mitokondri iç zarında bulunur ve sitoplazmaya salınması hücrede apoptozis mekanizmasını geri dönüşümsüz olarak indüklediğinin bir habercisidir [Green ve Reed 1998, Kroemer ve Zamzani 1997].

Zimojen (inaktif prokürsör) olarak sitoplazmada yer alan kaspaz ailesi, aktif merkezlerinde sistein aminoasidine sahip olduklarından sistein proteazlar olarak adlandırılan enzimlerdir [Thornberry ve Lazebnik 1998]. Birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir yolağın başlatılmasına neden olurlar. Bu yolağın başlatılmasında görev alan granzimler ve perforinler ise sitotoksik lenfositlerin (CTL) ve natural killer (NK) hücrelerinin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar. CTL'lerin hedef hücreye (patojenle enfekte edilmiş ve tümör hücreleri) bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin hücre zarına bağlanarak zarda delikler oluşturur. Bu delikler sitozolik kalsiyum düzeyini hızla artırır. Beraberinde salgılanan, serin proteaz olan granzimin de bu boşluklar aracılığıyla hücreye girmesiyle prokaspaz 8 aktive olarak kaspaz yolağı başlatılır [Ulukaya 2003].

1.2.2. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesi hücre kaderini belirlemede önemli rol oynar [Adams ve Cory 1998]. Fonksiyonlarına göre iki gruba ayrılırlar:

1. Proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri: Bax, Bak, Bid, Bcl-Xs gibi. Bu proteinler BH3 parçası taşımaktadırlar.

2. Antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri: Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w gibi.

Bu iki zıt grubun işleyişi yapılarında bulunan hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks bölgelerine bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cep'i oluştururlar. Amfipatik -heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer Bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanırlar. Proapoptotik grubun bir kısmı her üç bölgeyi de içerirken (Bax, Bak) diğer grup sadece BH3'ü içerir (Bid, Bad, Bim). Antiapoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunmaktadır. Bu iki grubun üyeleri dimerler oluşturarak hücrenin apoptozise gidip gitmemesini etkileyebilirler [Thornberry ve Lazebnik 1998, Lee ve ark. 2000]. Apoptozise dayanıklı hücrelerde Bcl-2:Bax heterodimerleri baskındır. Bax: Bax homodimerleri hücre ölümüne yatkınlığı gösterir. Bcl-2 veya Bcl-x1 onkoproteinleri farklı uyarıcılar (büyüme faktörlerinin uzaklaştırılması, tümör nekroz faktör (TNF), iyonize edici radyasyon, myc gibi onkogenler ve kemoterapötik ajanlar [Thompson 1995]) tarafından indüklenen apoptozisi bloke ederler ve antiapoptotik Bcl-2 onkoproteininin koruyucu etkileri Ca^{+2} kompartimentalizasyonunda değişiklikler gerektirmektedir [Baffy ve ark. 1993, Marin 1996]. Bcl-2'nin endoplazmik retikuluma; Ca^{+2} pompalanmasını artırarak hücreyi apoptozise karşı koruduğu bilinmektedir. Sawada ve arkadaşlarının (2000) yaptığı bir çalışmada etoposid, C2 ve C6 seramidlerine maruz bırakılan hücrelerin Bax/Bcl-2 oranındaki bir artışına ve kaspaz 9 ile kaspaz 3 aktivasyonuna neden olarak Bcl-2 down regülasyonu yaptıkları bulunmuştur.

1.2.3. Kaspazlar

Apoptozis mekanizması hücre içinde iki farklı yolağın stimülasyonu ile gerçekleşir, bunlar ölüm reseptörlerinin ve stres-aracılıklı apoptozis (sitokrom c ve apaf1 yolu) aktivasyonu sonucu uyarılan yolaklardır. Ölüm reseptörlerinin aktivasyonuna bağımlı apoptozis mekanizması daha çok bağışıklık sistemi tarafından kullanılır. Yapılan son çalışmalarda hücre ölüm reseptörü olarak tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) ve Fas (APO-1 veya CD-95) reseptörleri tanımlanmıştır [Ashkenazi ve Dixit 1998]. Bunlardan Fas reseptörü lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde hatta miyokarda hücre zarında yer almaktadır. Bu reseptörün spesifik agonisti TNF ailesinin bir üyesi olan FasL olarak bilinmektedir ve daha çok sitotoksik T lenfositlerinde ve natural

killer hücrelerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Spesifik agonistin hücre ölüm reseptörlerine bağlanması sonucunda [Marin ve ark. 2002] aktif hale geçen reseptör üzerinde yer alan ve ölüm bölgeleri (death domain) adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain) ve FADD (Fas associated death domain) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri daha sonra apoptotik sinyal yollarının alt bölgelerinde yer alan enzim ve efektör aktivasyonunu başlatırlar [Krauss 2001, Ulukaya 2003], (Şekil 1.2).

Apoptotik mekanizmanın ikinci yolağı ise UV radyasyon, DNA hasarı, düzenli olmayan onkogen ekspresyonu, aktinomisin D gibi sitotoksik ilaçlarla muamele edilmesi ve sitokinler ile büyüme faktörlerinin uzaklaştırılması ve oksidatif stres etkisiyle mitokondrinin transmembran potansiyelinin bozulması ile oluşur [Ashkenazi ve Dixit 1998, Fearnhead ve ark. 1998, Soengas ve ark. 1999]. Bunun sonucu sitokrom C, apoptozis-indükleyici faktör (AIF, apoptosis-inducing factor) ile birlikte sitoplazmaya salınır ve daha sonra sitokrom C sitoplazmik protein olan Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-12)'e bağlanır ve onun aktivasyonuna neden olur. Bu yapıya ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz 9'un aktif kaspaz 9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz 9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü ve 7'yi aktive eder [Clermont ve ark. 2003]. Aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü (ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) tarafından kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD)'ın serbest hale geçmesini sağlar bunun sonucu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonu ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonu meydana gelir [Nagata 2000], (Şekil 1.2).

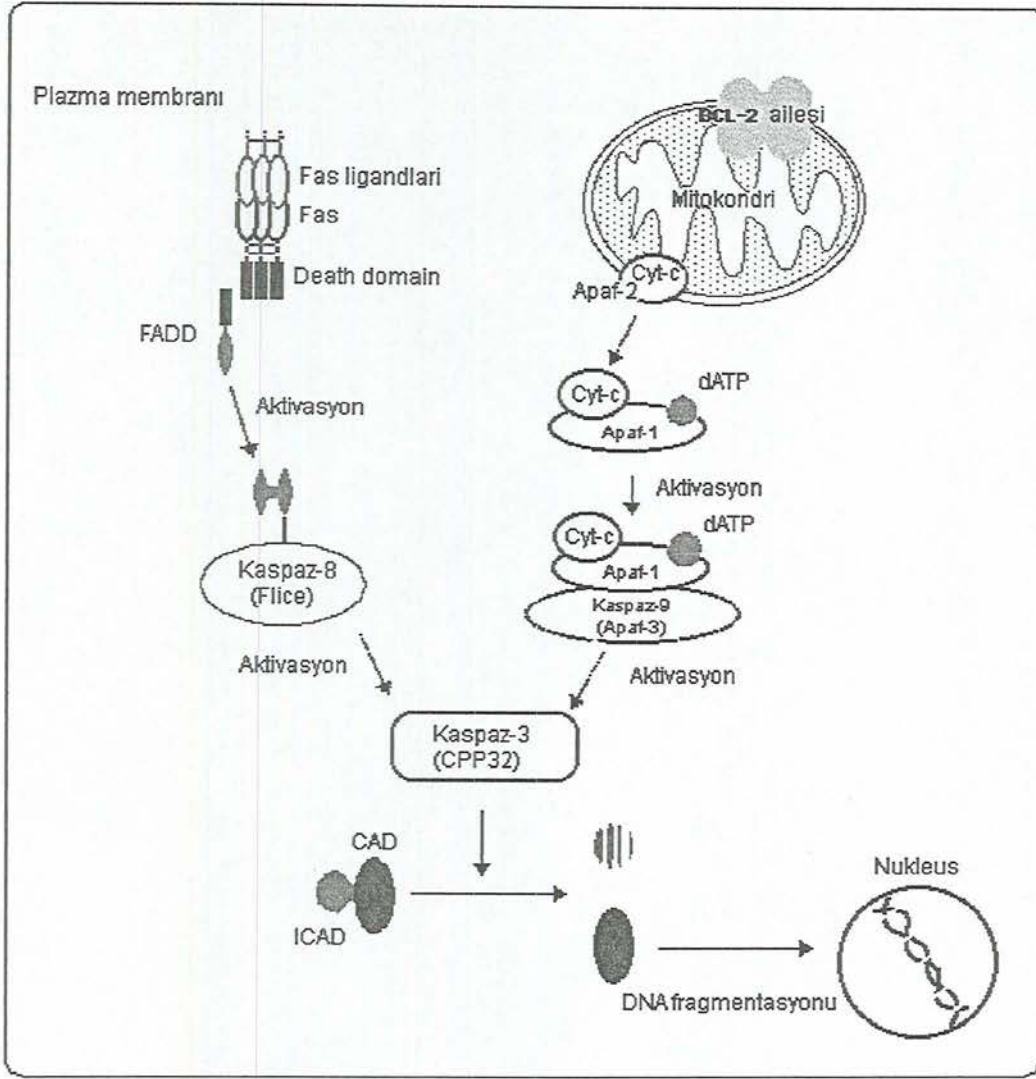
Bu mekanizmada yer alan kaspaz enzim ailesinden ilk olarak interlökin-1- β dönüştürücü enzim (ICE) tanımlanmış olup bu ICE proteazların kaspaz ailesi ile uyumlu çalıştığı tespit edilmiştir [Salvesen ve Dixit 1997, Thornberry ve Lazebnik 1998, Earnshaw ve ark. 1999].

Kaspazlar da diğer proteazlar gibi inaktif proenzimler olarak bulunur ve proteolitik işlemlerle aktive edilirler. Apoptozisdeki fonksiyonlarına bağlı olarak iki sınıfa ayrılırlar:

1. Başlatıcı Kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9 ve 10). Bunlar transmembran reseptörlerle veya sitotoksik etkilerle aktive edilirler ve proapoptotik sinyali alarak kaspaz yolağının aktivasyonuna neden olurlar [Saraste ve Pulkki 2000].
2. Efektör Kaspazlar (Kaspaz 3, 6 ve 7). Bu tür kaspazlar ise önceden aktive olmuş kaspazlar tarafından stimüle edilirler ve merkezi proteinleri degradasyona uğratarak apoptozisi gerçekleştirirler. Bunlardan kaspaz 3 ölüm programında anahtar rol oynamaktadır.

Hücre içi kaspaz enzim aktivasyonu iki farklı şekilde gerçekleşir. Bunlardan birincisi kaspaz yolağında meydana gelen proteolitik yarılmadır. Bir prokaspaz apoptotik sinyal yolunda önceden aktive olmuş bir kaspaz tarafından proteolitik olarak aktive edilir ve apoptotik yolun efektör bölümü genellikle bu mekanizmayı kullanır. İkinci yol bir başlatıcı kaspaz tarafından indüklenir ve bu aşamada kofaktörler önemli role sahiptirler. Yapıları bir araya getirerek özel agregatların oluşumunu sağlarlar [Krauss 2001].

Kaspazlar tarafından ayrılan proteinlerin hücre yaşamında düzenleyici ve yapısal fonksiyonları bulunmaktadır. Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), kaspaz 3'ün en iyi tanımlanan substratlarından biridir. Apoptotik uyarıya cevap olarak kalsiyum iyonlarının miktarı artırılır ve transkripsiyon faktörleri veya diğer düzenleyici moleküller aktive edilir veya baskılanır [Bellamy 1997].



Şekil 1.2. Apoptozisin hücrel sinyal yolları [Apoptozis sinyal yolu]

1.2.4. Apoptozis mekanizmasının hücre içi sinyal yolları ile etkileşimi

1.2.4.1. PKC ve apoptozis

Kalsiyum bağımlı protein kinaz C (PKC), hücrenin fizyolojik gereksinimine göre farklı hücre tiplerine özel ekspresyonu ile biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesini sağlayan önemli bir enzimdir ve sinyal iletiminde fonksiyonel bir işleve sahiptir. Sinyallerin plazma zarından çekirdeğe iletilmesi esnasında fosforilasyon yolu ile bir seri protein kinazda modifikasyonlar meydana gelir. Bu modifikasyon yollarının mitojenik ve apoptotik mekanizmalara yol açtığı gösterilmiştir [Krauss 2001]. PKC de protein fosforilasyon yolu aracılığıyla hücrel cevaplarda önemli bir rol oynamaktadır. Bunu destekleyen bir çalışmada

hücre içi kaspaz substratı olan PKC- γ 'nın ayrılmasının, apoptozisin belirteci olan kromatin kondensasyonuna ve nükleer fregmantasyona neden olduğu gözlenmiştir [Hashimoto ve ark. 2001].

Spesifik PKC aktivasyonu, bazı şartlarda bazı hücreleri apoptotik işleme karşı korurken bazı hücreleri de proliferasyona karşı korumaktadır. [Lavin ve ark. 1996]. Bu işlemler gerçekleştirilirken farklı hücrelerde farklı PKC izoformlarının aktive olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada timositlerde glukokortikoidlerin indüklediği apoptozisin, PKC- ϵ 'nin seçici aktivasyonunu ve translokasyonunu gerektirdiği gözlenmiştir [Iwata ve ark. 1994]. Diğer bazı çalışmalar ise PKC aktivasyonunun apoptozisi bloke ettiğini savunmaktadır. Forbol esterinin (tümör promotörü) ve diğer PKC aktivatörlerinin çeşitli hücrelerde (timositler, normal ve lösemili B hücrelerinde, insan meme adenokarsinoma hücre tipinde (BT-20), insan sinovial hücrelerinde ve böbrek epitelial hücrelerinde) endonükleaz aktivasyonunu inhibe ederek apoptozisi engelledikleri gözlenmiştir [McConkey ve Orrenius 1996]. Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da Ca^{2+} mobilizasyonu olmaksızın PKC aktivasyonunun Fas ekspresyonunu indüklemekte yeterli olduğu ve bu şekilde apoptozisin başlatıldığı gözlenmiştir [Wang ve ark. 1998].

1.2.4.2. PI3-Kinaz ve Apoptozis

PI3-kinazın aktivasyonu sonucu büyüme artırıcı sinyallerin stimülasyonunun yanı sıra antiapoptotik sinyallere de aracılık ettiği gösterilmiştir [Krauss 2001]. Antiapoptotik sinyal iletimi PI3-kinazdan Akt kinaz'a doğru olur. Bu iletim sırasında Akt aktivasyonunun PI3-kinaz tarafından şekillendirilen PtdInsP₃ tarafından olduğu bilinmektedir. Aktive olmuş Akt kinaz spesifik substratı ve Bcl-2 ailesinin proapoptotik bir üyesi olan Bad proteinini serin kalıtından fosforile olmasını sağlar ve bu yüzden Bad proteininin proapoptotik etkisi inhibe edilmiş olur [Datta ve ark. 1997].

1.2.4.3. P53 ve apoptozis

P53 proteini hücre siklusundaki bir hata sonucu oluşmakta ve DNA hasarı tarafından başlatılan apoptotik sinyal yollarının merkezinde bulunmaktadır.

DNA'daki aşırı harabiyet sonrası p53'ün etkinliği artmakta ve bir G1 denetim noktası olarak görev yapmaktadır. Böyle bir durumda hücre bölünmesi inhibe olur ve onarım için zaman sağlanır. Eğer hücre bölünmesi denetimsiz olarak ilerlerse DNA zedelenmesi replikasyona uğrar ve kalıcı mutasyonlar oluşur [Lewis ve ark. 2002, Murray ve ark. 1998]. Hücre tipine bağlı olarak p53'ün indüklediği apoptozis transkripsiyon aktivasyonunu gerektirir veya bunu RNA ve protein sentezi olmadan da gerçekleştirir [Polyak ve ark. 1997].

p53'ün transkripsiyonel hedefi proapoptotik bax proteinidir. Bax proteininin konsantrasyonundaki bir artış mitokondrial zarı porlarının oluşumuna neden olur ve bu protein sitokrom C'nin kofaktörüdür. Sitokrom C daha sonra Apaf-1 ile birleşir ve kaspaz 9 ve daha sonraki kaspaz aktivasyonu ile apoptozisi başlatır. P53'ün transkripsiyondan bağımsız olarak başlattığı apoptozisde sitozolden hücre zarına p53'ün Fas ölüm reseptörünün dağılımı da gösterilmiştir [Bennet ve ark. 1998].

1.3. Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisinde, çoğu kanserin lokal olarak herhangi bir toksik sistemik terapi gerektirmeden tedavi edilebileceğini bilmek önemlidir. Ancak lokal tedavide, cerrahi sırasında veya daha sonrası belirlenemeyen mikrometastazdan dolayı cerrahinin ve radyoterapinin etkinliğini arttırmak amacıyla sistemik terapinin kullanımında artış gözlenmektedir [Franks ve Teich 1998].

Lokal olarak tedavi edilecek kanserlerin birinci grubu meme ve serviks kanseri gibi *in situ* kanserlerdir. Diğer grup ise, metastaz oluşturmamış fakat lokal olarak yayılma özelliğine sahip kanserlerdir. En yaygın olarak görüleni derinin bazal hücre karsinomasıdır (rodent ülser). Bu kanser türü ya radyoterapi ile ya da cerrahi olarak tedavi edilebilmektedir. Bunun yanı sıra fibromatozlar da bu şekilde tedavi edilmektedirler.

Radyoterapi ile tedavide ise yüzeysel veya derin tümörlere karşı farklı enerjili radyoterapi kullanılır. Yüzeysel tümörler kobalt kaynağından düşük enerjili x ve gama ışınları kullanılırken derin tümörler için foton ve elektronlar kullanılarak megavoltaj tedavisi uygulanmaktadır.

Diğer bir yöntem olarak lazer tedavisinde ise çevre dokulara zarar vermeden kanserli dokunun suyu alınarak tümör kesilebilmektedir. Özafagus ve kolon kanserlerinde uygulanabilecek bir yöntemdir.

1.3.1. Kemoterapi

Yüksek doz antineoplastik terapi birçok yan etkilere neden olmaktadır. Kemoterapi normal dokulara toksisitesinden dolayı, tedavinin doz ve zamanını sınırlayabilir. Bundan dolayı, kemoterapinin normal hücrelerde toksisiteyi korurken, kanserli hücrelerde kemoterapik ajanların (bitkisel veya yapay üretilen) toksisitesini arttırması üzerinde önemle durulması gerekmektedir [Lee ve ark. 2004]. Bugüne kadar çoğu tümörün kısıtlanmamış hücre bölünmesine neden olduğundan bu ilaçların birçoğu DNA sentezini inhibe etmelerinden dolayı kullanılmaktadır.

Kanser tedavisinde büyüme payı olarak adlandırılan sürekli döngüde yer alan hücrelerin yüzdesi önemlidir. Yüksek büyüme payına sahip tümörler kemoterapiye, döngünün G_0 evresinde bulunan hücelere oranla daha fazla yanıt verirler. Anti-kanser ilaçlar; hücre döngüsüne spesifik olanlar (CCS) ve olmayanlar (CCNS) olarak iki sınıf da toplanabilir. CCS grubuna metotreksat, fluorourosil ve sitarabin diğer gruba alkilleyici ajanlar ve cisplatin girmektedir. Evreye özgül olanlardan bleomisin G_2/M evresine dahildir [Sikic 1986]. Kemoterapide uzun süre düşük dozda tedavi yerine zaman zaman yüksek doz ilaç verilmesinin daha etkili olduğu gözlenmiştir. Özellikle bazı kanserlerde kombine ilaç tedavisinin daha etkili olduğu bilinmektedir.

Kemoterapide önemli bir sorun da kullanılan ajana karşı direnç gelişmesidir. Bir ilaca karşı direnç kazanan bir hücre diğer ilaçlara da direnç gösterebilmektedir ki buna multipli direnç sistemi denmektedir. İlaça karşı dirençlilik mekanizması, aynı zamanda tümör dokusu içinde azalmış ilaç dağılımı, özel hücrel havuzlar içine ilacın alınması, artmış metabolik inaktivasyon ve azalmış hücrel alım gibi farmokinetik faktörlere de neden olmaktadır. Azaltılmış ilaç alımı tümör hücresinin kazandığı ajana karşı ilk defans sistemidir ve bu taşıyıcı moleküller tarafından düzenlenir. En iyi belirlenen transporter ATP-bağlı kaset (ABC) ailesi üyesi P-glikoprotein (P-gp) dir [Gottesmann ve ark.

2002, Leonard ve ark 2002]. P-gb ekspresyonunun varlığı birçok kanser tipinde gösterilmiştir. [Ro ve ark. 1990, Chan ve ark. 1997]. Farklı kanser tiplerinin çoğunda P-gp ekspresyonu görülmüştür ve bir çok durumda P-gb nin varlığı düşük iyileşme oranı ve daha kısa yaşama zamanı ile ilişkilendirilmiştir.

Farmakokinetik ve farmakodinamik faktörler de sinerjistik olarak kemoterapiye önemli bir engel teşkil ederler. Farmodinamik tümörlerde heterolog hücre popülasyonlarını (çoğalma ve sessiz durumda) dahil ilaç etkinliğini, DNA tamir sistemlerini ve apoptotik uyarıya karşı değişmiş cevapları etkilemektedir.

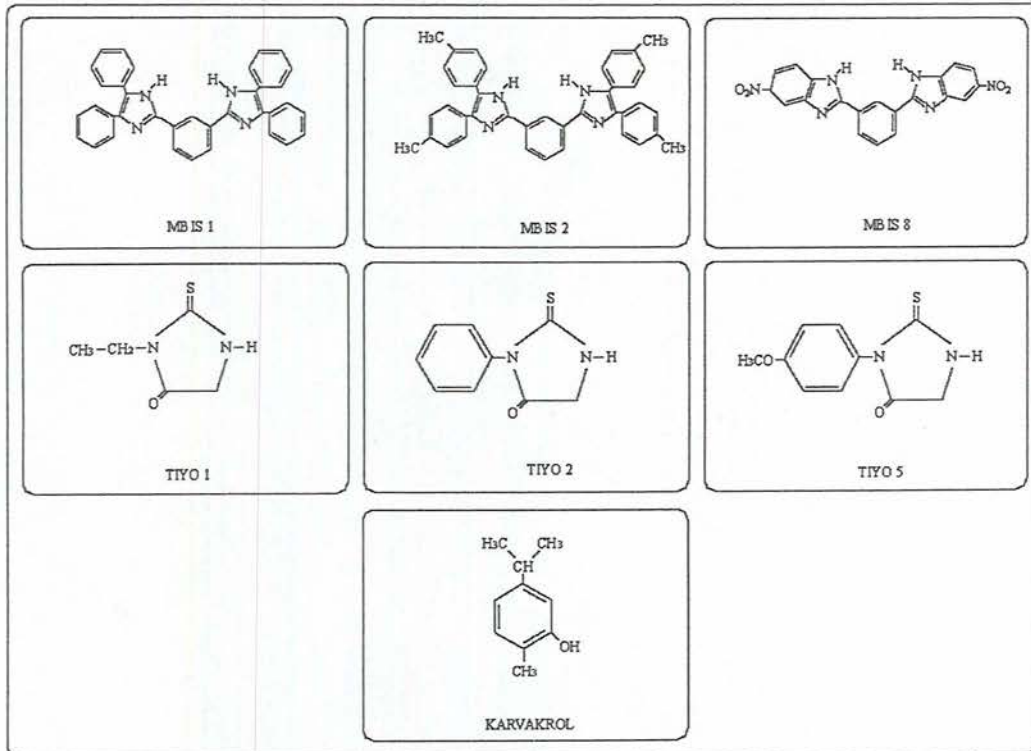
Kemoterapinin kanser tedavisinde önemli bir yaklaşım olduğunu düşünerek çalışmamızda anti-tümör etkiye sahip olduğunu düşündüğümüz yada deneysel çalışmalarla kanıtlanmış bazı sentetik (MBİS1, MBİS2 ve MBİS8 gibi 1,3-bis-(heteroaryl süstitüe) benzen türevleri ve Tiyo1, Tiyo2 ve Tiyo5 gibi 3-süstitüe-2-tiyohidantoin türevleri) bileşenlerin ve doğal bileşen olan Karvakrol'un N-ras ve H-ras aktif ve normal hücrelerde, sitotoksik etkileri ve hücre içi protein aktivasyonunun yanı sıra apoptozis mekanizması üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Bu bileşenlerden karvakrol, timol'un izomeri olan fenolik bir monoterpendir. Türkiye'de kekik olarak bilinen ve kullanım alanına sahip bu bitkinin sabit yağının büyük miktarını oluşturmaktadır [Kırimer ve ark. 1995]. Yapılan çalışmalarda , karvakrol'un antibakteriyal [Hortváth ve ark 2002, Ultee ve ark. 2001], antifungal [Karaman ve ark. 2001], insektisidal [Karpouhtsis ve ark. 1998], antioksidan [Pearson ve ark. 1997, Burits ve Bucar 2000] gibi etkilerinin yanında 60µg'ın üzerindeki dozlarda DNA sentezini inhibe edici etkisi de gözlenmiştir [Zeytinoğlu ve ark. 2003]. Aynı zamanda insan larinx karsinomasından köken alan Hep-2 hücrelerinin canlılığı ve çoğalmasını doza bağımlı olarak inhibe ettiği ve apoptotik fenotipi indüklediği bilinmektedir [Stammati ve ark. 1999].

Tez kapsamında kullandığımız sentetik bileşik olan hidantoinlerin ise antikonvulzan [Hudkins ve ark. 1997], antimikobakterial, [Szymanska ve Kiec-Kononowicz. 2002], aldoz redüktaz inhibisyonu yapıcı [Sugiyama ve ark. 2000], antiaritmik [Vidrio ve ark. 1980] ve trombosit agregasyonu yapıcı [Sarges ve ark. 1988] etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bazı 3-süstitüe-2-tiyohidantoin

türevlerinin hücre içi Ca^{+2} artışına ve Ca^{+2} sinyaline neden olduğu ve doza bağımlı olarak F2408 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler gösterdikleri gözlenmiştir [İncesu ve ark. 2004].

1,2(3)(4)(5)-bis (sübtitüe) benzen çekirdeği bulunan bileşikler çeşitli farmakolojik etkiler göstermektedir. Bu etkiler antitümör [Hoye ve ark. 1996, Nozoe ve ark. 1995], sitotoksik [Sato ve ark. 1995], antiviral [Grijavallabhan ve ark. 1992], fungusit [Enomoto ve ark. 1992, Place ve Pepin 1987], kas gevşetici [Kimura ve ark. 1990], akarisit [Takahashi ve ark. 1989, Bettarini ve ark. 1980], insektisit [Dorn ve ark. 1979], lipoksijenaz inhibitörü [Iwaki ve ark. 1985], gençlik hormon aktivitesi [Bettarini ve ark. 1980, Massardo ve ark. 1983] etkileri gözlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan 1,3-Bis (heteroaril sübtitüe) benzen türevleri ise hücre içi Ca^{+2} seviyesini plazma zarındaki Ca^{+2} kanallarını etkileyerek artırmışlardır [Meriç ve ark. 2002]. Yapılan bir çalışmada hücre içi artan kalsiyum düzeyinin apoptozise yol açtığı ve bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinin Ca^{+2} 'i tekrar depolarına gönderip hücre içi kalsiyumu etkilediği bunun sonucu apoptozisi engellediği gözlenmiştir [Zang ve ark. 2001].



Şekil 1.3. Maddelerin kimyasal formülleri

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Materyaller

2.1.1. Kimyasal maddeler

% 70 etanol solüsyonu, agaroz, akridin oranj, %30 akrilamid karışımı, amonyum per sülfat, aprotinin, borik asit, bovin serum albumin, bradford boyası, bromfenol mavisi, coomasie brilliant mavisi solüsyonu, dekzametazon, etidyum bromür, etilendiamin tetra asetik asit, fenol, gliserol, izoamil alkol, kloroform, kodak developer ve replenisher, kodak fixer ve replenisher, 2-merkaptotanol, MTT (3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), NP-40, ponceau S boya solüsyonu, penisilin-streptomisin solüsyonu, PMSF (fenil metil sülfonil klorür), protein marker, proteinaz K, puck's saline A (PSA), RNaz A, sarkosil, sodyum azid, sodyum dodosil sülfat, tris (hydroxy methyl) aminomethane, tris-HCl, trizma baz, X-ray filmi (Sigma, Almanya), dimetilsülfoksit (Sigma Almanya, Merck, Almanya), disodyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, potasyum klorür, sodyum bikarbonat, sodyum klorür, metanol (Merck, Almanya), at serumu, dulbecco's modified eagle medium, fetal calf serum (Gibco, UK), ApoTarget Annexin-V FITC apoptosis kit (Biosource, Belçika), ECL (Enhanced chemiluminicance) solüsyonları (Amersham, Avusturya), fosfolipaz C inhibitörü (U 73122), PKC inhibitörü (GF 109203x) (Tocris, UK), glasiyel asetik asit (Riedel-de Haen, Almanya), glisin (Appllichem, Almanya), tripan mavisi solüsyonu (Biochrom AG, Almanya), tripsin /EDTA (Biological Industries,, İsrail), tırnak cilası, Anti-fare monoklonal antikor, Horseradish-peroksidaz işaretli antitavşan IgG (Chemicon, USA).

2.1.2. Sarf malzemeler

Otoklavlanabilir cam şişe (Iso-Lab, Hollanda), 1,2,5 ve 25 ml'lik cam pipetler (HBG, UK), 10,100, 1000 ve 5000 µl'lik pipet takımı ve uçları (Gilson, Fransa), 1000 µl'lik mikrosantrifüj tüpü (Eppendorf, Almanya), 22x22 lamel, lam, thoma lamı (Marienfeld, Almanya), 25 ve 75 cm²'lik kültür şişeleri, 96 kuyucuklu plakalar, 15 ve 50 ml'lik sanrifüj tüpü (TPP, İsviçre), steril petri (Corning), 3MM

whatman kağıdı (Sigma, Almanya), nitroselüloz membran (Amersham, Avusturya), 5 ml'lik polistiren yuvarlak tabanlı tüp (Falcon-Becton Dickinson, Almanya).

2.1.3. Cihazlar

Dikey protein elektroforez cihazı (Hoefler), transfer ünitesi (Biometra), güç kaynağı (Amersham), eliza cihazı (ELx808-IU) (Bio-Tek), flow sitometri analiz cihazı (Calibur B.D, (Becton Dickinson Cell Source), jel görüntüleme sistemi (Bio Lab), hassas terazi (Ohaus), immüno-floresan mikroskop ve fotoğraf ataçmanı (Olympus), inverted mikroskop (Olympus), karbondioksit inkübatörü (Heraeus), kuru hava sterilizatörü (Heraeus), manyetik karıştırıcı (Heidolph), yatay DNA jel elektroforez ünitesi (FİRMA), mikrosantrifüj (Eppendorf), orbital karıştırıcı (Biometra), otoklav (Hirayama), pH metre (Orion), soğutmalı santrifüj (Heraeus), spektrofotometre (UV-1208, Shimadzu), steril kabin (Holten).

2.2.Yöntemler

2.2.1. Hücre kültürü ve bileşiklerin hazırlanması

C2 ve CO25 hücreleri Dr. I. Gibson 'dan East Anglia Üniversitesi (İngiltere) Biyolojik Bilimler Okulu, Moleküler Biyoloji bölümünden sağlanmıştır. C2 hücreleri [Yaffe ve Saxel 1977] fare bacak kasından izole edilmiştir. CO25 hücreleri ise, ata hücre olan C2 hücrelerine [Gosset ve ark 1988, Gerhart ve ark. 2001] 61. kodonundan mutant *N-ras* onkogeni taşıyan bir plazmidin aktarılması ile elde edilmiştir.

F2408 hücre hattı sıçan embriyo fibroblast hücreleridir. Bu hücrelere daha sonra T24 mesane karsinoması hücre hattından klonlanmış olan *c-Ha-ras* onkogenini aktif halde içeren pEI plazmidini ile transfeksiyon yapılarak 5RP7 hücre hattı elde edilmiştir [Garbisa ve ark. 1987].

Fare iskelet kas hücre hatlarının C2 (normal hücreler) ve CO25 (*N-ras* onkogeni transform hücreler) % 10 fetal calf serum (FCS), 100 ünite/ml penisilin-streptomisin ve % 1 glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisinde kültürü yapılmış ve 37 °C' de % 5 CO₂ ve %95 hava içeren

atmosfer ortamında inkübe edilmişlerdir. Hücreler hızlı büyüme fazına ulaştıktan sonra 2x tripsin/EDTA solüsyonu ile 1:3 oranında alt kültürlerle ayrılmışlardır.

CO25 hücreleri petri yüzeyini % 80 oranında kapladıktan sonra transformasyona uğramaları için 4-7 gün 1µM deksametazon içeren %10 at serum besi ortamında tutulmuşlardır ve bu sürenin sonunda transformasyonun başlaması mikroskobik olarak takip edilerek transformasyona uğrayan hücreler diğer deney aşamalarında kullanılmak üzere ayrılmışlardır [Zeytinoğlu ve ark. 2003].

Sıçan embriyo fibroblast F2408 (normal hücreler) ve 5RP7 (H-ras onkogeni transform hücreler) [Garbisa ve ark. 1987] hücreleri % 10 FCS, 100 ünite/ml penisilin-streptomisin, % 1 glutamin içeren DMEM içersinde 37 °C'de kültürde tutulmuşlardır. Her 3 günde bir hücreler, tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilerek 1:3 ile 1:6 oranları arasında alt kültürlerle ayrılmışlardır.

Hücreler bileşenler ile muamele edilmeden önce, hücre sayısı tomlam ile belirlenerek deney koşullarına uygun ortamlara ekildikten sonra 24 saat % 5 CO₂ içeren atmosfer ortamında inkübe edilmişlerdir.

Benzen, tiyohidantoin türevleri ile karvakrol' ün ilk aşamadaki stok solüsyonları dimetil sülfoksit (DMSO) içersinde hazırlanmıştır. Daha sonraki dilüsyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır.

2.2.2. MTT ölçümü

2×10^4 hücre/ml % 10 FCS içersinde süspansiyon haline getirildikten sonra 200 µl hücre süspansiyonu 96 kuyulu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğuna aktarılmış ve aynı zamanda hücrelere 0,0002-0,001-0,002-0,01-0,02-0,1 mg/ml konsantrasyonlarında sitotoksik etkileri incelenmek üzere bileşenler eklenerek 37 °C' de inkübe edilmişlerdir. 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası (5 mg/ml) eklendikten sonra canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzu haline dönüştürülmesi için hücreler 37 °C' de 2 saat daha inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyuya 200 µl DMSO eklenerek 10 dakika oda ısısında inkübe edilmişler ve renk değişimi, ELx808-IU Bio-Tek plaka okuyucu da 540 nm dalga boyu ile belirlenmiştir. Her bir

konsantrasyon deney içerisinde üç farklı kuyuda tekrarlanmıştır. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir [Zeytinoğlu ve ark. 2003].

2.2.3. Tripan mavisi ile boyama

Bileşenlerin sitotoksik etki sonuçlarına göre belirlenen konsantrasyonlar ile 5 dakika, 10 dakika, 2 saat, 8 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat muamele edilen hücreler süspansiyon haline getirildikten sonra 50µl alınarak eşit miktardaki tripan mavisi boya solüsyonuna (% 0.5 w/v) eklenmiştir. Hücre-boya karışımı 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra ışık mikroskobunda 40X büyüteç altında renksiz canlı hücreler ve mavi renkli ölü hücreler sayılmıştır. Her bir deney bağımsız olarak 2 kez tekrar edilmiştir [Hayashi ve ark. 1990].

2.2.4. Akridin oranj boyama

Tripsinlenen hücreler hemositometrede sayılarak 1×10^6 hücre/ml gelecek şekilde hücre solüsyonu hazırlanmıştır. 1 ml hücre solüsyonu, steril lamellerin yerleştirildiği cam petri kaplarına aktarılmıştır. Bu aşamada önceden belirlenen konsantrasyonlardaki test maddeleri hücrelere eklenerek belli zaman aralıklarında 37 °C de inkübatör ortamında tutulmuşlardır. Bu sürenin bitiminde hücreler 3 defa 2 dakika süre ile $1 \times$ PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Son yıkama işleminden sonra cam petrilere 1 ml % 70 etanol eklenerek 5 dakika oda ısısında inkübe edilmişlerdir ve daha sonra 5 defa distile su ile yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. 2 dakika $1 \times$ PBS'de bekletilen hücreler 1:10 oranında $1 \times$ PBS içerisinde seyreltilen 200 µl Akridin oranje (100 µg/ml) ve Etidium bromür (100 µg/ml) karışımı ile oda ısısında 5 dakika inkübe edilmişlerdir. Hücreler $1 \times$ PBS ile yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra lam ile preparat hazırlanmıştır. Bu aşamadan sonra preparatlar ya hemen floresan mikroskop ile incelemeye alınmış yada +4 °C de 1 hafta saklanmıştır [Cotter ve Martin 1996].

2.2.5. Akım sitometri analizi

Tripsinlenerek toplanan hücreler 800 rpm de 4 dakika santrifüj edildikten sonra 2 kez $1 \times$ PBS ile yıkanmışlardır. Hücreler $2-3 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde

1 × Annexin-V bağlanma çözeltisinde süspanse edildikten sonra hücre solüsyonundan 100 µl alınarak tüplere aktarılmıştır. Daha sonra her bir tüpe, 5 µl Annexin-V FITC ve 10 µl propidium iyodür çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 400 µl 1 × Annexin-V bağlanma çözeltisi ilave edilmiş ve hücreler 1 saatlik boyama süresi içerisinde akım sitometresi ile analiz edilmiştir.

2.2.6. DNA ekstraksiyonu ve elektroforetik analiz

1 × 10⁶ hücre/ml olacak şekilde cam petrilere ekim yapılan hücreler 24 saat uygun besi ortamlarında bekletilmişlerdir. Önceden belirlenen doz aralığındaki bileşikler ile belirli zaman aralıklarında inkübe edildikten sonra tripsin ile toplanarak 1.5 ml' lik ependorf tüplere aktarılmışlardır. Daha sonra 800 rpm de 4 dakika santrifüj edilen hücreler 1 × PBS çözeltisinde yıkanmış ve % 0.5 sarkosil, 20 mg/ml proteinaz K (Reader ve ark., '1999), 50 mM Tris (hidroksimetil) aminometan (pH: 8.0) ve 10 mM EDTA 55 °C de 3 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda RNaz A (10 mg/ml) [Reader ve ark. 1999] eklenmiş ve 55 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. İzole edilen DNA, fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) ile ekstrakte edilerek etidyum bromür içeren (500 µg/ml) %1.2' lik agaroz jelde 50 V uygulanarak 120 dakika yürütülmüştür [Wang ve ark. 1999].

2.2.7. Western blotlama

2.2.7.1. Sitoplazmik protein ekstraksiyonu

Soğuk PBS ile yıkanan hücreler 500 µl lizis solüsyonu ile buz üzerinde 20 dakika inkübe edilmiştir. Sıyırıcı yardımı ile toplanan hücreler 1.5 ml' lik tüplere aktarıldıktan sonra 15 000 rpm'de +4 °C' de 10 dakika santrifüje tabi tutulmuşlardır. Daha sonra süpernatant alınarak ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır. Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir [Bradford 1976].

2.2.7.2. Jel elektroforezi (SDS-PAGE)

100 µg sitoplazmik protein örnekleri, 10µl 2X jel yükleme tamponu (pH 6.8) ile karıştırılmış ve bu karışım 100 °C'de 3-5 dakika kaynatılarak

denatürasyona uğratılmıştır. Daha sonra 6000 g de 6 saniye kadar santrifüj edilerek toplanmıştır. Toplanan protein örnekleri 10 ml % 12'lik ayırıcı jel elektoroforez jel ünitesine yüklenmiştir. İlk önce 80V daha sonra 120 V elektrik akımı uygulanarak, Tris-Glisin elektroferez tamponu içinde yürütülmüşlerdir. Moleküler ağırlık standardı aynı jelde, protein örneklerinin hazırlandığı şekilde hazırlanarak ayrı bir sütunda yürütülmüştür.

Proteinler elektroforetik olarak nitroselüloz (0,45 μ M) transfer filtresine aktarılmışlardır. Jel ile aynı boyutlarda 6 tane 3MM Whatman kağıdı kesilerek transfer tamponu içinde 2 dakika tutulmuştur. Filtre jel boyutunda kesildikten sonra distile su ile yıkanarak 10-15 dakika distile suda inkübe edilmiştir. Transfer aparatının alt ünitesine, üç tane Whatman kağıdı yerleştirilip bunun üzerine sırasıyla nitroselüloz filtre, distile su ile yıkanmış jel ve en üst kısma da geri kalan üç adet Whatman kağıdı yerleştirildikten sonra 1-2 saat süre ile 0,65 mA/cm² olacak şekilde elektrik akımı verilmiştir. Antikor ile işaretleme aşamasına başlamadan önce nitroselüloz filtre Panceu S boyası ile 2-5 dakika boyanırken eş zamanda jel de Coomasie brilliant mavi boyası ile 2 saat boyanarak protein içerikleri görüntülenmiştir [Dunber 1994].

2.2.7.3. Antikor ile işaretleme

Filtre, yıkama tamponunda 5-10 dakika ıslatıldıktan sonra bloklama tamponunda oda sıcaklığında 1 saat hafifçe çalkalanarak bloklanmıştır. Daha sonra filtre % 0.1 Tween-20 (1XPBS) yıkama solüsyonu ile iki kez hızlıca, bir kez 15 dakika ve 2 kez de 5 er dakika süre ile hafifçe çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkanmış filtre daha sonra %1 BSA+PBS solüsyonunda 1:250 oranında seyreltilen (RbtXMS Bax) monoklonal antikor (Chemicon) ile 2 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin bitiminde filtre, yeniden yıkama işlemlerine tabi tutulmuştur. Filtre 1 saat %1 BSA+1XPBS' de 1:5000 oranında seyreltilmiş horseradish-peroksidaz işaretli anti-tavşan IgG ile inkübe edildikten sonra yıkama işlemleri yine bir önceki gibi tekrarlanmıştır. Daha sonra filtre 1:1 oranında hazırlanan ECL A ve B karışımlarında 1 dakika bekletildikten sonra fazla ECL solüsyonu ortamdaki uzaklaştırılmıştır. X-ray filmi ve filtre kaset içine konulduktan sonra belli sürelerde inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

2.2.8. İstatistiksel değerlendirmeler

Deney sonuçları, SPSS (Statistics Program for Social and Science) istatistik programında günler ve gruplar parametrelerine karşı tek yönlü ANOVA ve Post-Hoc testlerinden Tukey kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

Araştırma kapsamında, bazı sentetik bileşiklerin (benzen türevleri (MBİS1, MBİS2 ve MBİS8) ve tiyohidantoin türevleri (Tiy01, Tiy02 ve Tiy05) ve doğal bir bileşik olan Karvakrol'un sitotoksik ve apoptotik etkileri, iki farklı onkogen ile transform edilmiş kanserli (CO25, N-ras aktif fare iskelet kas hücreleri ve 5RP7, H-Ras aktif sıçan embriyo fibroblast hücreleri) ve transform edilmemiş normal hücre tipleri (C2, fare iskelet kası hücreleri ve F2408, sıçan embriyo fibroblast hücreleri) kullanılarak incelenmiştir.

3.1. Sitotoksik Etkiler

3.1.1. Benzen türevlerinin sitotoksik etkileri

Hücreler farklı konsantrasyonlardaki benzen türevleri (MBİS1, MBİS2 ve MBİS3) ile 24 ve 48 saat, 37°C de inkübe edildiler ve daha sonra test maddelerinin sitotoksik etkileri tetrazolium (MTT) deneyi ile belirlendi. Hücre sayısını ve canlılığını ölçen indikatör bir boya olan MTT, canlı hücre mitokondrial dehidrogenaz enzimlerin aktivitesi [Mossmann 1983] ile renkli bir formazan tuzuna dönüşür [Zeytinoğlu ve ark. 2003].

Şekil 3.1, MBİS1'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini göstermektedir. F2408 hücrelerinin 24 saat MBİS1 (0,0002 mg/ml) ile inkübasyonu sonucu herhangi bir sitotoksik etki gözlenmezken, aynı deneysel koşulları altında 5RP7 hücrelerinde ise % 25 sitotoksosite tespit edilmiştir (Şekil 3.1a, b). Daha yüksek konsantrasyonlarda MBİS1, 5RP7 hücreleri üzerinde anlamlı bir sitotoksik etki göstermesine rağmen, her iki hücre tipinde de (F2408 ve 5RP7) zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği gözlenmiştir.

Test maddesinin F2408 hücreleri (24 saat) için IC₅₀ değeri 0,04 mg/ml, 5RP7 hücreleri (24 saat) için ise 0,002 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1).

MBİS1'in N-ras aktif hücreler üzerine olan sitotoksik etkileri ise doza bağımlı olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 3.1d). 24 saat sonra benzen türevi (0,02 mg/ml) CO25 hücreleri üzerine % 13 sitotoksosite gösterirken, bu oran zamana bağlı olarak 48 saat sonra % 42'ye kadar yükselmiştir. Benzer şekilde, MBİS1 türevi C2 kontrol hücrelerinde de zamana ve doza bağımlı sitotoksik bir etkiye

sahip olduğundan (Şekil 3.1c) bu türevin *N-ras* aktif hücre çoğalması üzerine spesifik inhibitör bir etkiye sahip olmadığını söyleyebiliriz. MBİS1'in C2 hücreleri (24 saat) için IC₅₀ değeri 0,09 mg/ml, CO25 hücreleri için ise 0,1 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1).

Bir diğer benzen türevi olan MBİS2'in ise 5RP7 ve F2408 hücrelerinde 24 saat sonra konsantrasyona bağlı olarak stabil bir eğri vermediği ve dalgalanma gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.2a, b). Canlılık oranının 48 saat sonra konsantrasyona bağlı olarak azaldığı görülmektedir. 24 saat inkübasyondan sonra MBİS2'nin (0,0002 mg/ml) 5RP7 ve F2408 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine bakılacak olursa, 5RP7 hücrelerinde % 25 sitotoksositeye neden olurken F2408 hücrelerinde sitotoksik etki gözlenmemiştir. IC₅₀ değerleri F2408 hücreleri için 0,07 mg/ml, 5RP7 hücreleri içinde 0,02 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1). Bu türevin *N-ras* aktif ve kontrol hücre sitotoksitesisi üzerine etkisi (Şekil 3.2c, d) MBİS1'in etkisi (Şekil 3.1c, d) ile benzerlik göstermektedir. CO25 hücrelerinde MBİS2 konsantrasyona ve zaman bağlı sitotoksik etkiye sahipken benzer etki C2 kontrol hücrelerinde de görülmektedir bu nedenle bu benzen türevinin *N-ras* aktif hücreleri üzerine seçici bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu söylemek mümkün değildir. IC₅₀ değerleri C2 ve CO25 hücreleri için sırasıyla 0,06 ve 0,1 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1).

Diğer benzen türevlerinin aksine MBİS8'in, *H-ras* aktif hücreler üzerine spesifik ve anlamlı (0,0002-0,01 mg/ml doz aralığında F2408 kontrol hücrelerde % 10-25 oranında sitotoksik etkiye sahip) bir sitotoksik etkiye sahip olduğu Şekil 3.3a ve 3b de görülmektedir. 0,001 mg/ml konsantrasyonunda (48 saatte) MBİS8, F2408 kontrol hücrelerinde sitotoksik etki göstermezken (%100 canlılık), *H-ras* aktif hücrelerinde % 71 oranında sitotoksik bir etkiye neden olmaktadır. IC₅₀ değerleri olarak F2408 hücreleri için 0,02 mg/ml, 5RP7 hücreleri için ise 0,0006 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1). *H-ras* aktif hücrelerin aksine, MBİS8'in *N-ras* aktif hücreler ve C2 kontrol hücreler ile 24 saat inkübasyonu spesifik bir sitotoksosite göstermemektedir. Fakat 48 saat sonraki veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde MBİS8'in özellikle 0,0002-0,001 mg/ml konsantrasyon aralığında C2 kontrol hücrelerde sitotoksositeye neden olmadığını, CO25 hücrelerinde ise % 4-36 oranında hücre çoğalmasını inhibe ettiği gözlenmektedir.

Bu konsantrasyon aralığına ve zamana bağlı olarak MBİS8, N-ras aktif hücre çoğalmasını seçici olarak inhibe etmektedir. IC₅₀ değerleri olarak C2 hücreleri için 0,06 mg/ml, CO25 hücreleri için ise 0,1 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1).

3.1.2. Tiyohidantoin türevlerinin sitotoksik etkileri

Tiyol1, H-ras aktif hücre canlılığı üzerine zamana bağlı olarak sitotoksik bir etki göstermektedir. Tiyol1'in en düşük konsantrasyonu (0,0002 mg/ml) ile 48 saat muamele edilen 5RP7 hücrelerinin canlılığı % 37 oranında inhibe edilirken, F2408 hücre canlılığında herhangi bir etkiye rastlanmamıştır (Şekil 3.4a, b). Madde konsantrasyonun artması özellikle 5RP7 hücrelerinin canlılığında anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Genel olarak, hücre canlılığı, her iki hücre hattında da madde konsantrasyonuna bağlı olarak azalmıştır. IC₅₀ değerleri olarak F2408 hücreleri için 0,04 mg/ml, 5RP7 hücreleri için ise 0,03 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1). Tiyol1 türevinin CO25 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri kontrol hücre ile karşılaştırıldığında özellikle 48 saat sonra anlamlı sitotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Şekil 3.4c, d). Bu etki konsantrasyonuna bağlı olarak % 10-50 arasında değişmektedir. Tiyol1 türevi de MİS8'in etki mekanizmasına benzer şekilde N-ras aktif hücre canlılığı üzerine seçici bir etki göstermiştir. Tiyol1'in IC₅₀ değeri C2 hücreleri için 0,07 mg/ml iken bu değer CO25 hücreleri için ise 0,1 mg/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

H-ras aktif hücreleri Tiyol2 (0,001 mg/ml) ile muamele edildiğinde (kontrol hücre ile karşılaştırıldığında) 24 saat sonra % 39, 48 saat sonra ise % 25 sitotoksik etkinin ortaya çıktığı bulunmuştur (Şekil 5a, b). Özellikle test maddesinin 48 saat inkübasyonundan sonra sitotoksik etkisi H-ras aktif hücrelerde anlamlı bir şekilde artmıştır. Tiyol2'nin en yüksek konsantrasyonu ise (0,1 mg/ml) % 86 oranında 5RP7 hücrelerinin ölümüne neden olmuştur (Şekil 3.5b). Tiyol2'nin IC₅₀ değeri F2408 hücreleri için 0,04 mg/ml, 5RP7 hücreleri için 0,03 mg/ml olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, genel olarak N-ras aktif hücrelerinin Tiyol2 varlığında H-ras aktif hücrelerinden farklı davrandığını göstermektedir (Şekil 3.5b, d). Tiyol2 varlığında C2 ve CO25 hücre canlılığı 24 saat sonra konsantrasyonuna bağlı bir azalış göstermektedir fakat bu azalış CO25

hücrelerinde daha anlamlı olarak ortaya çıkmaktadır (0,001mg/ml Tiyo2 varlığında C2 hücre canlılığı % 94, CO25 hücre canlılığı % 60) (Şekil 3.5c, d). H-ras aktif hücrelerinin aksine, zamanın uzaması ile Tiyo2'nin C2 ve CO25 hücre canlılığı üzerindeki etkisinde azalmalar saptanmıştır. Tiyo2'nin IC₅₀ değeri C2 hücreleri için 0,1 mg/ml, CO25 hücreleri için 0,04 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1).

Diğer tiyohidantoin türevleri ile karşılaştırıldığında, Tiyo5'in H-ras aktif hücre çoğalmasını anlamlı ve spesifik bir şekilde inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 3.6a, b). 5RP7 hücrelerine bu türevin 24 ve 48 saat uygulanmasından sonra hücre canlılığında F2408 hücrelerine göre anlamlı bir azalış gözlenmiştir. 48 saat sonra (0,001 mg/ml) 5RP7 hücreleri % 70 oranında canlılık gösterirken bu oran F2408 hücrelerinde % 100 olarak tespit edilmiştir. Tiyo5'in F2408 hücreleri için IC₅₀ değeri 0,04 mg/ml, 5RP7 hücreleri için IC₅₀ değeri 0,01 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1). Bu türevin CO25 hücre üzerine sitotoksik etkisi Tiyo2 ile benzerlik göstermektedir. CO25 hücrelerinin Tiyo5 ile 24 saat muamelesinden sonra kontrol hücrelerine göre (0,0002 mg/ml) % 36 oranında bir sitotoksik etkiye sahiptir (Şekil 3.6d) ve bu oran konsantrasyona bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Uygulama süresinin uzaması ile etkide (Tiyo2 türevinde olduğu gibi) bir azalış tespit edilmiştir fakat benzer etki C2 hücrelerinde görülmemiştir (Şekil 3.6c). Zamana bağlı olarak gelişen bu etki, N-ras aktif hücrelerin hücre içi tolerans mekanizması geliştirdiklerini ve özellikle Tiyo2 ve Tiyo5 türevlerine karşı daha dirençli bir hal aldıklarını göstermektedir. Bu etki mekanizmasının aydınlatılması ile ilgili deneysel çalışmaların yapılması ileri ki aşamalarda planlanmaktadır. Tiyo5'in C2 hücreleri için IC₅₀ değeri 0,1 mg/ml, CO25 hücreleri için IC₅₀ değeri 0,07 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1).

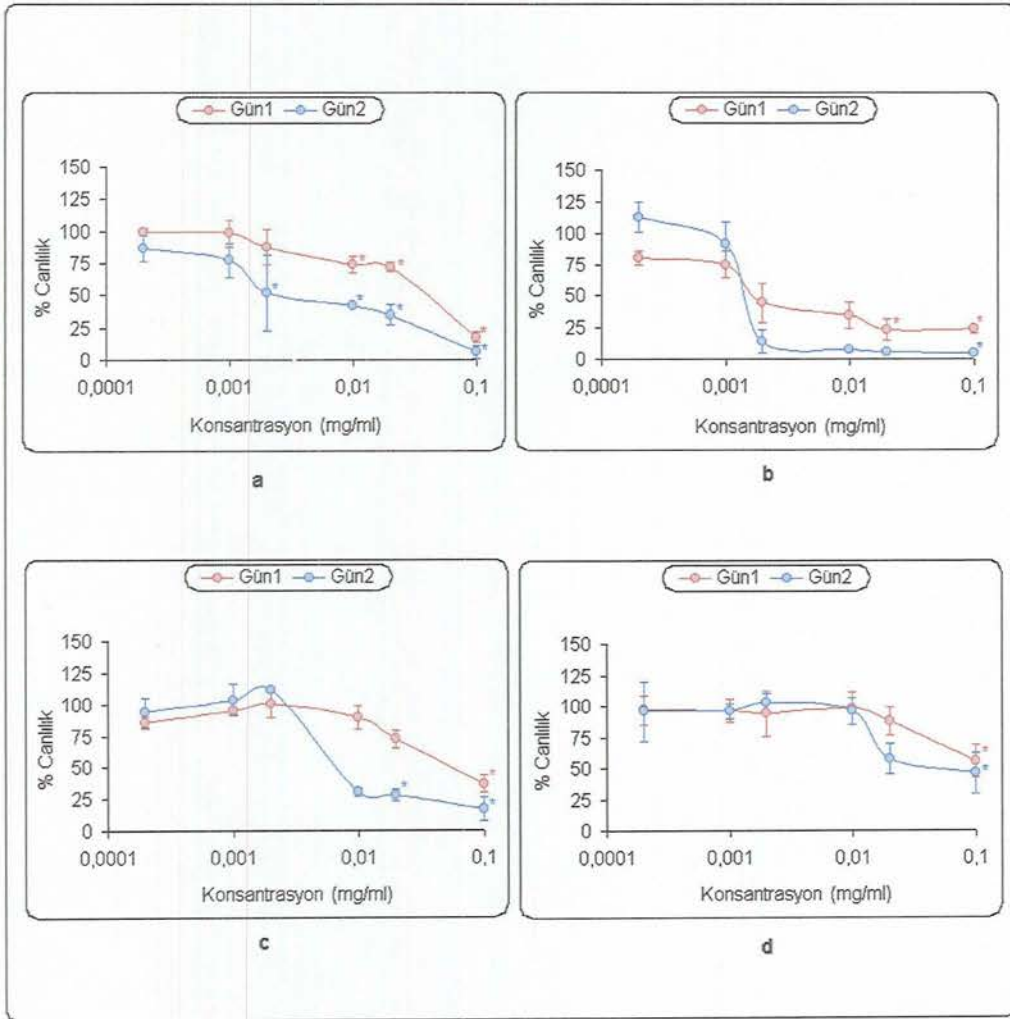
3.1.3. Karvakrol'ün sitotoksik etkileri

Doğal bir bileşik olan Karvakrol'ün H-ras aktif hücreler üzerine olan sitotoksik etkisi (24 saat) F2408 hücreleri ile benzerlik göstermektedir. Her iki hücre tipinde de konsantrasyona bağlı bir sitotoksik etki saptanmıştır (Şekil 3.7a, b). 48 saat uygulama süresi sonunda ise karvakrol'ün F2408 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi 5RP7 hücrelerine göre anlamlı bir artış göstermiştir. Karvakrol'ün

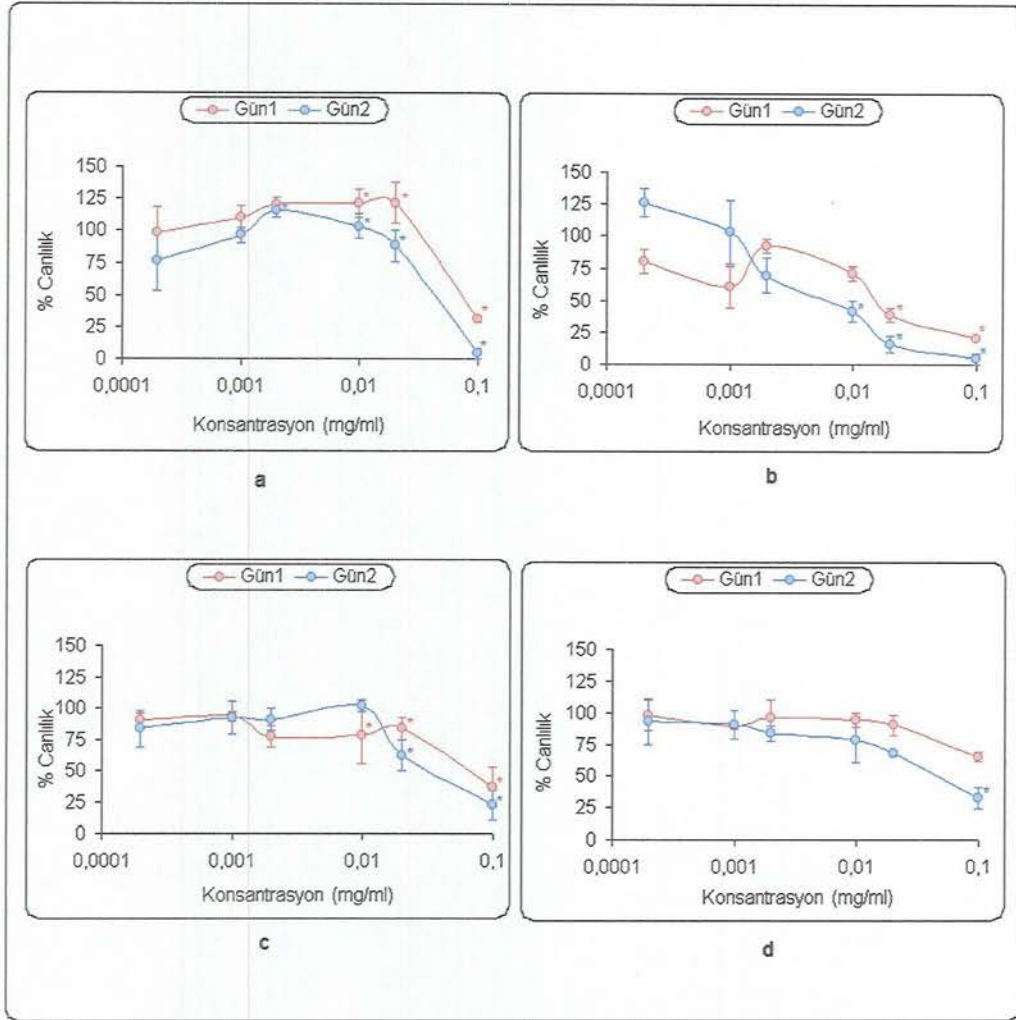
F2408 ve 5RP7 hücreleri için IC_{50} değeri 0,04 mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1). CO25 hücre tipinin denenen konsantrasyon aralığında Karvakrol'e dayanıklı olduğu buna karşın C2 hücrelerinde zamana bağlı sitotoksik etkinin meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 3.7c, d). Karvakrol'ün C2 ve CO25 hücreleri ile muamele edilmesi sonucunda IC_{50} değerleri sırasıyla 0,06 mg/ml ve 0,1 mg/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. MTT deneyi sonuçlarına göre maddelerin 24 saat sonra hücreler üzerindeki IC_{50} değerleri konsantrasyon birimi: mg/ml

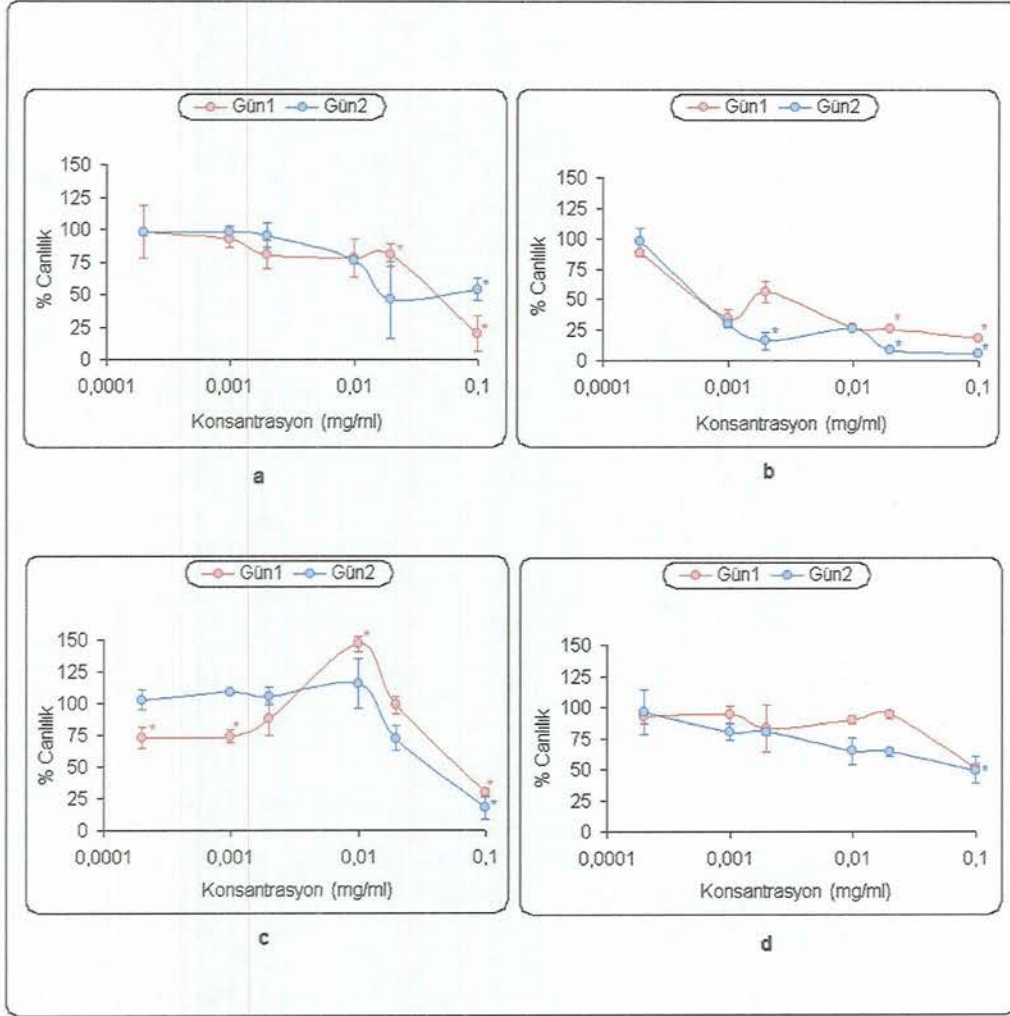
Maddeler	Hücre Tipleri			
	F2408	5RP7	C2	CO25
MBİS1	0,04	0,002	0,09	0,1
MBİS2	0,07	0,02	0,06	0,1
MBİS8	0,02	0,0006	0,06	0,1
Tiyo1	0,04	0,03	0,07	0,1
Tiyo2	0,04	0,03	0,1	0,04
Tiyo5	0,04	0,01	0,1	0,07
Karvakrol	0,04	0,04	0,06	0,1



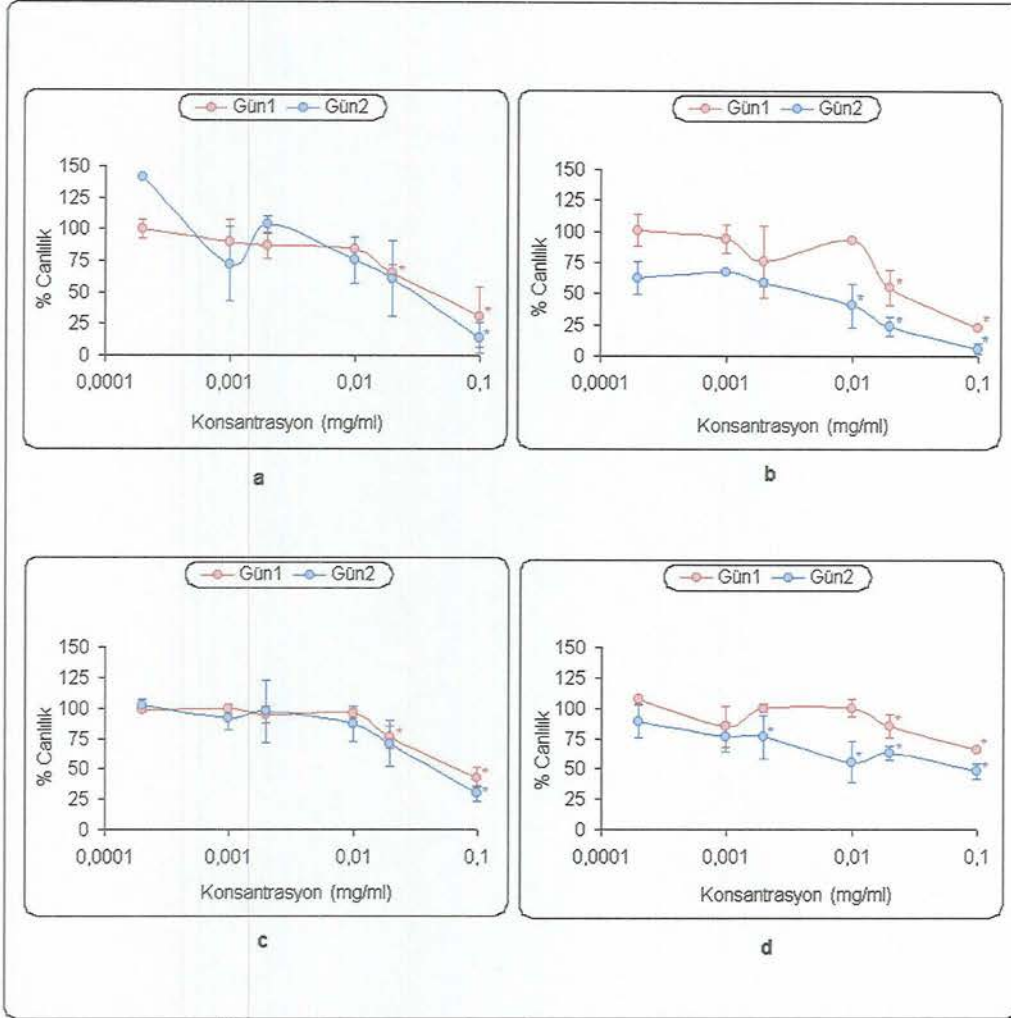
Şekil 3.1. MBİS1'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisi. Sitotoksite MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Hücreler 96 kuyulu tabakalara ekildikten sonra 0,0002-0,001-0,002-0,01-0,02 ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarında MBİS1 ile 24 ve 48 saat inkübe edilmişlerdir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Kontrol grubun hücre çoğalma yüzdesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n=3)



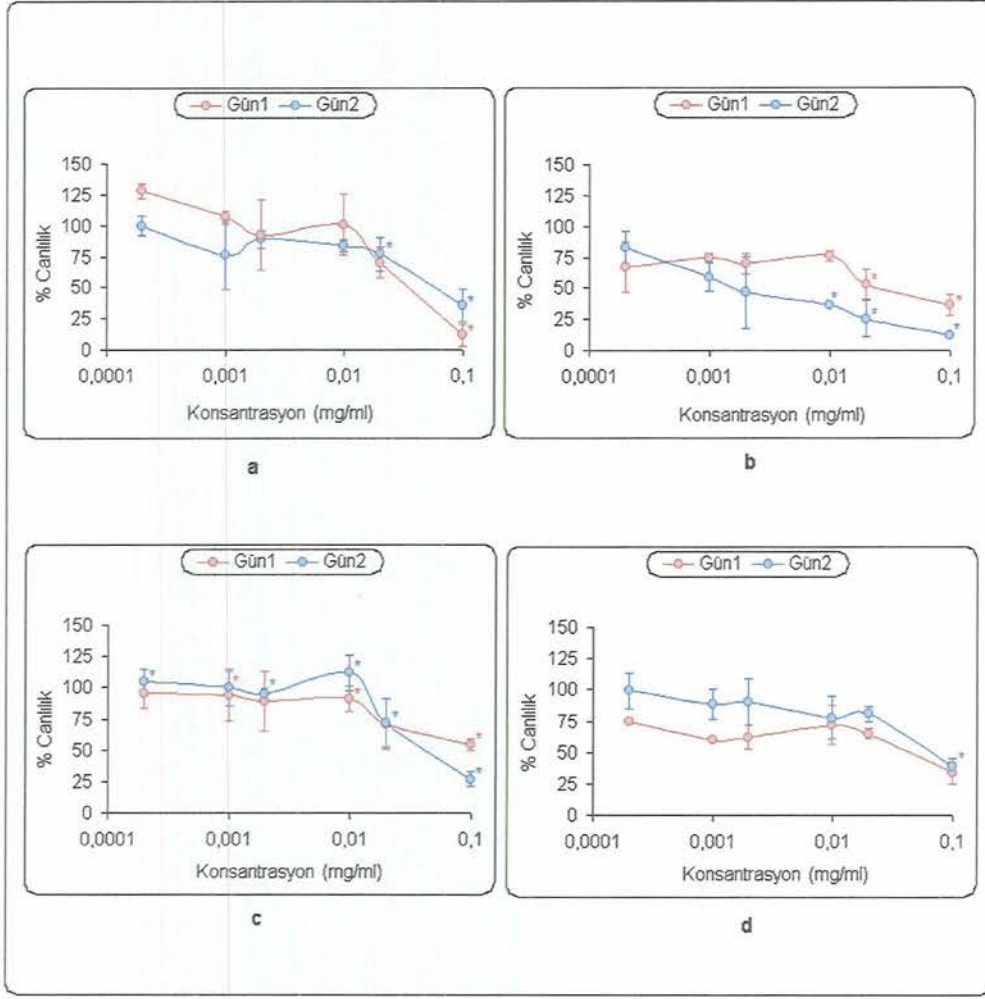
Şekil 3.2. MBİS2'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi. Hücreler 96 kuyulu tabakalara ekildikten sonra 0,0002-0,001-0,002-0,01-0,02 ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarında MBİS2 ile 24 ve 48 saat inkübe edilmişlerdir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Kontrol grubun hücre çoğalma yüzdesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n=3)



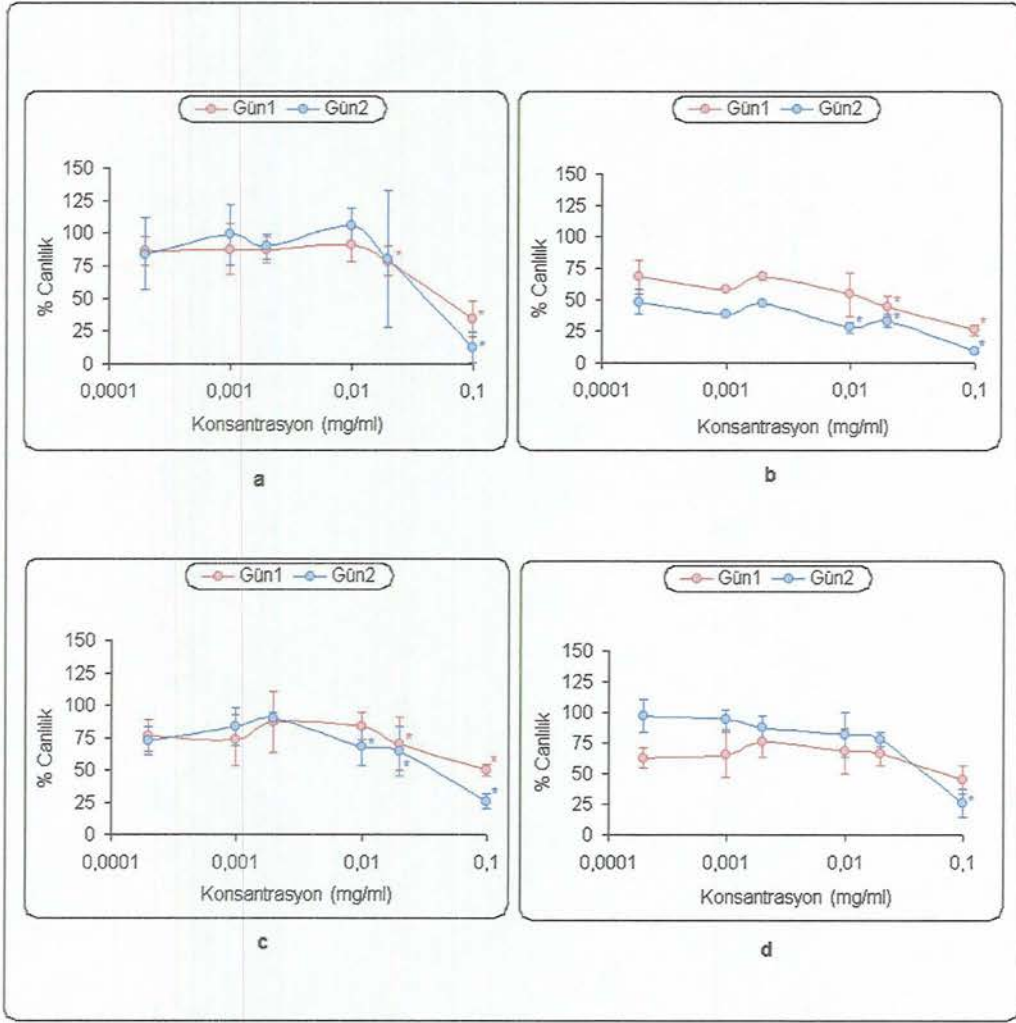
Şekil 3.3. MBİS8'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi. Hücreler 96 kuyulu tabakalara ekildikten sonra yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda MBİS8 ile 24 ve 48 saat inkübe edilmişlerdir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Kontrol grubun hücre çoğalma yüzdesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n=3)



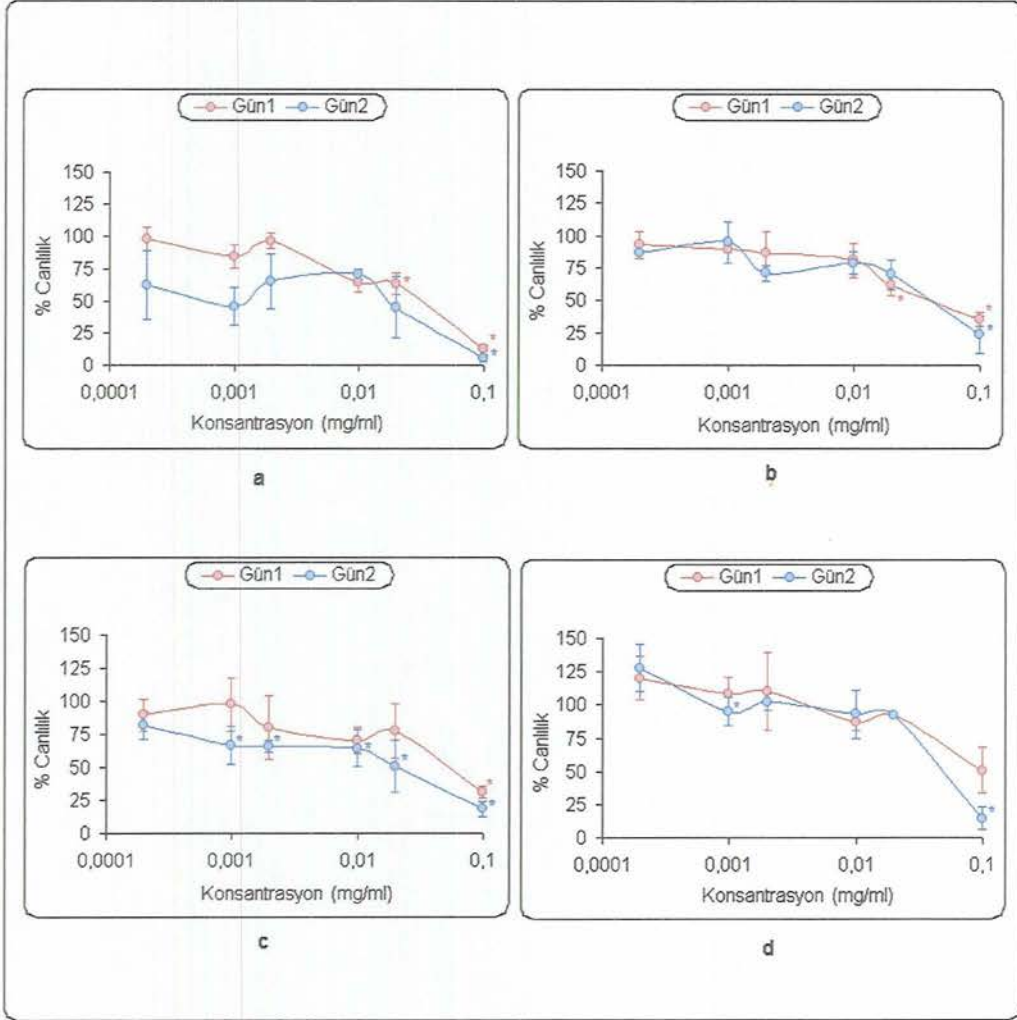
Şekil 3.4. Tiyo1'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi. Hücreler 96 kuyulu tabakalara ekildikten sonra 0,0002-0,001-0,002-0,01-0,02 ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarında Tiyo1 ile 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra sonuçlar Eliza-okuyucudan değerlendirilmiştir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Kontrol grubun hücre çoğalma yüzdesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n=3)



Şekil 3.5. Tiyo2'nin F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi. Hücreler 96 kuyulu tabakalara eşit sayıda ekildikten sonra belirli konsantrasyonlarda Tiyo2 ile 24 ve 48 saat inkübe edilmişlerdir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Kontrol grubun hücre çoğalma yüzdesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n=3)



Şekil 3.6. Tiyo5'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi. Belirli sayıda hücre 96 kuyulu tabakalara ekildikten sonra 0,0002-0,001-0,002-0,01-0,02 ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarında Tiyo5 ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Kontrol grubun hücre çoğalma yüzdesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n=3)



Şekil 3.7. Karvakrol'ün F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi. Hücreler tabakalara belli sayıda ekildikten sonra 0,0002-0,001-0,002-0,01-0,02 ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarında Karvakrol ile 24 ve 48 saat inkübe edildiler. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. Kontrol grubun hücre çoğalma yüzdesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n=3)

3.2. Doğal ve Sentetik Bileşiklerin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Test maddelerinin hücre canlılığı üzerine etkileri MTT metotuna alternatif bir yöntem olan Tripan mavi boyama yöntemi ile de incelenmiştir. Hücre canlılığının kaybolması ile hücre zar yapısının bozulma esasına dayalı bu yöntemde ölü hücreler mavi renge boyanır [Cotter ve Martin 1996] ve canlı yada ölü hücrelerin mikroskop altında sayılması ile % canlılık belirlenmiş olur.

3.2.1. Benzen Türevlerinin hücre canlılığı üzerine etkileri

Sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile tespit edilen benzen türevlerinden MBİS1 ve MBİS8'in hücre canlılığı üzerine olan etkileri tripan mavi boyama yöntemi ile incelenmiştir. Her iki test maddesinin hücreye spesifik olan IC₅₀ değeri ve bu değer altındaki iki konsantrasyon aralığı dikkate alınarak farklı zaman aralıklarındaki etkileri deneysel olarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8-12 de gösterilmiştir.

IC₅₀ değeri olan 0,04 mg/ml MBİS1 ile 24 saat muamele edilen F2408 kontrol hücrelerinde (MTT deney sonuçlarına paralel olarak) % 55 oranında hücre ölümü tespit edilmiştir. 0,0002 mg/ml ve 0,02 mg/ml konsantrasyonlarında ise zamana bağlı olarak 8 saat inkübasyon süresinden sonra hücre ölümü gözlenmeye başlanmıştır (sırasıyla %10 ve %29) (Şekil 3.8a). H-*ras* aktif hücrelerinde ise hücre canlılık yüzdesi IC₅₀ değerinin (0,002 mg/ml) altındaki konsantrasyonlarda, zamana bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. Özellikle 8 saat sonra 0,0002 ve 0,001 mg/ml konsantrasyonları sırasıyla % 15 ve 37 oranında hücre ölümüne neden olmuştur (Şekil 3.8b).

0,0002, 0,045 ve 0,09 (IC₅₀) mg/ml MBİS1 ile 8 saat muamele edilen C2 ve CO25 hücre canlılığında değişiklik gözlenmezken zamanın uzaması ile (72 saat) konsantrasyona bağlı olarak C2 hücrelerinde sırasıyla % 42, % 50, % 72 oranında hücre ölümü tespit edilmiştir (CO25 hücrelerinde ise % 42, % 50 ve % 78) (Şekil 3.8c). MBİS1'in, N-*ras* aktif hücre canlılığı üzerine spesifik bir etkisi bulunmamaktadır ve bu sonuçlar MTT deney sonuçları ile de desteklenmektedir (Şekil 3.8d).

0,0002 mg/ml MBİS8 ile inkübe edilen F2408 (% 48) ve 5RP7 (% 70) hücre canlılığı 72 saat sonunda inhibe edilmiştir buna rağmen konsantrasyonun

artması ile her iki hücre canlılık oranında da % 10 seviyelerine kadar bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 3.9a, b). Aynı test maddesinin düşük konsantrasyonu C2 (% 7 ölüm) hücrelerinin yaşamını etkilemezken, *N-ras* aktif hücre canlılığını 48 saat (% 40 ölüm) sonra inhibe etmiştir (Şekil 3.9d). 0,0002 mg/ml konsantrasyonundaki MBİS8 seçici olarak *N-ras* aktif hücre canlılık seviyesini azaltığı gözlenmiştir.

3.2.2. Tiyohidantoin türevlerinin hücre canlılığı üzerine etkileri

MTT deney sonuçlarına benzer şekilde *H-ras* aktif hücre canlılığı kontrol hücrelere oranla Tiyo2 varlığında zamana bağlı olarak daha anlamlı bir düşüş göstermiştir (Şekil 3.10a, b). 0,0002 mg/ml Tiyo2'nin her iki hücrenin canlılık oranını değiştirmedığı saptanmıştır. Konsantrasyonun artması (0,02 mg/ml) ile 24 saat sonra, F2408 kontrol hücre canlılığında % 34 oranında bir ölüm saptanırken bu oran 5RP7 hücrelerinde % 46 olarak bulunmuştur.

Aynı test maddesi, 48 saat sonra kontrol hücrelerine göre, CO25 hücre canlılığını 0,02 mg/ml konsantrasyonunda % 50 oranında azaltırken C2 hücrelerinde 0,05 mg/ml konsantrasyonunda bu oran % 35 olarak tespit edilmiştir. Hücre canlılığı zamana bağlı olarak CO25 hücrelerinde daha anlamlı bir düşüş göstermesine rağmen C2 hücre canlılığında da azalma saptanmıştır (Şekil 3.10c, d).

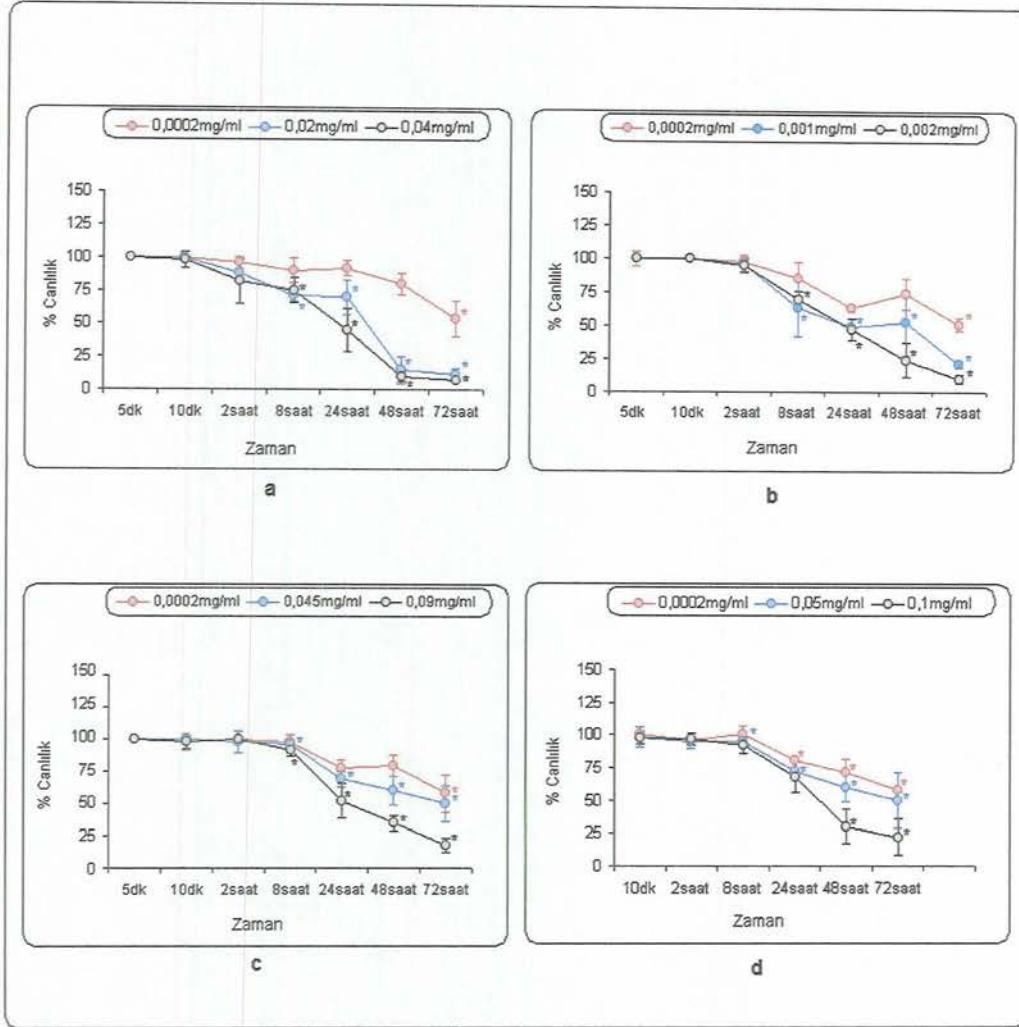
Tiyo5'in varlığında F2408 ve 5RP7 hücre canlılığındaki değişimleri gösteren veriler sitotoksisite deney sonuçları (Şekil 3.6a, b) ile benzerlik göstermektedir. IC₅₀ değerinin bir alt değeri ile 24 saat inkübe edilen 5RP7 hücrelerinin ölüm oranında %48 oranında bir düşüş gözlenirken bu oran F2408 hücrelerinde % 30 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.11a, b). 5RP7 hücrelerinde saptanan bu etki 48 saat sonrasında % 69'a ulaşırken 72 saat sonra hücre canlılığının değişmediği bulunmuştur. Tiyo5'in (% 70 ölüm) de kontrol hücrelerine göre *H-ras* aktif hücre canlılığı üzerine daha etkili olduğu saptanmıştır. Tiyo5'in düşük konsantrasyonu (0,0002 mg/ml) 72 saat sonra C2 hücrelerinde % 40 ölüme neden olurken, bu oran CO25 hücrelerinde % 30 olarak bulunmuştur. Fakat konsantrasyonun artması ile etkininde değiştiği gözlenmektedir. Buna göre, Tiyo5 test maddesi CO25 hücrelerinde (0,035 mg/ml)

zamana bağlı olarak azalan bir hücre ölümüne neden olmuştur (48 saat sonra % 50 iken 72 saat sonra % 62) (Şekil 3.11d) bu oranın C2 (0,05 mg/ml) hücrelerinde daha düşük olduğu tespit edilmiştir (48 saat, % 40 ; 72 saat, % 49 ölüm oranı) (Şekil 3.11c).

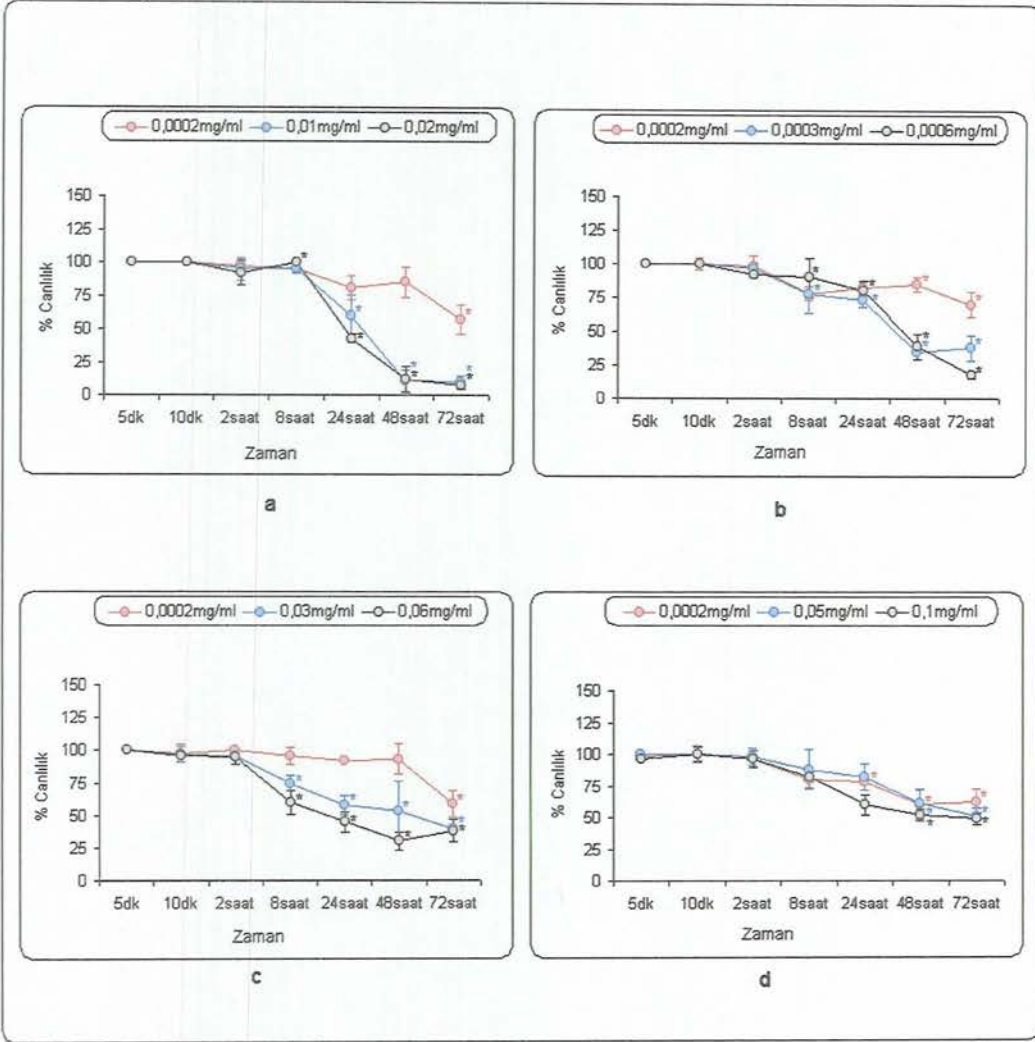
3.2.3. Karvakrol'ün hücre canlılığı üzerine etkileri

Karvakrol, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak seçicilik göstermeden F2408 kontrol ve *H-ras* aktif hücre canlılığı üzerine benzer etkiler göstermiştir. 0,0002 mg/ml karvakrol F2408 hücre ölüm oranı 24 saat sonra zamana bağlı olarak artarken (24 saat, % 20, 48 saat, % 30 ve 72 saat, % 39 ölüm oranı) 5RP7 hücre ölümünde 24, 48 ve 72 saat aralıklarında bir artış gözlenmiştir (24 saat, % 13; 48 saat, % 25; 72 saat, % 40 ölüm oranı) (Şekil 3.12a, b).

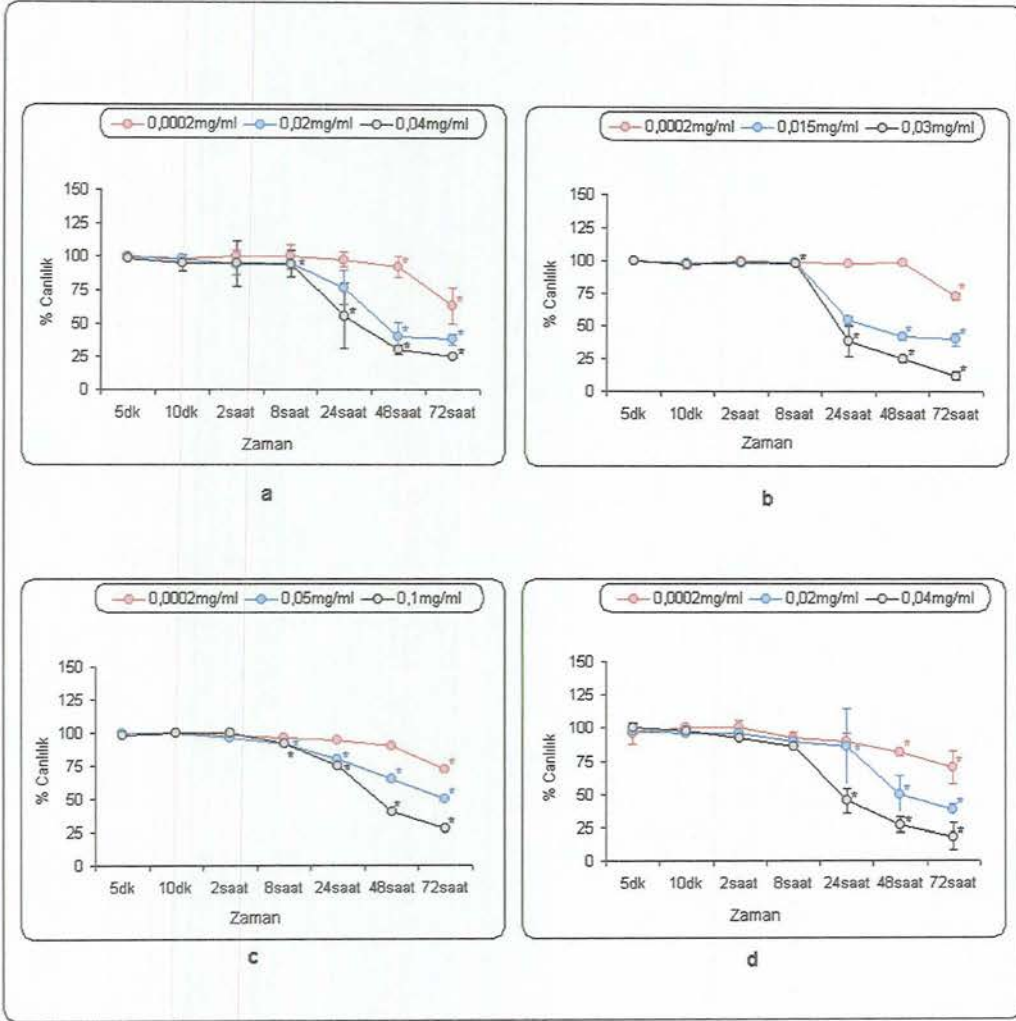
Karvakrol'lün varlığında, CO25 hücre canlılığında zamana ve konsantrasyona bağlı olarak azalma gözlenmiştir. Fakat C2 hücrelerine göre değişiklik saptanmamıştır. Yalnızca 24 saat sonra 0,0002 mg/ml karvakrol varlığında C2 hücre ölümü % 11 iken bu oran CO25 hücrelerinde % 18 olarak bulunmuştur (Şekil 3.12c, d).



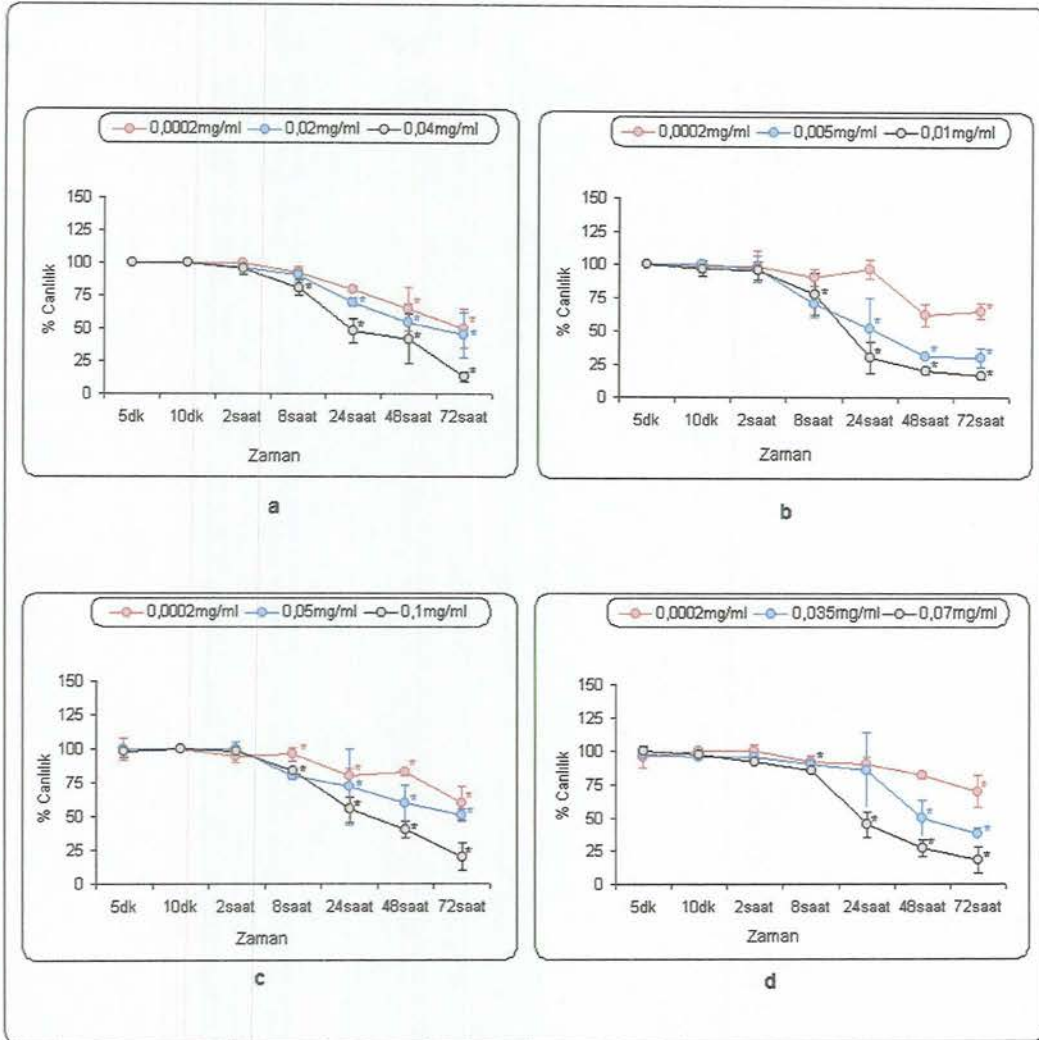
Şekil 3.8. MBİS1'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri. Hücreler (2×10^5 /ml) farklı zaman aralıklarında MBİS1 ile muamele edilmiştir. Tripan mavisi ile boyanmış ve boyanmamış hücre oranı hemositometre yardımı ile sayılarak hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Her bir veri 2 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata ($n = 6$)



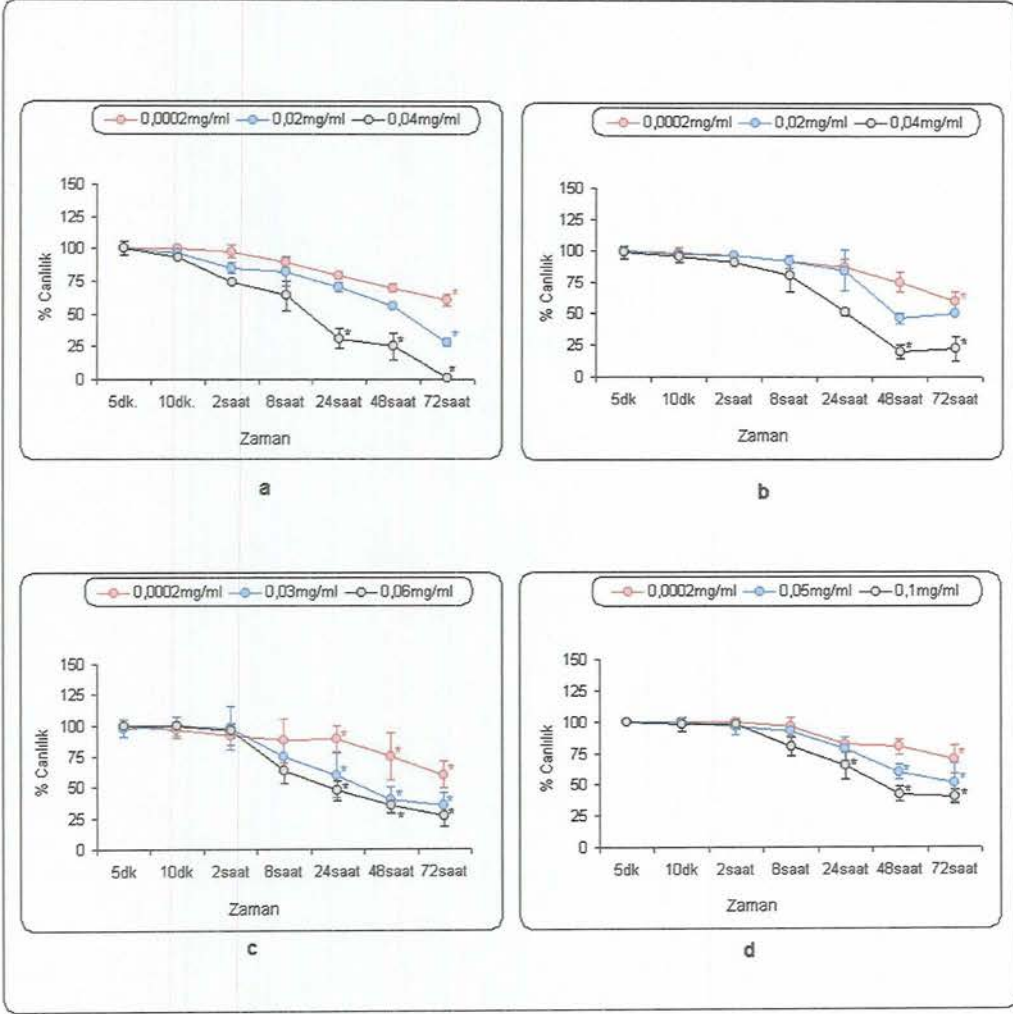
Şekil 3.9. MBİS8'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri. Etkiler Tripan Mavisi boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Hücreler farklı zaman aralıklarında MBİS1 ile muamele edilmiştir. Tripan mavisi ile boyanmış ve boyanmamış hücre oranı hemositometre yardımı ile sayılarak hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Her bir veri 2 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata (n = 6)



Şekil 3.10. Tiyo2'nin F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri. Etkiler Tripan Mavisi boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Hücreler farklı zaman aralıklarında Tiyo2 ile muamele edilmiştir. Tripan mavisi ile boyanmış ve boyanmamış hücre oranı hemositometre yardımı ile sayılarak hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Her bir veri 2 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata ($n = 6$)



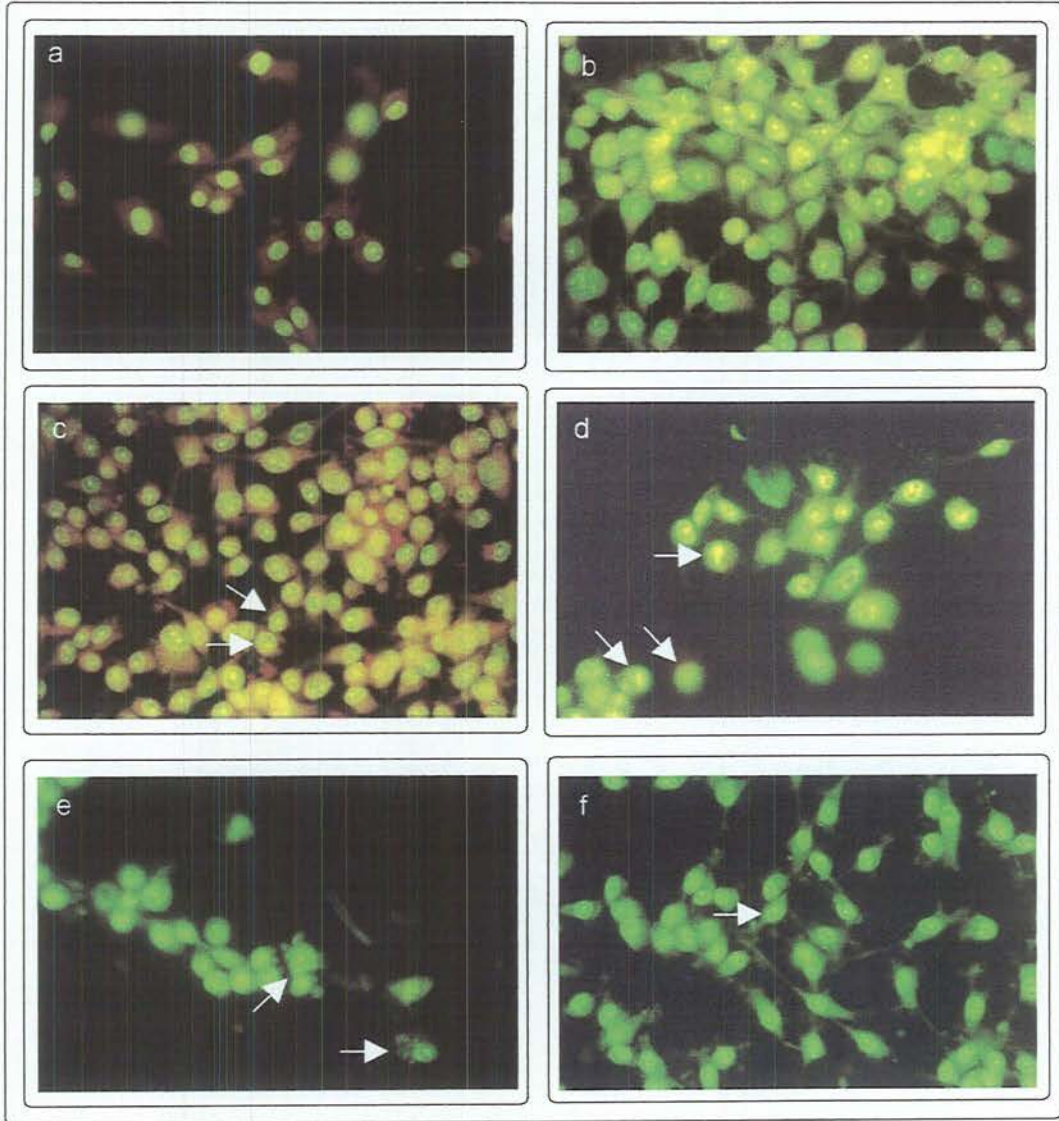
Şekil 3.11. Tiyo5'in F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri. Etkiler Tripan Mavisi boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Belirli sayıda Hücre farklı zaman aralıklarında Tiyo5 ile muamele edilmiştir. Tripan mavisi ile boyanmış ve boyanmamış hücre oranı hemositometre yardımı ile sayılarak hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Her bir veri 2 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata ($n = 6$)



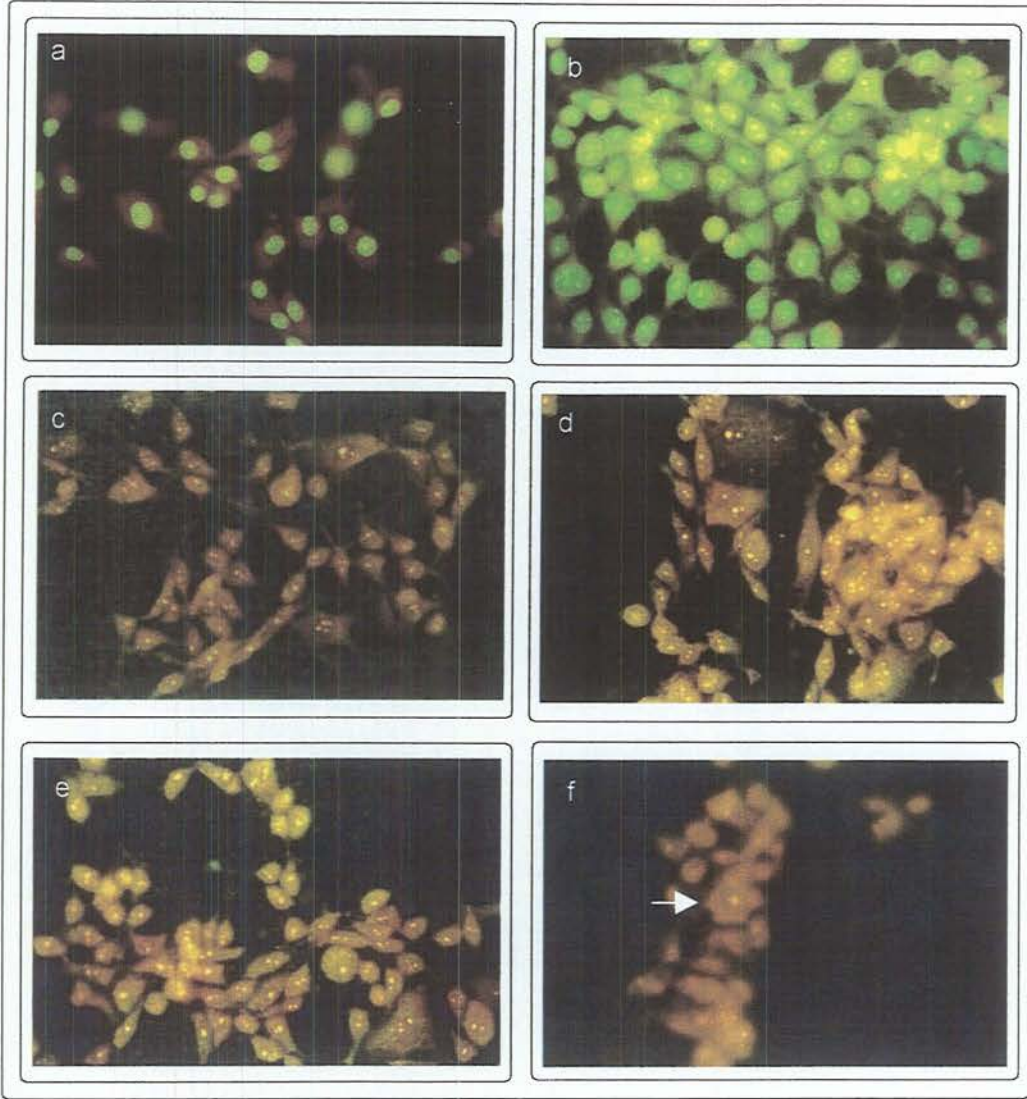
Şekil 3.12. Karvakrol'ün F2408 (a), 5RP7 (b), C2 (c) ve CO25 (d) hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri Tripan Mavisi boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Hücreler farklı zaman aralıklarında Karvakrol ile muamele edilmiştir. Tripan mavisi ile boyanmış ve boyanmamış hücre oranı hemositometre yardımı ile sayılarak hücre canlılık oranı tespit edilmiştir. Her bir veri 2 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, Ortalama değerler \pm St. Hata ($n = 6$)

3.3. Apoptozisin Morfolojik Olarak Belirlenmesi

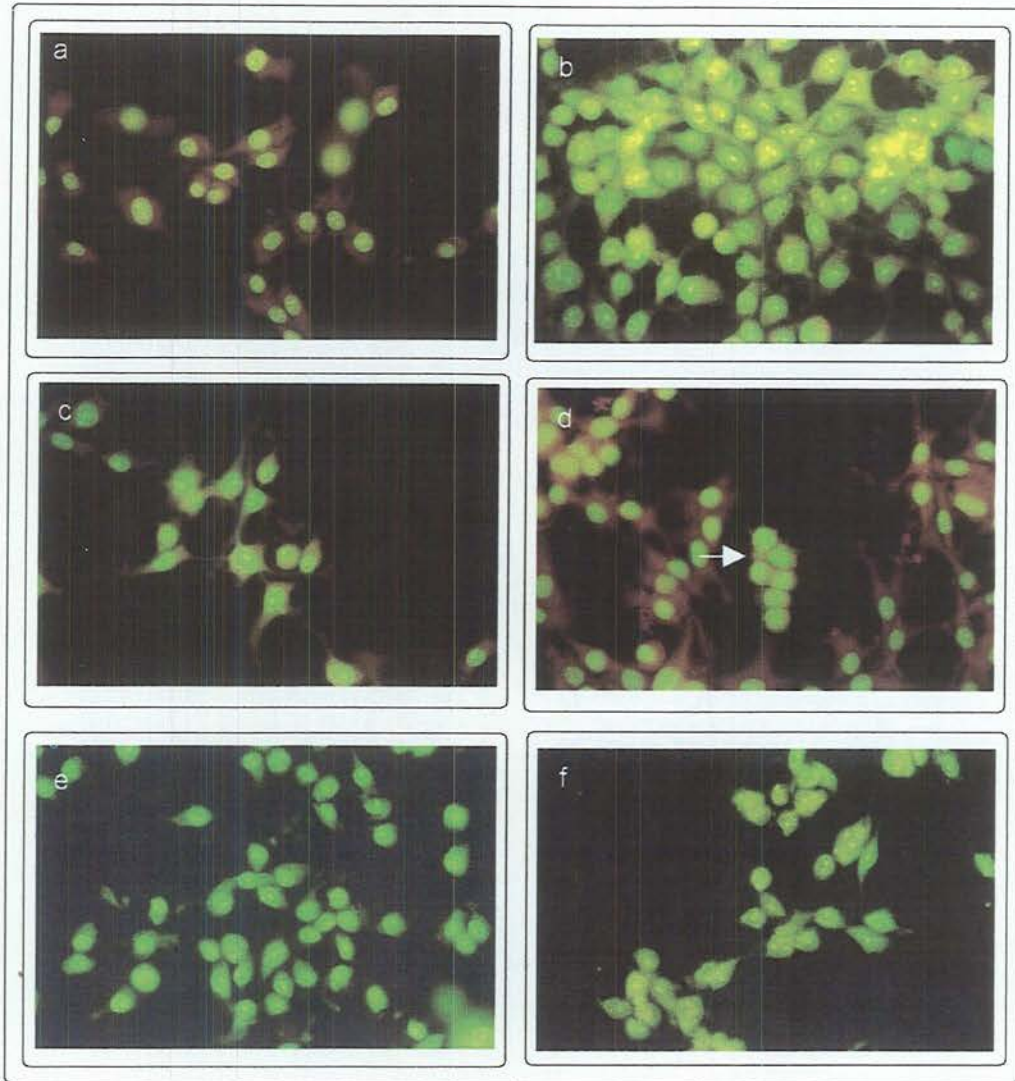
Test maddelerinin apoptotik etkileri, sitoplazmik boya olan akridin oranj ile DNA boyası olan etidyum bromürün beraber kullanılması sonucu floresan mikroskop ile morfolojik olarak incelenmiştir. 8 ve 24 saat inkübasyon sürelerinin sonucunda hem yüzeye bağlı hücreler hem de yüzen hücreler toplanarak mikroskobik olarak incelenmiştir ve 5RP7 hücreleri ile yapılan akridin oranj / etidyum bromür boyama deneyinde MBİS1'in 0,001 mg/ml ve 0,002 mg/ml konsantrasyonlarında hücreler ile 8 saat (Şekil 3.13c, d) ve 24 saat (Şekil 3.13e, f), 0,0006 mg/ml MBİS8 ile 24 saat (Şekil 3.14f), 0,03 mg/ml Tiyo2 ile 8 saat (Şekil 3.15d), 0,005 mg/ml Tiyo5 ile 24 saat (Şekil 3.16e), 0,04 mg/ml Karvakrol ile 8 saat (Şekil 3.17d) ve 24 saat (Şekil 22f), 0,02 mg/ml Karvakrol ile 24 saat (Şekil 3.17e) inkübasyon sonrasında, CO25 hücreler ile yapılan boyama deneyinde ise 0,05 mg/ml ve 0,1 mg/ml MBİS8'in hücreler ile 8 saat (Şekil 3.19c, d) ve 24 saat (Şekil 3.19e, f), 0,02 mg/ml Tiyo2'nin hücreler ile 24 saat (Şekil 3.20e), Karvakrol'ün 0,1 mg/ml konsantrasyonunda 8 saat (Şekil 3.22d) ve 24 saat (Şekil 3.22f) muamelesi sonucunda hücre sitoplazmasının ve çekirdeğinin küçülmesi, apoptotik yapıların hücre zarı etrafında toplanması ve hücre çekirdeğinin böbrek şeklini alması gibi apoptozise özgü morfolojik değişikliklere neden oldukları saptanmıştır. Bu morfolojik değişimler özellikle 8 saat inkübasyon sonunda başlamış olup 24 saat inkübasyon süresi sonunda da gözlenmiştir.



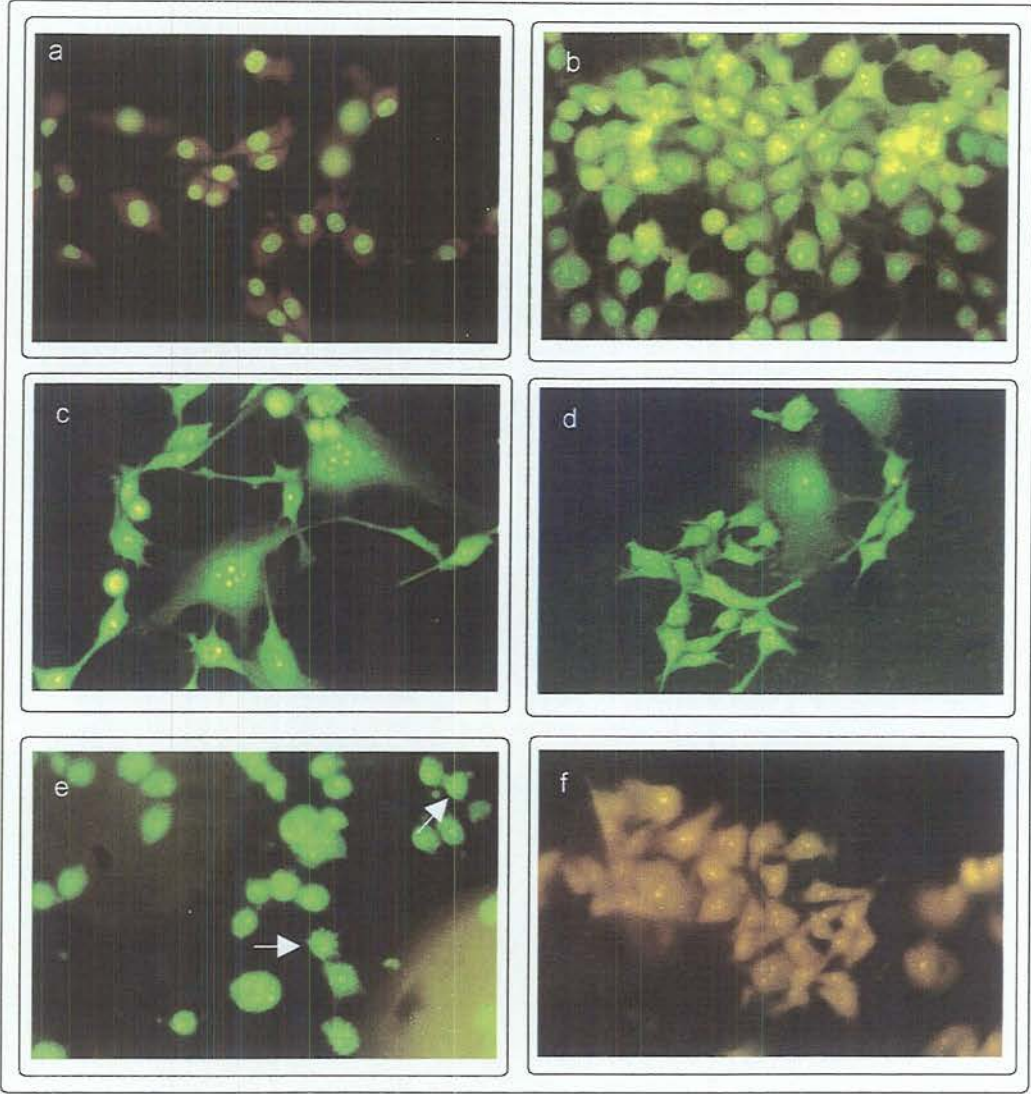
Şekil 3.13. MBİS1'in 5RP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta (Olympus) incelenmiştir. **a.** 8 saat kontrol hücreleri, **b.** 24 saat kontrol hücreleri, **c.** 0,001 mg/ml MBİS1 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **d.** 0,002 mg/ml MBİS1 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **e.** 0,001 mg/ml MBİS1 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, **f.** 0,002 mg/ml MBİS1 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.



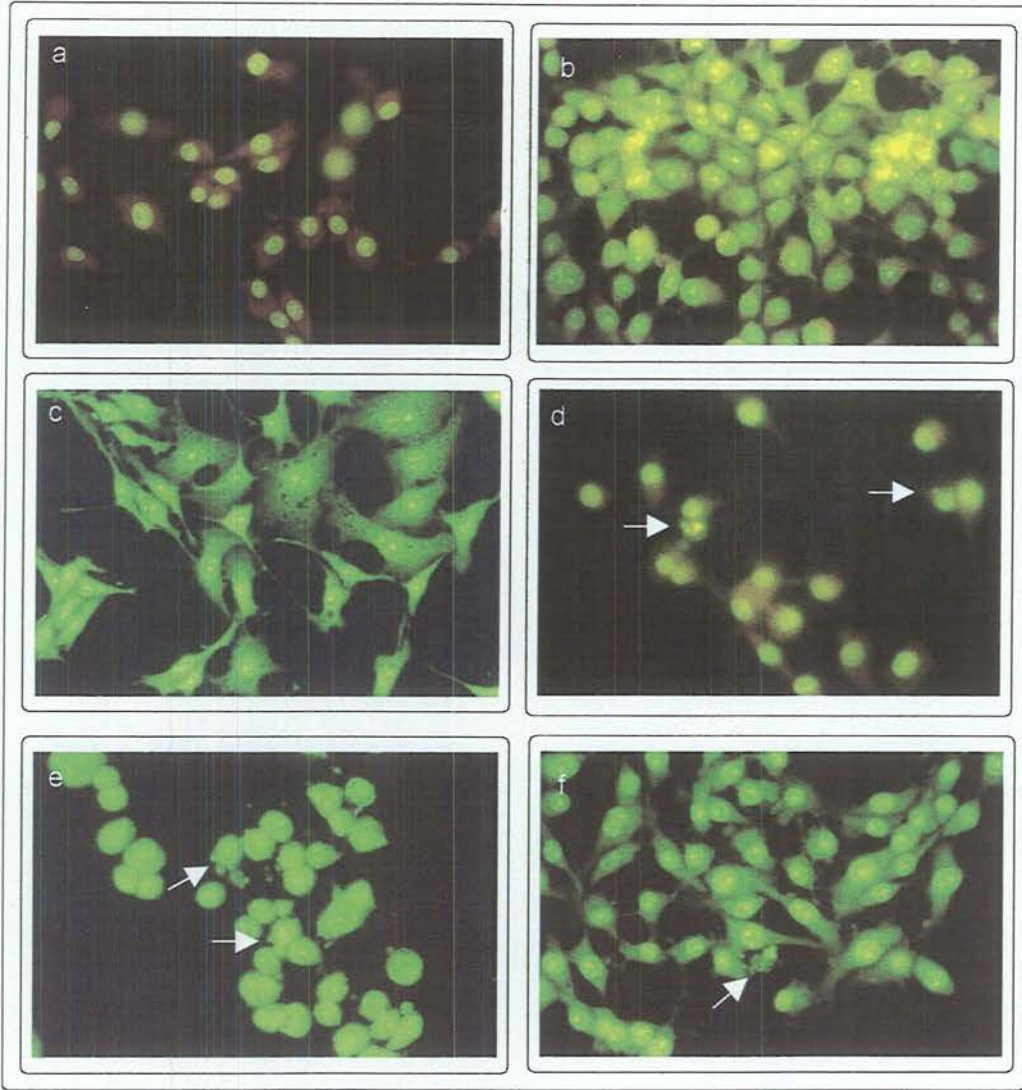
Şekil 3.14. MBİS8'in 5RP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta (Olympus) incelenmiştir. **a.** 8 saat kontrol hücreleri, **b.** 24 saat kontrol hücreleri, **c.** 0,0003 mg/ml MBİS8 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **d.** 0,0006 mg/ml MBİS8 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **e.** 0,0003 mg/ml MBİS8 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, **f.** 0,0006 mg/ml MBİS8 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.



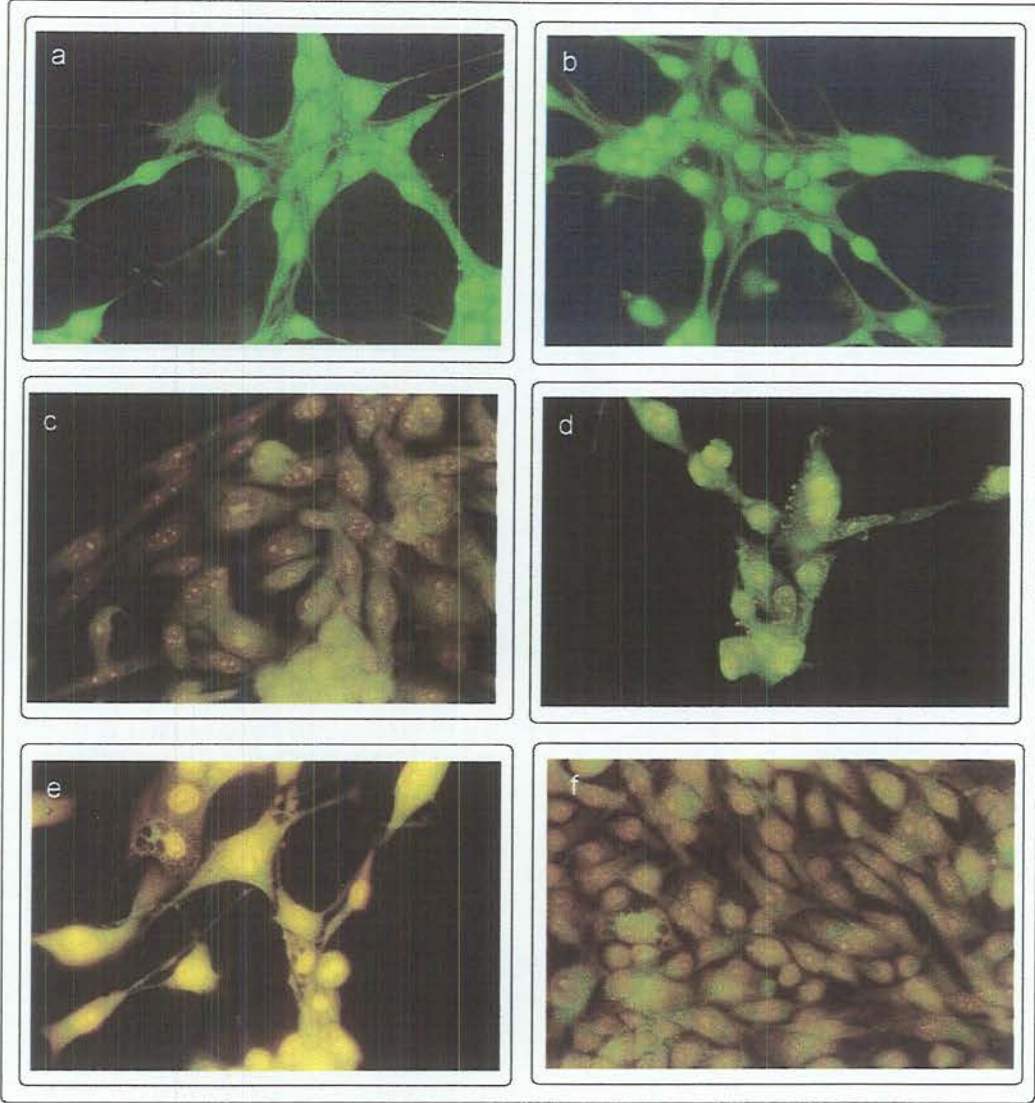
Şekil 3.15. Tiyo2'nin 5RP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta (Olympus) incelenmiştir. **a.** 8 saat kontrol hücreleri, **b.** 24 saat kontrol hücreleri, **c.** 0,015 mg/ml Tiyo2 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **d.** 0,03 mg/ml Tiyo2 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **e.** 0,015 mg/ml Tiyo2 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, **f.** 0,03 mg/ml Tiyo2 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.



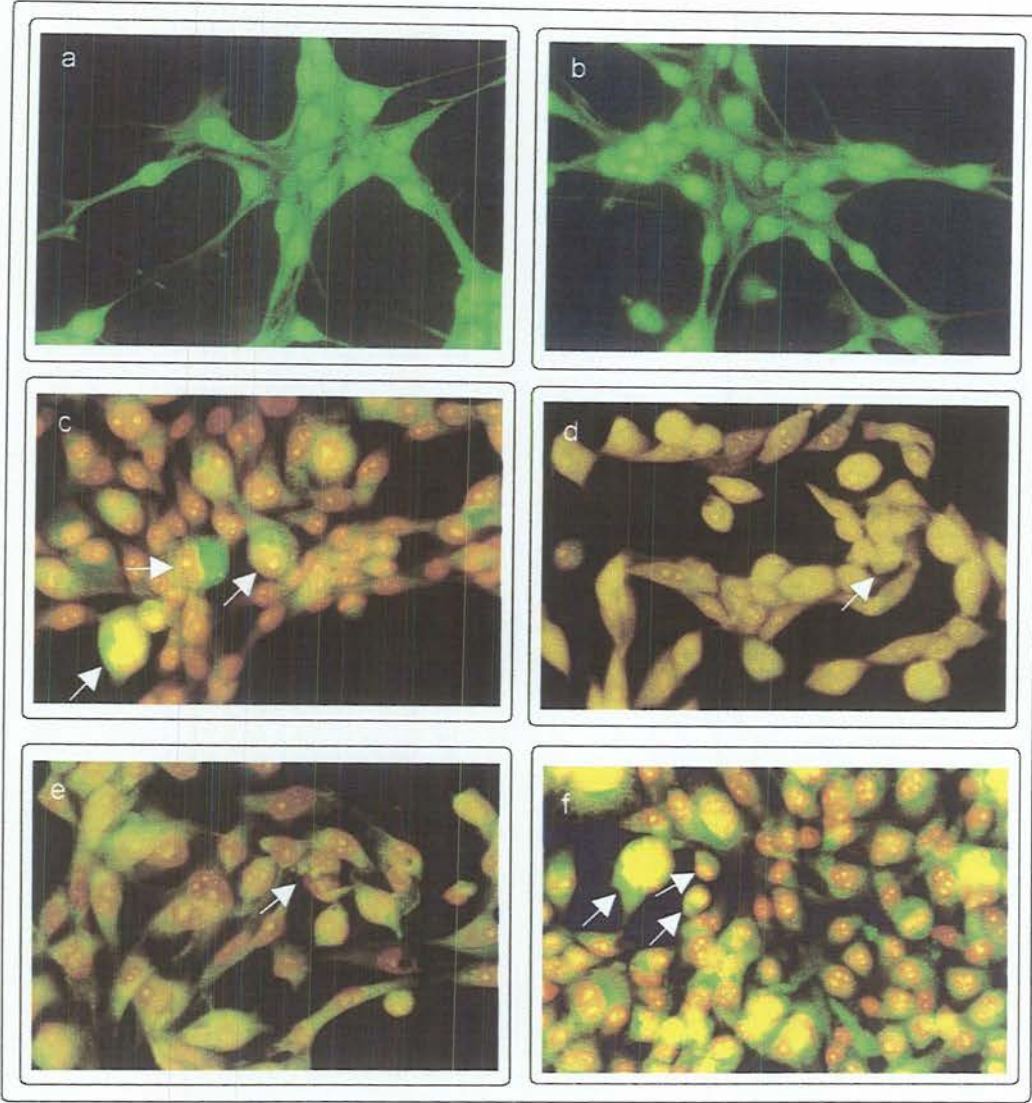
Şekil 3.16. Tiyo5'nin 5RP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta (Olympus) incelenmiştir. a. 8 saat kontrol hücreleri, b. 24 saat kontrol hücreleri, c. 0,005 mg/ml Tiyo5 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, d. 0,01 mg/ml Tiyo5 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, e. 0,005 mg/ml Tiyo5 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, f. 0,01 mg/ml Tiyo5 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.



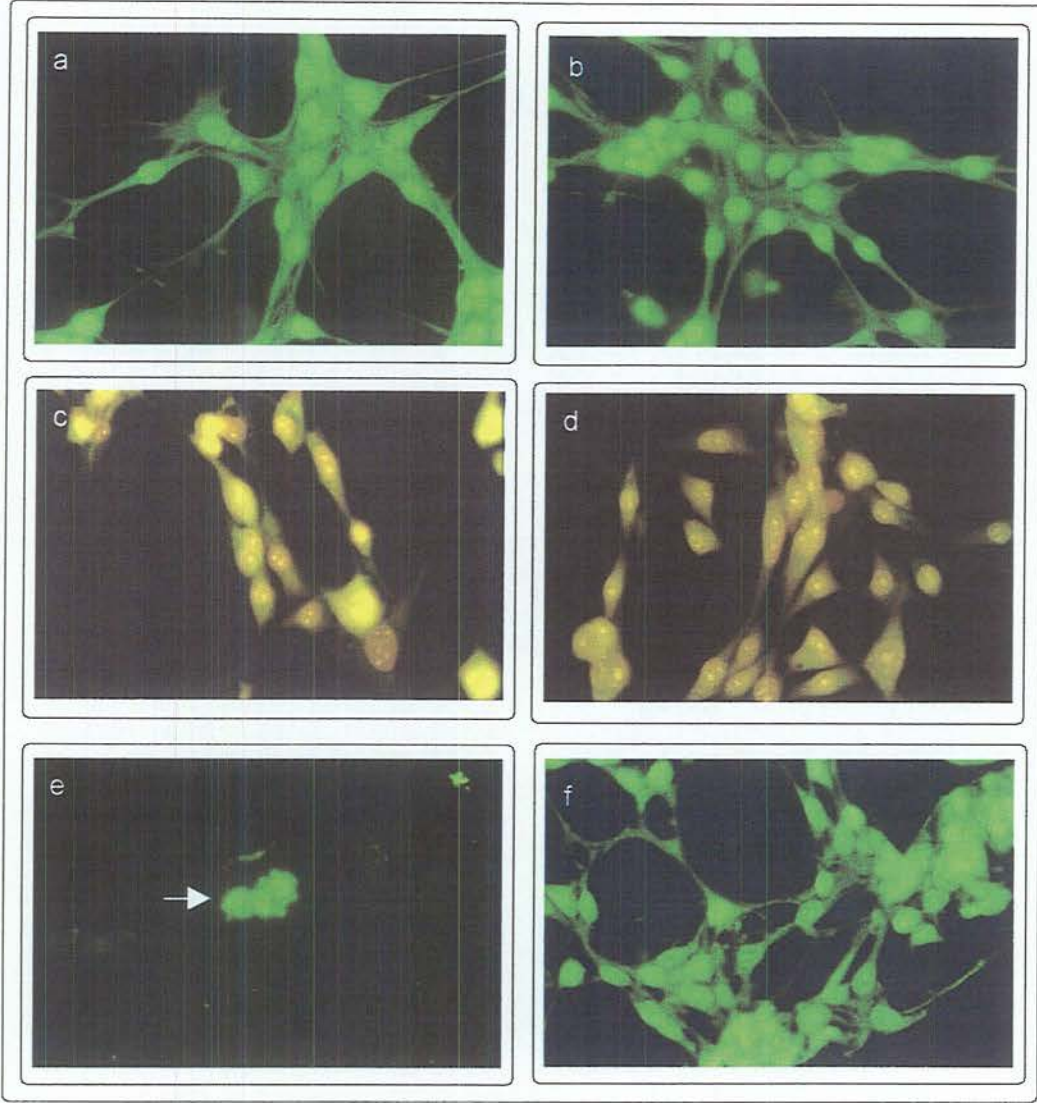
Şekil 3.17. Karvakrol'ün 5RP7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta (Olympus) incelenmiştir. **a.** 8 saat kontrol hücreleri, **b.** 24 saat kontrol hücreleri, **c.** 0,02 mg/ml Karvakrol ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **d.** 0,04 mg/ml Karvakrol ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **e.** 0,02 mg/ml Karvakrol ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, **f.** 0,04 mg/ml Karvakrol ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.



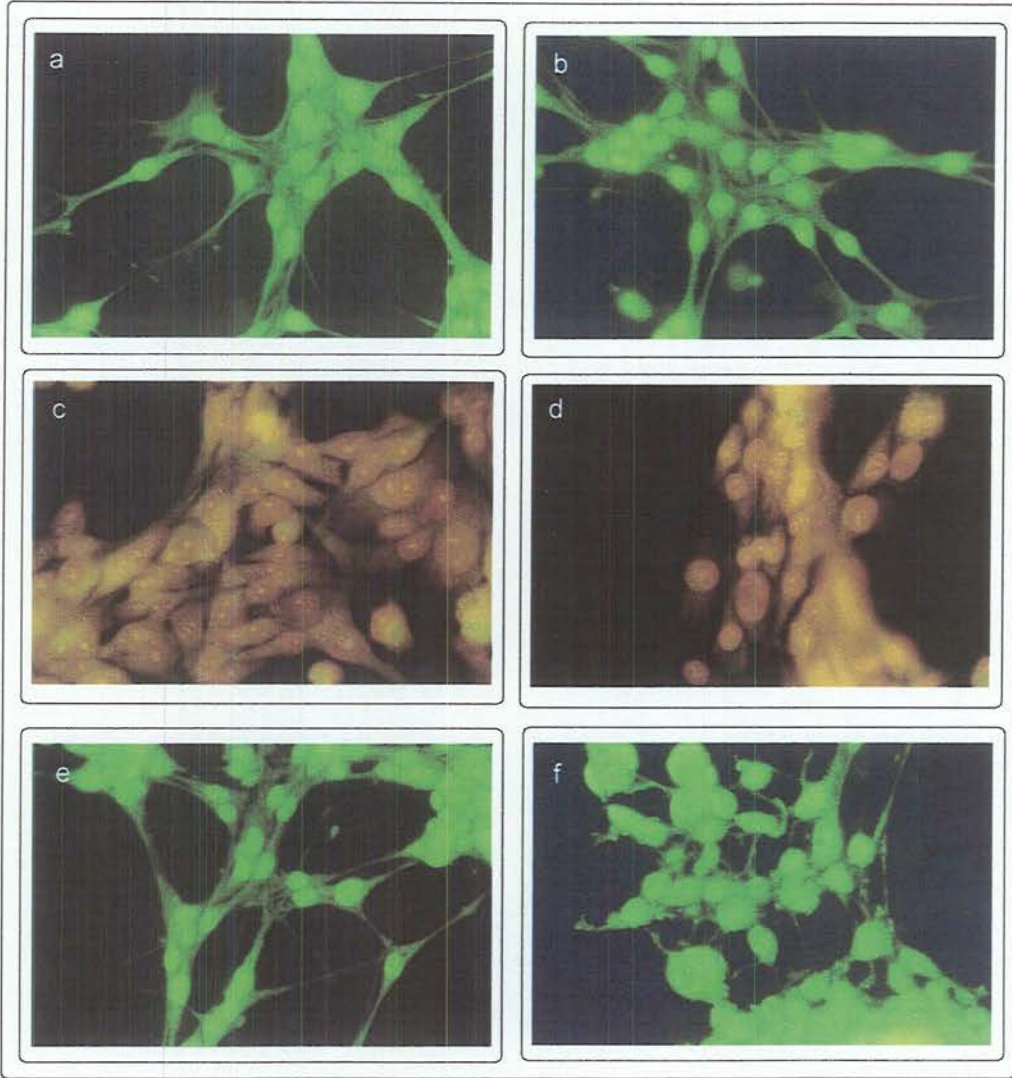
Şekil 3.18. MBİS1'in CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta (Olympus) incelenmiştir. **a.** 8 saat kontrol hücreleri, **b.** 24 saat kontrol hücreleri, **c.** 0,05 mg/ml MBİS1 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **d.** 0,1 mg/ml MBİS1 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **e.** 0,05 mg/ml MBİS1 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, **f.** 0,1 mg/ml MBİS1 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.



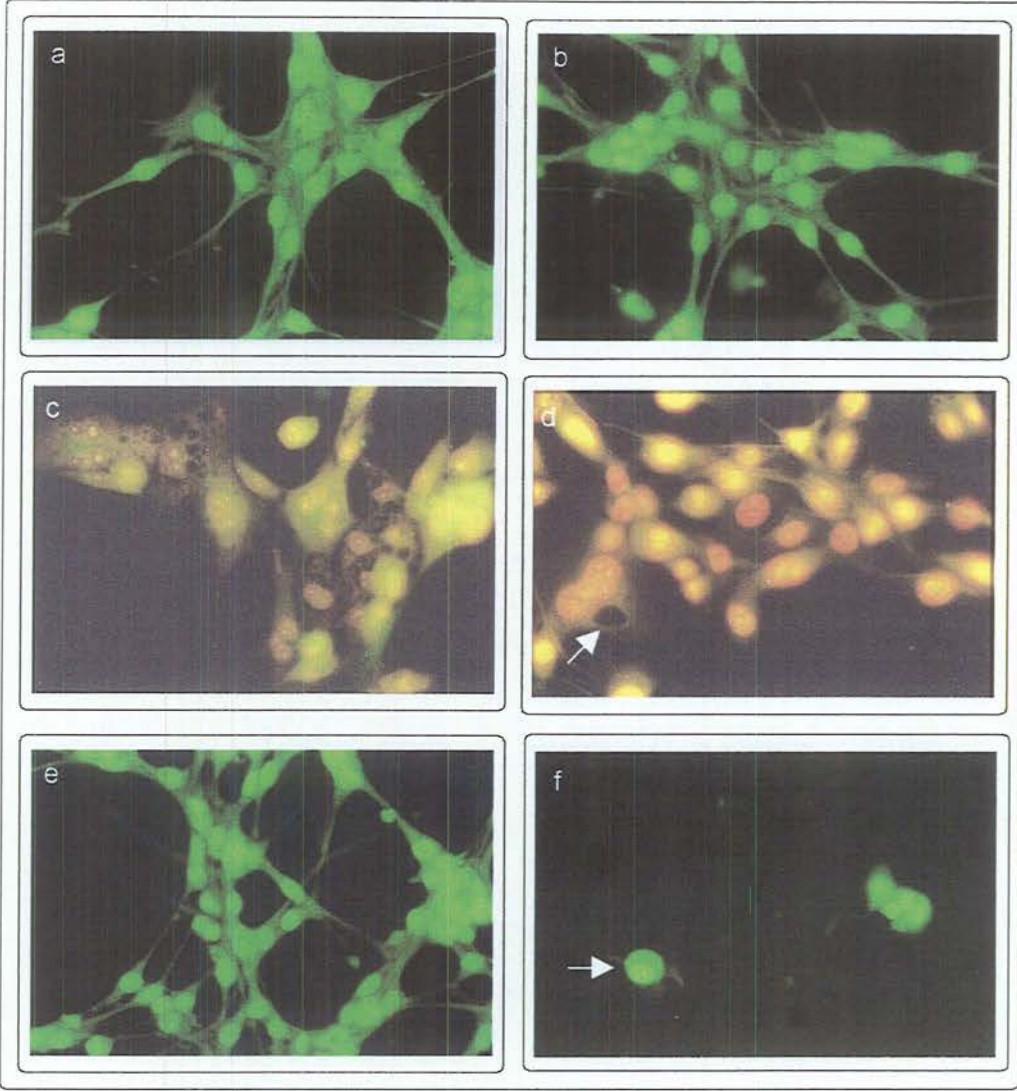
Şekil 3.19. MBİS8'in CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta (Olympus) incelenmiştir. **a.** 8 saat kontrol hücreleri, **b.** 24 saat kontrol hücreleri, **c.** 0,05 mg/ml MBİS8 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **d.** 0,1 mg/ml MBİS8 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **e.** 0,05 mg/ml MBİS8 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, **f.** 0,1 mg/ml MBİS8 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.



Şekil 3.20. Tiyo2'nin CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta (Olympus) incelenmiştir. **a.** 8 saat kontrol hücreleri, **b.** 24 saat kontrol hücreleri, **c.** 0,02 mg/ml Tiyo2 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **d.** 0,04 mg/ml Tiyo2 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **e.** 0,02 mg/ml Tiyo2 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, **f.** 0,04 mg/ml Tiyo2 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.



Şekil 3.21. Tiyo5'in CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta (Olympus) incelenmiştir. a. 8 saat kontrol hücreleri, b. 24 saat kontrol hücreleri, c. 0,035 mg/ml Tiyo5 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, d. 0,07 mg/ml Tiyo5 ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, e. 0,035 mg/ml Tiyo5 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, f. 0,07 mg/ml Tiyo5 ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.



Şekil 3.22. Karvakrol'ün CO25 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. Hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskopta (Olympus) incelenmiştir. **a.** 8 saat kontrol hücreleri, **b.** 24 saat kontrol hücreleri, **c.** 0,05 mg/ml Karvakrol ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **d.** 0,1 mg/ml Karvakrol ile 8 saat inkübasyon sonrası hücreler, **e.** 0,05 mg/ml Karvakrol ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler, **f.** 0,1 mg/ml Karvakrol ile 24 saat inkübasyon sonrası hücreler.

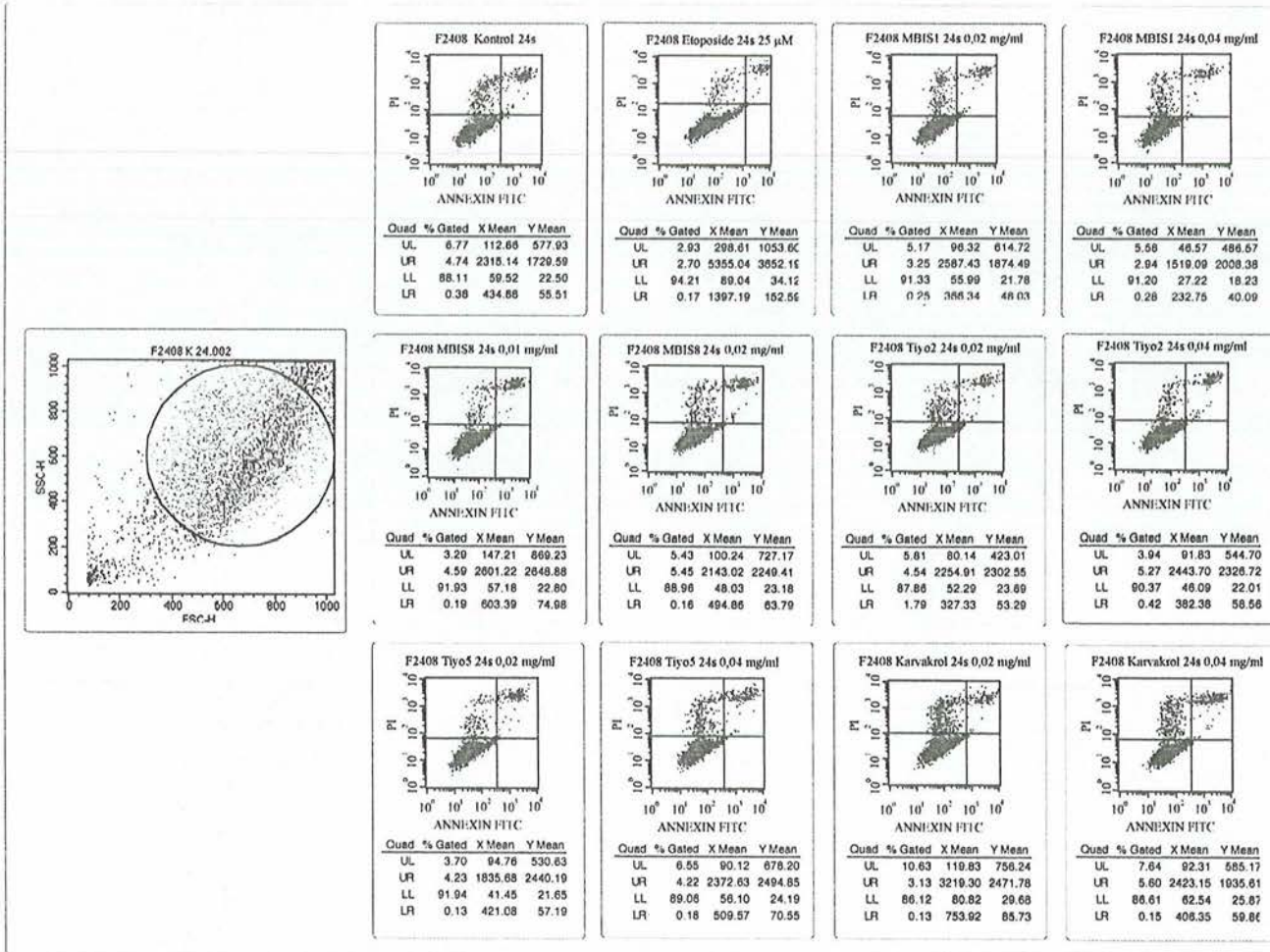
3.4. Bileşiklerin Erken Apoptozis Üzerine Etkileri

Benzen, tiyodantoin türevlerinin ve karvakrol'ün 5RP7 ve CO25 hücre apoptozisi üzerine olan etkileri, apoptozis mekanizmasının tetiklenmesi ile hücre dış yüzeyine hareket eden fosfotidilserine karşı yüksek affiniteye sahip Annexin-V ile incelenmiştir. Aynı deney ortamına propidyum iyodürün eklenmesi ile de geç apoptotik ya da nekrotik hücre oranları da ölçülmüştür (Şekil 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27).

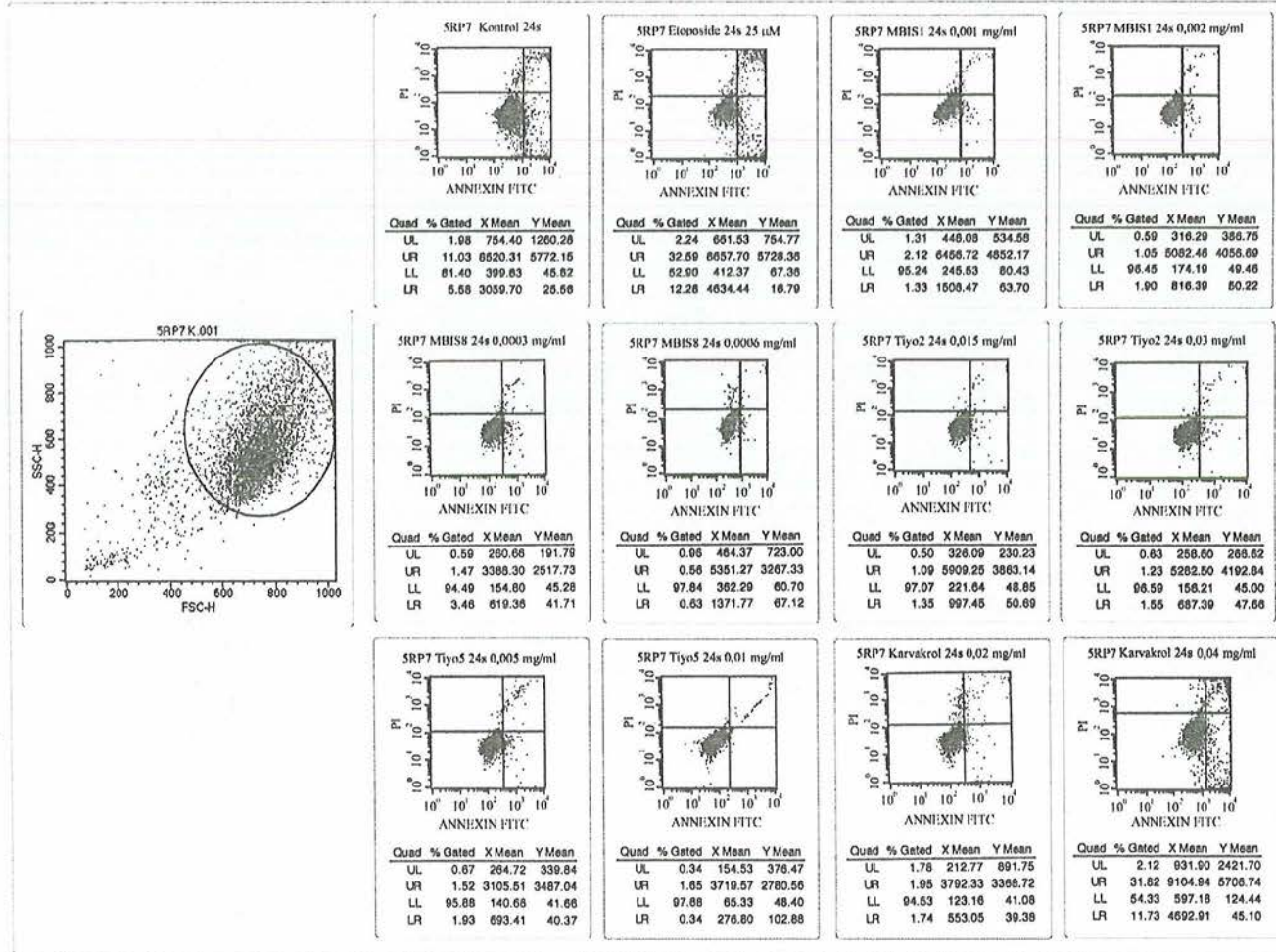
MBİS1 (0,001-0,002 mg/ml), MBİS8 (0,0003-0,0006 mg/ml), Tiyo2 (0,015-0,03 mg/ml), Tiyo5 (0,005-0,01 mg/ml) ve karvakrol'ün (0,02-0,04 mg/ml) 5RP7 hücreleri ile 48 saat inkübasyonu sonucu Annexin-V bağlı ve Annexin V-Propidyum iyodüre bağlı hücre oranında negatif kontrole ya da etoposide göre herhangi bir değişim tespit edilememiştir. Negatif kontroldeki Annexin-V bağlı hücre oranı % 0.75 iken Annexin-V ve Propidyum iyodüre bağlı hücre oranı % 8.63 olarak bulunmuştur. Bu oranlar pozitif kontrol olan (25 µM) etoposidin eklenmesi ile sırasıyla % 3.87 ile % 34.07 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.25). Test maddelerinin 24 saat kontrol hücre olan F2408 ile muamelesi sonucu her iki parametre oranında da belirgin bir artış gözlenmemiştir (Şekil 3.23).

24 saat Karvakrol (0,04 mg/ml) ile 5RP7 hücrelerinin % 11.73 oranında Annexin-V pozitif olduğu ve bu oranın (25 µM) etoposid ile % 12.28, kontrol hücrelerde ise % 5.58 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.24). Karvakrol, bu hücrelerde 24 saat inkübasyon sonucu etoposide benzer bir etkiye sahiptir. Annexin-V ve Propidyum iyodür bağlanma oranı ise (0,04 mg/ml) karvakrol varlığında % 31.82 iken pozitif kontrol hücrelerde % 32.59, negatif kontrol hücrelerde ise % 11.03 olduğu tespit edilmiştir. Diğer maddelerin ise 5RP7 hücreleri ile 24 saat inkübasyon sonrası erken veya geç apoptozise neden olmadıkları gözlenmiştir (Şekil 3.24).

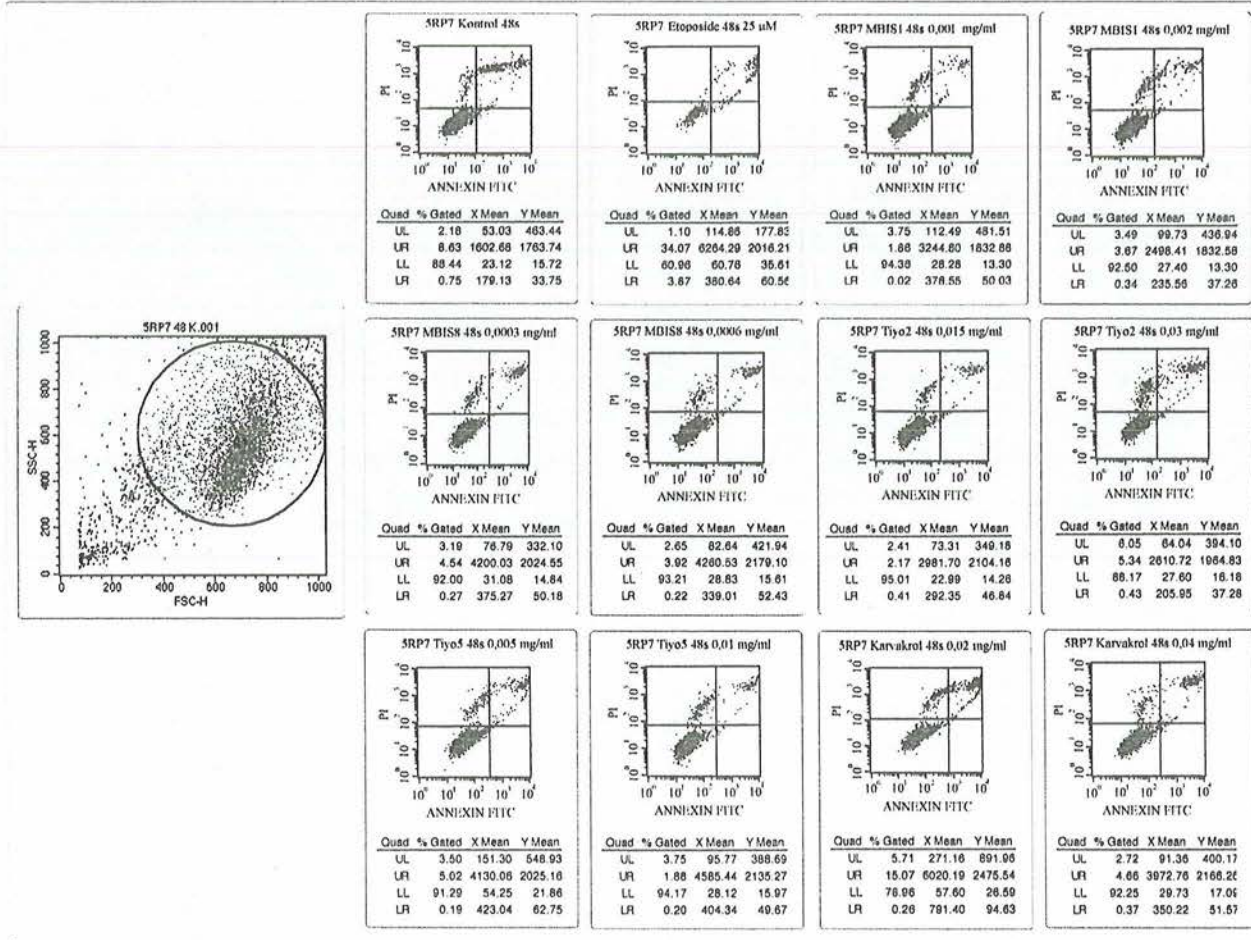
Test maddelerinin ve etoposidin CO25 ve C2 hücrelerinde ise erken veya geç apoptozise neden olmadıkları gözlenmiştir (Şekil 3.26, 3.27).



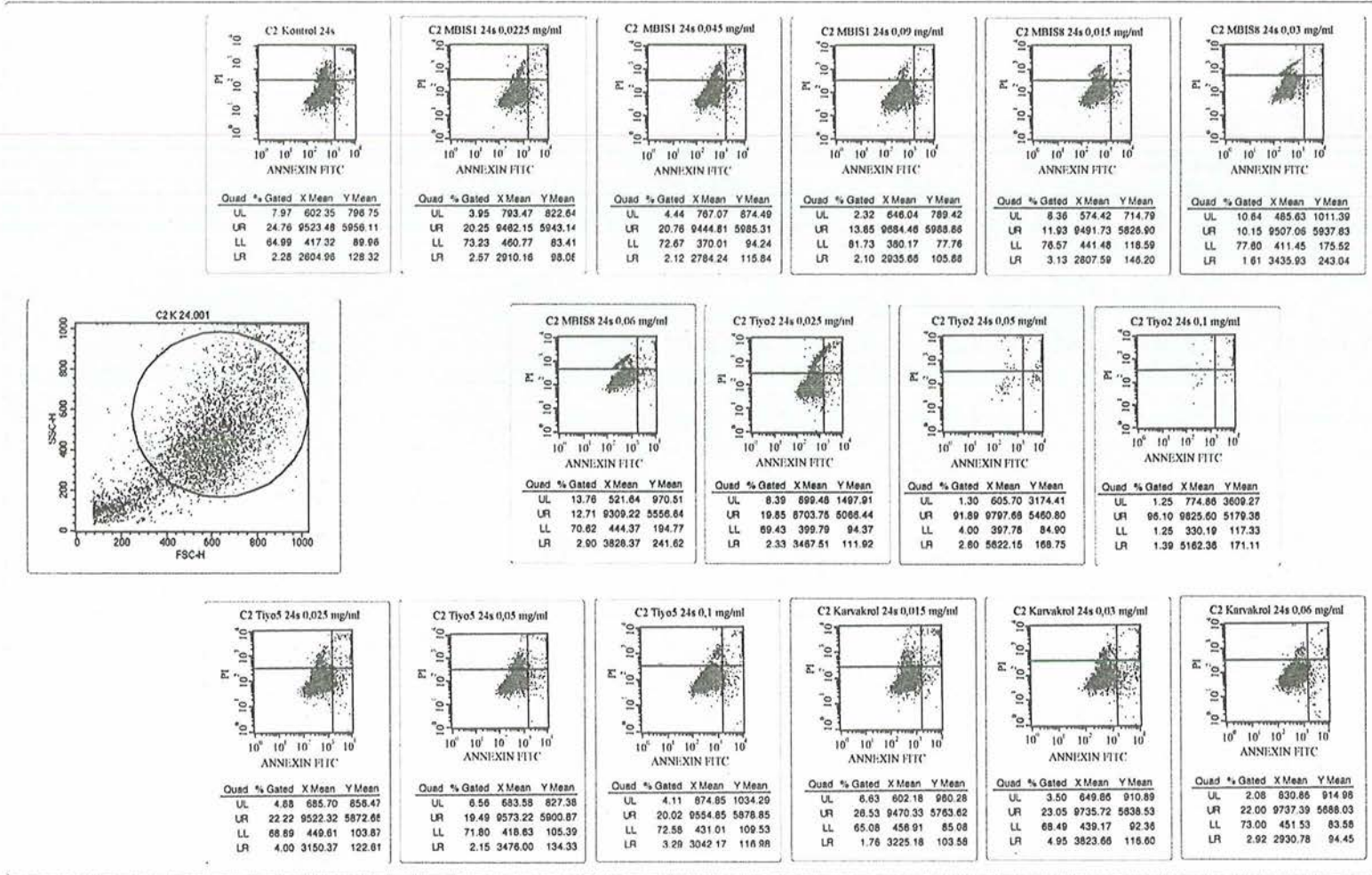
Şekil 3.23. Maddelerin F2408 hücreleri üzerine 24 saat inkübasyon sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları



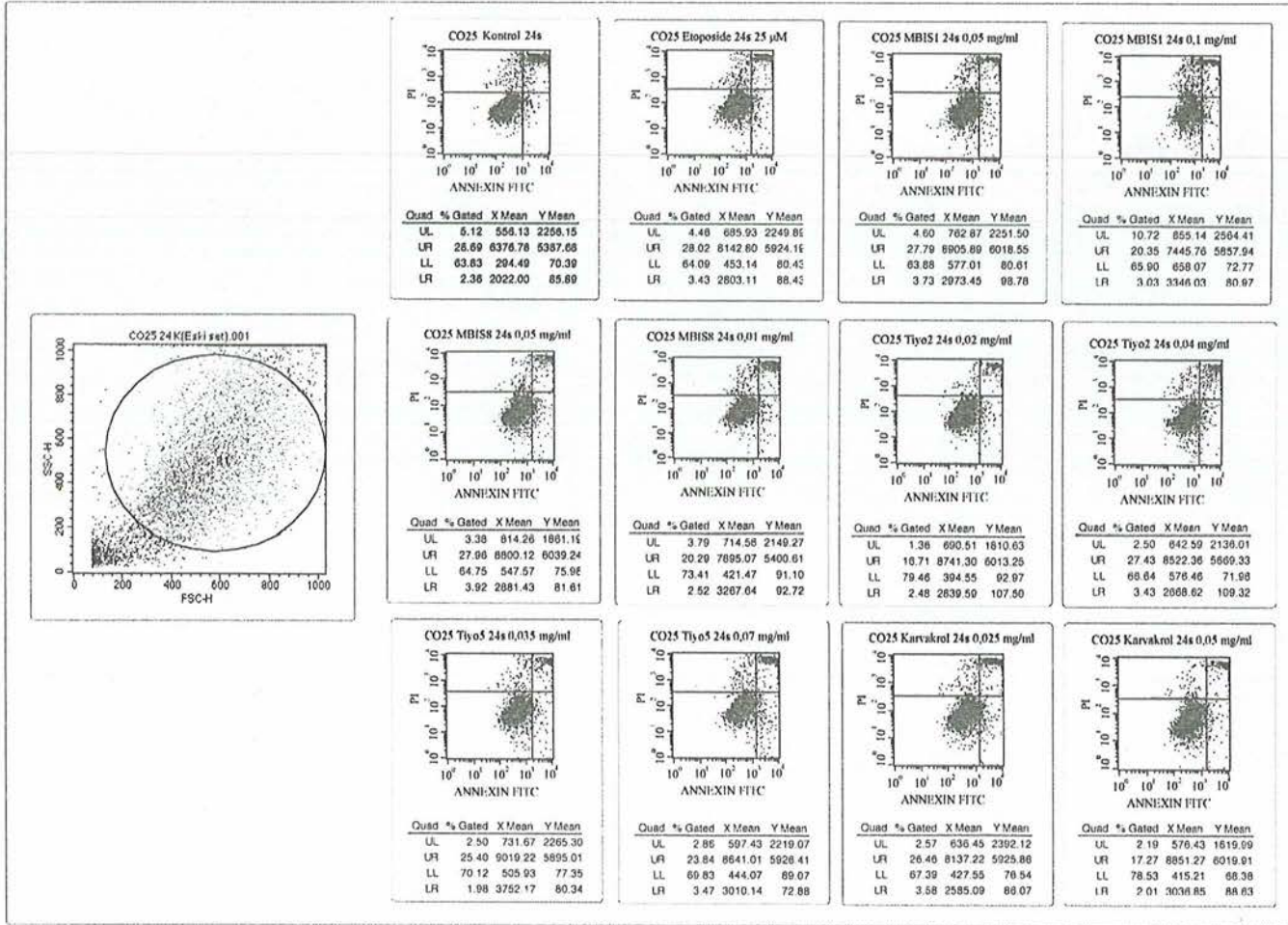
Şekil 3.24. Maddelerin SRP7 hücreleri üzerine 24 saat inkübasyon sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları



Şekil 3.25. Maddelerin SRP7 hücreleri üzerine 48 saat inkübasyon sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları



Şekil 3.26. Maddelerin C2 hücreleri üzerine 24 saat inkübasyon sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları



Şekil 3.27. Maddelerin CO25 hücreleri üzerine 24 saat inkübasyon sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları

3.5. Bileşenlerin Geç Apoptozis Üzerine Etkileri

Test bileşenlerinin 5RP7, CO25 ve kontrol F2408, C2 hücrelerinin DNA'sı üzerine etkileri DNA agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir. Bu yöntem DNA merdiveni yada oligonükleozomal bantların oluşumuna bağlı olarak apoptozisi tespit eden klasik bir yöntemdir. Hücreler her bir madde ile 9, 16 ve 24 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin genomik DNA'ları fenol / kloroform / izoamilalkol ekstraksiyon yöntemi ile izole edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.28, 3.29, 3.30, 3.31 ve 3.32 de özetlenmiştir.

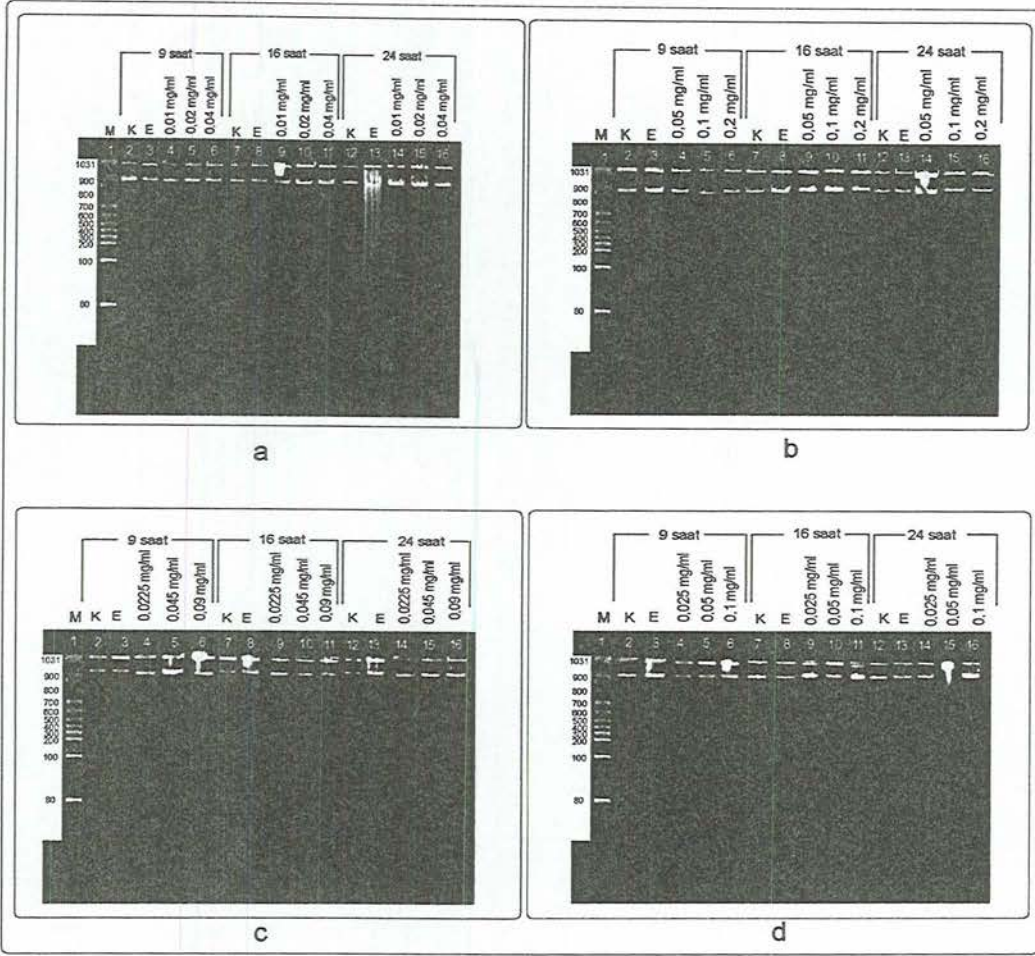
MBİS1 ile yapılan çalışma göstermiştir ki, 25 µM etoposid (pozitif kontrol) 24 saat inkübasyondan sonra F2408 kontrol hücre DNA'sında kırılmalara neden olurken (Şekil 3.28a), MBİS1'in farklı konsantrasyonları (0,01-0,02-0,04 mg/ml) ve farklı inkübasyon süreleri F2408 kontrol hücrelerinde herhangi bir etkiye sahip değildir. Benzer şekilde bu bileşen 5RP7 hücre genomik DNA'sında kırılmaya neden olmamıştır (Şekil 3.28b). CO25 (Şekil 3.28d) ve C2 kontrol hücrelerinde de herhangi bir etki tespit edilmemiştir (Şekil 3.28c).

Diğer bir benzen türevi olan ve -NO₂ yan grubuna sahip MBİS8'in ise MBİS1'in (-Fenil) etki mekanizmasının aksine 0,005 mg/ml ve 9 saat ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda 5RP7 hücrelerinde DNA fragmentasyonuna neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.29b). Bunun aksine F2408 (Şekil 3.29a), C2 (Şekil 3.29c) ve CO25 (Şekil 3.29d) hücre DNA'sı üzerine etkisiz olduğu tespit edilmiştir.

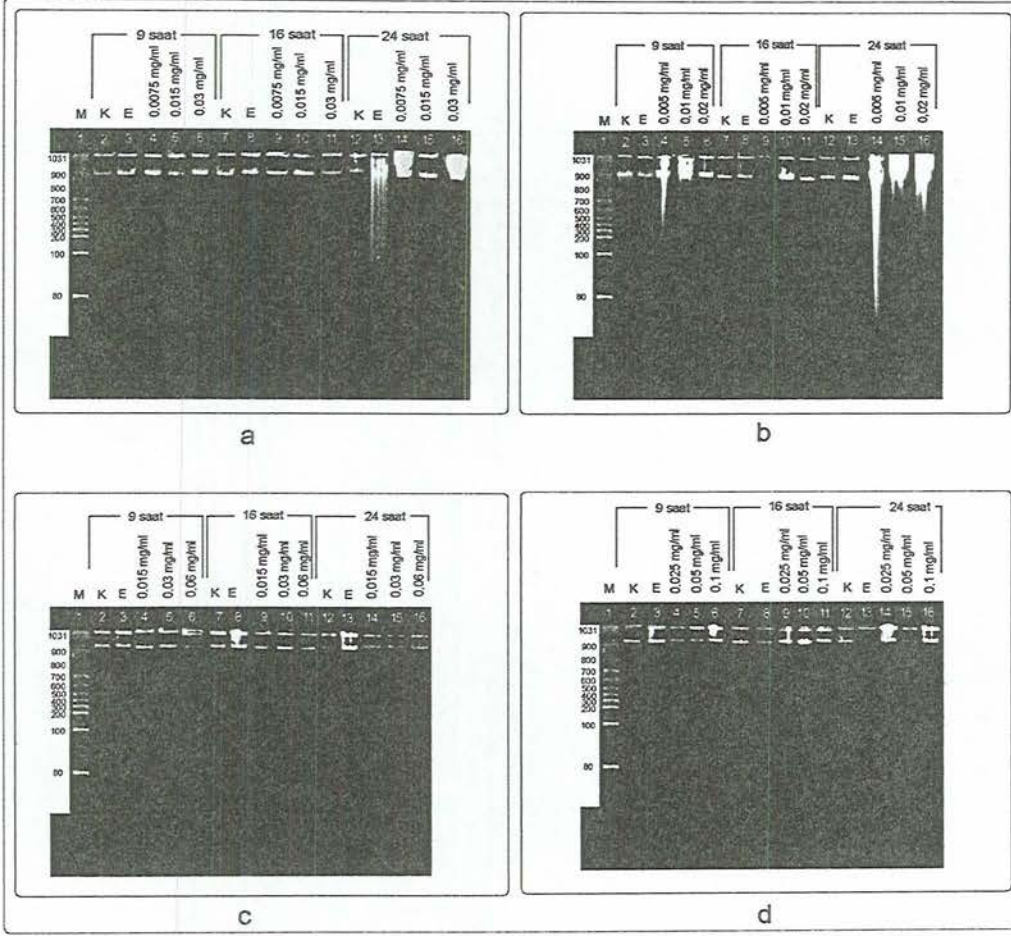
Metoksifenil substitüentine sahip T5 thiohydantoin türevi ile inkübasyon sonucunda dört hücre tipinde de internükleozomal DNA parçalanmasına rastlanmazken (Şekil 3.31, a, b, c ve d), fenil substitüentine sahip T2 türevi yalnızca 5RP7 hücrelerinde 24 saat sonra DNA fregmantasyonuna neden olmuştur (Şekil 3.30b). Diğer hücre tiplerinde DNA parçalanması tespit edilememiştir (Şekil 3.30a, c, ve d).

Doğal bileşen olan karvakrol'ün genomik DNA fragmentasyonu üzerine etkisi benzen ve tiyohidantoin türevlerinin etkilerine benzerlik göstermektedir. Şekil3.32a'da gösterildiği gibi karvakrol yalnızca konsantrasyona bağlı olarak H-ras aktif ve kontrol hücre tipinde DNA fragmentasyonuna neden olmuştur (Şekil 3.32a, b). 0,02 mg/ml (IC₅₀ alt konsantrasyonu) karvakrol'ün 24 saat inkübasyonu

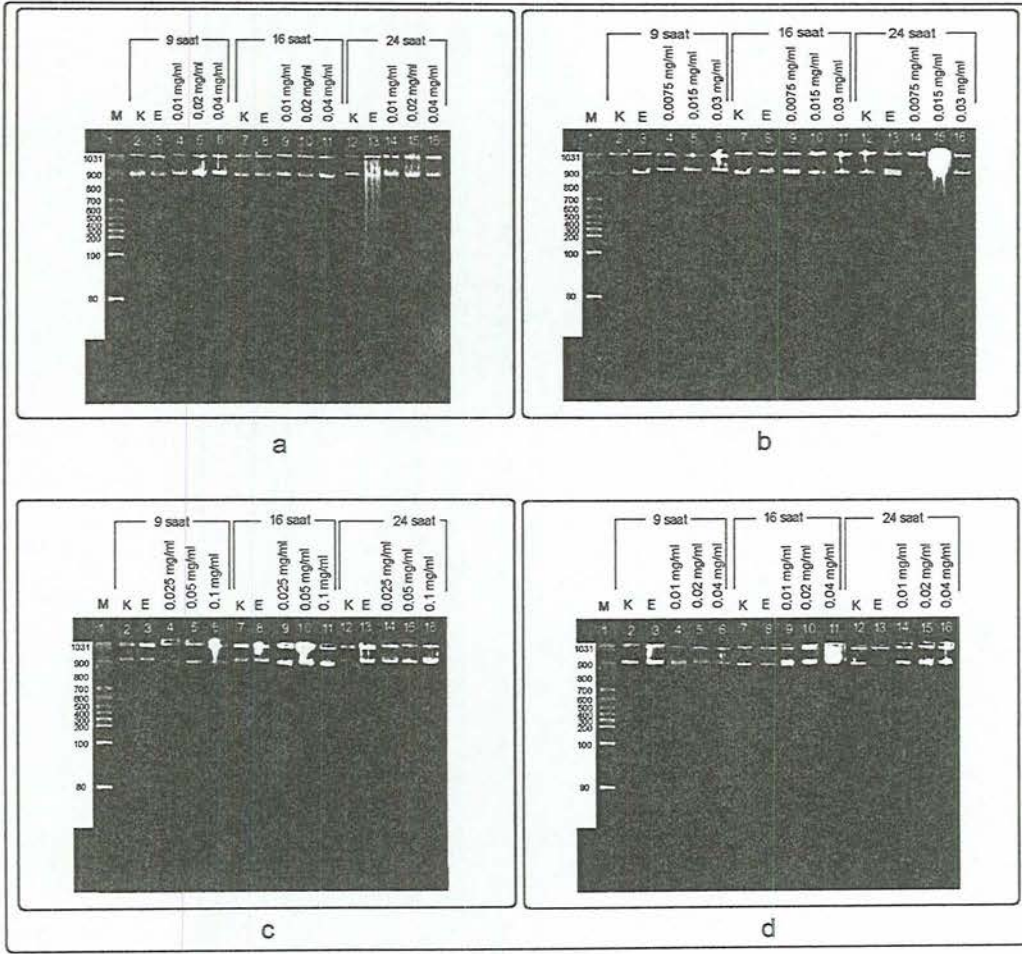
sonucu kontrol F2408 hücrelerinde DNA merdiven yapısı gözlenirken, *H-ras* hücrelerde ise bu yapı 9 veya 24 saat inkübasyon süresi bitiminde IC_{50} konsantrasyonunda ortaya çıkmıştır (Şekil 3.32b). C2 ve CO25 hücre DNA'sında ise karvakrol muamelesi sonrasında kırılma gözlenmemiştir (Şekil 3.32c, d).



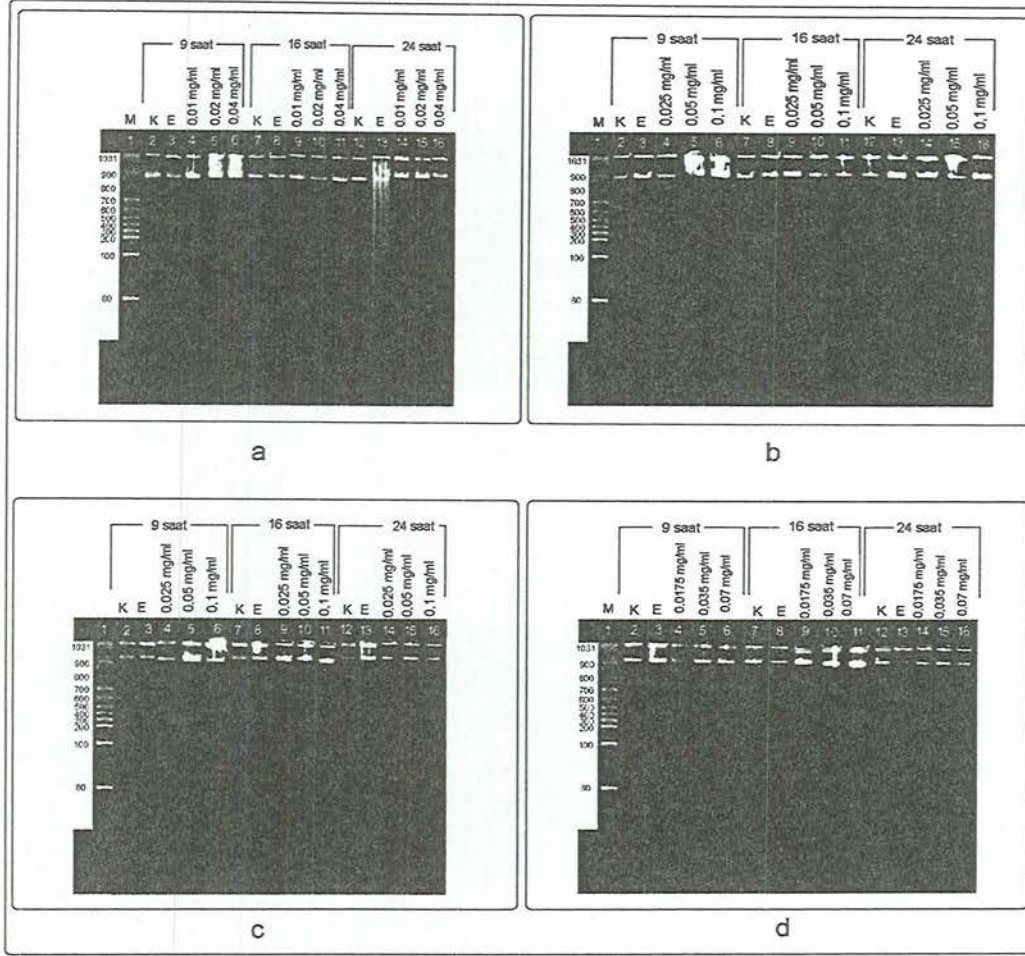
Şekil 3.28. Zamana ve doza bağımlı DNA fragmentasyonu. (a) MBİS1'in farklı konsantrasyonlar ile (0,01-0,02-0,04 mg/ml) 9, 16 ve 24 saat muamele edilmiş F2408 kontrol hücreleri, (b) 0,05-0,1-0,2 mg/ml madde ile inkübe edilmiş 5RP7 hücreleri, (c) 0,0225-0,045-0,09 mg/ml (IC_{50} değeri) madde ile 9, 16 ve 24 saat MBİS1 ile inkübe edilmiş C2 kontrol hücreleri, (d) 0,025-0,05-0,1 mg/ml (IC_{50} değeri) madde ile inkübe edilmiş CO25 hücreleri. Genomik DNA fenol/kloroform/izoamilalkol ile ekstraksiyon yöntemi ile izole edilmiştir. Daha sonra %1,2 lik agaroz jel üzerinde elektroforez işlemine tabi tutulan genomik DNA etidyum bromür ile boyanmıştır. M, DNA marker; K, maddesiz kontrol hücreler; E, 25 μ M ile muamele edilmiş pozitif kontrol.



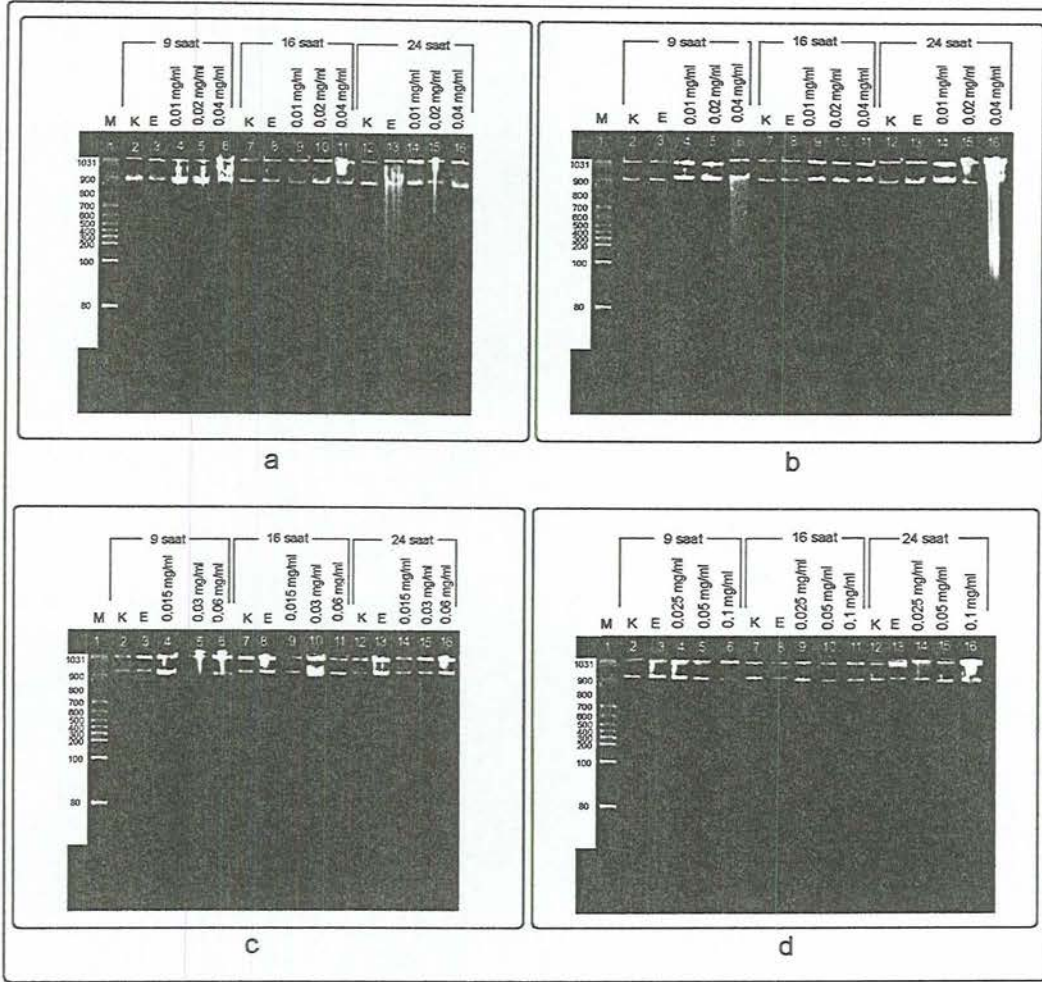
Şekil 3.29. Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi. (a) MBİS8'in farklı konsantrasyonlar ile (0,0075-0,015-0,03 mg/ml) 9, 16 ve 24 saat muamele edilmiş F2408 kontrol hücreleri, (b) 0,005-0,01-0,02 mg/ml madde ile inkübe edilmiş 5RP7 hücreleri, (c) 0,015-0,03-0,06 mg/ml (IC_{50} değeri) madde ile 9, 16 ve 24 saat MBİS8 ile inkübe edilmiş C2 kontrol hücreleri, (d) 0,025-0,05-0,1 mg/ml (IC_{50} değeri) madde ile inkübe edilmiş CO25 hücreleri



Şekil 3.30. Tiyohidantoin türevi olan Tiyo2'nin apoptozis üzerine etkisi. (a) Tiyo2'nin farklı konsantrasyonlar ile (0,01-0,02-0,04 mg/ml) 9, 16 ve 24 saat muamele edilmiş F2408 kontrol hücreleri, (b) 0,0075-0,015-0,03 mg/ml madde ile inkübe edilmiş 5RP7 hücreleri, (c) 0,025-0,05-0,1 mg/ml (IC_{50} değeri) madde ile 9, 16 ve 24 saat Tiyo2 ile inkübe edilmiş C2 kontrol hücreleri, (d) 0,01-0,02-0,04 mg/ml (IC_{50} değeri) madde ile inkübe edilmiş CO25 hücreleri. 1×10^6 hücre liziz edildikten sonra DNA ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra DNA fragmentasyonu agaroz jel üzerinde incelenmiştir.



Şekil 3.31. Tiyohidantoin türevi olan Tiyo5'nin apoptozis üzerine etkisi (a) Tiyo5'nin farklı konsantrasyonlar ile (0,01-0,02-0,04 mg/ml) 9, 16 ve 24 saat muamele edilmiş F2408 kontrol hücreleri, (b) 0,0025-0,05-0,1 mg/ml madde ile inkübe edilmiş 5RP7 hücreleri, (c) 0,025-0,05-0,1 mg/ml (IC_{50} değeri) madde ile 9, 16 ve 24 saat Tiyo5 ile inkübe edilmiş C2 kontrol hücreleri, (d) 0,0175-0,035-0,07 mg/ml (IC_{50} değeri) madde ile inkübe edilmiş CO25 hücreleri. 1×10^6 hücre lizis edildikten sonra DNA ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra DNA fragmentasyonu agaroz jel üzerinde incelenmiştir.



Şekil 3.32. Karvakrol'ün apoptozis üzerine etkisi (a) Karvakrol'ün farklı konsantrasyonlar ile (0,01-0,02-0,04 mg/ml) 9, 16 ve 24 saat muamele edilmiş F2408 kontrol hücreleri, (b) 0,01-0,02-0,04 mg/ml madde ile inkübe edilmiş 5RP7 hücreleri, (c) 0,015-0,03-0,06 mg/ml (IC_{50} değeri) madde ile 9, 16 ve 24 saat Karvakrol ile inkübe edilmiş C2 kontrol hücreleri, (d) 0,025-0,05-0,1 mg/ml (IC_{50} değeri) madde ile inkübe edilmiş CO25 hücreleri. Belirli sayıdaki hücre liziz edildikten sonra DNA ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra DNA fragmentasyonu agaroz jel üzerinde incelenmiştir.

3.6. Bileşenlerin Pro-apoptotik Bax Protein Ekspresyonu Üzerine Olan Etkileri

MBİS8'in 5RP7 hücre içi protein aktivasyon sonuçlarına baktığımızda marker'in yoğun yüklenmesi nedeni ile bantlar ayrılmamış oldukları gözlenmektedir. Bu nedenle jelde 46 kd'dan düşük molekül ağırlıklı proteinlerin ekspresyonunun gözlenmesine rağmen spesifik olarak Bax'ın eksprese edildiğini söylemek mümkün değildir. Ancak özellikle 1,5 saat inkübasyon sonucunda total protein dağılımına bakılırsa, kontrole nazaran 25 μ M Etoposid varlığında ya da 0,0006 mg/ml MBİS8 varlığında bazı proteinlerin ekspresyonunun inhibe edildiği gözlenmiştir (Şekil 3.33a). Tüm kuyucuklara eklenen protein miktarı 100 μ g'dır.

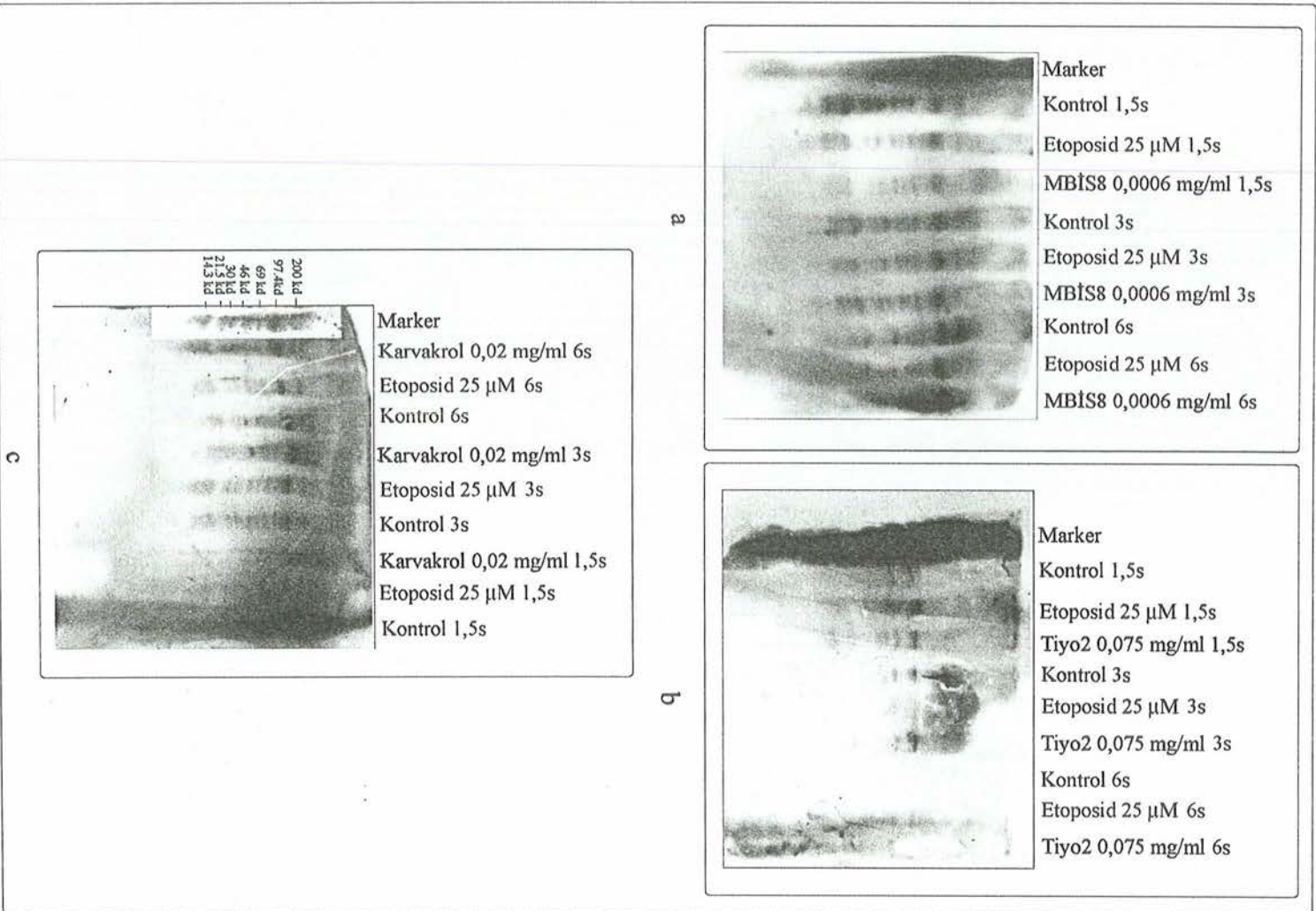
Yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin varlığı hem kontrol 5RP7, hem 25 μ M Etoposid, hem de 0,0075 mg/ml Tiyo2 inkübasyonu sonucu tespit edilmiştir. Bu proteinlerin bazılarının Etoposid ve Tiyo2 varlığında kontrole göre daha yoğun bir şekilde ekspres edildiği bulunmuştur. Düşük molekül ağırlığında (>46 kd) olan proteinlerin (Bax) ekspresyonu gözlenmemiştir (Şekil 3.33b).

0,02mg/ml Karvakrol muameleli hücelere bakıldığında ise, 6 saat inkübasyon sonrası düşük molekül ağırlıklı (21 kd) Bax proteininin eksprese olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca Karvakrol muameleli hücelerde normal ve 25 μ M Etoposid muameleli hücelere nazaran diğer proteinlerin de ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir.

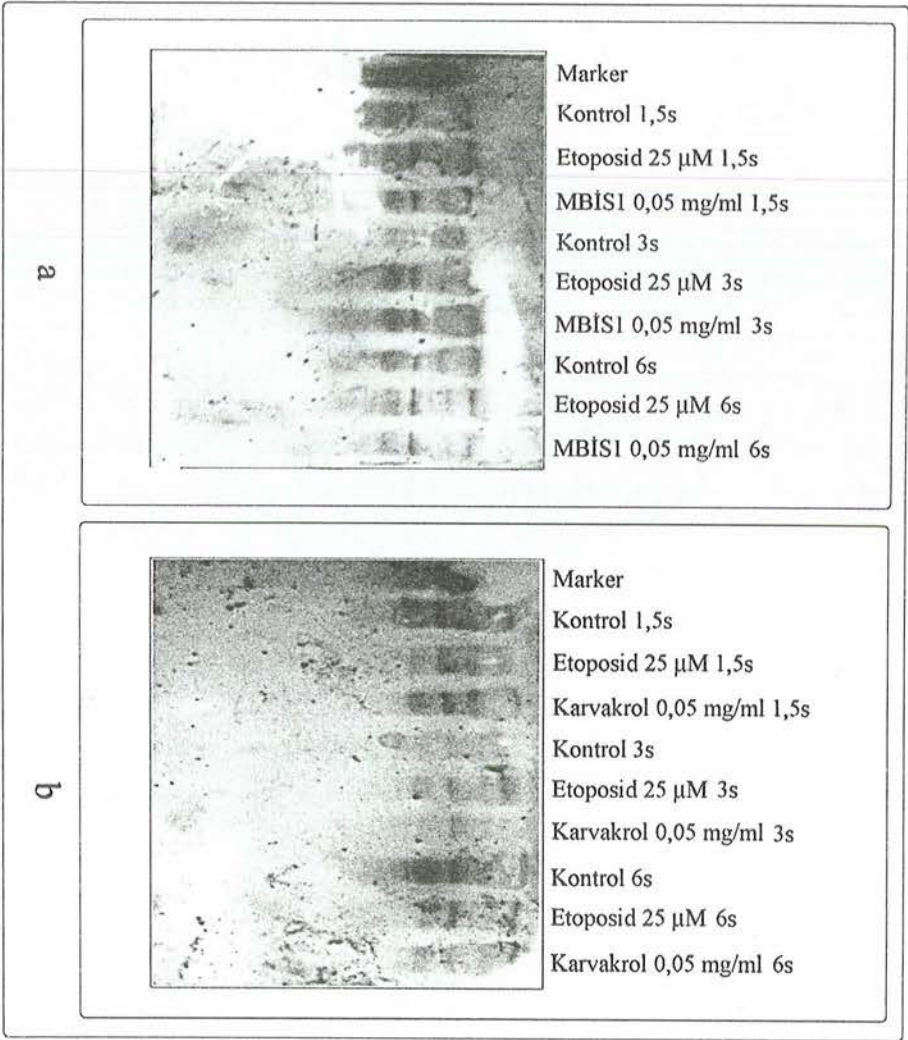
0,05 mg/ml MBİS1 muameleli CO25 hücelerinde yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin eksprese edildiği gözlenmiş, düşük molekül ağırlıklı Bax proteini ile ilgili bantlar gözlenememiştir (Şekil 3.34a). 0,05 mg/ml Karvakrol muameleli hücelerde de MBİS1 sonuçlarındakiler ile benzer şekilde bantlar gözlenmiş, düşük molekül ağırlıklı bantlar gözlenememiştir (Şekil 3.34b).

Şekil 3.35b'deki Marker'a baktığımızda bantlar ayrılmamış olduğundan dolayı elde edilen bantların boyutu hakkında yorum yapmamız mümkün değildir. Ancak 50 nM PLC inhibitörü varlığında Etoposid'in hücelerde neden olduğu protein aktivasyonunda bir azalma gözlenmektedir (Şekil 3.35b). 250 nM PKC inhibitörü varlığında Etoposid'in etkisi ise 50 nM PLC inhibitörüne göre daha fazla olup, protein aktivasyonunda daha fazla azalmaya neden olmuştur. PKC inhibitörünün dozunun artırılması ile (500 nM) protein aktivasyonunun daha

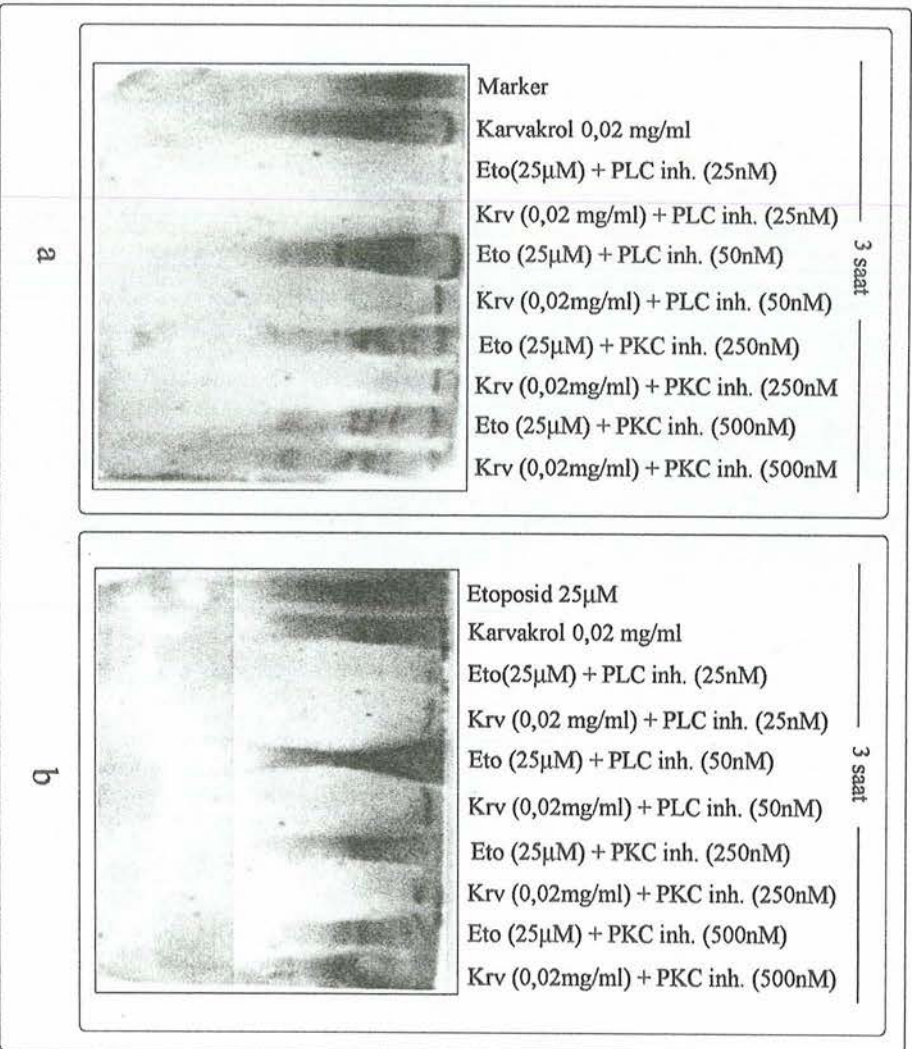
fazla inhibe edildiği gözlenmiştir (Şekil 3.35b). Karvakrol de Etoposid'e benzer şekilde 500 nM PKC inhibitörü varlığında protein aktivasyonunda azalmaya yol açmıştır (Şekil 3.35a).



Şekil 3.33. a. MBIS8'in (0,0006 mg/ml) SRP7 hücre içi protein aktivasyonu , b. Tiyo2'nin (0,0075 mg/ml) SRP7 hücre içi protein aktivasyonu, c. Karvakrol'un (0,02 mg/ml) SRP7 hücre içi protein aktivasyonu



Şekil 3.34. a. MBIS1'in (0,05 mg/ml) CO25 hücre içi protein aktivasyonu , **b.** Karvakrol'ün (0,05 mg/ml) CO25 hücre içi protein aktivasyonu



Şekil 3.35. a. Karvakrol'ün PKC inhibitörü ve PLC inhibitörü varlığında 5SRP7 hücre içi protein aktivasyonuna etkisi, **b.** Karvakrol'ün PKC inhibitörü ve PLC inhibitörü varlığında 5SRP7 hücre içi protein aktivasyonuna etkisi (PKC inh.: Protein Kinaz C inhibitörü, PLC inh.: Fosfolipaz C inhibitörü, Eto: Etoposide, Krv: Karvakrol)

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sentetik olarak sentezlenen MBİS1 (-fenil), MBİS2(-4-metilfenil), MBİS8 (-nitro), Tiyo1(-etil), Tiyo2 (-fenil), Tiyo5 (-4-metoksifenil) türevleri ve doğal bileşen olan, kekik bitkisinde bol miktarda bulunan Karvakrol'un N-ras onkogeni taşıyan CO25 ve H-ras onkogeni taşıyan 5RP7 hücrelerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca bu hücrelerin kontrol hücre grupları olan C2 (fare iskelet kası) ve F2408 (sıçan embriyo fibroblast) hücreleri üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması olarak araştırılması amaçlanmıştır.

1,2(3)(4)(5)-Bis (substitüe) benzen çekirdeğini taşıyan bileşiklerin antitümör [Hoye ve Ye 1996, Nozoe 1994] ve sitotoksik [Sato ve ark. 1995] etkileri bazı gruplar tarafından bulunmuştur. Laboratuvarımızda 1,3 Bis (heteroaril substitüe) benzen türevlerinin F2408 hücrelerinde hücre içi Ca^{+2} seviyesini plazma zarındaki Ca^{+2} kanallarını etkileyerek arttırdığı da tespit edilmiştir [Meriç ve ark. 2001]. Sitolitik kalsiyum konsantrasyonundaki değişimler çeşitli ekstraselüler sinyalleri sekresyondan harekete, çoğalmaya hatta hücre ölümü gibi hücre içi apoptotik ve nekrotik [Berridge ve ark. 2000] etkilere çevirirler [Pinton ve ark. 2002]. Artan hücre içi kalsiyum konsantrasyonu aynı zamanda nükleaz aktiviteden de sorumludur ve DNA fragmentlerinin (50 kb) oluşması için gereklidir [Zhivotovsky ve ark. 1994b]. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda bahsettiğimiz hücre hatlarını apoptozise götürebileceğini düşündüğümüz MBİS1, MBİS2 ve Ca^{+2} kanallarına etkisiz MBİS8'i kullanmayı düşündük. Bahsedilen türevlerin sitotoksikite testleri ilk kez tarafımızdan yapılarak MBİS1'in IC_{50} değerlerinin F2408 hücreleri için 0,04 mg/ml (77,8 μ M) (Şekil 3.1a) ve 5RP7 hücreleri için 0,002 mg/ml (3,9 μ M) olduğu bulunmuştur (Şekil 3.1b). Buradan maddenin H-ras aktif hücreler için daha toksik olduğunu söylemek mümkündür. Hücre canlılığı üzerinde yapılan bir diğer test olan Tripan mavisi boyama sonuçları da MTT'yi destekler niteliktedir (Şekil 3.8 a,b). 5RP7 hücrelerindeki morfolojik değişimlerde ise apoptotik hücre diyebileceğimiz bulgulara rastlanmıştır (Şekil 3.13). Ancak Annexin V ile boyanan erken apoptotik hücrelere, gerçekleştirilen deney süresince rastlanamamıştır (24 ve 48 saat) (Şekil 3.24 ve 3.25). Agaroz jel elektroforezi sonuçlarına baktığımızda ise DNA fregmentasyonu görüntüsüne neden olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.28a, b).

Maddenin C2 ($IC_{50}= 0,1 \text{ mg/ml}= 175 \text{ }\mu\text{M}$) ve CO25 ($IC_{50}= 0,09 \text{ mg/ml}= 194 \text{ }\mu\text{M}$) hücrelerinin her ikisinde de zamana ve konsantrasyona bağlı bir toksisite gösterdiğinden dolayı CO25 hücrelerine spesifik bir etkiden söz edilemez (Şekil 3.1c, d). Ancak maddenin CO25 hücrelerindeki etkisi morfolojik olarak incelendiğinde hücrelerin toplu yapılarını kaybettiği ve zamanla hücrede konsantrasyona bağlı olarak vakuoller oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 3.18). 5RP7 hücrelerinde olduğu gibi CO25'lerde de bu madde ile DNA fragmentasyonuna rastlanmamıştır (Şekil 3.28c, d).

Apoptozisde her zaman DNA fragmentasyonu gözlenmeyebilir. Oberhammer ve arkadaşlarının (1993) yaptığı bir çalışmada, mutasyon sonucunda Kaspaz-3 proteazından yoksun MCF-7 meme kanseri hücrelerinin DNA fragmentasyonu göstermeden proapoptotik uyarı ile apoptozise gittiği gözlenmiştir. CO25 hücrelerinde madde sitümlasyonu sonucu DNA fragmentasyonu göstermemesinin nedenlerinin araştırılması gerekmektedir.

Diğer bir bileşik olan MBİS2'nin elimizdeki verilere göre H-ras aktif hücrelerde kontrole ($IC_{50}= 0,07 \text{ mg/ml}= 122,8 \text{ }\mu\text{M}$) oranla $0,02 \text{ mg/ml}$ ($35,1 \text{ }\mu\text{M}$) IC_{50} değeriyle toksik bir etkiye sahiptir. Ancak maddelerin N-ras aktif hücrelere spesifik bir toksisite göstermediği de bulgularımız arasındadır (IC_{50} C2= $0,06 \text{ mg/ml}= 105 \text{ }\mu\text{M}$ ve IC_{50} CO25= $0,1 \text{ mg/ml}= 175 \text{ }\mu\text{M}$).

Nitro substitüenti taşıyan MBİS8 bileşiğinde MTT ve Tripan mavisi boyama sonuçlarına baktığımızda normal hücrelere oranla anlamlı bir şekilde H-ras aktif hücrelerine toksik olduğunu gözlemledik ($IC_{50}= 0,0006 \text{ mg/ml}= 1,5 \text{ }\mu\text{M}$). Akridin oranj / etidyum bromür ile boyanan hücrelerde de özellikle morfolojik olarak 24 saatte apoptotik hücrelere rastlanmıştır (Şekil 3.14f) ve $IC_{50}/4$ değerinde de 5RP7 hücrelerini DNA fragmentasyonuna neden olarak apoptozise götürdüğünü söylemek mümkündür (Şekil 3.29b). MBİS8'in sitotoksikite bulgularına göre N-ras aktif hücrelere spesifik bir etki gösterdiği maddenin C2 normal hücrelere daha toksik olmasına dayanarak söylenemez (C2 $IC_{50}= 0,06 \text{ mg/ml}= 150 \text{ }\mu\text{M}$ ve CO25 $IC_{50}= 0,1 \text{ mg/ml}= 250 \text{ M}$). Ancak maddelerin düşük konsantrasyonda ($0,0002 \text{ mg/ml}$) CO25 hücrelerinde daha fazla sitotoksikiteye neden olduğu ve bu sonuçların Tripan mavisi boyama sonuçları ile de tutarlı olduğu gözlenmiştir. Maddenin kullanılan konsantrasyon ve zamanda morfolojik

olarak apoptotik hücelere de neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.19). Yine agaroz jelde DNA fragmentasyonu görüntüsüne rastlanmamıştır (Şekil 3.29d)

Hidantoin ve tiyohidantoin türevlerinin etkileri uzun zamandır bilinmektedir. Üre grubu içeren hidantoin çekirdeğinin antikanser [Süzen ve Büyükbingöl 2000] etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu çekirdekte değişen substitüente göre etkiler de değişmektedir. Khodair ve arkadaşlarının (2001) yaptığı bir çalışmada 2-tiyohidantoinin glikozillenmesi sonucu herhangi bir antiviral yada anitümoral etki göstermediği gözlenmiştir. Etkilerine baktığımız 3-substitüe-2-tiyohidantoin türevleri ile ilgili antikanser aktivite çalışması daha önce yapılmamış ve sadece F2408 hüceleri üzerine sitotoksisite laboratuvarımızda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Tiyo1'in IC_{50} değerinin $200 \pm 40 \mu M$, Tiyo2'nin $240 \pm 80 \mu M$ olduğu ve Tiyo5'in diğer bileşenlere göre daha toksik olduğu ve IC_{50} değerinin $50 \pm 10 \mu M$ olduğu gözlenmiştir [İncesu ve ark. 2003]. Bizim çalışmamızda da yukarıdaki bulgularla tutarlı bir şekilde Tiyo1'in IC_{50} değeri 0,04 mg/ml ($270 \mu M$), Tiyo2'nin 0,04 mg/ml ($208 \mu M$), Tiyo5'i bu bileşenlerden daha toksik olduğu ve IC_{50} değeri 0,04 mg/ml ($180 \mu M$) olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak F2408 hücrelerinin H-ras onkogeni transforme edilmiş 5RP7 hücrelerindeki etkisi de incelenmiş ve Tiyo1'in IC_{50} değerinin 0,03 mg/ml ($208 \mu M$), Tiyo2'nin 0,03 mg/ml ($156 \mu M$) ve Tiyo5'in de 0,01 mg/ml ($45 \mu M$) olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.1). Bu sonuçlara göre her üç madde de F2408 kontrol hücrelerine göre daha toksiktir. Tiyo1'in N-ras aktif CO25 hücrelerine etkisi 24 saatte kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı değildir. Ancak ($IC_{50} C2 = 0,07$ mg/ml = $486 \mu M$ ve $IC_{50} CO25 = 0,1$ mg/ml = $694 \mu M$) 48 saat sonunda CO25 hücrelerinde Tiyo2'nin kontrol hücrelerine göre anlamlı sitotoksik etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz (Şekil 3.9d).

Tripan mavisi boyama sonuçlarına baktığımızda Tiyo2 ve Tiyo5'in hücreler üzerindeki etkisinin MTT deneyi sonuçlarına paralel olduğunu ve özellikle Tiyo2'nin $IC_{50}/2$ değeri olan 0,02 mg/ml konsantrasyonda 24 saat inkübasyon sonucu maddenin daha etkili olduğunu gözlemledik (Şekil 3.1a, b) Tiyo5'in ise $IC_{50}/2$ değeri olan 0,015 mg/ml konsantrasyonda benzer bir şekilde etki göstermiştir. Akridin oranj boyama sonuçlarına göre de Tiyo2 maddesinin hem IC_{50} hem de $IC_{50}/2$ değerinde sitotoksisite sonuçlarını destekler nitelikte

hücreleri apoptozis yoluyla 8 saat ve 24 saatte ölüme götürdükleri morfolojik olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.15d). Fenil grubu taşıyan Tiyo2'nin sadece H-ras aktif hücrelerde $IC_{50}/2$ değerinde 24 saat sonunda DNA fragmentasyonuna yol açması maddenin düşük konsantrasyonda da etkili olabileceğinden dolayı sevindiricidir (Şekil 3.30).

Tiyo2'nin CO25 hücrelerinde ($IC_{50}= 0,04 \text{ mg/ml}= 208 \text{ } \mu\text{M}$) özellikle düşük konsantrasyonda C2 kontrole göre ($IC_{50}= 0,1 \text{ mg/m}= 520 \text{ } \mu\text{M}$) daha anlamlı sitotoksik etkiler gösterdiği gözlenmiştir (0,001 mg/ml'de). Sonuçlar diğer alternatif metodla da desteklenmiştir ve morfolojik olarak da apoptotik hücrelere ve bozulmuş hücre yapılarına rastlanmıştır (Şekil 3.20).

Tiyo5'in N-ras aktif hücrelerdeki ($IC_{50}= 0,07 \text{ mg/ml}= 318 \text{ } \mu\text{M}$) etkileri de Tiyo2 ile benzerlik göstermektedir. Düşük konsantrasyonda (0,0002 mg/ml) CO25 hücrelerine daha toksik olduğu gözlenmiştir. Bulgular diğer alternatif metodla da paralellik göstermekte ve yine hücrelerde de morfolojik olarak toplu yapılarda dağılmalar ve sitoplazmada küçülmeler gözlenmiştir.

Karvakrol kekik bitkisinde doğal olarak bulunan bir fenolik monoterpindir [Kırimer 1995]. Yapılan çalışmalarda çeşitli etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. Zeytinoğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, karvakrol'ün melanoma hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gözlenmiştir [Zeytinoğlu ve ark. 1998, He ve ark. 1997]. İnsan larinks karsinomasından köken alan Hep-2 hücrelerinde IC_{50} değerinin 0,2 mM olduğu gözlenmiş [Stammati ve ark. 1999] ve bu değer bizim çalışmamızda bulunan 5RP7 için 0,04 mg/ml IC_{50} değeri ile uyuşmamaktadır. Bunun nedeni hücre tipi ile ilgili olabileceği gibi karvakrol'ün saflığı ile de ilgili olabilir. Karvakrol ile ilgili CO25 hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada da Karvakrol'ün hücrelerde IC_{50} değerinin 60 $\mu\text{g/ml}$ olduğu bulunmuştur [Zeytinoğlu ve ark. 2003] Bu sonuçları da göz önüne alarak çalışmalarımızda $IC_{50}/2$ değerlerini de kullandık. C2 hücrelerinde ise, IC_{50} değeri 60 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir ve CO25 ile benzer etkiler olduğu ve yalnızca CO25'e spesifik bir etki olmadığı gözlenmiştir. Sonuçlar tripan mavisi boyama yöntemi ile de desteklenmiştir (Şekil 3.12c, d). Morfolojik olarak CO25 hücrelerine bakıldığında ise hem $IC_{50}/2$ hem de IC_{50} değerinde hücrelerde 8 saat ve 24 saat sonrası vakuoller ve apoptotik hücrelerin varlığı gözlenmiştir (Şekil 3.22). Ancak diğer

maddelerde de olduğu gibi agaroz jelde DNA fragmentasyonu ve smear görüntüsüne rastlanmamıştır (Şekil 3.32d). Proapoptotik Bax proteininin ekspresyonu da bulgularımız arasında yoktur. Buradan hareketle karvakrol'ün CO25 hücrelerini sitokrom c salınım yoluyla değil de, ölüm reseptörü aracılıklı yoldan apoptozise götürüyor olabileceğini düşündürmektedir. Mekanizma daha ileriki deneylerle aydınlatılabilir.

H-ras aktif 5RP7 ve F2408 hücrelerinde karvakrol'ün benzer etkiler gösterdiği her iki hücrede de Aynı dozda ($IC_{50}= 0,04$ mg/ml) sitotoksik etki göstermesi etkinin H-ras aktif hücrelere spesifik olmadığını göstermektedir. Bulgular Tripan mavisi boyama yöntemiyle de tutarlıdır (Şekil 3.12a, b). Morfolojik olarak IC_{50} değeri ve al dozunda hücrelerde multinukleuslu yapılar ve apoptotik hücreler gözlenmiştir. Aynı zamanda 0,04 mg/ml jelde smear görüntüsüne rastlanmıştır (Şekil 3.32b). Hücre içi proapoptotik protein olan Bax ekspresyonunun da varlığı hücrelerin mitokondriden sitokrom c salınımı yoluyla apoptozise uğrayabileceklerini düşündürmektedir.

Sonuç olarak 1,3-bis-(heteroaryl substitüe) benzen türevlerinden $-NO_2$ yan grubu taşıyan MBIS8'in diğer türevlere göre kontrollere oranla hem H-ras aktif 5RP7 hem de N-ras aktif CO25 hücrelerinde daha etkili olduğunu söylemek bulgularımız dahilinde mümkündür. Diğer sentetik gruptan (3-substitüe-2-tiyohidantoin) olan -4 -metoksi fenil grubu taşıyan Tiyo5'in kontrole oranla H-ras aktif hücrelerde, fenil grubu taşıyan Tiyo2'nin de N-ras aktif hücrelerde daha etkili olduklarını söylemek mümkündür. Doğal bileşen olan karvakrol'ün ise IC_{50} ve $IC_{50}/2$ dozunun altında da apoptotik etkiler göstermesi normal hücrelere daha az zarar vererek kanserli hücreleri apoptozise götürmesi açısından sevindiricidir. Elde ettiğimiz bulgular etkilerini incelediğimiz maddelerin antineoplastik tedavide kullanılabileceklerini ve klinik yararlarının olabileceğini düşündürmektedir. Ancak kesin bir yargıya varabilmek için in vivo olarak da daha ileri araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- ADAMS, J.M. and CORY S., *The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival*, *Science*, **281**, 1322-1326, (1998).
- ADLER, V., PINCUS, M.R., BRANDTRAU, P.W. and RONAI, Z., *Complexes of p21 (ras) with Jun N-terminal Kinase and Jun Proteins*, *Proc. Natl Acad Sci USA*, **92**, 10585-10589 (1995).
- APOPTOZİS SİNYAL YOLU, <http://www.hokudai.ac.jp/veteri/organization/env/radbiol/apoptosis.gif>.
- ASHKENAZI, A. and DIXIT, V.M., *Death Receptors: Signalling and Modulation*, *Science*, **281**, 1305-1308 (1998).
- BAFFY, G., MIYASHITA T, WILLIAMSON, J.R. and REED, J.C., *Apoptosis Induced by Withdrawal of Interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent Hematopoietic Cell Line Is Associated with Repartitioning of Intracellular Calcium and Is Blocked by Enforced Bcl-2 Oncoprotein Production*, *J. Biol. Chem.*, **268**, 6511-6519, (1993).
- BARBACID, M., *Ras Genes*, *Anu Rev Biochem*, **56**, 779-827 (1987).
- BELLAMY, C.O., *p53 and Apoptosis*, *Br Med Bull*, **53**(3), 522-538 (1997).
- BENNETT, M., MACDONALD, K., CHAN, S.W., LUZIO, J.P., SIMARI, R. and WEISSBERG, P., *Cell Surface Trafficking of Fas: A Rapid Mechanism of p53-mediated Apoptosis*, *Science*, **282**, 290-293, (1998).
- BERRIDGE, M.J., LIIP, P. and BOOTMAN, M.D., *The Versality and Universality of Calcium Signalling*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 11-21 (2000).
- BETTARINI, F., MASSARDO, P., PICCARDI, A. and LONGONI, A., *Hydroquinone Diethers Having a Juvenile Hormone and Acaricide Activity*, *U.S. Pat.*, 4,334,104 (1982).
- BOURNE, H.R., SANDERS, D.A. and McCORMICK, F., *The GTPase Superfamily: Conserved Structure and Molecular Mechanism*, *Nature*, **349**, 117-127 (1991).
- BRADFORD, M.M., *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding*, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- BURITS, M. and BUCAR, F., *Antioxidant Activity of Nigella sativa Essential Oil*, *Phytother Res*, **14**, 323-328 (2000).

CHAN, H.S., GROGAN, T.M., HADDAD, G., DEBOER, G. and LING, V., *P-glycoprotein Expression: Critical Determinant in the Response to Osteosarcoma Chemotherapy*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **89**, 1706-1715 (1997).

CLERMONT, F., ADAM, E., DUMONT, J.E. and ROBAYE, B., *Survival Pathways Regulating the Apoptosis Induced by Tumour Necrosis Factor- α in Primary Cultured bovine Endothelial Cells*, *Cellular Signalling*, **15** (5), 539-546 (2003).

COTTER T.G. and MARTIN S.J., *Techniques in Apoptosis (A User's Guide)*, Portland Press, London, 1996.

DATTA, S.R., DUDEK, H., TaO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y. and GREENBERG, M.E., *Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-intrinsic Death Machinery*, *Cell*, **91**, 231-241, (1997).

DIVE, C., GREGORY, C.D., PHIPPS, D.J., EVANS, D.L., MILNER, A.E. and WYLLIE, A.H., *Analyses and Discrimination of Necrosis and Apoptosis (Programmed Cell Death) by Multiparameter Flow Cytometry*, *Biochimica et Biophysica*, **1133**, 275-285 (1992).

DORN, S., PFIFFNER, A. and ZURFLUH, R., *Pesticidal Propynyloxymethyl Derivatives*, *Eur. Pat. Appl.*, **5**, 710 (1979).

DOWNWARD, J., *Ras Signalling and Apoptosis*, *Current Opinion in Genetics & Development*, **8**, 49-54 (1998).

DOWNWARD, J., *Regulatory Mechanisms for Ras Proteins*, *BioEssays*, **14** (3), 177-183 (1992).

DUNBER, B.S., *Protein Blotting A Practical Approach*, Oxford University Press, 1994.

EARNSHAW, W.C., MARTINS, L.M. and KAUFFMANN, S.H., *Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates and Functions During Apoptosis*, *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 383-424 (1999).

ENOMOTO, M., TAKAHASHI, J., KUSABA, T., SUGANO, M., MATSUNAGA, R. and TAMAOKI, M., *Preparation of 2-cyano-1-dimethylsulfamoyl-5,6-bis(1', 1', 2', 2'-tetrafluoroethoxy) benzimidazole as Horticultural and Agrochemical Fungicid*, *Jpn. Pat.*, **4**, 308, 580 (1992).

FEARNHEAD, H.O., RODRIGUEZ, J. and GOVEK, E.E., *Oncogene-dependent apoptosis is mediated by Caspase-9*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **95** (23), 13664-13669 (1998).

FEIG, L.A. and BUCHSBAUM, R.J., *Cell Signaling: Life or Death Decisions Dispatch of Ras Proteins*, *Current Biology*, **12**, 259-261 (2002).

FRANKS, L.M. and TEICH, N.M., *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, 3rd ed., Oxford University Press, New York, 1998.

GARBISA, S., POZZATTI, R., MUSCHEL, R.J., SAFFIOTTI, U., BALLIN, M., GOLDFARB, R.H., KHOURY, G. and LIOTTA, L.A., *Secretion of Type IV Collogenolytic Protease and Metastatic Phenotype: Induction by Transfection with c-HA-ras but not c-Ha-ras plus Ad2-Ela*, *Cancer Research*, **47** (6), 1523-1528 (1987).

GE, Y., LI, Z-H., MARSHALL, M.S., BROXMEYER, H.E. and LU, L., *Involvement of H-ras in Erythroid Differentiation of TF1 and Human Umbilical Cord Blood CD34⁺⁺⁺ Cells*, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **24** (8), 124-136 (1998).

GERHART, J., BAST, B., NEELY, C., IEM, S., AMEGBE, P., NIEWENHUIS, R., MIKLASZ, S., CHENG, F. and GEORGE-WEINSTEIN, M., *MyoD-positive Myoblasts Are Present in Mature Fetal Organs Lacking Skeletal Muscle*, *J. Cell Biol.*, 2001; **155** (3), 381 – 392 (2001).

GIRIJAVALLABHAN, V.M., GANGULY, A.K., VERSACE, R., SAKSENA, A.K. and PINTO, P.A., *Orally Active Antiviral Phenolic Diethers*, *Eur. Pat. Appl.*, **519**, 702 (1992).

GOSSETT, L.A., ZHANG, W. and OLSON, E., *Dexamethasone-dependent Inhibition of Differentiation of C2 Myoblasts Bearing Steroid-Inducible N-ras Oncogene*, *J. Cell. Biol.*, **106**, 2127-2137 (1988).

GOTTESMAN, M.M., FOJO, T. and BATES, S.E., *Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-dependent Transporters*, *Nature Rev Cancer*, **2** (1), 48-58 (2002).

GREEN, D.R. and REED, J.C., *Mitochondria and Apoptosis*, *Science*, **281**, 1309-1312 (1998).

GROEGER, A.M., ESPOSITO, V., MUELLER, M.R., CAPUTI, M., KAISER H.E. and GIORDANO, A., *Advances in the Understanding of Lung Cancer*, *Anticancer Research*, **17**, 2519-2522 (1997).

GUENGERICH, F.P., *Metabolism of Chemical Carcinogens*, *Carcinogenesis*, **21** (3), 345-351 (2000).

HASHIMOTO, T., ASHIDA, H., SANO, T., FURUYASHIKI, T., HATANAKA, Y., MINATO, K., MIZUNO, M., NOMURA, K., KUMATORI, A., KANAZAWA, K. and DANNO, G., *3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) Induces Caspase-dependent Apoptosis in Mononuclear Cells*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1539** (1-2), 44-57 (2001).

HAYASHI, K., HAYASHI, T., MORITA, N. and NIWAYAMA, S., *Antiviral Activity of an Extract of Cordia salicifolia on Herpes simplex Virus Type 1*, *Planta Med*, **56**, 439-443 (1990).

HORVÁTH G., KOCSIS, B., BOTZ, L., NEMETH, J. and SZABÓ, L., *Antibacterial Activity of Thymus Phenols by Direct Bioautography*, *Acta Biologica Szegediensis*, **46** (3-4), 145-146 (2002).

HOYE, T.R. and YE, Z., *Highly Efficient Synthesis of the Potent Antitumor Annonaceus Acetogenin (+)-Parviflorin*, *J Am. Chem. Soc.*, **118**, 1801-1802 (1996).

HU, R., ZHAI, Q., LIU, W. and LIU, X., *An Insight into the Mechanism of Cytotoxicity of Ricin to Hepatoma Cell: Roles of Bcl-2 Family Proteins, Caspases, Ca²⁺-Dependent Proteases and Protein Kinase C*, *Journal of Cellular Biochemistry*, **81**, 583-593 (2001).

HUDKINS, R.L., DeHAVEN-HUDKINS, D.L. and DOUKAS, P., *Design of Dual Acting Anticonvulsant-Antimuscarinic Succinimide and Hydantoin Derivatives*, *Bioorganics&Medicinal Chemistry Letters*, **7** (8), 979-984 (1997).

IWAKI, H., FUKUYAMA, K. and MATSUI, K., *1,4-Benzoquinone Derivatives and Benzene Derivatives*, *Eur. Pat. Appl.*, **151**, 995 (1985).

IWATA, M., ISEKI, R., SATO, K., TOZAWA, Y. and OHOKA, Y., *Involvement of Protein Kinase C-Epsilon in Glucocorticoid-induced Apoptosis in Thymocytes*, *International Immunology*, **6**, 431-438 (1994).

İNCESU, Z., BENKLİ, K., AKALIN, G., KAPLANCIKLI, Z.A., *Modification of Intracellular Free Calcium in Cultured F2408 Embryo Fibroblasts by 3-substituted-2-thiohydantoin Derivatives*, *Cell Biology International*, **28**, 267-272 (2004).

KARAMAN, S., DIGRAK, M., RAVID, U. and ILCIM, A., *Antibacterial and Antifungal Activity of the Essential Oils of Thymus revolutus Celak from Turkey*, *Journal of Ethnopharmacology*, **76**, 183-186 (2001).

KARP, G., *Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiments*, Von Hoffmann Press, New York, 1996.

KARPOUHTSIS, I., PARDALI, E., FEGGOU, E., KOKKINI, S., SCOURAS, Z.G. and MAVRAGANI-TSIPIDOU, P., *Insectisidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils*, *J.Agric. Food Chem.*, **46**, 1111-1115 (1998).

KAUFFMANN, Z., A., RODRIGUEZ-VICIANA, P., ULRICH, E., GILBERT, C., COFFER P., DOWNWARD, J. and EVAN, G., *Suppression of c-Myc-induced Apoptosis by Ras Signaling Through PI(3)K and PKB*. *Nature*, **385**, 544-548 (1997).

- KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H. and CURRIE, A.R., *Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implication in Tissue Kinetics*, *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257 (1972).
- KHODAIR, A., *Glycosylation of 2-thiohydantoin Derivates. Synthesis of Some Novel S-alkylated and S-glucosylated Hydantoins*, *Carbohydrate Research*, **331**, 445-453 (2001).
- KIMURA, M., NAITO, O., SAKUMA, T. and MORITA, T., *Preparation of Quaternary Ammonium Compounds as Muscle Relaxants*, *Ger. Offen*, **4**, 010, 925 (1990).
- KIRIMER, N., BASER, K.H.C. and TUMEN, G., *Carvacrol-Rich Plants in Turkey*, *Chem. Nat. Comp.*, **31**, 37-41 (1995).
- KLUG, S.W. and CUMMINGS M.R. ., *Concepts of Genetics*, 6th Edition, Printice Hall, Oxford, 2000.
- KÖKTÜRK, N., KIRIŞOĞLU, C.E. and ÖZTÜRK, C., *Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi*, *Solunum*, **5** (3), 127-138 (2003).
- KRAUSS, G., *Biochemistry and Signal Transduction and Regulation*, WILEY-VCH, Germany, 2001.
- KROEMER, G., ZAMZANI, N. and SUSIN, S.A., *Mitochondrial Control of Apoptosis*, *Immunol Today*, **18**, 44-51 (1997).
- LAVIN, M.F., WATTERS D. and SONG Q., *Role of Protein Kinase Activity in Apoptosis*, *Experientia*, **52**, 979-994, (1996).
- LEE, J.E., SOHN, J., LEE, K.C., LEE, K.C., SON, C.S. and TOCKGO, Y.S., *Regulation of Bcl-2 Family In Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis In Human Leukemia HL-60 Cells*, *Experimental and Molecular Medicine*, **32** (1), 42-46, (2000).
- LEE, R., KIM, Y.J., LEE, Y.J. and CHUNG, H.W., *The Selective Effect of Genistein on the Toxicity of Bleomycin in Normal Lymphocytes and HL-60 Cells*, *Toxicology*, **195**, 87-95 (2004).
- LEONARD, G.D., POLGAR, O. and BATES, S.E., *ABC Transporters and Inhibitors: New Targets, New Agents*, *Curr Opin Investing Drugs*, **3** (11), 1652-1659 (2002).
- LEWIS, J.M., TRUONG, T.N. and SCHWARTZ, M.A., *Integrins Regulate the Apoptotic Response to DNA Damage Through Modulation of p53*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **99** (6), 3627-3632 (2002).

LUCAS, M. and DIAZ, P., *Thapsigargin-induced Calcium Entry and Apoptotic Death of Neutrophils Are Blocked by Activation of Protein Kinase C*, *Pharmacology*, **63**, 191-196, (2001).

MARIN, L., MINGUELA, A., MOYA-QUILES, M.R., TORIO, A., MURO, M., GARCIA-ALONSO, A.M., SANCHEZ-BUENO, F., BRU, M., PARRILLA, P. and ALVAREZ-LOPEZ, M.R., *Expression of CD95 and Apoptosis Induction In Peripheral Blood Cells From Liver Graft Recipients, Transplantation Proceedings*, **34**, 280-282, (2002).

MARIN, M.C., FERNANDEZ, A., BICK, R.J., BRISBAY, S., BUJA, L.M., SNUGGS, M., McKONKEY, D.J., von ESCHENBACH, A.C., KEATING, M.J. and McDONNELL, T.J., *Apoptosis Supression by BCL-2 is Correlated with the Regulation of Nuclear and Cytosolic Ca²⁺*, *Oncogene*, **12**, 2259-2266, (1996).

MARTE, B.M. and DOWNWARD, J., *PKB/Akt: Connecting PI3-kinase to Cell Survival and Beyond. Trends Biochem Sci*, **22**, 355-358 (1997).

MARTE, B.M., RODRIGUEZ-VICIANA, P., WENNSTROM, S., WAME, P.H. and DOWNWARD, J., *PI 3-kinase and PKB/Akt act as an Effector Pathway for R-Ras*, *Current Biology*, **7**, 63-70 (1997).

MASSARDO, P., BETTARINI, P., PICCARDI, P. and LONGONI, A., *Synthesis and Juvenile Hormone Activities of Some New Ether Derivatives of Hydroquinone*, *Pestic. Sci.*, **14**, 461-469 (1983).

MAYO, M.W., WANG, C.-Y., COGSWELL, P.C., ROGERS-GRAHAM, K.S., LOWE- S.W., DER, C.J. and BALDWIN, A.S.Jr., *Requirement of NF- κ B Activation to Suppress p53-independent Apoptosis Induced by Oncogenic Ras*, *Science*, **278**, 1812-1815 (1997).

McKONKEY, D.J. and ORRENIUS, S., *Signal Transduction Pathways in Apoptosis*, *Stem Cells*, **14**, 619-631, (1996).

McMAHON, M. and WODDS, D., *Regulation of the p53 Pathway by Ras, the Plot Thickens*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1471**, 63-71, 2001.

MERİÇ, A., İNCESU, Z., İŞIKDAĞ, İ., *Synthesis and Effects on Intracellular Calcium of Some 1,3-bis-(heteroaryl substituted) Benzene Derivatives, II* *Farmaco*, **57** (7), 543-548 (2002).

MIYATO, M., IBUKI, Y., OHYAMA, H., YAMADA, T. and GOTO, R., *Phosphatidylserine Induces Apoptosis in CHO Cells Without Mitochondrial Dysfunction in a Manner Dependent on Caspases Other Than Caspases-1, -3, -8 and -9*, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **504**, 73-77, (2001).

MOSSMANN, T., *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*, *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55-63 (1983).

MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A. and RODWELL, V.W., *Harper'in Biyokimyası*, Barış Kitabevi, İstanbul, 1998.

NAGATA, S., *Apoptotic DNA Fragmentation*, *Experimental Cell Research*, **256**, 12-18 (2000).

NOZOE, S., TAKAHASHI, A., NUNOSAWA, T. and ENDO, T., *Preparation of Diphenoxybenzene Derivatives as Antitumor Agents and Their Intermediates*, *Jpn. Pat.*, **06**, 16, 601 (1995).

OBERHAMMER, F., WILSON, J.W., DIVE, C., MORRIS, I.D., HICHMAN, J.A., WAKELING, A.E., WALKER, P.R. and SIKORSKA, M., *Apoptotic Death in Epithelial Cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb Fragments Prior to or in the Absence of Internucleosomal Fragmentation*, *EMBO J.*, **12**, 3679-3684 (1993).

PEARSON, D.A., FRANKEL, E.N. and EDWIN, N., *Inhibition of Endothelial Cell-Mediated Oxidation of Low-Density Lipoprotein by Rosemary and Plant Phenolics*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 578-582 (1997).

PINTON, P., FERRARI, D., RAPIZZI, E., VIRGILIO, F.D., POZZAN, T. and RIZZUTO, R., *A Role for Calcium in Bcl-2 Action?*, *Biochimie*, **84**, 195-201 (2002).

PLACE, P. and PEPIN, R., *Preparation of (Propargyloxy) Benzene Derivatives as Fungicides*, *Fr. Pat.*, **2**, 598, 408 (1987).

PLAS, D.R. and THOMPSON, C.B., *Cell Metabolism in the Regulation of Programmed Cell Death*, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **13** (2), 75-78 (2002).

POLYAK, K., XIA, Y., ZWEIER, J.L., KINZLER, K.W. and VOGELSTEIN, B., *A Model for p53-induced Apoptosis*, *Nature*, **389** (6648), 237-238, (1997).

RAS SİNYAL YOLU, <http://dragon.zoo.utoronto.ca/~J03T0201C/ras.JPG>.

READER, S., MOUTARDIER, V. and DENIZEAU, F., *Tributyltin Triggers Apoptosis in Trout Hepatocytes: The Role of Ca²⁺ Protein Kinase C and Proteases*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1448**, 473-485 (1999).

RO, J., ŞAHİN, A., RO, J.Y., FRITSCHKE, H., HORTOBAGYI, G. and BLICK, M., *Immunohistochemical Analysis of P-glycoprotein Expression Correlated with Chemotherapy Resistance in Locally Advanced Breast Cancer*, *Hum Path.*, **21** (8), 787-791 (1990).

ROTH, J.A., *Molecular Events in Lung Cancer, Lung Cancer*, **12** (Suppl. 2), 3-15 (1995).

RUSSEL, M., LANGE-CARTER, C. and JOHNSON, G.L., *Direct Interaction Between Ras and the Kinase Domain of Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase (mekk1)*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 11757-11760 (1995).

SALVESEN, G.S. and DIXIT, V.M., *Caspases: Intracellular Signalling by Proteolysis*, *Cell*, **91**, 443-446, 1997.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T., *Molecular Cloning*, Second Ed., Cold Harbor Lab. Press, 1998.

SARASTE, A. and PULKKI, K., *Morphological and Biochemical Hallmarks of Apoptosis*, *Cardiovascular Research*, **45**, 528-537 (2000).

SARGES, R., SCHNUR, R.C., BELLETIRE, J.L. and PETERSON, M.J., *Spirohydointoin aldose reductase inhibitors*, *J Med Chem*, **31**, 230-243 (1988).

SATO, R., OHYAMA, T. and OGAWA, S., *Efficient Synthesis and Biological Properties of New Benzopentathiepins*, *Heterocycles*, **41**, 893-896 (1995).

SAVILL, J., FADOK, V., HENSON, P. and HASLETT, C., *Phagocyte Recognition of Cells Undergoing Apoptosis*, *Immunology Today*, **14** (3), 131-136 (1993).

SAWADA, M., NAKASHIMA S., BANNO, Y., YAMAKAWA, H., HAYASHI, K., TAKENAKA, K., NISHIMURA, Y., SAKAI, N. and NOZAWA, Y., *Ordering of Ceramide Formation, Caspase Activation, and Bax/Bcl-2 Expression During Etoposide-induced Apoptosis in C6 Glioma Cells*, *Cell Death Differ.*, **7**, 761-772, (2000).

SHIMODA, R., ACHANZAR, W.E., QU, W., NAGAMINE, T., TAKAGI, H., MORI, M. and WAALKES, M.P., *Metallothionein Is a Potential Negative Regulator of Apoptosis*, *Toxicological Sciences*, **73**, 294-300, (2003).

SIKIC, B.I., *Biochemical and Cellular Determinants of Bleomycin Cytotoxicity*, *Cancer Surv.*, **5** (1), 81-91 (1986).

SOENGAS, M.S., ALARCON, R.M., YOSHIDA, H., GIACCIA, A.J., HAKEM, R., MAK, T.W. and LOWE, S.W., *Apaf-1 and Caspase 9 in p53-dependent Apoptosis and Tumor Inhibition*, *Science*, **284** (5411), 156-159 (1999).

STAMMATI, A., BONSI, P., ZUCCO, F., MOEZELAAR, R., ALAKOMI, H.L. and WRIGHT A.V., *Toxicity of Selected Plant Volatiles in Microbial and Mammalian Short-term Assays*, *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 813-823 (1999).

SUGIYAMA, K., ZHOU, C., LEE, Y.S. and KADOR, P.F., *Isolation of a non-covalent Aldose Reductase-Nucleotide-Inhibitor Complex*, *Biochemical Pharmacology*, **59** (4), 329-336 (2000).

SUZEN, S. and BÜYÜKBİNGÖL, E., *Anti-cancer Activity Studies of Indolalithiohydantoin (PIT) on Certain Cancer Cell Lines*, *II Farmaco*, **55**, 246-248 (2000).

SZYMANSKA E. and KIEC_KONONOWICZ, K., *Antimycobacterial Activity of 5-arylidene Aromatic Derivatives of Hydantoin*, *IL Farmaco*, **57**, 355-362 (2002).

TAKAHASHI, J., NISHIDA, S., FUJIMOTO, I., SHONO, Y. and FUJIMOTO, H., *Preparation of Fluoroalkyl Phenyl Ethers and Insecticidal and/or Acaricidal Compositions Containing Them*, *Eur. Pat. Appl.*, 315, 370 (1989).

TCHIA, M.M., HOLMES, M.D. and McLENNAN, G., *The Molecular Biology of Lung Cancer*, *Med J Australia*, **154**, 501-503 (1991).

THOMPSON, C.B., *Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease*, *Science*, **267**, 1456-1462, (1995).

THORNBERRY, N.A. and LAZEBNIK, Y., *Caspases: Enemies Within*, *Science*, **281**, 1312-1316, (1998).

ULTEE, A. and SMID, E.J., *Influence of Carvacrol on Growth and Toxin Production by Bacillus cereus*, *International J. of Food Microbiol*, **64**, 373-378 (2001).

ULUKAYA, E., *Apotozis Ders Notları*, www20.uludag.edu.tr/~eulukaya (2003).

UTHAISANG, W., NUTT, L.K., ORRENIUS, S. and FADEEL, B., *Phosphatidylserine Exposure in Fas Type I Cells Is Mitochondria-dependent*, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **545**, 110-114, (2003).

VAUX, D.L. and FLAVELL, R.A., *Apoptosis Genes and Autoimmunity*, *Current Opinion in Immunology*, **12** (6), 719-724 (2000).

VEGA, O.S., KHOKHLATCHEV, A., NEDWIDEK, M., ZHANG, X.F., DAMMANN, R., PFEIFER, G.P. and AVRUCH, J., *The Putative Tumor Suppressor RASSF1A Homodimerizes and Heterodimerizes with the Ras-GTP Binding Protein Nore1*, *Oncogene*, **21**, 1381-1390 (2002).

VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. and REUTELINGSPERGER, C., *A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V*, *Journal Immunol. Methods*, **184**, 39-51, (1995).

- VIDRIO, H., MENA, M.A., and HONG E, *Antiarrhythmic Activity of TR2985, A Novel Diphenylhydantoin Derivative, Arzneim, Forsch*, **30**, 12-17 (1980).
- VOJTEK, A.B. and DER, C.J., *Increasing Complexity of the Ras Signalling Pathway, The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 19925-19928 (1998).
- WALKER, P.R. and SIKORSKA, M., *Endonuclease Activities, Chromatin Structure and DNA Degradation in Apoptosis, Biochem. Cell Biology*, **72**, 615-623, (1994).
- WANG, I.-K., LIN-SHIAU, S.-Y. and LIN, J.-K., *Induction of Apoptosis by Apigenin and Related Flavonoids Through Cytochrome c Release and Activation of Caspase-9 and Caspase-3 in Leukaemia HL-60 Cells, European Journal of Cancer*, **35** (10), 1517-1525 (1999).
- WANG, R., ZHANG, I., YIN, D., MUFSON, R.A. and SHI, Y., *Protein Kinase C Regulates Fas (CD95/APO-1) Expression, The Journal of Immunology*, **161**, 2201-2207, (1998).
- WHITE, M.K., BAIREDDY, V. and STRAYER, D.S., *Natural Protection from Apoptosis by Surfactant Protein A in Type II Pneumocytes, Experimental Cell Research*, **263**, 183-192, (2001).
- WYLLIE, A.H., *Glucocorticoid-induced Thymocyte Apoptosis is Associated with Endogenous Endonuclease Activation, Nature*, **284** (5756), 555-556 (1980).
- XIA, Z., DICKENS, M., RAINGEAUD, J., DAVIS, R.J. and GREENBERG, M.E., *Opposing Effects of ERK and JNK-p38 MAP Kinases on Apoptosis, Science*, **270**, 1326-1331 (1995).
- YAFFE, D. and SAXEL, O., *Serial Passaging and Differentiation of Myogenic Cells Isolated from Dystrophic Mouse Muscle, Nature*, **270**, 225-227 (1977).
- YAO, R.J. and COOPER, G.M., *Requirement fo Phosphatidylinositol-3 Kinase in the Prevention of Apoptosis by Nerve Growth Factor, Science*, **267**, 2003-2006 (1995).
- ZANG, Q-H., SHENG, H.P. and LOH, T.T., *Bcl-2 Protects HL-60 Cells from Apoptosis by Stabilizing Their Intracellular Calcium Pools, Life sciences*, **68**, 2873-2883 (2001).
- ZEYTİNOĞLU, H., İNCESU, Z. and BASER, K.H.C., *Inhibition of DNA Synthesis by Carvacrol in Mouse Myoblast Cells Bearing a Human N-Ras Oncogene, Phytomedicine*, **10** (4), 292-299 (2003).
- ZHA, J., HARAD, H., YANG, E., JOCKEL, J. and KORSMEYER, S.J., *Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 not BCL-X, Cell*, **87**, 619-628 (1996).

ZHIVOTOVSKY, B., WADE, D., NICOTERA, P. and ORRENIUS, S., *Role of Nucleases in Apoptosis*, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **105**, 333-338 (1994).

ZHIVOTOVSKY B., CEDERVAL B., JIANG S., NICOTERA P. and ORRENIUS S. *Involvement of Ca^{+2} in The Formation of High Molecular Weight DNA Fragments in Thymocyte Apoptosis*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **202**, 120-127 (1994).