

**KLOMİPRAMİN VE KLOROPİRAMİN'İN
KANSERLİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ
APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**
Yüksek Lisans Tezi

Bahar DEMİR
ESKİŞEHİR, 2017

**KLOMİPRAMİN VE KLOROPİRAMİN'İN KANSERLİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ
APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bahar DEMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyokimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Ocak, 2017**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bahar DEMİR'in "KLOMİPRAMİN VE KLOROPİRAMİN'İN KANSERLİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı tezi 11/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Eğitim/Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

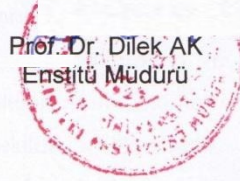
İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Üye : Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ

Üye : Doç. Dr. Halide Edip TEMEL

Prof. Dr. Dilek AK
Enstitü Müdürü



ÖZET

KLOMİPRAMİN VE KLOROPİRAMİN'İN KANSERLİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bahar DEMİR

Biyokimya Anabilim Dalı, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak, 2017
Danışman: Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Kanser son yıllarda hem ülkemizde hem de diğer ülkelerde insidansı ve mortalitesi hızla artan bir hastalık olması nedeni ile bilim dünyasının çok dikkatini çekmiş ve tedavisi için üzerinde çok araştırma yapılan ve çeşitli yöntemler denenilen bir hastalık türü haline gelmiştir. Günümüzde kanser, gelişmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni olarak gösterilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, bir antidepresan türevi olan Klomipramin Hidroklorür, antihistaminik türevi olan Kloropiramin Hidroklorür'ün ve pozitif kontrol olarak kullanılan bir kemoterapötik ajan olan Sisplatin'in akciğer karsinom hücre hattı (A549) ve pankreas kanseri hücre hattı (PANC-1) üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Maddelerin sitotoksik analizleri MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) yöntemi her iki hücre tipi içinde yapılmıştır. Daha sonra Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA MP) antiproliferatif etkiler araştırılmış ve 24, 48 saatlik $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 ve PANC-1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri Akım Sitometri cihazında ve morfolojik görüntüleme yöntemleri ile detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Maddelerin 24 ve 48 saatlik apoptotik etkileri A549 ve PANC-1 hücrelerinde Annexin V/PI, kaspaz 3 aktivasyonu ve mitokondriyal membran depolarizasyonu (JC-1) yöntemleri ile Akım Sitometri cihazında belirlenmiştir. Hücrelerin morfolojik değişimleri Konfokal Mikroskopu ve Geçirimli Elektron Mikroskopu kullanarak görüntülenmiştir.

Çalışmanın sonucunda, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 ve PANC-1 hücreleri üzerinde apoptotik etkiye sahip olabilecekleri sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Klomipramin, Kloropiramin, A549, PANC-1, Apoptoz

ABSTRACT

EVALUATION OF APOPTOTIC EFFECTS ON CANCER CELL LINES CLOMIPRAMINE AND CHLOROPYRAMINE

Bahar DEMİR

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January, 2017

Supervisor: Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Cancer has attracted the attention of the scientific world due to the fact that in recent years the incidence and mortality rates rapidly increased both in our country and in other countries and it has become a kind of disease which is being investigated for the treatment and tried various methods. Today, cancer is the second leading cause of death after cardiovascular diseases in developed countries.

Within the scope of this thesis study, apoptotic and cytotoxic effects of an antidepressant derivative Clomipramine Hydrochloride, an antihistaminic derivative Chloropyrimine Hydrochloride and as a positive control, chemotherapeutic agent anticancer drug Cisplatin were investigated on lung carcinoma cell line (A549) and pancreas cancer cell line (PANC-1). Cytotoxic analyzes of the substances, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) method, performed on both cell types. Furthermore, antiproliferative effects were investigated in Real Time Cell Analysis System (RTCA MP) and $IC_{50/2}$ and IC_{50} values for 24 and 48 hours were determined. Apoptotic effects of Clomipramine Hydrochloride and Chloropyrimine Hydrochloride on A549 and PANC-1 cells researched in detail by using Flow Cytometer and morphological imaging methods. The 24 and 48 hour apoptotic effects of the substances were determined in A549 and PANC-1 cells on the Flow Cytometer using Annexin V / PI, caspase 3 activation, and mitochondrial membrane depolarization (JC-1) methods. Morphological changes of cells were visualized using Confocal Microscopy and Transmission Electron Microscopy.

As a result of the study, Clomipramine and Chloropyrimine have reached the conclusion that they may have apoptotic effects on the A549 and PANC-1 cells.

Keywords: Clomipramine, chloropyramine, A549, PANC-1, apoptosis

TEŞEKKÜR

Değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak hücre kültürünü bana sevdiren ve öğreten, her konuda bana yol göstererek destek olan, tezimi en iyi şekilde yapabilmem için çok çaba sarf eden, tanıştığım ilk andan beri çok sevdiğim ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ'ye

Laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan, tez çalışmam süresince bana gösterdikleri sabır ve anlayış için başta müdürümüz Prof. Dr. Temel ÖZEK'e, TEM analiz yorumlamalarında yardımlarını esirgemeyen Biyolog Arzu İŞCAN'a, Biyolog Vildan YILDIRIM'a ve bütün BİBAM personeline,

Tez çalışmamın her bir aşamasında benim kadar emeği olan, gerek çalışmalarımı yaparken gerek tez yazma sürecinde tecrübelerini benimle paylaşmaktan asla çekinmeyen, kedilerimin teyzesi, arkadaşım Şennur GÖRGÜLÜ KAHYAOĞLU'na

Bu süreçte bana gösterdikleri sabır ve sevgiden dolayı sevgili laboratuvar arkadaşlarım Arda SEVER, Büşra EKSELLİ'ye,

Lisans hayatımın başladığı günlerden bugünlere dek benden hiçbir desteğini esirgemeyen, her anımda yanımda olan, tez çalışmalarım sırasında bana güç veren ve hayallerime adım adım yaklaşırken benimle birlikte yürüyen erkek arkadaşım Hakan CEVİZLİDERE'ye,

Yüksek lisans eğitim hayatım sırasında sahiplendiğim, hayata farklı açıdan bakmamı sağlayan ve koşulsuz sevginin gerçek manada ne demek olduğunu öğreten canım kedilerim Luna ve Ufaklık'a,

Gözlerimi hayata açtığım ilk andan beri beni karşılıksız seven, ilgi ve desteklerini hiçbir durumda esirgemeyen, uzakta bile olsam arkamda hep varlıklarını hissettiğim başta canım kız kardeşim Ceyda, sevgili annem ve babam Birsen, Güven DEMİR olmak üzere bütün aile bireylerime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Eskişehir 2016

Bahar DEMİR

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Bahar DEMİR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Kanser	2
1.1.1. Kanser Türleri	3
1.1.1.1. Akciğer kanseri.....	3
1.1.1.2. Pankreas kanseri.....	5
1.2. Kanser ve Hücre Ölümü	6
1.2.1. Hücre ölümü mekanizmaları	6
1.2.1.1. Otofaji	7
1.2.1.2. Nekroz.....	8
1.2.1.2.1. Apoptoz ve nekroz farkı	8
1.2.1.3. Apoptoz	10
1.2.1.3.1. Apoptozun mekanizması.....	11
Dış reseptör ölüm yolu	11
İçsel ölüm reseptör ölüm yolu (iç mitokondriyal yolu).....	13
Endoplazmik retikulum stres aracılı apoptoz yolağı	15
1.2.1.3.2. Apoptozda görev alan proteinler	17
Kaspazlar	17
Bcl-2 ailesi.....	18
1.3. Kanser Tedavi Stratejileri	19

1.3.1. Cerrahi tedavi	21
1.3.2. Radyoterapi	21
1.3.3. Kemoterapi	21
1.4. Antidepresanlar ve Kansere İlişkisi	22
1.4.1. Klomipramin hidroklorür.....	25
1.5. Antihistaminikler ve Kansere İlişkisi	27
1.5.1. Kloropiramin hidroklorür	30
2. MATERYAL VE YÖNTEM	32
2.1. Araçlar ve Gereçler	32
2.1.1. Kullanılan kimyasal ve sarf maddeler	32
2.1.2. Kullanılan cihazlar	34
2.2. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması	35
2.2.1. Klomipramin hidroklorür.....	35
2.2.2. Kloropiramin hidroklorür	35
2.2.3. Sisplatin	35
2.3. Deneylerde Kullanılan Hücreler	36
2.3.1. İnsan akciğer karsinoma epitelial hücre hattı (A549)	36
2.3.2. Normal fare fibroblast hücre hattı (L929)- İmmortalize edilmiş fare fibroblast hücre hattı (L929)	36
2.3.3. İnsan pankreas karsinoma hücre hattı (PANC-1)	36
2.3.4. Normal pankreas hücre hattı (HTERT- HPNE)	37
2.4. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık.....	37
2.4.1. Malzeme sterilizasyonu.....	37
2.4.2. Hücrelerin stoklanması ve pasajlanması	37
2.4.3. Hücre sayımları.....	38
2.5. Sitotoksik Etki Belirleme Testleri.....	38
2.5.1. MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi.....	38
Yöntemin uygulanması	39
2.5.2. İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi	40
2.5.3. Verilerin istatistiksel Analizi	40
2.6. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA MP)	
Antiproliferatif Etkilerinin Araştırılması	40
Yöntemin Uygulanması.....	41
2.7. Akım sitometri cihazı ile yapılan deneyler.....	41

2.7.1. Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi	41
Yöntemin uygulanması	42
2.7.2. JC-1 boyama ile hücrelerin mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi	43
Yöntemin uygulanması	44
2.7.3. Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin belirlenmesi	44
Yöntemin uygulanması	45
2.8. Hücrelerin Morfolojik Görüntülerinin Alınması	45
2.8.1. Konfokal mikroskopu ile apoptotik etkilerin görüntülenmesi.....	45
Yöntemin Uygulanması	46
2.8.2. Geçirimli elektron mikroskopu ile apoptotik etkilerin görüntülenmesi	46
Yöntemin Uygulanması	49
3. SONUÇLAR VE BULGULAR	50
3.1. MTT Sonuçları	50
3.1.1. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi	50
3.1.1.1. Sisplatin'in A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	50
3.1.1.2. Klomipramin'in A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	52
3.1.1.3. Kloropiramin'in A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	54
3.1.2. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi	57
3.1.2.1. Sisplatin'in PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	57
3.1.2.2. Klomipramin'in PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	59
3.1.2.3. Kloropiramin'in PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	61
3.1.3. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in hTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi	64

3.1.3.1. Sisplatin'in h-TERT HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	64
3.1.3.2. Klomipramin'in HTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	66
3.1.3.4. Kloropiramin'in hTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	68
3.1.3. Sisplatin, Komipramin ve Kloropiramin'in L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	71
3.1.3.1. Sisplatin'in L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi.....	71
3.1.3.2. Klomipramin'in L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	73
3.1.3.3. Kloropiramin'in L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	75
3.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sonuçları	77
3.2.1. Sisplatin'in A549 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi	78
3.2.2. Klomipramin'in A549 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi	79
3.2.3. Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi.....	81
3.2.4. Sisplatin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi	82
3.2.5. Klomipramin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi.....	84
3.2.6. Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi.....	85
3.3. Klomipramin, Kloropiramin ve Sisplatin'in A549 ve PANC-1 Hücrelerinde Apoptotik Etkilerinin Akım Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi	87
3.3.1. Akım sitometri'de Annexin V FITC-PI yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi.....	87

3.3.1.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi	87
3.3.1.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi	90
3.3.1.3. PANC-1 hücreleri üzerindeki 24 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi	93
3.3.1.4. PANC-1 hücreleri üzerindeki 48 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi	96
3.3.2. Flow sitometri’de JC-1 yöntemi ile mitokondriyal membran aktivitesinin değerlendirilmesi.....	100
3.3.2.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerin değerlendirilmesi	100
3.3.2.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerin değerlendirilmesi	102
3.3.2.3. PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerin değerlendirilmesi	105
3.3.2.4. PANC-1 hücrelerindeki 48 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerin değerlendirilmesi	107
3.3.3. Flow sitometri’de kaspaz 3 yöntemi ile mitokondriyal membran aktivitesinin değerlendirilmesi.....	110
3.3.3.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik kaspaz 3 aktivitesinin değerlendirilmesi	110
3.3.3.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik kaspaz 3 aktivitesinin değerlendirilmesi	112
3.3.3.3. PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik kaspaz 3 aktivitesinin değerlendirilmesi	114
3.3.3.4. PANC-1 hücrelerindeki 48 saatlik kaspaz 3 aktivitesinin değerlendirilmesi	116
3.4. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin A549 ve PANC-1 Hücrelerinde Meydana Getirdiği Morfolojik Değişimlerin Konfokal Mikroskobu ile Değerlendirilmesi.....	119
3.4.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik morfolojik değişimlerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi	119
3.4.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik morfolojik değişimlerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi	121

3.4.3.	PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik morfolojik değişimlerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi	123
3.4.4.	PANC-1 hücrelerindeki 48 saatlik morfolojik değişimlerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi	125
3.5.	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin A549 ve PANC-1 Hücrelerinde Meydana Getirdiği Morfolojik Değişimlerin Geçirimli Elektron Mikroskobu ile Değerlendirilmesi.....	127
3.5.1.	A549 hücrelerindeki 24 saatlik morfolojik değişimlerin geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi.....	127
3.5.3.	PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik morfolojik değişimlerin geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi.....	131
KAYNAKÇA.....		145
ÖZGEÇMİŞ		

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1: Apoptoz ve Nekroz Karşılaştırması.....	9
Çizelge 1.2: Apoptoz ve Nekroz Karşılaştırması.....	10
Çizelge 1.3: Etki mekanizmasına göre antidepresanlar.....	23
Çizelge 2.1: Dehidratasyon Serileri.....	48
Çizelge 2.2: Şeffaflandırma Serileri.....	48
Çizelge 2.3: Gömmeye Geçiş.....	48
Çizelge 2.4: Resin solisyonlarının hazırlanması.....	49
Çizelge 3.1: MTT yöntemine göre belirlenen Sisplatin konsantrasyonlarının A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	52
Çizelge 3.2: MTT yöntemine göre belirlenen Klomipramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	54
Çizelge 3.3: MTT yöntemine göre belirlenen Kloropiramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	56
Çizelge 3.4: MTT yöntemine göre belirlenen Sisplatin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	59
Çizelge 3.5: MTT yöntemine göre belirlenen Klomipramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	61

Çizelge 3.6:	MTT yöntemine göre belirlenen Kloropiramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	63
Çizelge 3.7:	MTT yöntemine göre belirlenen Sisplatin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	66
Çizelge 3.8:	MTT yöntemine göre belirlenen Klomipramin Konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	68
Çizelge 3.9:	MTT yöntemine göre belirlenen Kloropiramin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	70
Çizelge 3.10:	MTT yöntemine göre belirlenen Sisplatin konsantrasyonlarının L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	72
Çizelge 3.11:	MTT yöntemine göre belirlenen Klomipramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	74
Çizelge 3.12:	MTT yöntemine göre belirlenen Kloropiramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri.....	76
Çizelge 3.13:	A549 hücreleri üzerinde Sisplatin için sigmoidal doz cevap eğrisi (değişken eğimli) ve 24, 48 ve 72 saatlik IC ₅₀ değerleri.....	79
Çizelge 3.14:	A549 hücreleri üzerinde Klomipramin için sigmoidal doz cevap eğrisi (değişken eğimli) ve 24, 48 ve 72 saatlik IC ₅₀ değerleri.....	80

Çizelge 3.15:	A549 hücreleri üzerinde Klomipramin için sigmoidal doz cevap eğrisi (değişken eğimli) ve 24, 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri.....	82
Çizelge 3.16:	PANC-1 hücreleri üzerinde Sisplatin için sigmoidal doz cevap eğrisi (değişken eğimli) ve 24, 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri.....	83
Çizelge 3.17:	PANC-1 hücreleri üzerinde Klomipramin için sigmoidal doz cevap eğrisi (değişken eğimli) ve 24, 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri.....	85
Çizelge 3.19:	A549 hücrelerinin 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	89
Çizelge 3.20:	Sisplatin'in A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	89
Çizelge 3.21:	Klomipramin'in A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	89
Çizelge 3.22:	Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	89
Çizelge 3.23:	A549 hücrelerinin 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	91
Çizelge 3.24:	Sisplatin'in A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	92
Çizelge 3.25:	Klomipramin'in A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	92
Çizelge 3.26:	Klomipramin'in A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	92
Çizelge 3.27:	PANC-1 hücrelerinin 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	95

Çizelge 3.28:	Sisplatin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	95
Çizelge 3.29	Klomipramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	95
Çizelge 3.30:	Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	95
Çizelge 3.31:	PANC-1 hücrelerinin 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	97
Çizelge 3.32:	Sisplatin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	98
Çizelge 3.33:	Klomipramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	98
Çizelge 3.34:	Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	98
Çizelge 3.35:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerinde 24 Saatteki % canlılık değerleri.....	102
Çizelge 3.36:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	104
Çizelge 3.37:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	107
Çizelge 3.38:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	109
Çizelge 3.39:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun % canlılık değerleri.....	112

Çizelge 3.40:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun % canlılık değerleri.....	114
Çizelge 3.41:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun % canlılık değerleri.....	116
Çizelge 3.42:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun % canlılık değerleri.....	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1:	Hücre de meydana gelen üç ana ölüm şekli..... 7
Şekil 1.2:	Fas Sinyal Yolağı..... 13
Şekil 1.3:	Mitokondri iç yolağı apoptoz şeması..... 15
Şekil 1.4:	Endoplazmik retikulum stres aracılı apoptoz yolları genel şeması..... 17
Şekil 1.5:	Kaspazların yapısı..... 19
Şekil 1.6:	Bcl-2 proteinlerinin sahip olduğu özelliklerin gösterilmesi..... 19
Şekil 1.7:	Klomipramin Hidroklorür'ün moleküler yapısı..... 25
Şekil 1.8:	Klomipramin Hidroklorür'ün apoptozu indükleme mekanizması..... 26
Şekil 1.9:	Histidin aminoasidinin Histamine dönüşümü..... 27
Şekil 1.10:	Eski ve yeni nesil antihistaminik ilaçlar..... 28
Şekil 1.11:	Kloropiramin Hidroklorür'ün moleküler yapısı..... 30
Şekil 2.1:	Formazan kristallerinin oluşumu..... 39
Şekil 2.2:	AnnexinV/PI'n hücreyle etkileşimi..... 42

Şekil 3.1:	Sisplatin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	51
Şekil 3.2:	Sisplatin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	51
Şekil 3.3:	Klomipramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	53
Şekil 3.4:	Klomipramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	53
Şekil 3.5:	Kloropiramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	55
Şekil 3.6:	Kloropiramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	55
Şekil 3.7:	Sisplatin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	58

Şekil 3.8:	Sisplatin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	58
Şekil 3.9:	Klomipramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	60
Şekil 3.10:	Klomipramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	60
Şekil 3.11:	Kloropiramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	62
Şekil 3.12:	Kloropiramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	62
Şekil 3.13:	Sisplatin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	65
Şekil 3.14:	Sisplatin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	65

Şekil 3.15:	Klomipramin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	67
Şekil 3.16:	Klomipramin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	67
Şekil 3.17:	Kloropiramin konsantrasyonlarının, hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	69
Şekil 3.18:	Kloropiramin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	69
Şekil 3.19:	Sisplatin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	71
Şekil 3.20:	Sisplatin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	72
Şekil 3.21:	Klomipramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	73

Şekil 3.22:	Klomipramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	74
Şekil 3.23:	Kloropiramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	75
Şekil 3.24:	Kloropiramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak değerlendirilmesi.....	76
Şekil 3.25:	xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için yapılan uygulamalarda A549 hücreleri üzerindeki Sisplatinin normalize edilmiş 72 saatlik görüntüsü.....	76
Şekil 3.26:	A549 hücreleri üzerinde Sisplatin etken maddesi için 72 saatlik IC ₅₀ değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72. saati temsil etmektedir.....	78
Şekil 3.27:	xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için yapılan uygulamalarda A549 hücreleri üzerindeki Klomipramin'in Normalize edilmiş 72 saatlik görüntüsü.....	79
Şekil 3.28:	A549 hücreleri üzerinde Klomipramin etken maddesi için 72 saatlik IC ₅₀ değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72. saati temsil etmektedir.....	80

Şekil 3.29:	A549 hücreleri üzerinde Kloropiramin etken maddesi için 72 saatlik IC ₅₀ değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72. saati temsil etmektedir.....	81
Şekil 3.30:	A549 hücreleri üzerinde Kloropiramin etken maddesi için 72 saatlik IC ₅₀ değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72. saati temsil etmektedir.....	81
Şekil 3.31:	PANC-1 hücreleri üzerinde Sisplatin etken maddesi için 72 saatlik IC ₅₀ değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72. saati temsil etmektedir.....	82
Şekil 3.32:	PANC-1 hücreleri üzerinde Sisplatin etken maddesi için 72 saatlik IC ₅₀ değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72. saati temsil etmektedir.....	83
Şekil 3.33:	xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için yapılan uygulamalarda PANC-1 hücreleri üzerindeki Klomipramin'in normalize edilmiş 72 saatlik görüntüsü.....	84
Şekil 3.34:	PANC-1 hücreleri üzerinde Klomipramin etken maddesi için 72 saatlik IC ₅₀ değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72. saati temsil etmektedir.....	84
Şekil 3.35:	Xcelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için yapılan uygulamalarda PANC-1 hücreleri üzerindeki Kloropiramin'in normalize edilmiş 72 saatlik görüntüsü.....	85

Şekil 3.36:	PANC-1 hücreleri üzerinde Kloropiramin etken maddesi için 72 saatlik IC ₅₀ değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72 saati temsil etmektedir.....	86
Şekil 3.37:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 24. saatteki apoptotik etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	87
Şekil 3.38:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 48. saatteki apoptotik etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	90
Şekil 3.39:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 24. saatteki apoptotik etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	93
Şekil 3.40:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 48. saatteki apoptotik etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	96

Şekil 3.41:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	100
Şekil 3.42:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	102
Şekil 3.43:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	105
Şekil 3.44:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	107
Şekil 3.45:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	110

Şekil 3.46:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	112
Şekil 3.47:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	114
Şekil 3.48:	Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC _{50/2} D) Sisplatin IC ₅₀ E) Klomipramin IC _{50/2} F) Klomipramin IC ₅₀ G) Kloropiramin IC _{50/2} H) Kloropiramin IC ₅₀	116
Şekil 3.49:	A549 hücrelerinin üzerinde 24 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boya ları kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin IC _{50/2} C) Sisplatin IC ₅₀ D) Klomipramin IC _{50/2} E)Klomipramin IC ₅₀ F) Kloropiramin IC _{50/2} G) Kloropiramin IC ₅₀	119

Şekil 3.50:	A549 hücrelerinin üzerinde 48 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boya ları kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin IC _{50/2} C) Sisplatin IC ₅₀ D) Klomipramin IC _{50/2} E)Klomipramin IC ₅₀ F) Kloropiramin IC _{50/2} G) Kloropiramin IC ₅₀	121
Şekil 3.51:	PANC-1 hücrelerinin üzerinde 24 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boya ları kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin IC _{50/2} C) Sisplatin IC ₅₀ D) Klomipramin IC _{50/2} E)Klomipramin IC ₅₀ F) Kloropiramin IC _{50/2} G) Kloropiramin IC ₅₀	123
Şekil 3.52:	PANC-1 hücrelerinin üzerinde 48 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boya ları kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin IC _{50/2} C) Sisplatin IC ₅₀ D) Klomipramin IC _{50/2} E)Klomipramin IC ₅₀ F) Kloropiramin IC _{50/2} G) Kloropiramin IC ₅₀	125
Şekil 3.53:	A549 hücre sinin 24 saatlik morfolojisinin TEM ile görüntülenmesi (kontrol).....	127
Şekil 3.54:	Sisplatin'in A549 hücre si üzerindeki morfolojik de ğişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (B1-B2).....	128
Şekil 3.55:	Klomipramin'in A549 hücre si üzerindeki morfolojik de ğişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (C1-C2).....	129
Şekil 3.56:	Kloropiramin'in A549 hücre si üzerindeki morfolojik de ğişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (D1-D2).....	130

Şekil 3.57:	PANC-1 hücresinin 24 saatlik morfolojisinin TEM ile görüntülenmesi (kontrol).....	131
Şekil 3.58:	Sisplatin'in PANC-1 hücresi üzerindeki morfolojik değişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (B1-B2).....	132
Şekil 3.59:	Klomipramin'in PANC-1 hücresi üzerindeki morfolojik değişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (C).....	133
Şekil 3.60:	Kloropiramin'in PANC-1 hücresi üzerindeki morfolojik değişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (D).....	134

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A549	: İnsan akciğer karsinoma epitelyal hücre hattı
ANOVA	: Varyans Analizi (Analysis of Variance)
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-fenilindol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FADD	: Fas ilişkili Ölüm Domaini
FAK	: Focal adezyon kinaz
FBS	: Fötal Sığır Serumı
IC_{50/2}	: %25 inhibe eden konsantrasyon
IC₅₀	: %50 inhibe eden konsantrasyon
kDa	: Kilo dalton
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
PANC-1	: İnsan pankreas karsinoma hücre hattı
PBS	: Fosfat tuz tampon çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)
PI	: Propium iyodür
RNA	: Ribo nükleik asit
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskopu
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hücrelerin olgunlaşma, bölünme, çoğalma özelliklerinde ve fonksiyonlarındaki bütünlüğün ve kontrolün kaybolması sonucunda oluşan ölümcül bir hastalık türüdür. Kanser çeşitli nedenler ile sağlıklı hücrelerde meydana gelen kontrol kaybı ile ortaya çıkmaktadır [1].

Kanser son yıllarda hem ülkemizde hem de diğer ülkelerde [2] insidansı ve mortalitesi hızla artan bir hastalık olması nedeni ile bilim dünyasının çok dikkatini çekmiş ve tedavisi için üzerinde çok araştırma yapılan ve çeşitli yöntemler denenilen bir hastalık türü haline gelmiştir [3].

Günümüzde kanser, gelişmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni olarak gösterilmektedir. Dünyada meydana gelen tüm ölümlerin %13'ü kanser nedeni ile gerçekleşmektedir [4]. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yapmış olduğu tahmin ve verilerine göre, kanser nedeni ile gerçekleşen ölümler 2000 yılında 6 milyon iken 2005 yılında 7.6 milyona, 2007 yılında ise 7.9 milyona çıkmıştır. 2000 ile 2007 yılları arasında kanser nedeni ile gerçekleşen ölümlerin %32 oranında arttığı açık bir şekilde ortaya konulmuştur [5].

WHO'nun 200 yılı kayıtlarında, Türkiye'de meydana gelen ölümlerin %13,1'inin kanser nedeni ile gerçekleştiği açıkça görülmektedir [5]. Türkiye'de 2013 yılında yaşa göre standardize edilmiş kanser hızı kadınlarda yüzbinde 186,5 iken erkeklerde ise yüzbinde 267,9'dur. Toplam kanser insidansı ise yüzbinde 227,2'dir. Türkiye'de bugüne kadar toplam 174 bin kişiye yeni kanser teşhisi konulmuştur [6].

Uluslararası kanser araştırma kurumunun (IARC) 2010 yılı raporlarına göre, akciğer kanseri dünyada en sık görülen ve en sık ölüme neden olan kanser türüdür. Her iki cinsten de mortalite rakamları bakımından birinci sırada yer almakta ve ayrıca sıralamada kadınlarda meme kanserinden sonra erkeklerde ise prostat kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Dünya genelinde akciğer kanser insidansı her yıl %0.5 artmaktadır [7].

Bir diğer ölümcül kanser türlerinden birisi olan pankreas kanseri, tüm kanserlerin %2'sini ve kanser nedeni ile gerçekleşen ölümlerin %5'ini oluşturmaktadır. Pankreas kanseri, başlangıç evrelerinde hiçbir belirti göstermeyen ve erken teşhisi ve cerrahi müdahalesi zor olan bir kanser türü olarak ilk sıralarda yer almaktadır. Kanser hastalarının büyük bir kısmının tanıdan 6 ay sonra ölümü gerçekleşmektedir [8, 9].

Günümüzde kanser tedavisinde; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi olmak üzere üç ana tedavi yöntemi ve bu tedavi yöntemlerinin kombinasyonları da kullanılmaktadır. Kemoterapi bu yöntemler arasında mekanizması dolayısı ile en çok kullanılandır.

Kullanılan bütün tedavi yöntemlerinin malign hücreler üzerinde etki etmesi beklenirken proliferen olan kanser hücrelerinin yanında sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. Bu nedenle günümüzde kullanılmakta olan tedavilere alternatif olacak şekilde daha etkili, daha seçici, daha az toksik olan doğal, biyolojik antikanser ilaçların bulunması ve etki mekanizmalarının belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır [10]. Kemoterapötikler kanserli hücrelerde apoptoz gibi hücre ölüm yollarını uyarak tedavi eden yöntemlerden biridir [11, 12].

Programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptoz, embriyonik dönemden ölüme kadarki süreçte patolojik ve fizyolojik birçok süreçte görev almaktadır. Apoptoz sırasında hücre yüzeyinde, hücre organellerinde ve çekirdekte çeşitli değişimler gözlenmektedir. Apoptotik mekanizmasının hücre içi ve dışı ölüm sinyalleri ile aktifleşmesi sonucunda hücrelerde, DNA kırılması, sitoplazmada büzülme, membranda parçalanma gibi olaylar meydana gelir. Birçok kanser doku ve hücrelerinde apoptotik sinyal yollarında bozulmalar olduğu belirlenmiştir [13, 14]. Birçok kemoterapötik ajan kanserli hücreler üzerinde proliferasyonu durdurucu etkiye sahiptir ve bunu hücre ölüm yolları üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Sisplatin gibi kemoterapötik ajanlar apoptotik yollar üzerinden hücre proliferasyonunu durdurduğu sonucuna ulaşılmıştır [15]. Apoptozun bu özellikleri doğrultusunda apoptoz mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Tez çalışması kapsamında, antidepresan türevi olan Klomipramin ve antihistaminik türevi olan Kloropiramin'in akciğer karsinom hücre hattı (A549) ve pankreas kanseri hücre hattı (PANC-1) üzerindeki sitotoksik ve apoptotik araştırılması amaçlanmıştır. Böylece, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin olası anti kanser ve biyokimyasal etkileri belirlenerek literatüre katkı sağlanması beklenmektedir.

1.1. Kanser

Kanser çeşitli etkilerle değişime uğramış hücrelerin, kontrolsüz olarak çoğalıp büyümeleri sonucu meydana gelen kötü huylu hastalıklar grubundandır. İnsan ve çok hücreli organizmaların doku ve organlarındaki hücreleri arasında bir denge söz konusudur. Bu denge sağlıklı hücrelerin belirli bir kontrol altında ve ihtiyaca göre büyüme faktörleri aracılığıyla bölünerek çoğalmasını kapsarken bir diğer taraftan da programlı hücre ölümü adı verilen 'apoptoz' mekanizması ile sağlanırlar. Ancak programlı hücre ölümü mekanizmasının işleyişinde meydana gelebilecek bir hata nedeni ile doku ve organlardaki denge bozulmaktadır. Bunun sonucu olarak kanser gibi çeşitli hastalıklar meydana gelmektedir [15].

Hücrelerin normal bir şekilde çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri DNA'daki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Tümör oluşumu ile ilgili genler; doğrudan hücre proliferasyonu kontrolü, programlanmış hücre ölümü kontrolü veya düzenlenmesi ve hasar görmüş DNA'nın tamirinde yer alan genlerin kontrolünü sağlamaktadırlar. Her bir süreci nasıl etkilediğine bağlı olarak bu genler tümör supresörü ve proto-onkogenler olarak iki kategoriye ayrılırlar. Tümör supresörü büyüme inhibisyonu olarak görev alırken, proto-onkogenler büyüme teşvik edici olarak rol almaktadırlar. Bu proto-onkogenler mutasyona uğradığında hücrelerde aşırı büyümeye ve çoğalmaya neden olarak tümörleri meydana getirmektedirler. Kanseri oluşumuna neden olan bu genlere "onkogen" adı verilmektedir [16, 17].

Çeşitli nedenler sonucunda meydana gelen tümörler, iyi huylu ya da vücuda metastaz yapma özelliğine göre kötü huylu olarak sınıflandırılabilir. Kanseri oluşum yerlerine göre farklı şekilde isimlendirilmektedirler. Bağışıklık sistemi ve hemopoietik yapıları etkileyen malign tümörler, lösemiler ve lenfomalar olarak; bağ dokuları, kas, kıkırdak, yağ ve kemik kaynaklı olan kanseri sarkomlar olarak; epitel yapılardan kaynaklanan kanseri türleri karsinom olarak adlandırılmaktadır [15].

Kısaca kanseri, hücrelerin normal özelliklerini değiştiren bir dizi moleküler olaylardan kaynaklanan, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi sağlayan, kullanılan kemoterapötik ilaçlara direnç kazanan ve metastaz yolu ile tüm vücuda yayılabilen bir hastalık olma özellikleri ile karmaşık bir hastalıktır. Bu karmaşıklıkların çözülmesi için kanseri günümüzde üzerinde en çok araştırma yapılan ve çalışmalar yürütülen hastalıklardan birisi haline gelmiştir. Bu karmaşıklıkların çözülebilmesi için günümüzde birçok yeni yol aranmaktadır [18, 19].

1.1.1. Kanseri Türleri

1.1.1.1. Akciğer kanseri

2010 yılında uluslararası kanseri araştırma kurumunun(IARC) yayınladığı rapora göre, akciğer kanserinin dünyada en sık görülen ve en sık ölüme neden olan kanseri türü olduğu açıklanmıştır. Akciğer kanseri küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan olarak iki tipe ayrılmaktadır ve her iki tipinde de mortalite rakamları bakımından birinci sırada yer almaktadır. Kadınlarda meme kanserinden sonra, erkeklerde ise prostat kanserinden sonra ikinci sıradadır. IARC'nin raporuna göre Dünya'da 7.6 milyon kanserden kaynaklanan ölüm görülmektedir ve bu ölümlerin 1.4 milyonundan akciğer kanseri sorumludur. Aynı raporda Türkiye için mortalite oranları erkeklerde 141.1/100.000, kadınlarda 71.1/100.000 olduğu belirtilmektedir [6].

Akciğer kanseri, hem erkeklerde hem de kadınlarda diğer kanserlerden daha fazla ölüme sebep olmaktadır. 2016 yılında yaklaşık 158.080 ölüm gerçekleşmesi beklenmektedir. Akciğer kanser teşhisi konulan vakalardan 4te1'i ölümlle sonuçlanmaktadır. Ölüm oranları sigara alışkanlığının azalmasından dolayı, 1990 yılından bu yana erkeklerde %38, kadınlarda 2002 yılından beri %12 oranında azalmıştır. 2008'den 2012'ye ölüm oranları erkeklerde yılda %2.9, kadınlarda ise yılda %1.9 azalmıştır. 1 ve 5 yıllık akciğer kanseri için sağkalım oranları sırasıyla % 44 ve %17'dir. Akciğer kanser hastalarının sadece %16'sı lokalize olmuş bir evrede iken teşhis edilebilmektedir ve teşhis edilenlerin 5 yıllık sağkalım oranları %55'tir. Küçük hücreli akciğer kanseri için 5 yıllık sağkalım oranı (%7) küçük hücreleri olmayanından (% 21) daha düşüktür.

İnsidans hızı 1980'lerin ortalarından beri erkeklerde azalmaktadır, ancak 2000'lerin ortalarından beri kadınlarda arttığı gözlenmektedir. Toplumsal cinsiyet farklılıkları, son on yılda sigara içme alışkanlığının tarihsel kalıplarını ve sigarayı bırakmayı yansıtmaktadır. Sigara alışkanlığını bırakmaya bağlı olarak akciğer kanserindeki görülme oranları; 2008-2012 yılları arasında erkeklerde yılda %3.0, kadınlarda yılda %1.9 oranında azaldığı görülmüştür.

Akciğer kanserinin semptomları, genellikle kanser ilerleyene kadar ortaya çıkmamakta ve sürekli öksürük, kanla sulanmış balgam, göğüs ağrısı, ses değişikliği, nefes darlığı kötüleşmesi ve nükseden pnömoni (zatürre) veya bronşit ile kendini belli etmektedir.

Sigara akciğer kanseri için en önemli risk faktörüdür; ABD'de akciğer kanseri ölümlerinin %80'i sigara içmekten kaynaklanmaktadır. Risk, hem sigara miktarı hem de süresi ile birlikte artmaktadır. Puro, pipo ve tütün içilmesi de riski artırmaktadır. Toprak ve yapı malzemelerinden salınan radon gazına maruz kalmak, ABD'de akciğer kanserinin ikinci en önemli nedeni olduğu tahmin edilmektedir. İkinci el dumana, asbeste (özellikle sigara içenlere), bazı metallere (krom, kadmiyum, arsenik), bazı organik kimyasallara, radyasyona, hava kirliliğine ve dizel egzozuna maruz kalma, mesleki veya çevresel maruziyet diğer risk faktörleridir. Bir diğer mesleki maruziyetler, kauçuk imalatı, asfaltlama, çatı kaplama, boyama ve baca temizlemeyi içermektedir. Yapılan araştırmalar da tüberküloz öyküsü olan kişilerde riskin arttığı gözlenmiştir. Genç yaşta akciğer kanserine yakalanan kişilerde genetik faktörler rol oynamaktadır. Düşük doz spiral bilgisayarlı tomografi (LDCT) ile yapılan taramalarda, yılda en az 30 paket sigara öyküsü olan yetişkinlerde standart akciğer grafisine kıyasla akciğer kanseri mortalitesini %20 azalttığı gösterilmiştir.

Akciğer kanseri için uygun tedavi, tümörün küçük hücreli (%13) veya küçük olmayan hücrenin (%83) yanı sıra diğer tümör özelliklerine de dayanmaktadır. Kanser türüne, evresine ve kanser hücrelerinin spesifik moleküler özelliklerine göre tedaviler cerrahi, radyasyon terapisi, kemoterapi ve / veya hedefli terapileri içerebilmektedir. Küçük hücreli olmayan erken evredeki akciğer kanser hastaları için, cerrahi ameliyat genellikle tedavi de tercih edilmektedir ancak bazen kemoterapi ve radyasyon ile birlikte uygulanması uygun görülmektedir. İleri evreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanser hastaları genellikle kemoterapi, hedeflendirilmiş ilaçlar (veya kemoterapi ile kombinasyonu) veya immünoterapi uygulanmaktadır. Tek başına veya radyasyon ile kombine edilmiş kemoterapi, genellikle küçük hücreli akciğer kanser hastaları için uygulanan bir tedavidir. Bu hastalarda uygulanan tedavi sonrasında kanser sıklıkla geri dönmesine rağmen, hastaların büyük çoğunluğunda gerileme görülmektedir [20].

1.1.1.2. Pankreas Kanseri

Pankreas kanseri başlangıç evrelerinde hiçbir belirti göstermeyen, teşhisi ve cerrahi müdahalesi kolay olmayan bir kanser türü olması nedeniyle en ölümcül türlerden birisi olarak görülmektedir. Pankreas kanser hastalarının birçoğunun ölümü tanıdan 6 ay sonra gerçekleşmektedir. Erken teşhis ile birlikte pankreas kanser hastalarının sağkalım şansı 5 yıla kadar %22'lik bir oranla arttırılabilmektedir [8]. Pankreas kanseri kadınlara oranla erkeklerde daha sık karşılaşılan ve 40 ile 85 yaş gibi ileri yaşlarda daha sık ortaya çıkan ölümcül ve agresif seyirli kötü huylu kanserlerden biridir [21].

2016 yılında ABD'de yaklaşık olarak 53.070 yeni pankreas kanser hastası beklenmektedir. Pankreas hastalarının %95'lik bir kısmı pankreasta gıda sindirimi için enzim üreten dış salgı bezinde (ekzokrin) gerçekleşmesi tahmin edilen bir pankreas türü olacaktır. Gelecekte görülmesi beklenen pankreas kanseri türüne yönelik yapılan çalışmalar, hastalarının %95'lik bir kısmının pankreasta gıda sindirimi için enzim üreten dış salgı bezlerinde (ekzokrin) gerçekleşeceğine yöneliktir. %5'lik bir kısımda daha nadir olarak görülen nöroendokrin tümörler; daha genç yaşlarda teşhis edilebilmekte ve daha iyi bir prognoza sahiptir.

Pankreas kanser insidans oranları 2000 yılından 2012 yılına kadar yılda %1.2 oranda artmıştır. 2016 yılı içinde pankreas kanseri kaynaklı 41.780 adet ölüm; benzer oranlarla erkeklerde 21.450 ve kadınlarda 20.330 adet ölüm gerçekleşeceği tahmin edilmektedirler. Pankreas kanseri nedeni ile gerçekleşen ölüm hızı 2000 yılından bu yıla kadar yılda %0.4 oranında bir artış göstermiştir.

İleri safhalarına kadar kendini belli etmeyen pankreas kanseri; kilo kaybı, karın rahatsızlığı ve sırttan yayılma ihtimali ve zaman zaman şeker hastalığı gelişimi ile kendini belli etmektedir. Genel safra kanalının yakınında gelişen tümörler, sarılığa (ciltte ve gözlerde sararma) neden olabilir; bu da bazen tümörün erken bir aşamada teşhis edilmesini sağlamaktadır. Gelişmiş evre hastalığının bulguları ciddi karın ağrısı, mide bulantısı ve kusmayı içerebilmektedir.

Pankreas kanserinin riski sigara içenlerde yaklaşık olarak iki kat daha fazladır. Ayrıca dumansız tütün kullanımı da riski arttırmaktadır. Diğer risk faktörleri ise ailenin pankreas kanseri hikayesi, kronik pankreatit, obezite veya kişinin diyabet geçmiştir. Lynch sendromu ve bazı diğer genetik sendromları olan bireyler de risk altındadır.

Pankreas kanserinin erken teşhisi için şu anda güvenilir bir yöntem bulunmamaktadır. Cerrahi ameliyat, radyoterapi ve kemoterapi, hastaların sağkalımını uzatabilen ve semptomları hafifletebilen tedavi seçenekleridir, ancak nadiren tam bir tedavi sağlamaktadırlar.

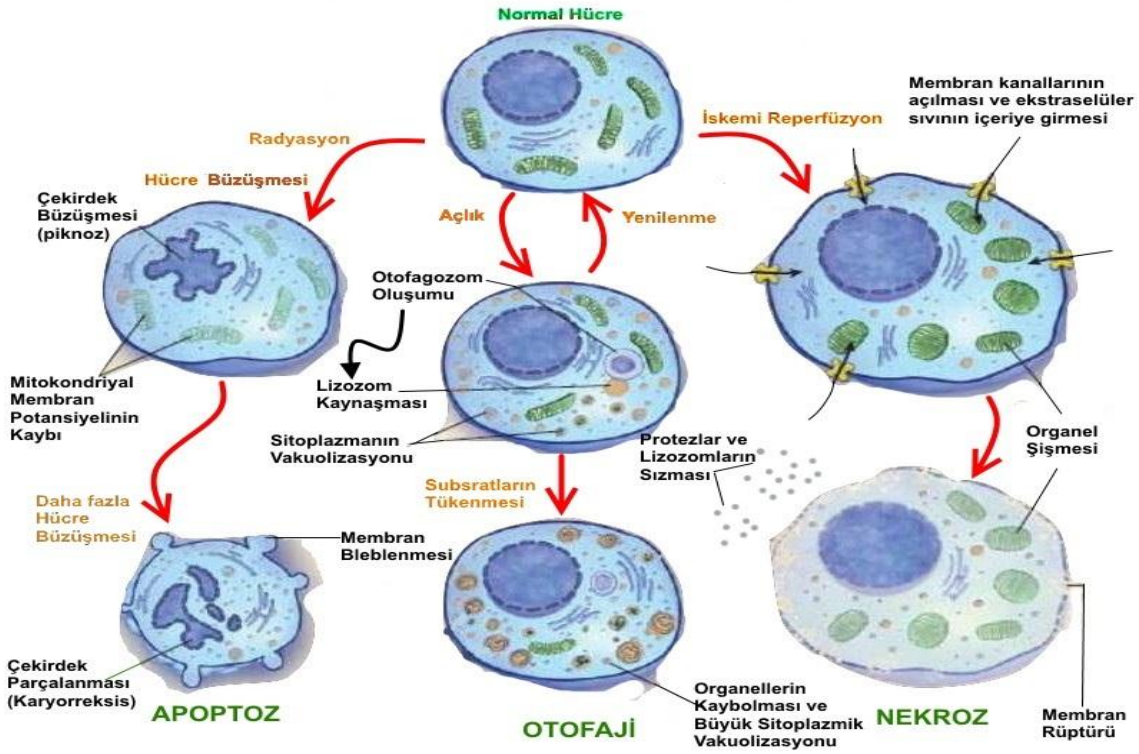
Hastaların %20'sinden daha azı cerrahi ameliyat için aday olabilmektedirler. Çünkü pankreas kanseri genellikle metastaz gerçekleştikten sonra saptanabilmektedir. Cerrahi müdahale için uygun bir aday olduğu düşünülen hastalarda bile, kanserin çoğunlukla çok geniş bir alana yayıldığı gözlenmiştir. Bazen ameliyat, kemoterapi (bazen radyasyon) ve adjuvan tedavilerini birlikte gören hastalarda tekrar nüksetme riski düşebilmektedir. İleri evrelerdeki hastalar için, kemoterapi hayatta kalmayı uzatabilmektedir [20].

1.2. Kanser ve Hücre Ölümü

1.2.1. Hücre ölümü mekanizmaları

Hem tek hücreli hem de çok hücreli organizmalarda yaşam; doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölüm gibi belli başlı kısımlardan oluşmaktadır. Her canlının hayatını devam ettirebilmesi için ölüm ve yaşam arasında sahip olması gereken bir denge vardır. Bir canlıda yeni hücreler meydana gelirken bazı hücreler ise çeşitli şekillerde yok olmakta ve bu da canlının yaşam dengesini meydana getirmektedir. Bu dengede meydana gelebilecek en ufak bir bozukluk bile çeşitli hastalıklara kapı açmaktadır. Bu dengeyi koruyabilmek adına canlı organizmalar birçok hücre ölüm mekanizmasına sahiptir [13]. Meydana gelen hücre ölümleri birçok farklı şekilde olmasına rağmen genellikle üç şekilde gerçekleşmektedir. Bunlar; hücrenin kendi kendini parçalaması anlamına gelen otofaji, genellikle kontrolsüz olarak gerçekleşen hücre ölümü nekroz, ve programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozdur (Şekil 1.1.)

[22]. Bunların dışında nekroptoz, mitotik katastrofi, pyroptosis, paraptosis, entosis ve anoikis gibi ölüm çeşitleri de mevcuttur [23].



Şekil 1.1. Hücre de meydana gelen üç ana ölüm şekli

Kaynak: Hotchkiss R, 2009.

1.2.1.1. Otofaji

Otofaji, organizmanın fizyolojik ve evrimsel olarak kendini koruması için geliştirdiği bir ölüm mekanizmasıdır [24]. Kelime anlamı kendini yeme (auto-phagy) olan bu hücre ölüm şekli; açlık durumunda besin elde etmek için hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlar aracılığı ile kendini parçalaması demektir. Uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organellerin parçalanması sonucu elde edilen aminoasit gibi hücre yapı taşları, metabolizmaya kazandırılarak yeniden kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar otofajinin, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü, metabolizma düzenlenmesi ve bağışıklık sistemin bir parçasının olduğunu göstermiştir [25].

1.2.1.2. Nekroz

Nekroz, genler tarafından kontrolü sağlanamayan, kontrol dışı meydana gelen bir hücre ölüm şeklidir. En yaygın nedeni hipoksi olmakla beraber, arsenik, siyanid, insektisitler gibi toksik maddeler ve ağır metaller, çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar nekroza neden olmaktadır. Nekroz sırasında sitoplazmik organeller özellikle mitokondri parçalanır veya hasarlanır, hücre membranı seçici geçirgen özelliğini kaybeder, hücre şişer ve parçalanır. Hücre içeriği ise dış dokulara yayılarak enflamasyona neden olur. Ayrıca mitokondriyal ROS üretimi artar, Kalsiyum kanalları açılır, apoptotik olmayan proteazlar aktive olur ve ATP üretimi azalır [26]. Nekrotik olaylar kaspazlardan daha çok yukarıda bahsedilen hücresel değişiklikler ile bağdaştırılmaktadır. İnflamasyon olayları da sıklıkla nekrozu tetiklemektedir. Ani gelişen nekrozun yanında "Programlanmış nekrotik hücre ölümü" adı verilen nekroz, çeşitli sinyalleme kaskadları arasındaki etkileşimin sonucudur. "Programlanmış nekroz" ya da "nekroptoz" terimi topluca nekroza atıfta bulunmaktadır ve bu ölüm sürecinin bir derece düzenleme ve moleküler mekanizmasını vurgular [27]. Nekroz yayılımındaki ana oyuncular RIP3 (reseptör etkileşimli serin/treonin kinaz 3), Ca^{2+} ve mitokondrilerdir. RIP3 RIP1 ile etkileşerek, karbonhidrat ve glutamin metabolizmalarının çeşitli enzimlerine bağlanır [28]. Ca^{2+} , nekrotik hücre ölümüne yol açan bir dizi olaya neden olan PLA'nın (polilaktik asit), kalpainlerin ve nitrik oksit sentazın (NOS) aktivasyonunu kontrol eder. Mitokondriyum aşırı reaksiyonlu oksijen türleri (ROS) oluşumu, mitokondriyal geçirgenlik geçişi ve mitokondriyal disfonksiyona bağlı ATP tükenmesi nedeniyle nekroza katkıda bulunur [29].

1.2.1.2.1. Apoptoz ve nekroz farkı

Apoptoz ve Nekroz karşılaştırması **Çizelge 1.1** ve **Çizelge 1.2.** 'de verilmiştir [13].

Çizelge 1.1. Apoptoz ve Nekroz Karşılaştırması

Özellik Hücre Ölümü	GÖRÜLME NEDENLERİ	MORFOLOJİK ÖZELLİKLER	BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER	DİĞER ÖZELLİKLER
APOPTOZ	Büyüme faktörü eksikliği, Hücre yaşlanması, HIV, Kanser ilaçları, Radyasyon, Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, Sitotoksik T lenfositler	Hücre membranı sağlamdır. Hücre küçülür. Kesecikler oluşur. Kromatin kondensasyonu gerçekleşir. Organeller sağlamdır. Apoptotik cisimcikler oluşur. Erken evrede fosfatidil serin translokasyonu gözlenir.	Programlıdır. ATP gerektirir. DNA kırıkları merdiven şeklini alır (jel elektroforezinde ladder).	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. Makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Enflamasyon görülmez.

Kaynak: Coşkun, 2011

Çizelge 1.2. Apoptoz ve Nekroz Karşılaştırması

Özellik Hücre Ölümü	GÖRÜLME NEDENLERİ	MORFOLOJİK ÖZELLİKLER	BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER	DİĞER ÖZELLİKLER
NEKROZ	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Litik viral enfeksiyon, Toksik maddeler, Ağır metaller, Şiddetli oksidatif stress	Hücre membranı bütünlüğü kaybolur. Hücre şişer. Büyük vakuoller oluşur. Organellerin parçalanır. Hücre lizisi gerçekleşir. Fosfatidilserin Tanslokasyonu yoktur.	İyon dengesi bozulur. ATP gerekmez. DNA rastgele parçalanır (Jel elektroforezinde smear).	Hücreler gruplar halinde ölür. Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır. Enflamasyona neden olur.

Kaynak: Coşkun, 2011

1.2.1.3. Apoptoz

Kelime anlamı Apo: ayrı, Ptoxis: düşmek demek olan apoptoz terimi ilk kez Avusturyalı Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972’de tanımlanmıştır. Hücreleri küçük veziküllere ayrılarak gerçekleşen ölümlerini sonbaharda dökülen yapraklara benzetmişlerdir. Apoptoz, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genler ile düzenlenen, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan bir çeşit hücre ölümüdür. Apoptoz terimi “programlanmış hücre ölümü” olarak da bilinmektedir [30, 31].

Apoptozun kilit nokta işareti nükleusta meydana gelen yoğunlaşma ve kırılmalarıdır. Çünkü normal bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılabilmektedir ancak apoptoziste yaklaşık olarak 300000 adet kırılma meydana gelmekte ve bu nedenle hücre onarımı gerçekleştirilememektedir. Apoptoz, nekrozun aksine tek bir hücre de meydana gelmekte ve hücre şişmek yerine büzüşmektedir. Bunun temel nedenlerinden birisi Na^+ , K^+ , Cl^- iyon kanallarının kapanması ve hücre içi ve dışı arasındaki geçişlerin durmasıdır. Bir diğer neden ise aktin ve lamininlerin ayrılması nedeniyle hücrenin iskelet yapısının bozulmasıdır [30].

Apoptozda kaspaz aktivasyonu, DNA ve protein bozulması ve membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınma olmak üzere üç ana biyokimyasal değişiklik gözlenmektedir. Sağlıklı bir hücrenin membranının iç kısmındaki fosfotidil serinler erken apoptoz evresinde hücre yüzeyine çıkarlar. Bu durum hücrelerin makrofajlar tarafından tanınmasına olanak sağlar ve nekrozun aksine fagositoya elverişli hale gelir. Böylece enflamasyon oluşmaz. Bunun ardından DNA'nın 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutundaki parçalara endonükleazlar ile bölünmesi izler. Bu parçalanma apoptozun işaretidir. Apoptozun bir diğer spesifik özelliği ise kaspaz enzimleridir. Aktive edilmiş kaspazlar birçok hayati hücresel proteini ve nükleer hücre iskeletini parçalamaktadırlar. Ayrıca nükleer DNA'yı daha da indirgeyen DNAaz'ı da aktive etmektedirler [32].

1.2.1.3.1. Apoptozun mekanizması

Apoptoz mekanizmaları oldukça karmaşık bir yapıda olup hala tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir. Günümüze kadar apoptozun mekanizması ile ilgili yapılan çalışmalar bize dış ölüm reseptör yolağı (ekstrinsik yolak) ya da iç ölüm reseptör yolağı (mitokondriyal yolak, intrinsik) olarak iki ana mekanizmaya işaret etmiştir. Bu ikisinin dışında son zamanlar yapısı aydınlatılmaya başlanmış ER (endoplazmik retikulum) stres aracılı apoptoz yolağı mevcuttur. Ancak bütün bu yolakların başlatıcı ve durdurucu merkezleri kaspazların aktivasyonundan geçmektedir. Ayrıca bütün bu yolaklar bir şekilde birbirleriyle de iletişim halindedir [32, 33].

Dış reseptör ölüm yolu

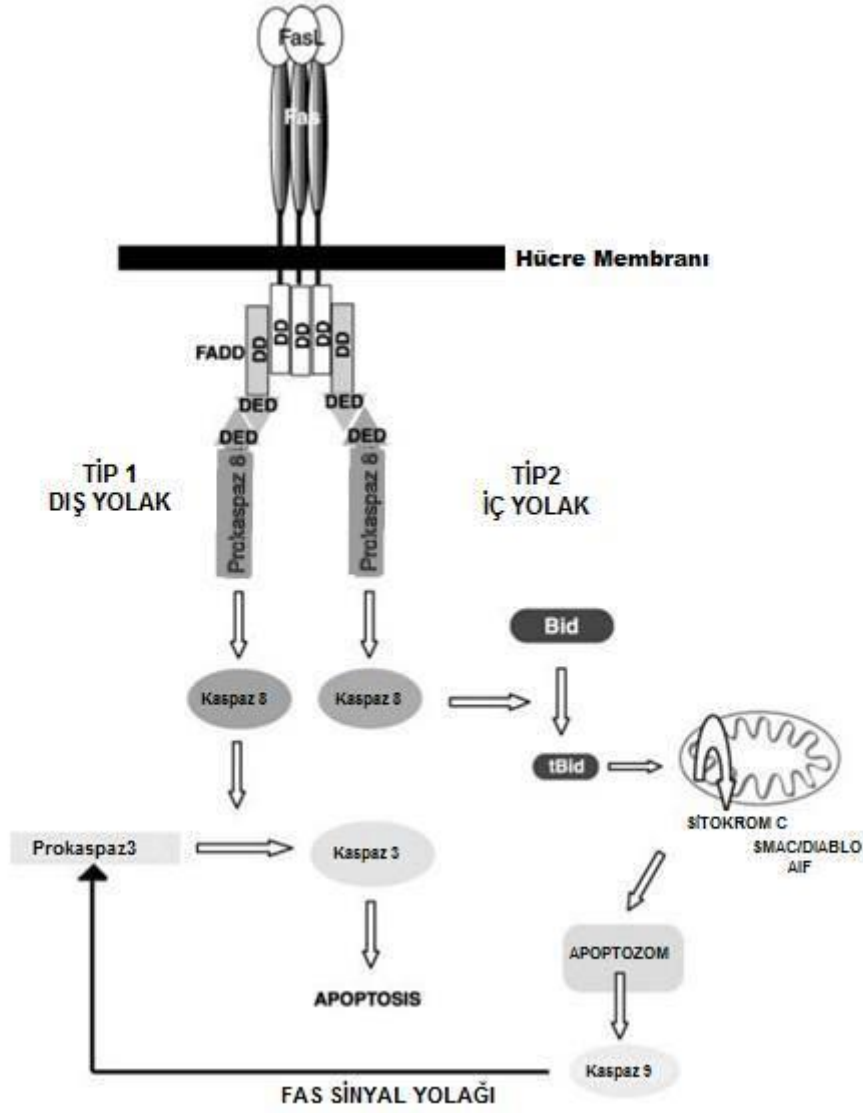
Dış yolak, hücre membranına yerleşmiş olarak bulunan ölüm reseptörlerine "death reseptör" (DR) spesifik ligandlar olan ölüm ligandlarının bağlanması ile aktive olurlar. Ölüm reseptörleri, Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR) süper ailesine aittir. Ölüm ligandları reseptörlerine bağlandıktan sonra apoptotik sinyaller göndererek bir dizi apoptotik kaskadları başlatmaktadırlar. En iyi karakterize edilmiş olan üyeler; FAS (Apo1 veya CD95) ve TNFR1 (p55 veya CD120a)'dır. Ölüm reseptörü 3 (Apo3, WSL-1, TRAMP veya LARD), ölüm reseptörü 4, ölüm reseptörü 5 (Apo2, TRAIL-R2, TRICK2 veya KILLER), ölüm reseptörü 6 da TNFR ailesinin diğer üyeleridir. Bu reseptörler transmembran reseptörleridir ve intrasellüler ölüm bölgeleri "death domain"(DD) ve ekstrasellüler sistein açısından zengin alanları "cysteine-rich domain" (CRD) ile karakterize edilmektedirler [34]. Bu ölüm reseptörlerinden Fas reseptörlerine;

FAS ligandı (FasL); TNFR-1lere TNF ve lenfotoksin α ; DR3 reseptörlerine Apo3 ligandı; DR4 ve DR5 reseptörlerine ise TRAIL'ler bağlanmaktadır [35, 36].

Ölüm reseptörleri, TNF(TRADD: TNFR Adaptör Protein with Death Domain) intraselüler ölüm domaini veya FAS (FADD: FAS Adaptör Protein with Death Domain) ölüm domainlerine bağlanabilirler. FADD'ın; ölüm domaini (DD) ve ölüm etkili domain (DED: Death Effector Domain) olmak üzere 2 adet protein etkileşim bölgesi bulunmaktadır. FADD ölüm reseptörlerine bu domainler arasındaki etkileşimler sonucunda bağlanabilmektedir. FADD'ın prokaspaz-8'e bağlanması, kendisi ve prokaspaz-8'de bulunan DED'lerin etkileşimi sonucu gerçekleşmektedir. Bu bağlanma sonucunda, ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (DISC: Death Inducing Complex) oluşur. DISC pro-kaspaz 8'i aktive eder ve aktifleşen prokaspaz-8 aktif kaspaz-8'e dönüşür. Aktif kaspaz-8 ise kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi sonlandırıcı kaspazları aktifleştirerek hücre ölümüne neden olur [14, 34].

Bu yolların düzenlenmesi karmaşıktır çünkü TNFR1'ler sadece hücre ölümü yollarını değil aynı zamanda Nükleer Transkripsiyon Faktörü (NF-kB) ve JNK aracılı sinyal yollarını da tetikleyebilmektedir. Ayrıca başka yolları da tetikleyebilmektedir. Kaspaz-8'in aktivasyonu C-FLIP (hücrel kaspaz & FLICE inhibitör proteinler) tarafından engellenmektedir [14].

DISC oluşumunu aynı yol üzerinden kullanmasına rağmen 2 farklı FAS yolağını tercih eden 2 hücre türü tanımlanmıştır. Bu tercih bazen gelen sinyal yoğunluğuna göre de şekillenmektedir. Bu yollar Tip1 ve Tip2 olarak adlandırılmaktadır. Tip1 yolağı bu başlık altında anlatılan apoptoz sinyal yolağıdır. Tip 2 ise iç yolak olan mitokondri aracılı apoptoz yolağıdır ve diğer başlık altında anlatılmıştır (Şekil1.2.) [34].



Şekil1.2. Fas Sinyal Yolağı

Kaynak: Ashe, 2003

İçsel ölüm reseptör ölüm yolu (iç mitokondriyal yolu)

Apoptozu başlatan olayların her biri, bir noktada mitokondri ile kesişmektedir. Mitokondrinin anahtar rol oynaması sebebi ile bu yolağa iç mitokondriyal yolağı adı da verilmektedir. DNA hasarı, hipoksi, viral enfeksiyonlar, Ca^{+2} 'nin sitozoldeki konsantrasyonunun artışı, büyüme faktörlerinin ve hormonların yokluğu, radyasyon, toksinler, hipertermi ve bazı serbest radikaller mitokondriyal yolağı başlatan tetikleyicilerdir [32, 33]. Ayrıca gelen sinyaller ile DISC'in aktifleştirdiği tip2 yolağı da mitokondri üzerinden devam eden bu iç yoldur.

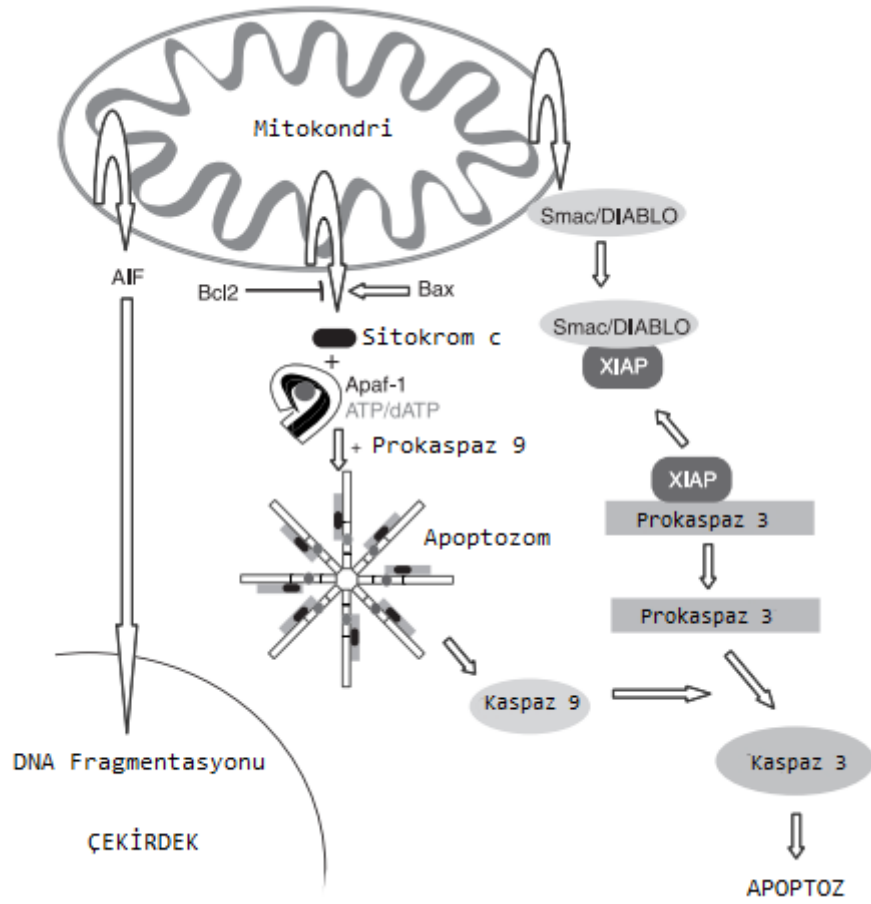
Mitokondriyal iç yolak, Bcl-2 ailesine ait bir grup protein ile düzenlenmektedir [37]. Bcl-2 ailesindeki proteinler birbirine iki zıt gruptan oluşmaktadır. Bu proteinler pro-apoptotik ve anti-apoptotik olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Pro-apoptotik proteinler (Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk) ile anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1) birbirlerine zıt olarak çalışırlar. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden salınımını indüklerken, anti-apoptotik proteinler salınımını baskırlar. Pro-apoptotiklerin anti-apoptotiklere bağlanması ile uygulanan baskı kalkar ve sitokrom c salınımı serbest hale gelmektedir. Bu nedenle de pro-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu apoptozu indüklediği, anti-apoptotik proteinlerin ise baskıladığı görülmektedir [32].

Bax ve Bad'lar mitokondri membranına yerleşmiş halde bulunan pro-apoptotik proteinlerdir. Sağlıklı hücrelerde, Bax ve Bad monomer olarak bulunurlar ve mitokondriyi etkileyerek içsel yolağı düzenlerler. Normalde Bax proteini hücrede serbest halde bulunmaktadır ancak bir ölüm sinyali alındığında mitokondrinin dış membranına yerleşerek mitokondri membranında bulunan Bak'larla oligomerleşir ve aktifleşirler. Böylece mitokondri membran geçirgenliği artar ve mitokondriyal iç membrandan bazı apoptotik proteinler dışarı salınır [38]. Bu proteinler, apoptoz indükleyici protein (IAP), ikinci mitokondri kökenli kaspaz aktivatörü (Smac), bağlanma proteini (DIABLO), doğrudan apoptoz inhibitör faktör (AIF), Omi/yüksek sıcaklık proteini A (HtrA2) ve sitokrom c'dir [32]. Sitozolik bir protein olan APAF-1 (apoptosis protease-activator factor 1), sitozole salınan sitokrom c ve kaspaz 9 ile birleşerek "apoptozom" adı verilen kompleksi oluştururlar. Bu oluşum aracılığı ile de sonlandırıcı kaspazlardan kaspaz 3 aktive edilir (Şekil1.3) [39].

Bir diğer taraftan da Smac/DIABLO veya Omi/ HtrA2, apoptoz protein inhibitörlerine (IAP) bağlanır. Bu bağlanma IAP'ların kaspaz 3 veya kaspaz 9'la olan aktivasyonunu bozarak kaspazları aktifleştirir [32].

Sitokrom c'nin sitozole salınması salınması JNK yolağını da aktive edebilmektedir. Ancak jnk yolağının apoptozu devam mı ettireceği yoksa sağkalımı mı artıracığı tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte sitokrom c salınımını arttıran birçok apoptotik proteinin JNK aracılı sinyal yolağını fosforile ettiği de bilinmektedir [14].

Mitokondriyal yolak reaktif oksijen türleri (ROS) 'lar aracılığı ile de aktive edilebilmektedir. ROS'lar elektron transport zincirinde bulunan protein komplekslerini düzenlemede görev yapar ve kaspazları aktifleştirerek apoptozu indükler [40].



Şekil1.3. Mitokondri iç yolağı apoptoz şeması

Kaynak: Ashe, 2003.

Endoplazmik retikulum stres aracılı apoptoz yolağı

Endoplazmik Retikulum (ER), salgı ve zar proteinlerinin translasyonu ve katlanması, lipid biyogenezi ve Ca^{2+} 'nin tutulması gibi birçok hücre fonksiyon için önem taşıyan hücreler içindeki membranöz bir ağıdır. ER, çekirdekten plazma zarına kadar uzanmaktadır bu nedenle hücre içi iskelet görevi de görmektedir. ER'nin lümeni, yeni sentezlenen proteinlerin katlanarak ve posttranslasyonel modifikasyonunda yer alan, şaperonlar, katlanan enzimler ve oksitleyici enzimler gibi birçok proteini içermektedir.

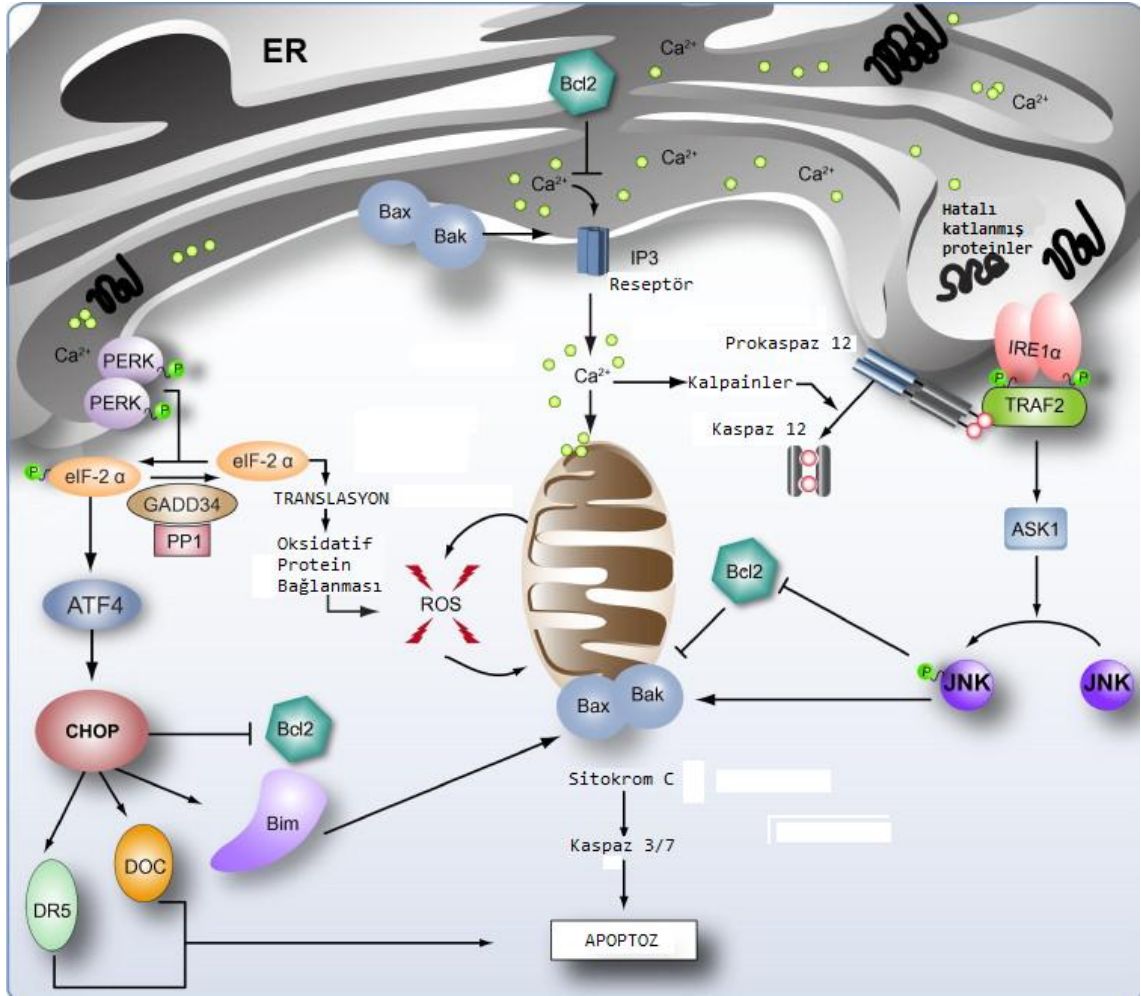
ER, en iyi şekilde çalışabilmek için homeostatik koşullarının iyi korunması gerekmektedir. Enerji yoksunluğu, hücre içi Ca^{2+} düzeylerinin herhangi bir nedenden dolayı bozulması, ER stresini tetikleyen ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikmesi (UPR: Unfolded protein response) ER'nin işlevlerini azaltan streslerdir. Bu streslere örnek olarak hipoksi, oksidatif stres ve glukoz yoksunluğu, iltihaplanma veya

viral enfeksiyon gibi olaylar verilebilir. ER stresine karşı koymak için, sağkalıma yardımcı olan UPR'leri harekete geçirir.

ER'ye lokalize olmuş 3 adet transmembran reseptörü bulunmaktadır. Bunlar; Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6) ve İnositol Gerektiren Kinaz 1 (IRE1 α)'dir. Bu reseptörler stres sensörleri gibi davranmaktadırlar. Normal koşullar altında bu sensörlerin yani reseptörlerden her biri bir protein ile pasif bir konfügürasyon halinde tutulmaktadır. Pasif konfügürasyona neden olan bu proteinler bir ER şaperon proteini olan GRP78 (BİP: Immunoglobulin binding protein)'lerdir. ER stresinden dolayı sayısı artan katlanmamış proteinlere GRP78 bağlanır çünkü GRP78 katlanmamış proteinler için daha yüksek bir afiniteye sahiptir. ER reseptörleri ile bağlantısı kopan GRP78 yerine katlanmamış proteinler bağlanarak hücre ölüm yolları tetiklenir [41, 42].

CHOP, fizyolojik koşullarda sentezlenememekte veya düşük düzeyde sentezlenmektedir. Fakat ER stresinin artması durumunda aşırı eksprese olmaktadır. Apoptoz CHOP'un aşırı uyarılması ile gerçekleşmektedir. UPR cevabında CHOP geni ER membranına lokalize olmuş olan IRE1, ATF6 ve PERK ile uyarılır. Ayrıca CHOP'un Bcl-2 proteinini baskıladığı ve ROS'ların üretimini arttırdığı bildirilmiştir [43].

Bcl-2 ailesinin üyelerinden olan Bax ve Bad proteinleri mitokondri de olduğu gibi ER'den kalsiyum salınımını gerçekleştirmektedir. Bax ve Bad'lar ER'de apoptozu iki farklı yolla uyarmaktadır. Birinci yol, ER stresi sırasında, mitokondri yolağında olduğu gibi Bax ve Bad konformasyonel değişiklik geçirmekte ve ER'den sitoplazmaya Ca⁺² geçişini arttırmaktadır. Kalsiyum konsantrasyonunun artması kalpaini aktive ederek prokaspaz 12'nin uyarılmasını sağlamaktadır. Uyarılan prokaspaz 12 aktif kaspaz 12'ye dönüşmektedir. Aktifleşen kaspaz 12 ise kaspaz 9'u aktifleştirmektedir. İkinci bir yol ise mitokondriyal iç yolağın aktifleşerek direkt kaspaz 9 üzerinden uyarılmasıdır (Şekil 1.4) [44].



Şekil 1.4. Endoplazmik retikulum stres aracılı apoptoz yolları genel şeması

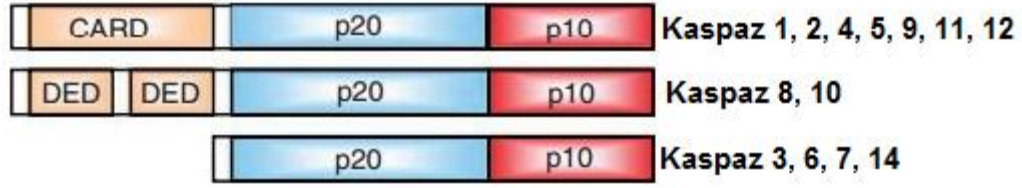
1.2.1.3.2. Apoptozda görev alan proteinler

Kaspazlar

Kaspazlar, aspartik asite spesifik sistein proteazlardan oluşan bir grup enzim ailesindendir. Terimsel olarak sisteine bağlı aspartata özgü proteazlar demektir. Hücre içinde inaktif formda (prokaspaz) veya zimojen olarak bulunmaktadır. Kaspazlar, bir N-terminal "prodomain", geniş bir altbirim ve küçük bir altbirim içermektedirler. Apoptoz indüksiyonu ile proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirmektedirler. 100 farklı proteini keserek apoptoza neden olmaktadır.

Kaspazlar, başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazlar ve inflamatuvar kaspazlar olmak üzere 3'e ayrılırlar. Başlatıcı kaspazlar 2, 8, 9, 10; efektör kaspazlar 3, 6, 7; inflamatuvar kaspazlar ise 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14'ü içeren kaspazlardır. Her aktif kaspaz, iki özdeş büyük altbirimden ve iki aynı küçük altbirimden oluşan bir tetramerdir. "Ölüm Efektör Alanları" (DED) veya kaspaz istihdam alanlarını (CARD) içerebilirler. Bu

alanların yardımıyla, aktif kaspazlar hücrenin içinde veya dışında diğer moleküllere bağlanabilir (Şekil1.5) [45, 46].



Şekil 1.5. Kaspazların yapısı

Kaynak: Li, 2008

Ölüm sinyalleri alan hücre başlatıcı kaspazlar ile apoptotik sürece girmektedir. Apoptotik sürece giren hücreler gelen bu ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletmektedirler. Efektör kaspazlar hücre iskeleti proteinlerini parçalayarak hücre morfolojisinde değişimlere neden olmaktadır. Kaspaz ailesinden ilk tanımlanan enzim prokaspaz 1 olarak bilinen ICE (interlökin 1- β dönüştürücü enzim)'dir. Kaspazlar birçok şekilde aktifleşebildiği gibi IAP gibi proteinler tarafından da inhibe edilebilmektedir [47].

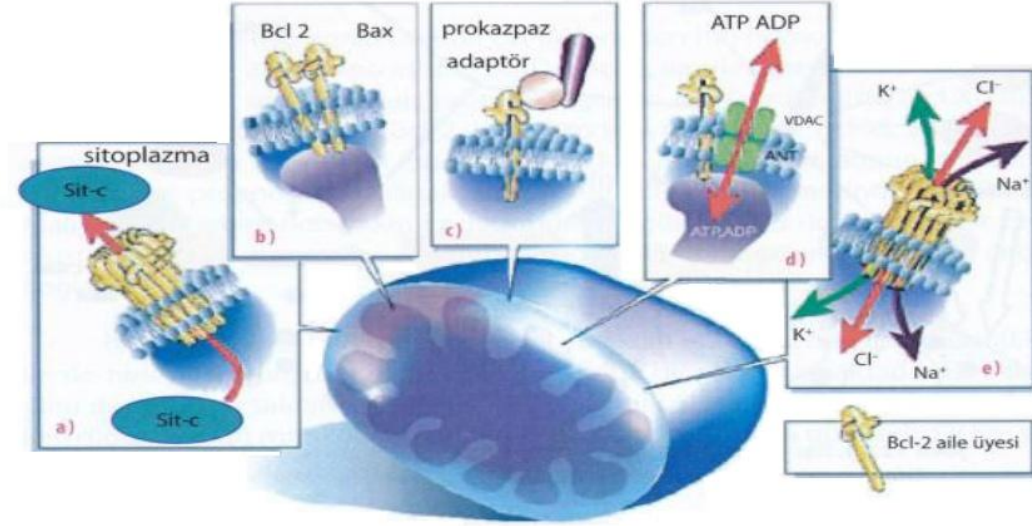
Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik olmak üzere iki gruba ayrılan, apoptozun düzenlenmesinde en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur. Bcl-2 yani B hücre lenfome 2 ailesi genlerinin heterodimer ya da homodimer formu hücreyi apoptoza sürüklenmesini sağlayan nedenlerden biridir.

Bcl-2 ailesinin tanımlanmış olan 20 üyesi bilinmektedir. Bu üyelerin bir kısmı apoptozu indüklerken bir diğer kısmı ise inhibe etmektedir. Apoptotik süreci indükleyen bcl-2 ailesine proapoptotik proteinler, inhibe eden ailesine antiapoptotikler adı verilmektedir. Bu proteinlerin ekspresyon düzeyleri ile hücrenin yaşam ve ölüm arasındaki denge kurulmaktadır. Proapoptotik üyeler Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Antiapoptotik üyeler ise BHRL-1, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1, Bcl-1'dir.

Proapoptotik üyeler sitozolde yer almaktadır ve sitokrom c, AIF gibi medyatörlerin salınımını artırarak apoptozu indüklemektedirler. Antiapoptotik proteinler ise mitokondri membranının dışında, ER ve çekirdek zarında por oluşumu sağlayarak Ca^{2+} iyonların transportunu ayarlarlar. Ayrıca kaspazların aktive olmasını, AIF ve sitokrom c salınımlarını durdurabilmektedirler. Bu nedenle Bcl-2 ailesi, apoptozu indüklemelerinden çok inhibe etmeleriyle bilinmektedir [48, 49, 50].

Bcl-2 geni ilk keşfedilen memeli genlerinden birisidir. Mitokondride, nükleus dışında ve ER zarında bulunmakta ve ağırlığı 25-26 kDa'dır. Bcl-2 proteini mitokondriyal iç yoldan ER ile birleşmekte ve ER aracılığı ile de apoptoz da rol oynamaktadır [51].



Şekil 1.6. Bcl-2 ailesi proteinlerinin sahip olduğu özelliklerin gösterilmesi a) mitokondri membranında por oluşturarak sitokrom c ve diğer intermembran proteinlerinin salınmasını, b) pro ve antiapoptotik üyeler arasında heterodimer oluşumunu c) Adaptör moleküller aracılığı ile kaspazların aktivitesinin düzenlenmesi, d) Diğer mitokondriyel proteinlerle etkileşim (VDAC), e) Oligomerize olarak zayıf seçici iyon kanalı oluştururlar.

Kaynak: Pınarbaşı, 2007

1.3. Kanser Tedavi Stratejileri

Tıp tarihindeki en eski kanser kaydı M.Ö. 3000'de Mısır'da yazılmıştır. Bu papirüste yazılmış olan 48 vaka arasından 45. vakada memeden kaynaklanan şişlik yapan tümör tarif edilmiştir. Bu tümör ile ilgili, dokunmayla soğuk olması durumunda tedavisinin olmadığı belirtilmiştir. Ulaşılan ilk kanser kaydı meme kanseri olduğu düşünülen bu kanserdir ve papirüste bir erkekte olduğu belirtilmiştir [52].

Kanser, günümüzün en sık görülen sağlık sorunlarından birisidir. Ülkemizde 1970'li yıllarda dördüncü sırada yer alan kanser, günümüzde kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada gelmektedir. Üstelik gerçekleşen 10 ölümden birisi kanser nedeniyle olmaktadır. Kanser sisteminin hala tam anlamıyla çözülememiş olması, neden olduğu

ölüm sayıları, görülme sıklığı gibi nedenlerden dolayı araştırmacıların dikkatini çeken konulardan biri haline gelmiştir [53].

Kansere yol açan etkenler genetik ve çevresel etkenler olarak iki gruba ayrılabilir. Bu etkenler ülkelere göre değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, Havaililerde kolon kanser oranı mide kanser oranına göre yüksekken Japonlarda mide kanseri oranı, kolon kanserine göre yüksektir [54].

Yaşamsal fonksiyonlar için gerekli olan kimyasallar, genlerdeki kodlar ile sentezlenmekte ve metabolik faaliyetlerde kullanılmaktadır. Metabolizma da kullanılan kimyasallar vücutta birikerek toksik etkiye neden olabileceğinden, vücuttan atılmaktadır bu işleme dotoksifikasyon adı verilmektedir. Ancak bu kimyasallar bazen DNA'nın geri dönüşümsüz hasarına neden olabilmekte ve kanser oluşmasını tetikleyebilmektedir. Bu kimyasalların kanserojen madde olmasına göre kanseri tetikleme ihtimalleri değişmektedir. Bu tarz kanser faktörlerine çevresel risk faktörleri adı verilmektedir [55].

Kansere neden olan faktörlerden genetik faktörler, çevresel faktörlere nazaran sadece %1 gibi bir kısmı oluşturmaktadır. Kalıtım ile genlerde meydana gelen bozukluklar çocukluk çağındaki kanserlere neden olmaktadır. Ancak farklı genlerde meydana gelen bozukluklar (BRCA1, BRCA2 gibi) ile ileri yaşlarda kanser oluşumuna sebep olabilmektedir [56].

Kanser tedavisinde yaygın olarak cerrahi tedavi, radyoterapi (ışınla tedavi) ve kemoterapi (ilaçla tedavi) kullanılmaktadır. Bunların dışında hormon tedavileri, biyolojik tedavi yöntemleri ya da hedefe yönelik tedaviler kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemleri tek başına ya da kombinlenerek kullanılabilir. İlk yapılan tedaviler genellikle birinci basamak tedavi adı verilmektedir. Birinci basamaktan önce yapılan tedavilere Birinci basamaktan önce yapılan tedaviler neoadjuvan, birinci basamaktan sonra uygulanan tedaviler ise adjuvan tedaviler olarak bilinmektedir [57].

Kanser tedavisinde uygulanacak olan yöntemler kanserin cinsine ve bulunduğu bölgeye göre farklılık göstermektedir. Bu yöntemler arasında en çok tercih edilen yöntem kemoterapidir [10].

Kullanılan kanser tedavi yöntemlerinin kanserli bölgeyi yok ederken, kanserli bölgenin etrafında bulunan sağlıklı doku ve organlara zarar vermemesi amaçlanmaktadır [58].

1.3.1. Cerrahi tedavi

Bazı kanser türleri cerrahi müdahale ile vücuttan çıkarılabilmektedir. Pek çok kanser türü için uygulanan ilk yöntem genellikle cerrahi tedavi olmaktadır. Cerrahi müdahale tedavinin yanında, tanının doğrulanması, evreleme, yan etkilerin ve ağrıların azaltılmasında da uygulanmaktadır.

1.3.2. Radyoterapi

Wilhelm Conrad Röntgen 1895 yılında X ışınını keşfetmiştir. Kanserli hastalara radyasyon tedavisi uygulaması X ışınının keşfinden hemen sonra başlamıştır. O günden bugüne kadar gelişen teknoloji sayesinde radyasyon tedavi yöntemleri de gelişmiştir.

Radyasyon tedavisi daha çok radyoterapi olarak bilinmektedir. Radyoterapi tek başına uygulanabildiği gibi kemoterapi ve cerrahi yöntemler ile beraber de uygulanabilmektedir. Radyoterapinin ana amacı tümör hücrelerini yok ederken ya da tümörü küçültürken sağlıklı dokularda oluşabilecek hasarı da minimuma indirmektir. Radyoterapi internal ve eksternal olarak uygulanabilmektedir. Internal radyoterapide radyoaktif madde hastaya damardan ya da ağız yolu ile hap şeklinde verilmektedir. Eksternal radyoterapi en sık kullanılan radyoterapi şeklidir ve radyasyon kaynağı hastaya dışarıdan ışın kaynağı bir makine yardımı ile verilmektedir [59, 60].

1.3.3. Kemoterapi

1940'lı yıllarda II. Dünya Savaşı sırasında Mustard gazı taşıyan bir yük gemisinin batması ile askerler bu gaza maruz kalmıştır. Bu maruziyet sonucunda askerlerde lökopeni (lökosit azalması) gelişmiştir. Bu durumdan esinlenerek ilk sitotoksik ilaç olan nitrogen mustard üretilmiştir. Böylece kemoterapinin keşfi gerçekleştirilmiştir [61, 62].

Lösemi ve lenfoma gibi cerrahi müdahale ya da radyoterapi ile tedavi edilemeyen kanser türleri ya da cerrahi yöntem için geç teşhis edilen vakalarda en uygun tedavi yöntemi olarak kemoterapi görülmektedir [62].

Kemoterapi de asıl hedef diğer tedavi yöntemlerinde de olduğu gibi normal dokulara zarar vermeden, tümörlü bölgeyi küçültmek ya da yok etmektir. Günümüzde kemoterapi tedavisi gören hastalarda görülen en temel sıkıntı bu durumdur. Kemoterapi ilaçları durmaksızın bölünen tümör hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını durdururken veya onları yok ederken, vücutta hızla çoğalan kemik iliği hücreleri,

bağırsak ve ağız mukozası hücreleri, saç folikülleri, testis epitelyumu, fetüs ve embriyo hücreleri gibi normal hücrelerinde gelişip çoğalmasını önlemektedir. Bu nedenle kemoterapi tedavisi alan bireyler de tümörün iyileşmesine ek olarak yorgunluk, ağrı, saç dökülmesi, bulantı-kusma gibi bir çok yan etkide görülmektedir [63].

Bu nedenle tedavi yöntemlerin tümünde, kanserli hastada yeterli derecede analjezi sağlanması ve destekleyici tedaviler ile yaşam kalitesinin artırılmasıdır [64].

1.4. Antidepresanlar ve Kanser İlişkisi

Biyolojik, genetik, psikososyal ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimler sonucunda ortaya çıktığı düşünülen depresyon; stres, duygusal travma, viral enfeksiyonlar, biyolojik saatte meydana gelen değişimler ile meydana gelebilmektedir [65, 66]. Depresyon tedavisinde; ilaçlar, diyetin ve uykunun düzenlenmesi, egzersizler, psikoterapi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Klinikte kullanılan antidepresanlar dopamin, norepinefrin veya serotoninin beyindeki etkilerini artırarak iş görmektedirler [67].

Antidepresan ilaçlar afektif hastalıklar adı verilen duygu durum hastalıklar grubunda ve depresif bozukluk, manik bozukluk tedavisinde kullanılmaktadır. Depresyon tedavisinde kullanılan antidepresanlar dopamin, nöradrenalin ve serotonin gibi nörotransmitterlerin sinaptik konsantrasyonlarını arttırarak tedavi ederler. Bu konsantrasyon artışı, bir çok farklı şekilde sağlanabilmektedir [68].

Antidepresan ilaçların etki mekanizmaları henüz tam anlamıyla anlaşılmamıştır. Ancak, santral sinir sisteminde katekolaminler (noradrenalin, dopamin) veya indolamin olan serotonin gibi nöromediyatör monoaminlerin sinapslardaki kinetiği veya reseptörleri etkilemesi hepsinin ortak mekanizmasıdır. Antidepresanların çoğu, nörotransmitterleri noradrenerjik ve/veya serotonerjik sinapslarda geri alınımını inhibe ederler. Bu inhibisyon hemen başladığı halde ilaçların etki etmesi 2-3 haftalık bir süreç sonunda gerçekleşmektedir [68].

Antidepresanlar etki mekanizmalarına göre şu şekilde sınıflandırılmaktadırlar:

Çizelge 1.3. Etki mekanizmasına göre antidepresanlar

İLAÇ GRUBU	ETKİ MEKANİZMASI
Trisiklik Antidepresanlar(TSA) (amitriptilin, imipramin, desipramin)	Serotonin, dopamin ve noradrenalinin geri-alımını inhibe ederler.
Monoamin Oksidaz İnhibitörleri(MAOİ) (moklobemid)	Serotonin, dopamin ve noradrenalinin parçalanmasında görev alan enzimleri (MAO-A, MAO-B) inhibe ederler.
Selektif Serotonin Geri-alım İnhibitörleri (SSRI) (fluoksetin, paroksetin, fluvoxamin, setralin, sitalopram, essitalopram)	Seçici olarak serotonin geri-alımını inhibe ederler. Diğer nörotransmitterler üzerinde de bir takım etkileri vardır.
Nöradrenalin ve Dopamin Geri-alım İnhibitörleri (bupropion)	Noradrenalin ve dopamin geri-alımını inhibe ederler.
Serotonin Antagonistleri ve Geri-alım İnhibitörleri (trazodon, nefazodon)	Öncelikle 5-HT ₂ reseptörlerini antagonize ederler. Ayrıca nefazodon; serotonin, noradrenalin ve dopamin geri- alımını inhibe eder.
Noradrenerjik ve spesifik serotonerjik ajanlar (mirtazapin)	α_2 otoresptörleri ve heteroresptörlerini antagonize ederler. 5-HT _{2A/C} ve 5-HT ₃ reseptörlerini bloke eder; 5-HT ₁ reseptörlerini uyarırlar.
Serotonin- Noradrenalin Geri-alım İnhibitörleri (venlafaksin, duloksetin)	Serotonin ve noradrenalinin geri-alımını inhibe ederler.

Trisiklik antidepresanlar tersiyer trisiklikler, sekonder trisiklikler ve tetrasiklikler olarak gruplandırılabilir. Tersiyer trisiklikler, Amitriptilin, Klomipramin, Doksepin C, İmipramin, Trimipramin; sekonder trisiklikler, Amoksapin, Desipramin, Nortriptili, Protriptilin ve tetrasikler, Maprotilindir [69].

Trisiklik antidepresanlar (TSA) etkinlikleri kanıtlanmış ve 70 yılı aşkın bir süredir kullanımda olan ilaçlardır. Üç halka çekirdeğinden meydana gelen bu antidepresan grubu ismini yapısından almaktadır. Ancak bu grupta sanıldığı gibi aksine sadece trisiklik yapılardan değil, “monosiklik”, “bisiklik” ve “tetrasiklik” yapıda olanlardan da bulunması nedeniyle aslında bu isim çok uygun görülmemektedir [70, 71]. TSA’lar depresyon tedavisinde kullanılmaktadır ancak ilk başta antihistaminikler olarak sedatif özellikleri için kullanıldığı, daha sonra anti-psikotik olarak kullanılmaya başlandığı düşünülmektedir. TSA’lar depresyon tedavisinin yanında obsesif kompulsif bozukluk, panik atak tedavilerinde de kullanılmaktadır [71]. TSA’lar serotonin (5-HT) ve

nöradrenalinin geri alımını engelleyerek iş yapmaktadırlar. Neden oldukları biyokimyasal olaylar daha ilk dozda başlarken, etkileri iki-üç hafta içerisinde görülmektedir [72].

Antidepresan kullanımı ve kanser arasındaki ilişki yıllardır üzerinde tartışılan bir konudur. İnsan dışı yapılan çalışmalarda antidepresanların intraselüler'e bağlanarak tümör büyümesini teşvik edici etkilere sahip olduğu ileri sürülmüştür. Bir diğer yandan ise tümör büyümesini inhibe edici ve sitotoksik etkisi gösterilmiştir. Antidepresanların akciğer kanserine ilişkin risklerini anlamaya yönelik yapılan bir çalışmada herhangi bir bulguya rastlanamamıştır. Yine aynı çalışmada kullanılacak olan antidepresanın türüne ve kanser türüne göre durumların değişebileceği savunulmuştur [73].

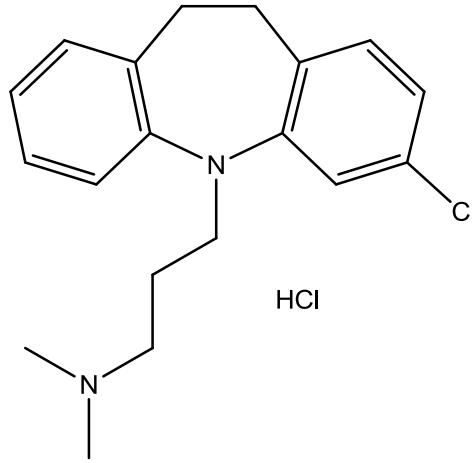
TSA'lar etkilerini, yapılan in vivo çalışmalarda membranlar ve membrana bağlı enzimler (özellikle mitokondriyal membrana) ile olan etkileşimlerden dolayı adenosin triphospat (ATP) üretiminin sınırlandırılması ve hücre solunumunun inhibe etmesi ile sonuçlandığı gösterilmiştir [74]. Yapılan daha ileri çalışmalarda ise kanserli hücrelerin, sağlıklı hücrelere kıyasla TSA'ların önleyici etkilerine karşı çok daha hassaslaştığını göstermişlerdir. TSA'lar ile yapılan tedaviden sonra, solunum oranlarının normal hücrelere göre kanserli hücrelerde belirgin bir şekilde daha az olduğu oksijen elektrot çalışmalarında gözlenmiştir. TSA'lar gibi anti-mitokondriyal ilaçların, kanser hücrelerinde mitokondriyal aktiviteyi baskıladığı, böylece hücre ölümüne yol açtığı, ancak sağlıklı hücrelerin tedaviden sonra iyileşmeyi başarabildiği sonucuna varılmıştır [75]. TSA'ların sahip olduğu bu etkiler trisiklik antidepresan grupları arasında ortak bir özellik olarak bulunmasına karşın kimyasal yapı ve farmakolojik etki bakımından herhangi net bir bilgi bulunmamaktadır. [76] Ancak bununla beraber klor içeren ilaçlarda mitokondriyal membranın işlevlerine karşı diğer ilaçlara göre daha toksik olduğu söylenmektedir [77].

Mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ATP tükenmesine ve nekrotik hücre ölümüne neden olabilir [78]. Ancak son zamanlarda mitokondrinin hem apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesi hem de kanser oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir [76]. Kanserli dokuda mitokondriyal solunumun azaldığı ve mitokondrinin hücre içeriğinin azaldığı bildirilmiştir. Bu bulgular, tümör hücrelerinin bir enerji kaynağı olarak glikolizden yararlandığını ve bunun hipoksik koşullar altında hayatta kalmalarını sağladığını göstermektedir [79]. Mitokondrinin apoptozu birkaç yol üzerinden tetiklediği bilinmektedir. Trisiklik antidepresanların apoptozu mitokondri yoluyla üzerinden tetiklediği bilinmektedir [80].

TCA'lar imipramin ve Klomipramin ile seçici serotonin geri alım inhibitörü (SSRI) sitalopramın kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği ve bu sürecin reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde erken bir artışa neden olduğu ve bunun sonucunda ortaya çıkan mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [81]. TSA'ların akut miyeloid lösemik hücrelerde, lenfomalarda ve gliomalarda apoptozu indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [80].

1.4.1. Klomipramin hidroklorür

$C_{19}H_{24}Cl_2N_2$ moleküler formülüne sahip olan Klomipramin Hidroklorür'ün yapısı Şekil 1.7. 'da gösterilmiştir [82].

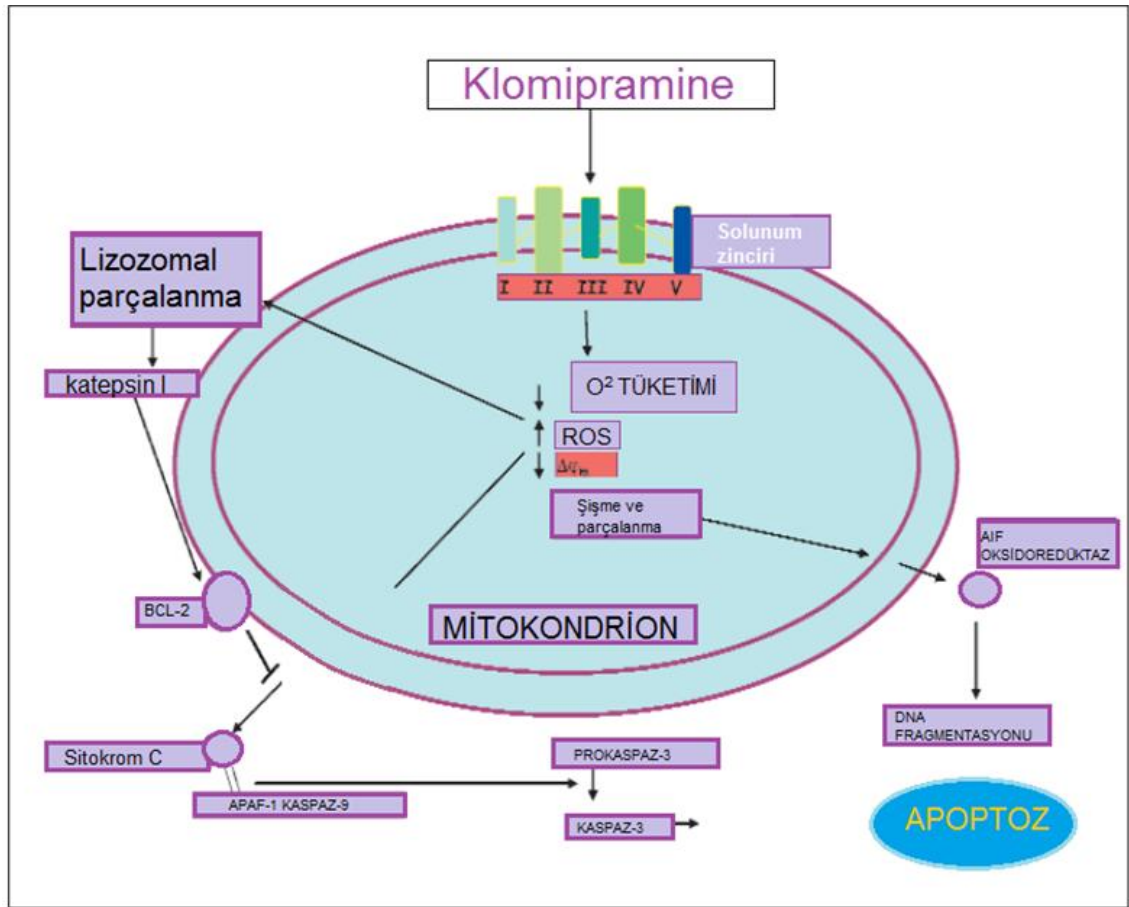


Şekil 1.7. Klomipramin Hidroklorür'ün moleküler yapısı

Trisiklik antidepresan grubunun bir üyesi olan Klomipramin 30 yılı aşkın süredir ilaç olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda Klomipramin'in maya ve insan fibroblast hücrelerinde; hücrel oksijen tüketimini blokladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda Klomipramin insan lösemi hücreleri, katı mürin tümörleri ve insan renal kanser hücrelerine karşı pozitif bir etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca; TSA'ların normal insan lenfositlerinde ve non-Hodgkin lenfoma hücrelerinde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Klomipramin etki mekanizması, ROS seviyesinin yükseltilmesini, sitokrom c salınımını ve kaspaz ile aktifleştirilmiş apoptoz ile sonuçlanan solunum zincirindeki kompleks III inhibisyonunu içerir [83].

Klomipramin, solunum zinciri kompleksi III yoluyla mitokondriyal aracılı apoptozu tetikleyerek hareket eder. Burada, azaltılmış reaktif oksijen türlerine ve neoplastik hücreye özgü membran potansiyelini değiştirerek, sitokrom C aracılığıyla kaspaz yolağını aktive eder ve apoptozu harekete geçirir (Şekil 1.8) [83]. Xia ve arkadaşlarının HL-60 insan akut lösemi hücreleri ile yaptıkları çalışmada, apoptoz

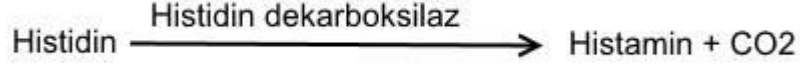
öncesinde Klomipramin'in reaktif oksijen türlerinde artışa neden olduğu ve bununda mitokondriyal membran potansiyel değişikliklerine ve kaspaz 3 aktivasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir [81, 84]. Bütün bunlara ek olarak Klomipramin'in seçici serotonin gerilimli inhibitör grubu arasında glioma ve lenfomada en etkili olduğu bilinmektedir. Çok yakın zamanlar da Klomipramin ile SSRI'ları karşılaştırarak yapılan çalışmalarda, C6 rat glioma ve insan nöroblastoma hücrelerinde p-c-Jun seviyelerinin hızlı artışı, mitokondriden sitokrom c salınımı ve kaspaz-3 benzeri aktivitenin öncülüğünde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir [85].



Şekil 1.8. Klomipramin Hidroklorür'ün apoptozu indüklemeye mekanizması

1.5. Antihistaminikler ve Kanser İlişkisi

Histidin amino asidinin dekarboksilasyona uğraması sonucunda histamin meydana gelmektedir. L-Histidin, dokularda bulunan histidin dekarboksilaz enzimi aracılığı ile asit yapısını kaybeder ve histamine dönüştürülür. Antihistaminikler kimyasal olarak β -imidazoletilamin'lerdir (Şekil1.9) [86].



Şekil 1.9. *Histidin aminoasidinin Histamine dönüşümü*

Histamin karmaşık fizyolojik ve patolojik etkilere sahip olan ve vücutta bir çok dokuda bulunan bir amindir. Alerji adı verilen reaksiyonlar histaminin çeşitli nedenler ile hücre dışına çıkması ile başlayan biyolojik olaylardır. Vazodilatör madde olarak 1911'li yıllarda keşfedilen histamin geçen yıllar içerisinde çeşitli alerjik reaksiyonlarla bağdaştırılmış, mast hücreleri ile olan ilişkisi ortaya çıkarılmıştır. Ancak tam olarak etki mekanizması 1966 yıllarında anlaşılmıştır [87].

Zaman içerisinde histaminin bir hormon gibi iş gördüğü anlaşılmıştır bu nedenle insan sağlığı için çok önemli bir rol oynamaktadır. 4 veya daha fazla reseptör çeşidine sahiptir ve bu reseptörler aracılığı ile insan sağlığında farklı etkiler bırakmaktadır. Örneğin, H1 reseptörü aracılığıyla, hücre çoğalması ve farklılaşması, hematopoez, embriyonik gelişme, rejenerasyon ve yara iyileşmesi üzerinde etkisini göstermektedir. Bazı reseptörleri ise, damarlarda genişleme, sinir sisteminde rol alma, kaşıntı, hışırtı, ciltte kızarıklık, damar geçirgenliğini artırma, mide salgısını artırma, kalp atışlarını hızlandırma gibi etkiler ortaya çıkarabilmektedir. Histamin vücutta özellikle akciğer, cilt, karaciğer ve sindirim sistemi dokularında daha fazla miktarda bulunduğu, ayrıca sitokin salınımında ve adezyon sürecinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir [88, 87].

Histaminin farklı genler tarafından kodlanan 4 farklı reseptörü olduğu bilinmektedir. Bunlar, H1, H2, H3 ve H4 reseptörleri olarak bilinmektedirler [88]. Histamin reseptörleri G proteinine bağlı reseptör ailesindendir [89, 90].

Histamin reseptörlerini bloke eden ilaçlara H1 reseptör blokörleri denir [91]. H1 reseptörleri damar endotelinde, beyinde, bronş düz kaslarında, bezlerde, sinir hücrelerinde, hepatositlerde ve bağırsak düz kaslarında yaygın olarak bulunmaktadır [90]. Histamin, alerjik reaksiyon durumlarında, bazofillerden, mast hücrelerinden ve diğer tip hücrelerden salınmaktadır [92, 93].

H1 antihistaminleri daha önce düşündüğü gibi reseptör antagonistleri değil ters agonistlerdir. Vücuttaki histamin uyarımı miktarı, H1 antihistaminleri ve histaminler arasındaki dengeye bağlıdır. H1 reseptör blokeri antihistaminikler hedef hücrelerde H1 reseptörlerine kompetitif bağlanarak etki gösterirler [88]. Çeşitli nedenlerle aktifleşen histamin düz kasların kasılmasına, vazodilitasyona ve sensör nöronlarda uyarılmaya neden olmaktadır. Bu semptomlar ise alerjik reaksiyonlara işaret etmektedir [92, 93].

H1 reseptör blokerları 1.nesil (klasik), 2.nesil ve 3.nesil olmak üzere çeşitli sınıflara ayrılmıştır. Bu ayrım reseptörlerin farmakokinetik etkilerine, yapısal özelliklerine ve yan etkilerine bağlı olarak yapılmıştır (Şekil 1.10.) [91].

Kimyasal yapılarına göre klasik antihistaminikler (Birinci nesil antihistaminikler) altı gruba ayrılırlar. Bu grup başlıca; etanolamin, etilendiamin, alkilamin, piperazin, fenotiazinler türevleri ve diğerleridir. Bunlardan bazıları Bromopheniramin, Carbinoxamin, Antazolin, Promethazin, Buclizin, Azatadin, Chlorpheniramin, Clemastin, Pyrilamin, Mequitazin, Cyclizin, Cyproheptadin, Dexchlorpheniramin, Dimenhydrinat, Tripelenamin, Trimepazin, Meclizin, Ketotifen, Pheniramin, Diphenhydramin, Oxatomide, Dimethinden, Doxylamin, Hydroxyzin, Triprolidin, Phenyltoxamin, Acrivastin'dir.

İkinci nesil antihistaminikler; piperidinler türevleri ve diğerleri olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Bunlardan bazıları; Akriavastatin, Astemizol, Loratadin, Setirizin Feksofenadin, Telfast'dır [86].

Birinci Kuşak Antihistaminikler	Antazolin Azetadin Dimetinden Diphenhidramin Doksilamin Feniramin	Hidroksizin Karbonoksamin Klemastin Methdilazin Methapirilen Promethazin	Pirilamin Siklizin Siproheptadin Trimepazin Triprolidin
İkinci Kuşak Antihistaminikler	Akriavastin Astemizol Azelastin Ebastin Ketotifen	Loratadin Levocabastin Mizolastin Setirizin Terfenadin	
Üçüncü Kuşak Antihistaminikler	Desloratatin Feksofenadin Levosetirizin Norastemizol		

Şekil 1.10. Eski ve yeni nesil antihistaminik ilaçlar

Hücrelerde ikincil habercil sistemi olan adenilat siklaz/siklik AMP(cAMP) düzeyini arttırarak hücre fonksiyonlarını kontrol etmektedirler. Bu nedenle uyarılmaları daha yavaş gerçekleşmektedir. H2 resöptör blokerları uyarılınca cAMP artışı da indüklenir ve gastrik mukozada, vasküler düz kaslarda, beyinde, adopositlerde, bazofillerde, nötrofillerde ve diğer dokularda intrasellüler kalsiyum artışı gerçekleşir [87]. H2 resöptörleri histaminin midedeki asit salgılatıcı etkisi üzerinde güçlü bir şekilde durdurucu özelliği bulunmaktadır.

Genellikle duodenum ülseri, Zollinger-Ellison sendromu, diğer aşırı mide salgısı salgılanma durumları, mide ülseri, Mendelson sendromu, reflü hastalığı, stres ülseri ve kanama, karsinoid sendrom tedavilerinde kullanılmaktadır [86].

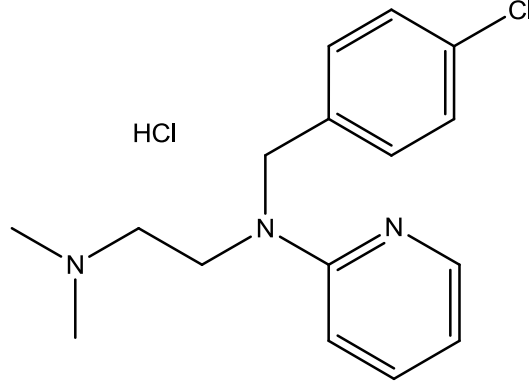
Antihistaminikler ilk kez 1937'de Bovet ve Staub tarafından tanımlamıştır. 1945'den sonra kullanımı yaygınlaşmıştır. Antihistaminikler, reseptörlere histamin yerine bağlanarak (histamin reseptör antogonisti) histamine bağlı semptomlarınoluşmasını engelleyen ilaçlardır. Tıpta ve veterinerlikte alerji hastalıkları başta olmak üzere birçok hastalıkta tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Klinik olarak ilk kullanılan antihistaminik ilaç Mepiramindir. Dermatolojide antibiyotiklerden sonra gelen en yaygın ikinci kullanımı olan sistemik ilaçlardır [94].

Antihistaminik-kanser ilişkisini araştırmak amacı ile terfenadin, astemizol, triprolidin ve diphenhidramin etken maddelerinin melonoma hücrelerindeki genotoksisitesi araştırılmış ve maddelerin kaspaz-2 bağımlı apoptozu indüklediği bulunmuştur [95].

21 adet antihistaminik ilacın genotoksisite etkisinin mekanizmasının anlaşılabilmesi için çeşitli deneyler yapılmıştır Test edilen 21 ilacın 2 tanesinde herhangi bir pozitif sonuca ulaşılamazken, 19 ilacın 9 tanesi in vitro çalışmalarda pozitif sonuç vermiştir [96]. Methapirilen ile yapılan çalışmalarda ise karsinojenik bir etkiye sahip olduğu ancak bunu sitotoksik olmayan yollardan gerçekleştirildiği bildirilmiştir [97, 98].

1.5.1. Kloropiramin hidroklorür

$C_{16}H_{21}ClN_3$ moleküler formülüne sahip olan Kloropiramin Hidroklorür'ün moleküler yapısı **Şekil 1.11**'de gösterilmiştir [99, 100]



Şekil: 1.11. Kloropiramin Hidroklorür'ün moleküler yapısı

Fokal Adezyon Kinaz (FAK) ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü reseptörü 3 (VEGFR-3), tümörün sağlıklı dokudaki ilişkisi için kritik sinyal molekülleridir. FAK, hücre ve ekstraselüler matris (ECM) arasında lokalize olan bir tirozin kinaz proteinidir ve hücre adezyonu, invazyon, hareket kabiliyeti ve anjiyogenez ile ilgili bir çok sinyal yolağının kilit noktasıdır. Anti-FAK antikorumları tarafından FAK'ın hedeflenmesi, antisens oligonükleotidler veya siRNA'lar kaynaklı hücre yuvarlanması, ayrılması apoptoz ile sonuçlanır.

FAK, kanser tedavisi için uygun bir hedef gibi gözükmemektedir çünkü FAK katı tümörlerde geniş bir aralık içinde yukarı doğru düzenlendiği ve normal dokularda çok düşük seviyelerde eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu da FAK hedefli ilaçların kanser tedavileri için kullanımını gündeme getirmektedir.

VEGFR-3 veya Flt4, lenfanjenez, anjiyogenezde önemli rol oynayan bir reseptör tirozin kinazdır ve ayrıca tümörün gelişimi ile bağlantılıdır. VEGFR-3, VEGF-C ve VEGF-D adı verilen, kanser gelişimini teşvik eden spesifik ligandlar tarafından aktive edilir. VEGF-C / VEGFR-3 eksenini çeşitli insan tümör hücrelerinde eksprese edildiği ve aktivasyonunun metastazı teşvik ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, VEGFR-3 sinyalleşmesinin engellenmesinin hem lenfatik ağın gerilemesine hem de tümör lenf nodu metastazının baskılanmasına yol açtığı gösterilmiştir. VEGFR-3, tümörlerin ve yaraların mikrovasküler yapısında yukarı doğru düzenlenir. Ve son zamanlarda, VEGFR-3'ün engellenmesinin, tümörlerde anjiyogenik filizlenmeyi bastırdığı gösterilmiştir. VEGFR-3 tümör hücrelerinde ekspresyon seviyeleri ile ilgili bazı

tartışmalar olsa da, VEGFR-3, kanser tedavisi için cazip bir hedef olmaya devam etmektedir [101].

SASH1 genini içeren SAM ve SH3 domaini başlangıçta akciğer, tiroid ve kolorektal kanserli dokularda; komşu normal dokuya kıyasla belirgin olarak daha düşük mRNA düzeylerinin saptanmasına dayanan tümör süpresör(baskılayıcı) geni olarak tanımlanmıştır. SASH1'in düşük eksprese olması kolon kanseri ve gliomanın kötü prognozu ile ilişkilidir. SASH-1 geninin baskılanmasının akciğer kanser hattında; hücre canlılığında, çoğalmasında ve göçünde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde hepatokarsinoma, tiroid ve yumurtalık kanseri hücre hatlarında mezenşimal farklılaşmaya ve invaziv hücre davranışına karşı negatif bir etkisi olduğu gözlenmiştir. SASH-1 Fokal adhezyon kinaz (FAK) ve AKT / PI3K aracılığı ile sinyallemeyi düzenleyebilmekte ve aşırı ekspresyonu apoptozu teşvik ettiği bilinmektedir [102].

Kloropiramin ilk kez Doğu Avrupa ülkelerinde onaylanmış bir antihistaminik ilaçtır. Alerjik konjuktivit, alerjik rinit, bronşiyal astım ve diğer alerjik durumların tedavisi için kullanılmaktadır. Kloropiramin, yarışmalı geri dönüşümlü H1-reseptör antagonisti olarak bilinmektedirler. İlaç histaminin etkilerini bloke ederek, dokudaki histamin salınımı ile bağlantılı vazodilatasyon, artmış vasküler permeabilite ve doku ödemi engellemektedir.

Kloropiramin Hidroklorür küçük molekülü bir bileşik olup VEGFR-3-FAK bağlanmasını bozmaktadır. Kloropiramin maddesi FAK'ın fosforilasyonunu azaltırken, VEGFR-3'ün fosforilasyonunu durduran bir bileşiktir. Kloropiramin'in birçok kanser hücreleri üzerinde yapılan deneylerinde özellikle VEGFR-3'ü aşırı ifade eden hücrelerde apoptozu başlattığı gözlenmiştir. İn vivo olarak yapılan deneyler de tümör büyümesinde azalma göstermiş ve meme kanseri xenograft modellerinde Doksorubisin ilacı ile sinerjik etki göstermiştir [103, 104].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Araçlar ve Gereçler

2.1.1. Kullanılan kimyasal ve sarf maddeler

10, 200, 1000, 5000 µL'lik mikropipet uçları (Axygen, İngiltere),
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya),
25 ve 75 cm²'lik hücre kültür flaksları (Corning, Amerika),
2 mL'lik santrifüj tüp (Eppendorf, Almanya),
5 ve 10 mL'lik steril enjektör (Hayat, Türkiye),
12 kuyulu 5 mL'lik rezervuarlar (Isolab, Almanya),
5-10 ve 25 mL'lik tek kullanımlık serolojik pipet (Costar, Sigma-Aldrich, Almanya),
6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre),
5 mL'lik flow tüpleri 12x75 mm (BD Biosciences, Amerika)
Lamel (Isolab, Almanya),
Lam (Isolab, Almanya),
Filtre (Sartorius stedim, Almanya),
Karyotüp (2mL) (Greiner bio-one, Amerika),
Parafilm (Pechiney, Fransa),
pH indikatör kağıdı (Macherey- Nagel, Almanya)
Thoma Lamı (Marienfeld, Almanya),
xCELLigence E-plate 96 (Roche, Almanya)
PANC-1 hücre hattı (ATCC, Amerika)
hTERT-HPNE hücre hattı (ATCC, Amerika)
A549 hücre hattı (ATCC, Amerika)
L929 hücre hattı (ATCC, Amerika)
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide % 98, Sigma-Aldrich, Almanya)
Fosfat tampon (PBS, Pan Biotech, Almanya)
Dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, Almanya),
Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma-Aldrich, Almanya),
Penisilin-streptomisin Solüsyonu(Isolab, Almanya),
Cis-Diamineplatinum(II) dichloride (Sigma Aldrich, ABD),
Chloropyramine Hydrochloride (Sigma Aldrich, ABD),
Clomipramine Hydrochloride (Sigma Aldrich, ABD),
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Almanya),
RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Almanya),

M3 Base Medium (Incell Corporation, Amerika)
Tripan mavisi (Biological Industries, İsrail),
Trypsin-EDTA Solüsyonu (Biochrom, Almanya),
MitoTracker Red CMX-ROS (Molecular Probes, Almanya),
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride; Thermo Fisher Scientific, Amerika),
Canlı Hücre Görüntüleme Solüsyonu(Molecular Probes, Almanya),
Annexin V-FITC/PI Apoptoz Tayin Kiti 1 (BD Biosciences,Amerika),
PE Active Caspase-3 Tayin Kiti(BD Biosciences,Amerika),
MitoScreen (JC-1) Membran Potansiyeli Tayin Kiti (BD Biosciences, Amerika),
Glutaraldehit %25 (Merck, Almanya),
 Na_2HPO_4 (Riedel-de Haen, Almanya),
 K_2HPO_4 (Sigma–Aldrich, Almanya),
Osmium tetraoksit (OsO_4 , Electron Microscopy Sciences, Amerika),
Etil alkol (Sigma–Aldrich, Almanya),
Propilen oksit %99.5 (Sigma–Aldrich, Almanya),
Epon 802 (Electron Microscopy Sciences, Amerika),
Uranyl acetate (Electron Microscopy Sciences, Amerika),
Kurşun sitrat (Electron Microscopy Sciences, Amerika),
Sodyum hidroksit (Carlo Erba Reagent, İtalya),
Sodyum tetraborate decahydrate (Sigma–Aldrich, Almanya)

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Inverted mikroskop (Olympus, Amerika),
Multimod mikropilaka okuyucu (BioTek, Synergy HTX, Amerika),
xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi MP İstasyonu (ACEA, Biosciences Inc. Amerika),
Akım sitometri cihazı (BD, FACS Aria ICell Sorter, Amerika),
Konfokal mikroskop (Leica, TCS-SP5 II, Almanya),
Geçirimli Elektron Mikroskop (FEITecni G2, Jeol Jem 1220, USA)
Ultramikrotom (Leica EM UC7, Almanya)
Işık Mikroskobu (Leica, Almanya)
Rotator (Stuart SB2, Almanya)
Laminar air flow kabini (Mars Scanlaf, Danimarka),
Masaüstü soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya),
Derin dondurucu buzdolabı (Nuaire, Amerika),
Steril CO2 inkübatörü (Binder, Almanya),
Sterilizatör (Heraeus, Almanya)
Su banyosu (Nüve, Türkiye),
Sıvı azot tankı (Taylor Wharton RS- Series, Amerika),
Hassas terazi (Mettler Toledo, Amerika),
Otoklav (Eryiğit A.Ş. Türkiye),
Orbital çalkalayıcı (Heidolph, Almanya),
Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya),
Farklı hacimlerde otomatik mikropipetler (Thermo, FinnPet, Kanada),
Farklı hacimlerde otomatik mikropipetler (Eppendorf, Research Plus, Almanya),
Çok kanallı otomatik mikropipet (Thermo, FinnPet, Kanada),
Vorteks (Heidolph, Almanya),
Distile Su Cihazı (Sartorius Stedim, Almanya),
Ultrasonik Su Banyosu (BD, ProbeTecET, Amerika)
Mr. Frosty (Nalgene, Amerika)

2.2. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması

2.2.1. Klomipramin hidroklorür

Çözücü olarak sıvı halde Sigma Aldrich'den satın alınan dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. 100 µL içerisinde Klomipramin Hidroklorür (Sigma Aldrich, ABD) maddesinden 17,5657 mg tartılarak ana stok oluşturulmuştur. Bu ana stoktan çalışmalarda kullanılmak üzere 500 µM, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlarda en yüksek DMSO oranı %0.1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her çalışmada ana stoklar yeniden hazırlanmıştır.

2.2.2. Kloropiramin hidroklorür

Toz halinde Sigma Aldrich'den satın alınan Kloropiramin Hidroklorür maddesinden 16,313 mg tartılarak 100 µL DMSO içerisinde çözülmüş ve ana stok oluşturulmuştur. Bu ana stoktan çalışmalarda kullanılmak üzere 500 µM, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlarda en yüksek DMSO oranı %0.1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her çalışmada ana stoklar yeniden hazırlanmıştır.

2.2.3. Sisplatin

Sisplatin maddesi deneylerde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Toz halde Acros Organics 'den satın alınan Sisplatin 100 µL DMSO içerisinde 15,0025 mg tartılarak ana stok oluşturulmuştur. Bu ana stoktan çalışmalarda kullanılmak üzere 500 µM, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlarda en yüksek DMSO oranı %0.1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her çalışmada ana stoklar yeniden hazırlanmıştır.

2.3. Deneylerde Kullanılan Hücreler

2.3.1. İnsan akciğer karsinoma epitelyal hücre hattı (A549)

Bu tezde kullanılan A549 hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC) firmasından CCL-185™ ticari kodu ile satın alınmıştır. A549 hücre hattı insan 58 yaşında bir erkekten alınmış insan alveolar bazal epitelyal hücreleridir. Bu hücreler tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir.

Bu hücreler ATCC'nin önerdiği şekilde, %10 fetal sığır serumu, %1 penisillin/streptomisin, içeren RPMI 1640 besiyerinde, CO₂' li etüvde, % 95 bağıl nem' de 37°C' de kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yenilenmiştir.

2.3.2. Normal fare fibroblast hücre hattı (L929)- İmmortalize edilmiş fare fibroblast hücre hattı (L929)

Bu tezde kullanılan L929 hücre hattı ATCC firmasında CCL-1™ ticari kodu ile satın alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan hücreler laboratuvarımızda var olan stoklardan kullanılmıştır. L929 hücre hattı gevşek bağ dokusu ve yağ dokusundan 100. Gününde bir erkek fareden alınan fibroblast hücreleridir. Bu hücreler tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir.

Bu hücreler ATCC'nin önerdiği şekilde, %10 fetal sığır serumu, %1 penisillin/streptomisin, içeren DMEM besiyerinde, CO₂' li etüvde, % 95 bağıl nem' de 37°C' de kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yenilenmiştir.

2.3.3. İnsan pankreas karsinoma hücre hattı (PANC-1)

Bu tezde kullanılan PANC-1 hücre hattı ATCC hücre bankasından CRL-1469 koduyla temin edilmiştir. PANC-1 hücre hattı 56 yaşında bir erkeğin pankreas kanalından izole edilmiştir. Epitelyal morfoloji gösteren epitelyoid karsinom hücreleri, tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir.

Bu hücreler ATCC'nin önerdiği şekilde, %10 fetal sığır serumu, %1 penisillin/streptomisin, içeren DMEM besiyerinde, CO₂' li etüvde, % 95 bağıl nem' de 37°C' de kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yenilenmiştir.

2.3.4. Normal pankreas hücre hattı (HTERT- HPNE)

Bu tezde kullanılmak üzere ATCC hücre bankasından CRL-4023 koduyla temin edilmiş olan hTERT-HPNE hücreleri, 52 yaşında bir erkeğin pankreas kanalından, asinar-duktal metaplazi sırasında oluşan hücrelerden izole edilmiştir. Epitelyal benzeri morfoloji gösteren normal ölümsüzleştirilmiş hücreler, tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir.

Bu hücreler %10 fetal sıgır serumu, %1 penisillin/streptomisin, içeren DMEM besiyerinde, CO₂' li etüvde, % 95 bağıl nem' de 37°C' de kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yenilenmiştir.

2.4. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık

2.4.1. Malzeme Sterilizasyonu

Deneylerde tek kullanımlık steril malzemeler kullanılmıştır. Bunların haricinde kullanılacak olan cam ve metal malzemelerin sterilizasyonu için alüminyum folyo ile sarılmış halde kuru hava sterilizatöründe 180°C'de 2 saat, sıvı solüsyonlar ve pipet uçları için 121°C, 1.5 atmosfer basıncında otoklavda 20 dakika arındırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Otoklavlanamayacak solusyonlar için 0,22 mikronluk tek kullanımlık filtreler kullanılmıştır.

2.4.2. Hücrelerin stoklanması ve pasajlanması

Çalışmalar da kullanılacak olan A549, L929, PANC-1 ve hTER-HPNE hücre hatları 2000 µL ilgili besiyeri içerisinde 100 µL DMSO eklenerek 2 mL'lik viallere koyulmuştur. Bu vialler Mr. Frosty'de -86 °C'de bir gece bekletildikten sonra ileride yapılacak olan çalışmalarda kullanılmak üzere sıvı azota (-196 °C) alınmıştır.

Çalışmada kullanılan hücre hatları sıvı azottan (-196 °C) çıkarılarak, 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek stok yapma sırasında kullanılan DMSO uzaklaştırılmıştır. Hücre hatları ilgili besiyerinde, CO₂' li etüvde, % 95 bağıl nem' de 37°C' de kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hücreler kültür kabında %70'lik oranda bir doluluğa ulaştığı zaman (yaklaşık 2-3 gün) alt kültürlere ayrılarak büyümesi ve çoğaltılması sağlanmıştır.

2.4.3. Hücre sayımları

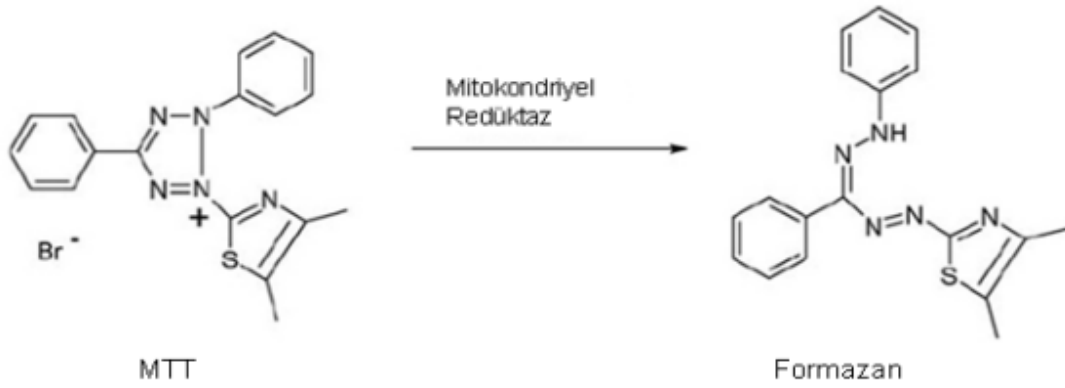
Kültür kaplarında büyütülen A549, Panc-1, L929 ve hTER-HPNE hücreleri 1x Pbs ile 2 kez yıkanmıştır. Yapışık halde bulunan hücreleri kaldırmak için kültür kaplarının boyutu ve hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak 500-1000 µL 1x Tripsin-EDTA solisyonu koyulmuş ve inkübatörde 2-3 dakika bekletilmiştir. Tripsin'in etkisini nötralize edebilmek için, hücrelerin üzerine 5 mL besiyeri ilave edilmiş ve hücreler santrifüjtüplerine alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atılarak üzerine 1000 µL besiyeri eklenmiş ve pipetleme ile homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. MTT, Xcelligence, Annexin-V/PI, Jc-1, Kaspaz-3, DNA, , Konfokal Mikroskop ile görüntüleme yöntemleri yapılmadan önce hücreler sayılmıştır. Sayma işlemi için 10 µL Tripan mavisi 10 µL hücre solisyonundan birer oranında karıştırılarak Thoma Lami'nda sayım yapılmıştır. Yapılan sayım ile elde edilen sonuç aşağıdaki formül ile hesaplanarak hücre sayısı elde edilmiştir.

Toplam hücre sayısı = 16 büyük karedeki hücre sayısı x 10,000 x dilüsyon faktörü

2.5. Sitotoksik Etki Belirleme Testleri

2.5.1. MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Hücre canlılığı belirlemek amacı ile birçok sitotoksikite analizi yapılmaktadır. MTT analizi ise bu sitotoksikite testlerinden biridir. 1983 yılında ilk kez Mossman tarafından belirtilen MTT protokolü günümüzde hala geçerliliğini koruyan bir yöntemdir. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) sarı renkli bir boyadır. Yöntemin işleyiş mekanizması sağlıklı hücrelerde mitokondriyal süksinik dehidrojenazın MTT tetrazolyum tuzunun formazan kristallerine dönüştürmesine dayanmaktadır (Şekil 2.1). Oluşan formazan kristalleri DMSO ile çözündürülür ve mavi-mor renkli bir çözelti oluşturulur. Bu çözelti spektrofotometrik olarak okutularak formazan kristallerinin miktarı belirlenir. Böylece ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücrelerin miktarları belirlenebilmektedir [105, 106, 107].



Şekil 2.1. *Formazan kristallerinin oluşumu*

Kaynak: Çelik, 2011

Yöntemin uygulanması

Klomipramin, Kloropiramin ve Sisplatin maddelerinin in vitro sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda inkübatörde flasklarda büyütülen hücreler, 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğunda 5×10^3 yoğunlukta olacak şekilde sayımı yapılmıştır. Sayımı yapılan hücreler plakalara 200 µL besiyeri içerisinde ekilmiştir. 24 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir. 24 saat sonunda hücrelerin üzerinden 100 µL besiyeri çekilmiş ve taze 100 µL besiyeri içinde 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 µM konsantrasyonlarında ilaç uygulaması yapılmıştır. Plakalar inkübatörde 24, 48 saat süresince bekletilmiştir. Bekleme sonunda 1x PBS(phosphate buffer saline) içerisinde 5mg/mL olacak şekilde MTT tozundan solisyon hazırlanmış ve ışık kapatılarak laminar air flow kabin içerisinde her bir kuyucuğa 20 µL eklenmiştir. MTT boyası eklenen plakalar 2-4 saat süresince inkübatörde bekletilmiştir. 2-4 saatin sonunda plakalardaki besiyeri ortamı uzaklaştırılarak formazan kristallerinin çözünmesini sağlamak için 100 µL DMSO eklenmiştir. Plakaların ışık görmesini engellemek amacıyla aliminyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında 15 dakika orbital çalkalayıcıya koyulmuştur. Mikroplaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okutulmuştur.

2.5.2. İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi

Spektrofotometreden alınan absorbens değerleri hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilmiştir. Herhangi bir maddenin uygulanmadığı, sadece hücrenin kendi büyümesinin ölçüldüğü kuyucukların sonuçları canlılık formülüne göre hesaplanıp % canlılık olarak belirlenmiştir. % canlılık belirlenirken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{örneğin absorbens değeri} / \text{kontrolün absorbens değeri}) * 100$$

Bulunan sonuçlara göre doz aralığı IC₅₀ değeri (hücre popülasyonunun %50'sini inhibe eden konsantrasyon) ve IC_{50/2} (hücre popülasyonunun %50'sini inhibe eden konsantrasyon) değeri belirlenene kadar genişletilmiştir. Tespit edilen çoğalmayı durduran konsantrasyon yani IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri apoptoz belirleme analizlerinde, morfoloji görüntüleme çalışmalarında kullanılmıştır.

2.5.3. Verilerin istatistiksel Analizi

MTT deneyinde alınan kontrol kuyularının absorbens değerleri ortalaması %100 kabul edilmiş ve diğer konsantrasyonların % canlılık değerlerindeki değişim hesaplanmıştır. Bulunan % canlılık değerlerinin istatistiksel yönden anlamlılığı, Graphpad Prism V7 ile tekyönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's post hoc testi ile belirlenmiştir (p<0.05*, p<0.01**, p<0.001***).

2.6. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA MP) Antiproliferatif Etkilerinin Araştırılması

xCELLigence RTCA MP cihazı, altın elektrotlar ile kaplanmış özel plakaların (e-plaka 96) her bir kuyucuk içerisindeki iyonik konsantrasyon ve hücrelerin elektrotlara bağlanıp bağlanmadığını ölçüm prensibine dayanan gerçek zamanlı analiz özelliğine sahip olan mikroelektronik biyosensör sistemidir. Bu elektrot empedansı farklı nedenler ile etkilenebilmektedir. Bu nedenlerden bazıları hücre sayısı, hücre morfolojisi, hücre canlılığı ve yapışma dereceleridir. Herhangi bir işaretçi kullanmaksızın hücre proliferasyonunu gerçek zamanlı olarak izlemeyi, otomatik ölçümler yapabilmeyi, yüksek duyarlılık ve doğrulukta görüntüleme için kullanılmakta olan bir sistemdir.

Hücre indeksi (cell index; CI) herhangi bir birime sahip değildir ve elektrik empedansında oluşan değişiklikler, elektrotlar üzerinde meydana gelen değişikliklerin saptanmasını ve izlenmesini sağlamaktadır. Böylece hücre durumu analiz edilebilmektedir. Sistemde hücre indeksinde meydana gelen artma ve azalmalara bağlı

olarak meydana gelen verileri kaydetmekte ve yazılımı sayesinde otomatik olarak değerlendirmektedir. Hücreler plakalara ekildikten sonra literatürde belirtilen hücre indeksine ulaşması için inkübasyona bırakılmaktadır. Hücre indeksi her hücrede farklı şekilde ve sürede artıp azalabildiğinden uygun indeks zamanı için literatür bilgilerinden yararlanılmaktadır.

Yöntemin Uygulanması

Deneye başlamadan önce cihazda öncelikli olarak kör okutması gerçekleştirilmiştir. Bunun için çalışmalarda kullanılacak olan plakalara 100 µL uygun besiyeri eklenmiş ve ortam ısısı ile eşitlenmesi için oda ısısında 5 dakika bekletilmiştir. Kör okutma sonrasında plaka cihazdan çıkartılarak, kuyu başına 100 µL uygun besiyeri içerisinde 1×10^4 adet hücre gelecek şekilde A549, PANC-1, HTERT, L929 hücre hatlarının ekimi yapılmıştır. Uygun CI değerine varan hücrelere Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 µM konsantrasyonlarında uygulaması yapılmıştır. Sistem saat başı veri alacak şekilde ayarlanarak analiz yapılmıştır. MTT yöntemi ile belirlenmiş olan konsantrasyon aralığının gerçek zamanlı etkisini görüntüleyebilmek için aynı konsantrasyonlar bu sistemde de kullanılmıştır.

Besiyeri kontrol: % 90 uygun besiyeri +% 10 FBS + %1-2 Pen-Strep Normal kontrol: % 90 uygun besiyeri +% 10 FBS + %1-2 Pen-Strep + Hücre

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analyzer MP, ACEA Biosciences Inc.) ile elde edilen hücre indeks (cell index) değerlerine göre; hücrelerinin proliferasyon eğrileri, RTCA Software 1.2.1.1002 programı kullanılarak analiz edilmiştir.

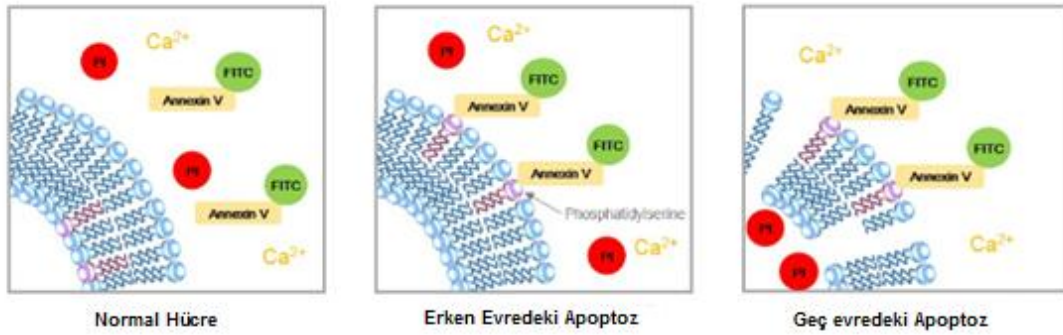
2.7. Akım sitometri cihazı ile yapılan deneyler

2.7.1. Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Bu yöntemin mekanizması, apoptoz sırasında hücrelerin fosfatidilserin (PS) ve DNA ya da RNA'larında meydana gelen değişimlere dayanmaktadır. Normal bir hücre de fosfatidilserinler, hücre membranının iç kısmına lokalize olmuşlardır. Hücrenin apoptotik sürece girmesi halinde PS'ler dış membrana doğru yer değiştirerek burada lokalize olmaktadır. Bu yer değiştirme sırasında, hücre membran bütünlüğü bozulmadığı apoptotik evreye erken evre denmektedir. Dış yüzeye bakan PS'ler, erken evre apoptoz belirteci olan Ca^{+2} bağımlı bir protein olan Annexin-V ile kompleks

oluşturabilmektedir. Annexin V FITC gibi floresan maddeler ile işaretlenerek apoptotik hücreler görünür hale getirilebilmektedir [108, 109].

Şekil 2.2.'de de anlatıldığı gibi geç evredeki apoptoz ve nekrozda membran yapısında bozukluklar meydana gelmektedir. Bu bozukluklar ile membranda porlar oluşmakta ve Propidyum iyodür (PI) boyası bu porlardan hücre içine girerek DNA ya da RNA'ya bağlanabilmektedir. Böylece geç apoptoz ve nekroz tespiti yapılabilmektedir [110, 111].



Şekil 2.2. AnnexinV/PI'n hücreyle etkileşimi

Yöntemin uygulanması

Yöntem, üretici firmanın kit prosedüründe önerdiği şekilde uygulanmıştır. A549, Panc-1 hücre hatları, 6 kuyucuklu plakalara her kuyu başına 3×10^5 adet hücre gelecek şekilde sayılarak, 2 mL besiyeri içerisinde ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda her kuyudan 1 mL besiyeri uzaklaştırılmıştır. IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozları belirlenen Kloropiramin, Kloropiramin ve Sisplatin maddeleri 1 mL besiyeri içerisinde hücrelere uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılarak ilaçların etki etmesi beklenmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında, hücreler ortamları ile beraber kaldırılarak flow tüplerine alınmıştır. Soğuk 1x PBS ile 2 kez yıkanarak ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj ederek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kit içeriğinden çıkan bağlanma solisyonu (AB: Assay Buffer) 10x halledir ve distile su ile 1x konsantrasyona dilüye edilmiştir. Santrifüj sonrasında her bir flow tüpüne 100 μ L bağlama solüsyonu eklenerek nazikçe pipetlenmiştir. 5 μ L Annexin V, 5 μ L Propidium İyodür (PI) eklenerek hücreler oda sıcaklığında 15 dakika karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. 15 dakikalık süre sonunda bağlanma solüsyonundan her bir flow tüpüne 400 μ L aktararak bir saat içerisinde akım sitometri cihazı ile analiz edilmiştir. Erken ve geç apoptotik hücre miktarları pozitif kontrole göre hesaplanmıştır.

2.7.2. JC-1 boyama ile hücrelerin mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi

Mitokondriyal solunum zincirindeki oksidasyon reaksiyonları sırasında bir enerji salınmaktadır ve bu salınan enerji mitokondriyal membran boyunca negatif bir elektrokimyasal gradyan olarak depolanmaktadır. Bu elektrokimyasal gradya $\Delta\psi_m$ polarize olarak ifade edilmektedir. $\Delta\psi_m$ 'nin çökmesi genellikle erken apoptoz sırasında meydana gelmektedir. Bazı çalışmalarda apoptozun ilk basamaklarından birisinin mitokondrinin depolarizasyonu olduğu bildirilmiş ve hatta sitokrom C salımı için olmazsa olmaz bir koşul olduğu iddia edilmiştir. Ancak $\Delta\psi_m$ 'nin çökmesi her zaman apoptoz sırasında meydana gelmemektedir. Ayrıca $\Delta\psi_m$ 'nin depolarizasyonu her apoptotik süreçte meydana gelecek diye bir şart yoktur yani her sistem apoptoz sürecini farklı bir mekanizma aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Nekroz, hücre döngüsü durması (hiperpolarizasyon) sırasında da $\Delta\psi_m$ 'de değişiklikler olduğu bilinmektedir.

Akım sitometrisi hemen hemen tüm hücrelerde $\Delta\psi_m$ analizinde tercih edilen bir tekniktir. Lipofilik katyonik florokromlar $\Delta\psi_m$ problemleri olarak kullanılır; hücrelere penetre olur ve floresanı $\Delta\psi_m$ 'yı yansıtmaktadır. JC-1 (5,5', 6,6'-tetrakloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolkarbosiyanin iyodid), $\Delta\psi_m$ 'nin durumunu değerlendirmek için kullanılan lipofilik bir florokromdur. JC-1'in floresan emisyon spektrumu, JC-1 konsantrasyonuna bağlı olarak $\Delta\psi_m$ 'nin durumuna göre belirlenmektedir. JC-1 agregat veya monomer şeklinde, her biri farklı emisyon spektrumuna sahip iki farklı duruma sahiptir. Düşük boya konsantrasyonlarında monomer olarak bulunurken, daha yüksek konsantrasyonlarda agregatlar oluşturmaktadır. JC-1'in agregat ve monomer şeklindeki her iki formu da, akış sitometrelerde FL-1 (yeşil) kanalında ölçülen spektrumun en sonunda yeşil floresan şeklinde görünmektedirler. Canlı hücreler JC-1 boyası ile inkübe edildiğinde, JC-1, hücrelerin plazma membranına monomerler olarak nüfuz eder. JC-1'in mitokondriye alınması $\Delta\psi_m$ tarafından kontrol edilmektedir. Normal, sağlıklı mitokondrinin $\Delta\psi_m$ 'si polarizedir ve JC-1 böyle mitokondriler tarafından hızla alınmaktadır. Bu alım JC-1 boyasının konsantrasyonunun gradyantını arttırmakta ve mitokondride (J-agregatları olarak bilinir) oluşumuna yol açmaktadır. J-agregatlar, çoğu akım sitometresinde FL-2 (Kırmızı) kanalında ölçülmektedir [112].

Yöntemin uygulanması

Mitokondriyal membran bütünlüğünün saptanabilmesi için kullanılan bu yöntem üretici firmanın kendi kit prosedüründe önerdiği şekilde uygulanmıştır. 6 kuyucuklu plakalara A549 ve Panc-1 hücreleri 2 mL besiyeri içerisinde kuyu başına 3×10^5 adet hücre gelecek şekilde ekilmiştir. 24 saat inkübatörde bekletilen hücreler üzerine daha önceden belirlenen Kloropiramin, Kloropiramin ve Sisplatin'in IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozları 1mL taze besiyeri içerisinde eklenmiştir. Plakalar, ilaçların etkisini göstermesi için inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında hücreler kaldırılarak flow tüplerine alınmıştır. Hücreler oda sıcaklığında 2 kez 1x Soğuk PBS ile yıkanarak ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kit içeriğinde bulunan bağlama solüsyonu (AB: Assay Buffer) içerisinde hazırlanan JC-1 boyasından her bir flow tüpüne 0.5 mL gelecek şekilde eklenerek nazikçe pipetlenmiştir. 15 dakika $37^\circ C$ de hücreler inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında hücreler iki kez bağlama solüsyonu ile yıkanmıştır. Birinci yıkamada hücrelere 2'şer mL, ikinci yıkamada hücrelere 1'er mL çalışma solüsyonu eklenerek 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj ile süpernatant uzaklaştırılmıştır. Son olarak her bir hücre pelletine 0.5 mL çalışma solüsyonu eklenerek nazikçe pipetlenmiş ve hemen akım sitometri cihazı ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar pozitif kontrole göre kıyaslanarak hesaplanmıştır.

2.7.3. Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Kaspazlar, apoptozun ana basamaklarında kilit anahtar rolü oynayan proteazlardır. Kaspaz-3 apoptoz mekanizmasının her bir yolağının son kısmında aktive olmaktadır ve sonlandırıcı kaspazlar olarak iş görmektedir. Kaspaz-3 bir hücrenin apoptoz sürecine girdiğini belirten en önemli enzimlerden biridir çünkü aktifleştikten sonra DNA fragmentasyonundan ve hücre iskeletine ait proteinlerin yıkımından sorumludur.

Kit içerisinde bulunan Cytofix/Cytoperm solüsyonu ile hücreler önce geçirgen hale getirilir. Geçirgen haldeki hücreler PE Rabbit Anti-Aktif kaspaz 3 boyası ile aktif kaspaz 3'ler boyanır. Boyanan aktif kaspaz 3 yüzdelерinin okuması flow sitometri cihazında yapılır [113, 114].

Yöntemin uygulanması

Kaspaz-3 aktivitesi belirlemek için uygulanan yöntem, üretici firmanın kit prosedüründe önerdiği şekilde uygulanmıştır. 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyu başına 2 mL besiyeri içerisinde 3×10^5 adet A549 ve Panc-1 hücresi gelecek şekilde ekilerek inkübatörde 24 saat bekletilmiştir. Klomipramin, Kloropiramin ve Sisplatin'in daha önceden belirlenen IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozları 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmak üzere 1 mL taze besiyeri içerisinde hücrelere uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik ilaç muamelesi sonrasında her bir kuyu içeriği kendine ait flow tüplerine alınmıştır. Flow tüpleri 2 kez soğuk 1x PBS ile yıkanmış her yıkama sonrasında 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırılmıştır. Kit içeriğinde bulunan Cytofix/Cytoperm solisyonundan her bir flow tüpüne 0.5 mL eklenerek 20 dakika buz üzerinde bekletilerek santrifüj ile supernatant uzaklaştırılmıştır. Distile su ile 1x konsantrasyona dilüe edilen Perm/Wash tampon çözeltisinden hücrelerin üzerine 0.5mL konularak 2 kez yıkaması yapılmıştır. Daha önceden 100 µL 1x Perm/Wash çözeltisi içersine 20 µL antibodi eklenerek hazırlanmış olan çözeltiden yıkama işlemleri tamamlanan hücrelerin üzerine eklenmiştir. Hücreler oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak her bir örnek 1mL 1x Perm/Wash tampon çözeltisi ile yıkanarak santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen hücrelere 0.5mL 1x Perm/Wash tampon çözeltisi eklenerek akım sitometrisi cihazından kaspaz-3 aktivitesi analiz edilmiştir. Sonuçlar pozitif kontrole göre kıyaslanarak hesaplanmıştır.

2.8. Hücrelerin Morfolojik Görüntülerinin Alınması

2.8.1. Konfokal mikroskopu ile apoptotik etkilerin görüntülenmesi

Konfokal mikroskop tekniği yaklaşık 50 yıl önce ilk kez Martin Minsky tarafından ortaya konmuştur. Biyolojik ve bilimsel araştırmalar da canlı veya fikse edilmiş, floresan veya yansıtıcı probalar ile işaretlenmiş 100 mikrometre kalınlığında değişen ince hücre ve doku kesitlerini görüntülemek için lazer taramalı konfokal mikroskop sistemleri kullanılmaktadır. Konfokal mikroskopunun sahip olduğu lazer ve bilgisayar teknolojileri sayesinde hücre altı yapılarının, fonksiyonlarının ve hücre/organizma yapısının detaylı bir şekilde görüntülenmesine olanak sağlamaktadır [115, 116, 117].

DAPI boyası mavi floresan özellikte bir boya olup özellikle çift iplikli DNA (dsDNA)'yı seçmek suretiyle nükleik asitleri boyamaktadır. DAPI'nin dsDNA'ya bağlanması, çift sarmallı yapısında bulunan küçük oluklardaki su moleküllerin yer değiştirmesinden dolayı 20 kat fazla floresan üretmesine neden olmaktadır. DAPI aynı zamanda RNA'ya da bağlanmaktadır. Ancak farklı bir bağlanma yöntemi izlemektedir.

DAPI/RNA kompleksi, DAPI / dsDNA kompleksine (~460 nm'ye karşı ~ 500 nm) göre sadece %20 kadar yüksek bir kuantum verimi segilemektedir.

MitoTracker Red CMXRos boyası apoptoz sırasında membran potansiyeli çöken, değişimler gösteren mitokondriye bağlanmaktadır. Konfokal mikroskop altında 579 nm'de uyarılarak 599 nm'de görüntülenir [118, 119].

Yöntemin Uygulanması

6 kuyucuklu plakalara önceden steril edilen lameller yerleştirilmiştir. Lamellerin üzeri hücrelerin daha iyi tutunabilmesi amacı ile 400 µl 1x jelatin ile kaplanmıştır ve 1 saat kabin içerisinde kuruması beklenmiştir. 5×10^3 adet olacak şekilde sayımı yapılan A549 ve Panc-1 hücreleri 0.5 mL uygun besiyeri içerisinde lamellerden taşmayacak şekilde ekimi yapılmıştır. Hücreler 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 ve 48 saat bekletilmek üzere Kloropiramin, Kloropiramin ve Sisplatin'in daha önceden belirlenen IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozları uygulanmıştır. Bu süre bitiminden sonra hücreler 3 defa 2 dakika süre ile 1x PBS ile yıkanmıştır. Her bir kuyu içine 1 mL 1x PBS eklenerek 2 dakika beklenmiştir. Hücreleri boyama işlemi için daha önceden kendi prosedürüne göre hazırlanarak bölünen DAPI ve MitoTracker Red CMXRos boyaları kullanılmıştır. Mitotracker Red CMXRos boyasından 75 µl kuyulardaki 1 mL'lik PBS içine eklenmiş ve hafifçe çalkalanmıştır. Karanlık bir ortam oluşturması için alüminyum folyo ile sarılan plakalar 15 dakika beklemesi için inkübatöre kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrasında her bir kuyuya DAPI boyasından 75 µl eklenmiş ve yine karanlık bir ortamda inkübatörde 5 dakika beklenmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda kuyular 1x PBS ile 3 kez yıkanmış ve üzerlerine 1x hücre görüntüleme solüsyonundan (Molecular Probes, ABD) 1'er mL eklenerek lam ile preparat hazırlanmış ve hemen konfokal mikroskopunda görüntülenmeye alınmıştır [120].

2.8.2. Geçirimli elektron mikroskobu ile apoptotik etkilerin görüntülenmesi

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM: Transmission Electron Microscopy) Max Knoll ve Ernst Ruska tarafından 1930'larda yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. TEM çok ince örnekler içinden yüksek enerjili elektronları geçirerek görüntüleme prensibine dayanan bir mikroskop türüdür. Optik mikroskopların aksine çok büyük büyütmeleme sahiptir ve ince detayların gösterilmesi için kullanılmaktadır. Görüntüler elektronların örnek ile etkileşimi sonucu meydana gelmektedir. Oluşan görüntü büyütülerek floresans ekran, fotoğrafik film katmanı veya CCD kamera gibi sensör üzerine odaklanması sağlanmaktadır [121].

TEM ile hücrelerin yapısal özellikleri 2 veya 3 boyutlu olarak görüntülenebilmektedir. Bu nedenle apoptoz belirleme yöntemlerinden birisi olarak çok kullanılmaktadır. Hatta TEM ile yapılan değerlendirmeler apoptoz değerlendirmeleri için en değerli yöntem ("gold standard") adı verilmektedir. Morfolojik olarak meydana gelen değişikliklerin (mitokondri, lizozom, endoplazmik retikulum, çekirdek vb organellerinde) belirlenmesinde kullanılmaktadır. TEM yardımı ile hücrede apoptoz sırasında meydana gelen sitoplazmik küçülme, kromatin kondensasyonu veya kırılması net olarak görüntülenebilmektedir [122].

Doku takibi, dokuların mikroskop ile görüntülenebilmesi için yapılan işlemler dizisine verilen isimdir. Dehidratasyon, şeffaflandırma ve sertleştirme doku takibinin ana işlemleridir [123].

Doku takibi sırası ile şu şekilde yapılmaktadır:

Fiksasyon: Fiksasyon işleminde temel amaç doku ya da hücreyi canlı olduğu halde sabitlemektir. Bu işlem doku proteinleri ve fiksatifler arasında çapraz bağların oluşturulması ile gerçekleşmektedir. Elektron mikroskobu ile incelenecek olan doku hemen fikse edilmesi gerekmektedir. Tamponlanmış %2'lik Glutaraldahit (pH:7.2) içerisinde +4°C'de 1 gece bekletilmelidir. Glutaraldehit fiksatifi fosfat tamponu ile 15 dakika boyunca 3 kez yıkanarak uzaklaşması sağlanmaktadır. Fosfat tamponu ile 1:1 oranında %2'lik Glutaraldahit hazırlanmakta ve oda koşullarında 2 saat rotator cihazında döndürülerek post-fiksasyon işlemi sağlanmaktadır. Osmium tetraoksit proteinler ile çapraz bağ yapmakta ve mekanizması çift bağlı doymamış yağ asitlerinde esterlerin oluşması prensibine dayanmaktadır.

Dehidratasyon: Dokulardaki suyun uzaklaştırılması için yapılan bir işlemdir. Bu işlem sırasında berrak, renksiz, kolay alev alabilen, orta derece toksik olan ve organik çözeltiler ile karışabilen etil alkol kullanılmaktadır. Etil alkol hidrofilik yani su sever özellikte olduğundan dehidratasyon işlemi için kullanılan iyi bir ajandır. Dehidratasyon işleminde kullanılan etil alkol artan konsantrasyonlarda kullanılmaktadır.

Çizelge 2.1. Dehidratasyon Serileri

%30 etil alkol	15 dak. - 2 kez	+4°C
%50 etil alkol	15 dak. - 2 kez	+4°C
% 70 etil alkol	15 dak. - 2 kez	+4°C
% 90 etil alkol	15 dak. - 2 kez	+4°C
% 96 etil alkol	15 dak. - 2 kez	+4°C
%100 etil alkol	30 dak.	+4°C
%100 etil alkol	30 dak.	+25°C

Şeffaflandırma: Dealkolizasyon olarak da bilinmektedir. Şeffaflandırıcı olarak Propilen oksit kullanılmaktadır. Şeffaflandırıcı ajanın dokuya zarar vermemesi, dehidratasyon maddesini temizleyebilmesi ve sertleştirici madde ile uyum sağlayabilen özellikte olması gerekmektedir. Dokular rotatorda 1 saat boyunca döndürülerek bekletilmektedir.

Çizelge 2.2. Şeffaflandırma Serileri

Propilenoksit	30 dak. +25°C
Propilenoksit	30 dak. +25°C

Çizelge 2.3. Gömmeye Geçiş

Propilenoksit/epon812	60 dak. +25°C
Propilenoksit/epon812	60 dak. +25°C

Bloklama: Hazırlanan epon 812 resinle bloklama işlemi yapılmaktadır. Polimerizasyon işleminin gerçekleşmesi için 48 saat boyunca 60°C’de etüv içerisinde bekletilmektedir.

Çizelge 2.4. Resin solisyonlarının hazırlanması

Araldit CY212	20 mL
DDSA	20 mL
BDMA	0,6 mL
Dibütilfitalat	1 mL

Kesitlerin alınması: Görüntü elde edebilmek için resinin 70-100 nm kalınlığında kesitler alınması gerekmektedir. Çünkü bloklama yapılan resin elektron geçiremeyecek kadar kalındır. Kesit alma işlemi ultramikrotom cihazı ile gerçekleştirilmekte ve bu işleme de ultramikrotomi adı verilmektedir. Alınan kesitler gridler üzerine yerleştirilmektedir ve boyama işlemi için uranil asetat ve kurşun sitrat kullanılmaktadır [123].

Yöntemin Uygulanması

A549 ve PANC-1 hücrelerinin 75 cm² lik kültür kaplarına 10 mL uygun besiyeri içerisinde ekimi yapıldı. 24 saat inkübatörde inkübasyona bırakılan hücreler, süre sonunda üzerlerinden 5 mL eski besiyeri çekilerek atılmıştır. Üzerlerine 5 mL taze besiyeri içerisinde Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinden daha önceden belirlenen 24 saatlik IC₅₀ ve IC_{50/2} dozları uygulanmış ve inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında doku takibi prosedürü yapılmış ve elektron mikroskobu ile hazırlanan preparatlar görüntülenmiştir.

3. SONUÇLAR VE BULGULAR

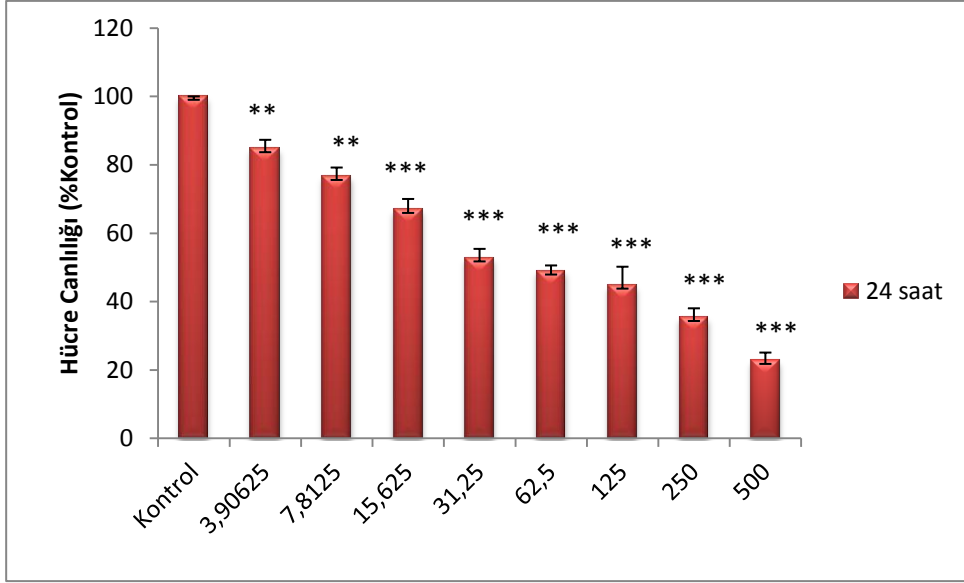
3.1. MTT Sonuçları

3.1.1. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

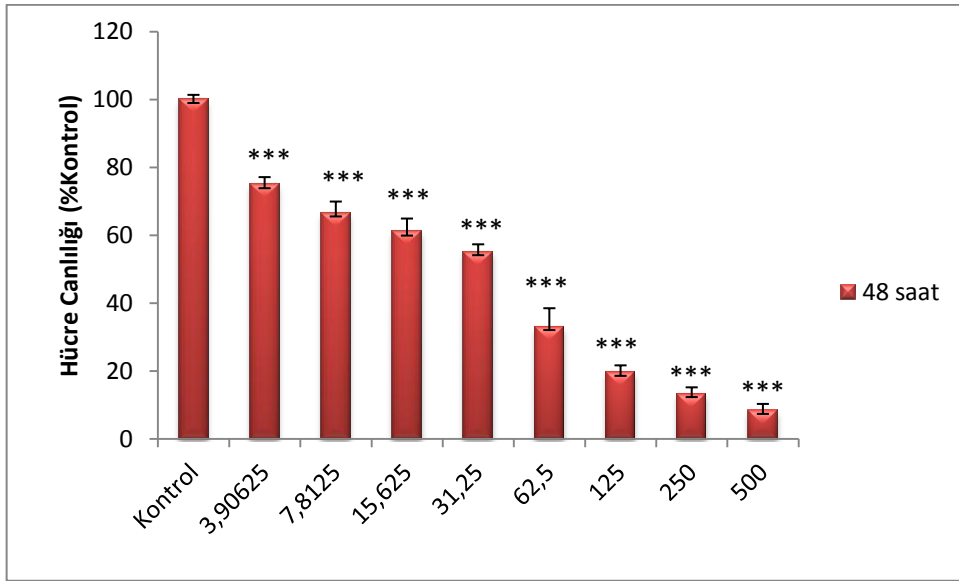
A549 hücrelerine Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531, 0.9765625 μ M konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon süresi sonunda MTT yöntemi ile maddelerin sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Kontrol ve maddeler ELİZA (Enzim Bağlantılı İmmunosorbent Yöntemi) cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. Her bir grubun hesaplamaları yapılarak % canlılık değerleri belirlenmiştir. Gruplara ait % canlılık değerlerinin grafikleri **Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6** 'da % canlılık değerleri **Çizelge 3.1, 3.2, 3.3** 'de belirtilmiştir.

3.1.1.1. Sisplatin'in A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Sisplatin konsantrasyonlarının A549 hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Sisplatin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. A549 hücrelerine uygulanan Sisplatin'in 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625 μ M konsantrasyonlarının 24.saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %22.7, 35.3, 44.7, 48.8, 52.7, 66.9, 76.5, 84.6 olarak hesaplanmıştır. Sisplatin konsantrasyonlarının 48. Saatteki etkisi kontrol grubuna göre % 8.3, 13.3, 19.5, 33.0, 55.1, 60.9, 66.5, 74.8 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *Sisplatin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$)($n=5$)*



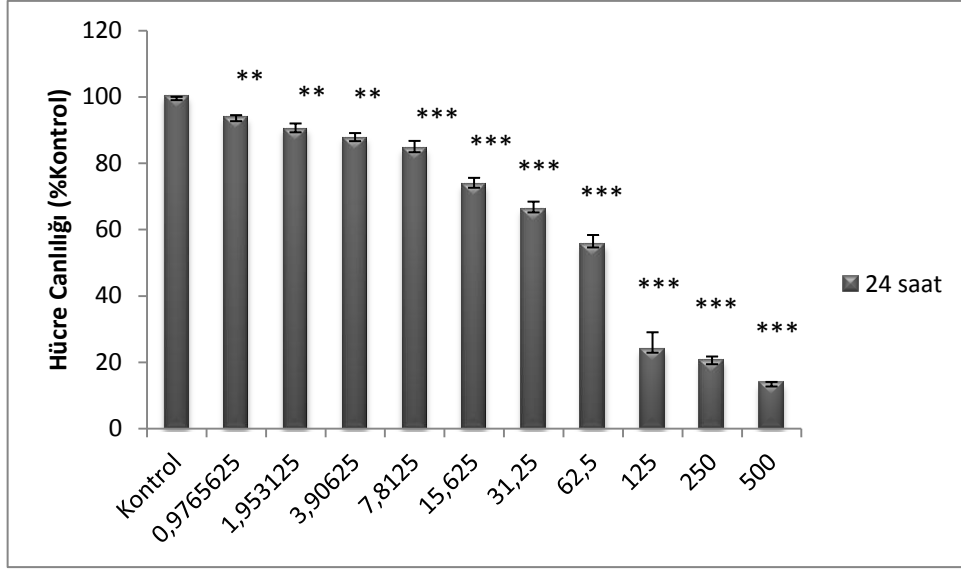
Şekil 3.2. *Sisplatin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0,001^{***}$)($n=5$)*

Çizelge 3.1. MTT yöntemine göre belirlenen Sisplatin konsantrasyonlarının A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri

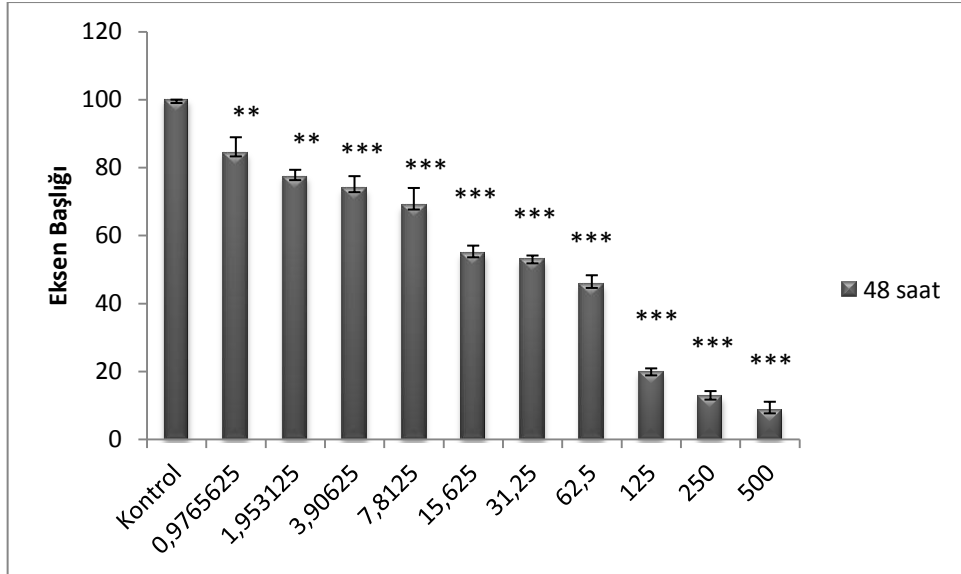
Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	22.7	8.3
250	35.3	13.3
125	44.7	19.5
62,5	48.8	33.0
31,25	52.7	55.1
15,625	66.9	60.9
7,8125	76.5	66.5
3,90625	84.6	74.8

3.1.1.2. Klomipramin'in A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Klomipramin konsantrasyonlarının A549 hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Klomipramin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. A549 hücrelerine uygulanan Klomipramin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531, 0.9765625 µM konsantrasyonlarının 24.saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %13.6, 20.4, 23.8, 55.5, 66.1, 73.6, 84.3, 87.6, 90.3, 93.6 olarak hesaplanmıştır. Klomipramin konsantrasyonlarının 48.saatteki etkisi kontrol grubuna göre % 8.6, 12.7, 19.8, 45.6, 52.8, 54.6, 68.6, 73.7, 77.3, 84.2 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.2** 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Klomipramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$)($n=6$)



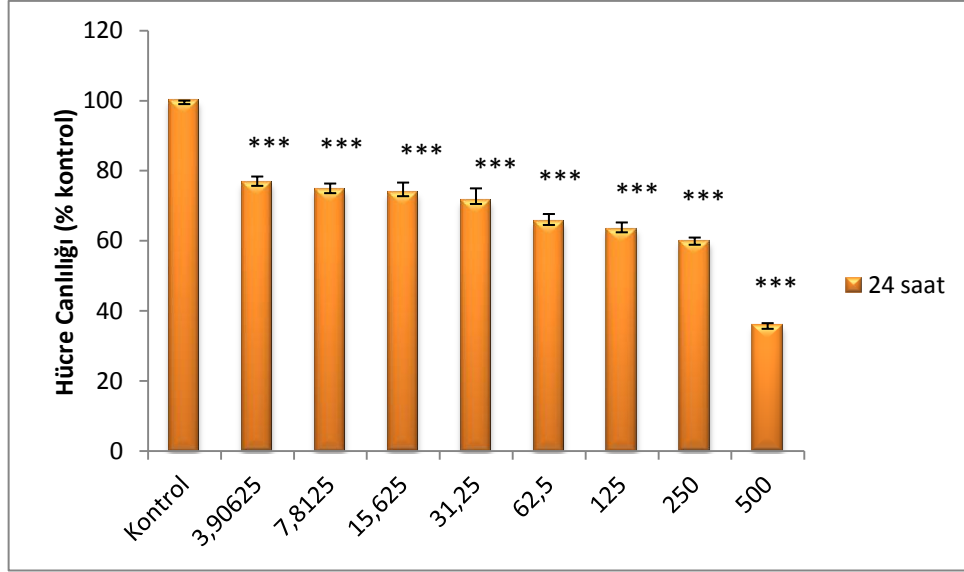
Şekil 3.4. Klomipramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$)($n=6$)

Çizelge 3.2. MTT yöntemine göre belirlenen Klomipramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri

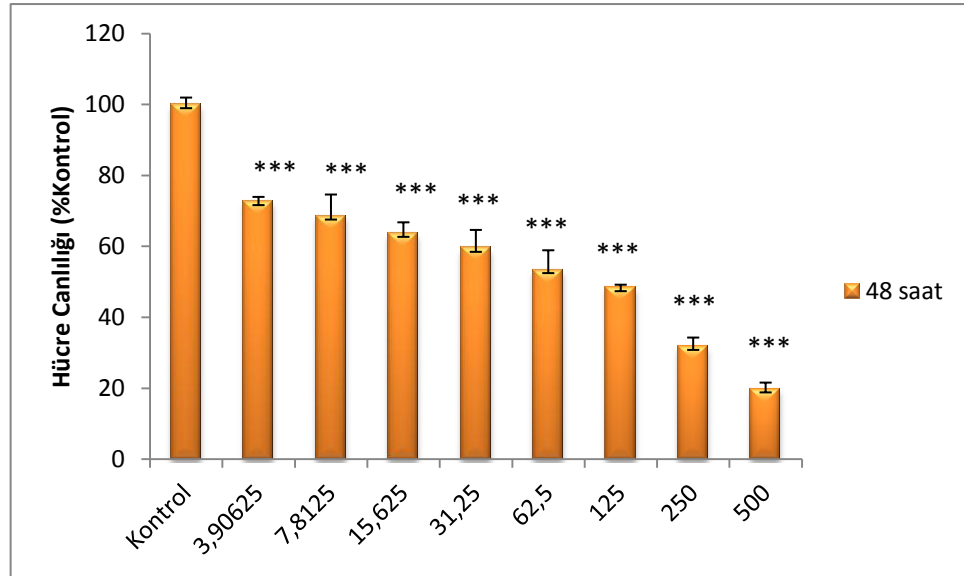
Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	13.6	8.6
250	20.4	12.7
125	23.8	19.8
62,5	55.5	45.6
31,25	66.1	52.8
15,625	73.6	54.6
7,8125	84.3	68.6
3,90625	87.6	73.7
1,953125	90.3	77.3
0,976563	93.6	84.2

3.1.1.3. Kloropiramin'in A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Kloropiramin konsantrasyonlarının A549 hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Kloropiramin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. A549 hücrelerine uygulanan Kloropiramin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 µM konsantrasyonlarının 24.saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %35.8, 59.8, 63.4, 65.5, 71.5, 73.7, 74.6, 76.6 olarak hesaplanmıştır. Kloropiramin konsantrasyonlarının 48. Saatteki etkisi kontrol grubuna göre %19.8, 31.8, 48.4, 53.5, 59.5, 63.7, 68.6, 72.6 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.3** 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Kloropiramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$)($n=5$)



Şekil 3.6. Kloropiramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0,001^{***}$)($n=5$)

Çizelge 3.3. MTT yöntemine göre belirlenen Kloropiramin konsantrasyonlarının A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri

Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	35.8	19.8
250	59.8	31.8
125	63.4	48.4
62,5	65.5	53.5
31,25	71.5	59.5
15,625	73.7	63.7
7,8125	74.6	68.6
3,90625	76.6	72.6

A549 hücrelerinde Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in 24 ve 48 saatlik sitotoksik etki belirlemek için yapılan MTT analizine göre, maddelerin ve $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Bu değerler belirlenirken Microsoft Excell grafiksel değerlendirme kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalarda Sisplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. MTT analizine göre yapılan değerlendirmeler sonucunda Sisplatin'in A549 hücreleri üzerindeki 24 saat sonundaki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 50.494 µM ve 100.989 µM olarak belirlenmiştir. Sisplatin'in A549 hücreleri üzerindeki 48 saatlik $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 21.248 µM ve 42.496 µM olarak belirlenmiştir.

Klomipramin'in A549 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile yapılan MTT analizi sonucunda $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. 24. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 36.143 µM ve 72.287 µM olarak, 48. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri ise sırası ile 40.935 µM ve 81.870 µM olarak belirlenmiştir.

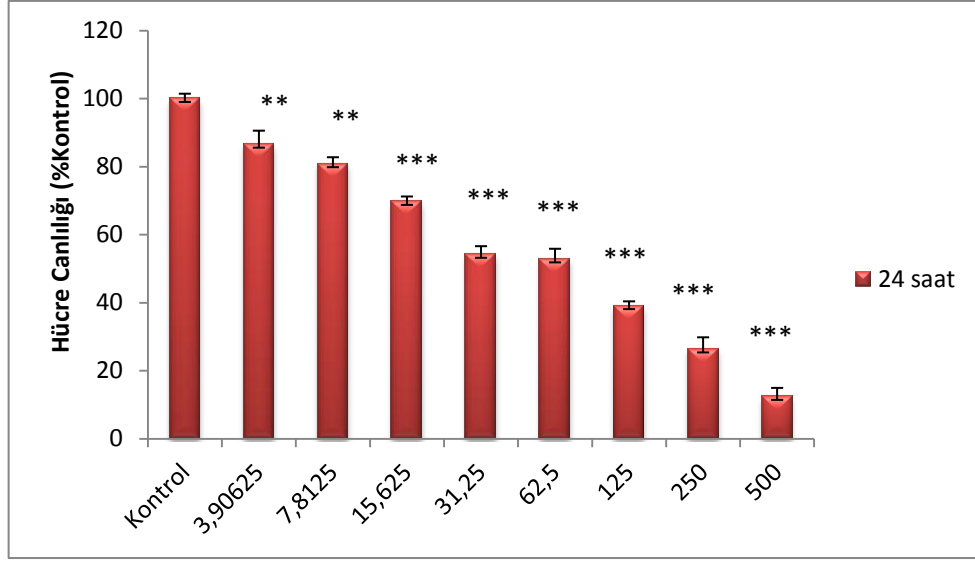
Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile yapılan MTT analizi sonucunda $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. 24. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 163.291 μ M ve 326.583 μ M olarak, 48. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri ise sırası ile 56.419 μ M ve 112.839 μ M olarak belirlenmiştir.

3.1.2. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

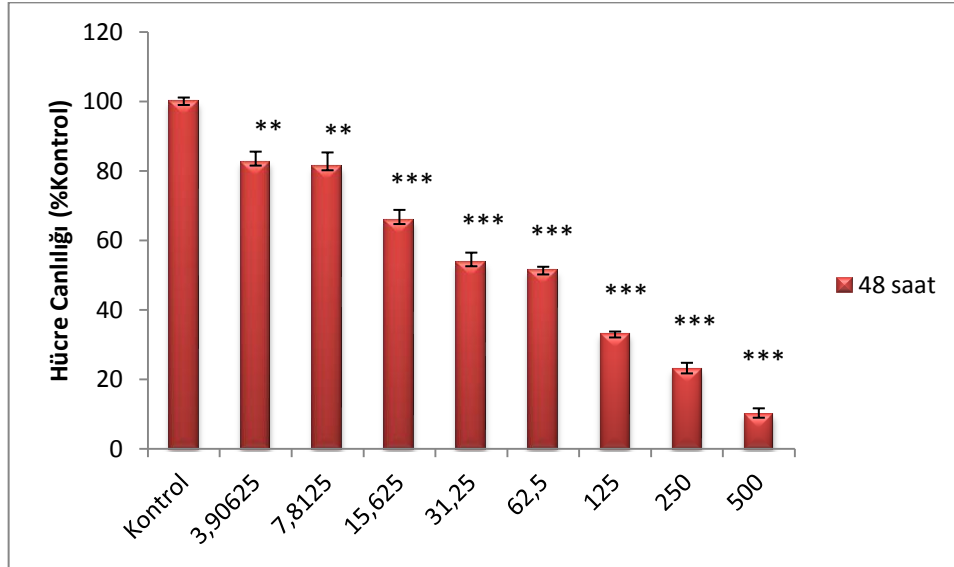
PANC-1 hücrelerine Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531, 0.9765625 μ M konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon süresi sonunda MTT yöntemi ile maddelerin sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Kontrol ve maddeler ELİZA (Enzim Bağlantılı İmmunosorbent Yöntemi) cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. Her bir grubun hesaplamaları yapılarak % canlılık değerleri belirlenmiştir. Gruplara ait % canlılık değerlerinin grafikleri **Şekil 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12** 'da % canlılık değerleri **Çizelge 3.4, 3.5, 3.6** 'de belirtilmiştir.

3.1.2.1. Sisplatin'in PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Sisplatin konsantrasyonlarının PANC-1 hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Sisplatin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. PANC-1 hücrelerine uygulanan Sisplatin'in 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625 μ M konsantrasyonlarının 24.saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %12.3, 26.3, 39.0, 52.8, 54.1, 69.7, 80.8, 86.5 olarak hesaplanmıştır. Sisplatin konsantrasyonlarının 48. Saatteki etkisi kontrol grubuna göre % 9.9, 22.7, 33.0, 51.2, 53.5, 65.7, 81.2, 82.5 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.4**'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Sisplatin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$) ($n=5$)



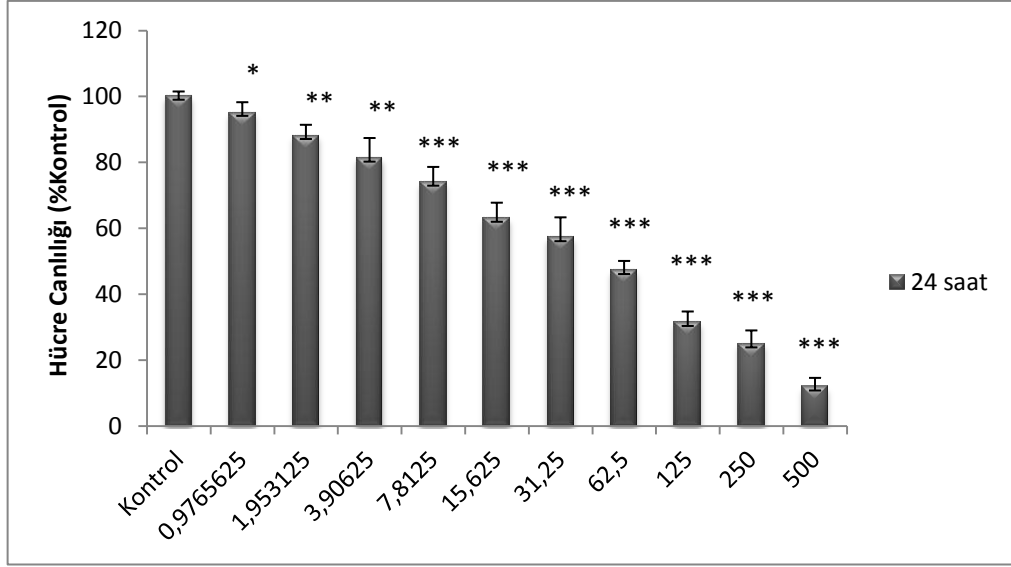
Şekil 3.8. Sisplatin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$) ($n=5$)

Çizelge 3.4. MTT yöntemine göre belirlenen Sisplatin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri

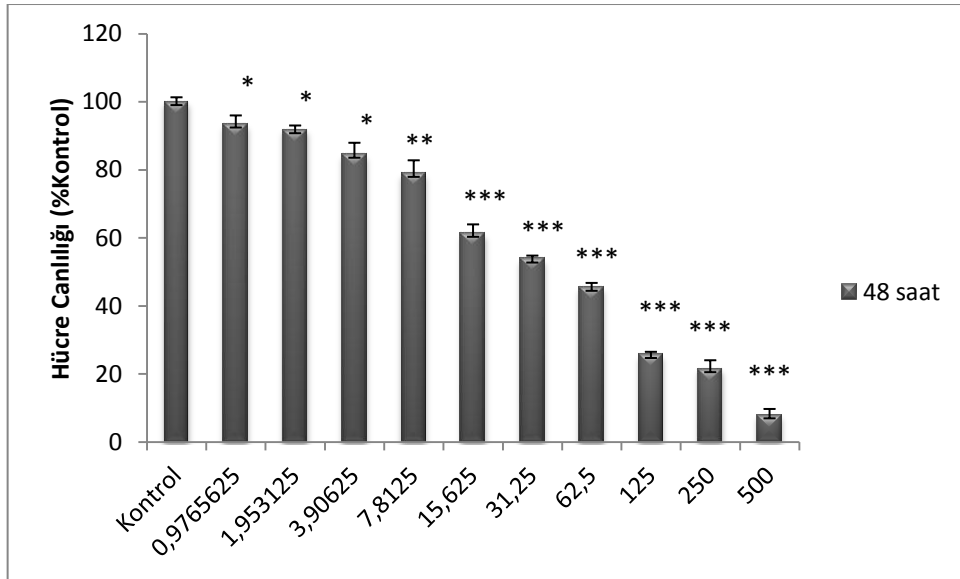
Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	12.3	9.9
250	26.3	22.7
125	39.0	33.0
62,5	52.8	51.2
31,25	54.1	53.5
15,625	69.7	65.7
7,8125	80.8	81.2
3,90625	86.5	82.5

3.1.2.2. Klomipramin'in PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Klomipramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Klomipramin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. PANC-1 hücrelerine uygulanan Klomipramin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531, 0.9765625 µM konsantrasyonlarının 24. saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %11.7, 24.8, 31.3, 47.0, 57.0, 62.9, 73.9, 81.2, 88.0, 95.1 olarak hesaplanmıştır. Klomipramin konsantrasyonlarının 48. Saatteki etkisi kontrol grubuna göre %7.9, 21.5, 25.6, 45.4, 53.7, 61.3, 78.9, 84.5, 91.7, 93.4 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.5** 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Klomipramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$)($n=6$)



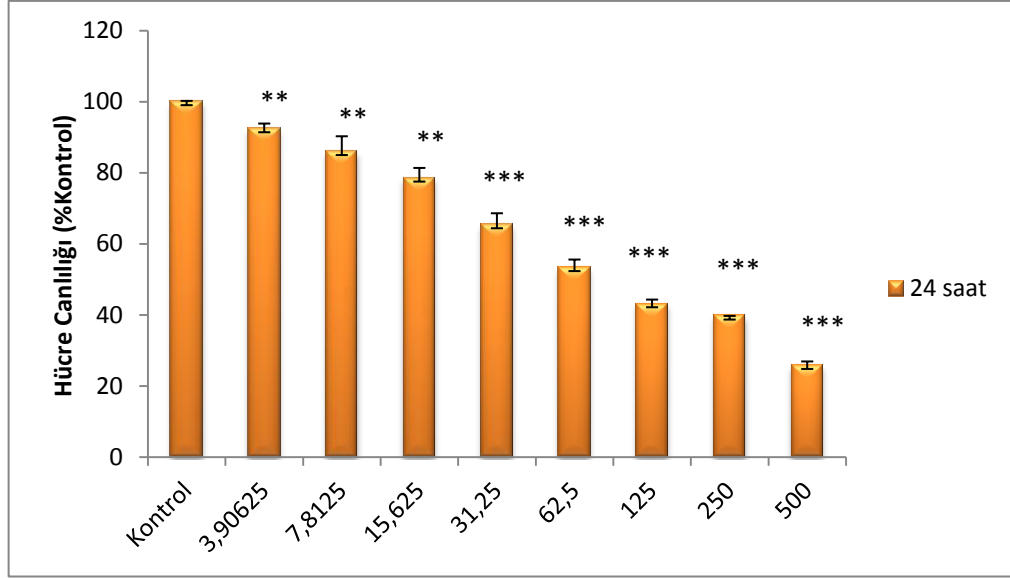
Şekil 3.10. Klomipramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$)($n=6$)

Çizelge 3.5. MTT yöntemine göre belirlenen Kloropiramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri

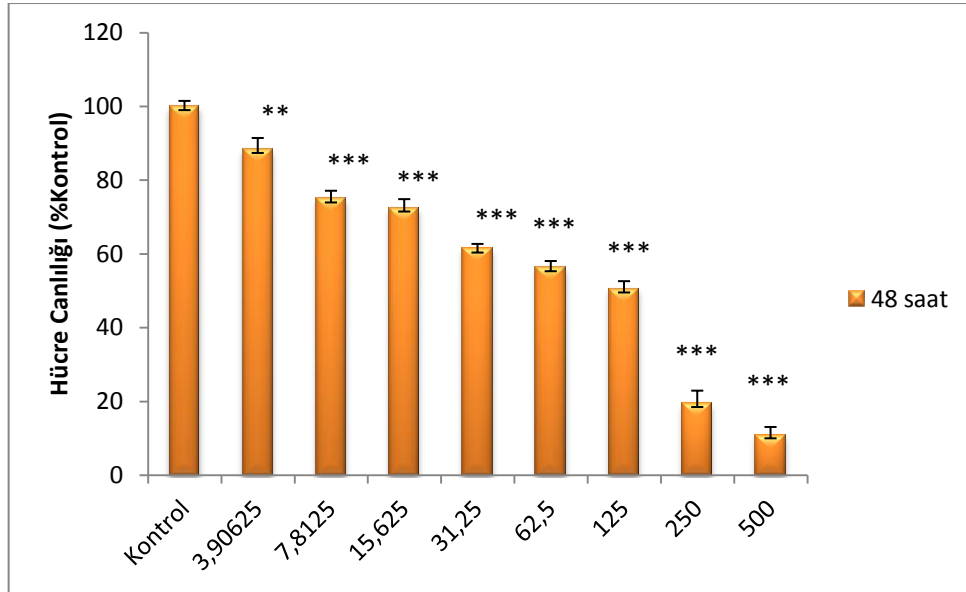
Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	11.7	7.9
250	24.8	21.5
125	31.3	25.6
62,5	47.0	45.4
31,25	57.0	53.7
15,625	62.9	61.3
7,8125	73.9	78.9
3,90625	81.2	84.5
1,953125	88.0	91.7
0,976563	95.1	93.4

3.1.2.3. Kloropiramin'in PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Kloropiramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Kloropiramin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. PANC-1 hücrelerine uygulanan Kloropiramin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625 µM konsantrasyonlarının 24. saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %25.8, 39.6, 43.1, 53.3, 65.3, 78.4, 85.9, 92.3 olarak hesaplanmıştır. Kloropiramin konsantrasyonlarının 48. Saatteki etkisi kontrol grubuna göre %11.0, 19.4, 50.5, 56.2, 61.3, 72.4, 74.9, 88.3 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.6** 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Kloropiramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p < 0,001^{***}$)($n=5$)



Şekil 3.12. Kloropiramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$) ($n=5$)

Çizelge 3.6. MTT yöntemine göre belirlenen Kloropiramin konsantrasyonlarının PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri

Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	25.8	11.0
250	39.6	19.4
125	43.1	50.5
62,5	53.3	56.2
31,25	65.3	61.3
15,625	78.4	72.4
7,8125	85.9	74.9
3,90625	92.3	88.3

PANC-1 hücrelerinde Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in 24 ve 48 saatlik sitotoksik etki belirlemek için yapılan MTT analizine göre, maddelerin ve $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Bu değerler belirlenirken Microsoft Excell grafiksel değerlendirme kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalarda Sisplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. MTT analizine göre yapılan değerlendirmeler sonucunda Sisplatin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki 24 saat sonundaki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 45.419 µM ve 91.838 µM olarak belirlenmiştir. Sisplatin'in A549 hücreleri üzerindeki 48 saatlik $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 33.875 µM ve 67.750 µM olarak belirlenmiştir.

Klomipramin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile yapılan MTT analizi sonucunda $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. 24. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 32.553 µM ve 65.106 µM olarak, 48. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri ise sırası ile 31.716 µM ve 63.432 µM olarak belirlenmiştir.

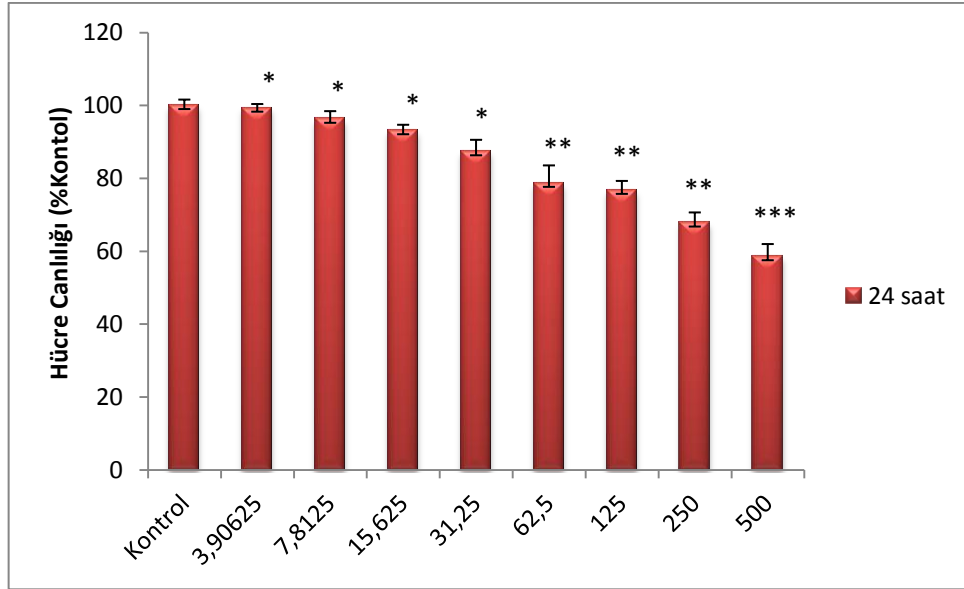
Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile yapılan MTT analizi sonucunda $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. 24. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 65.370 µM ve 130.741 µM olarak, 48. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri ise sırası ile 54.750 µM ve 109.501 µM olarak belirlenmiştir.

3.1.3. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in hTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

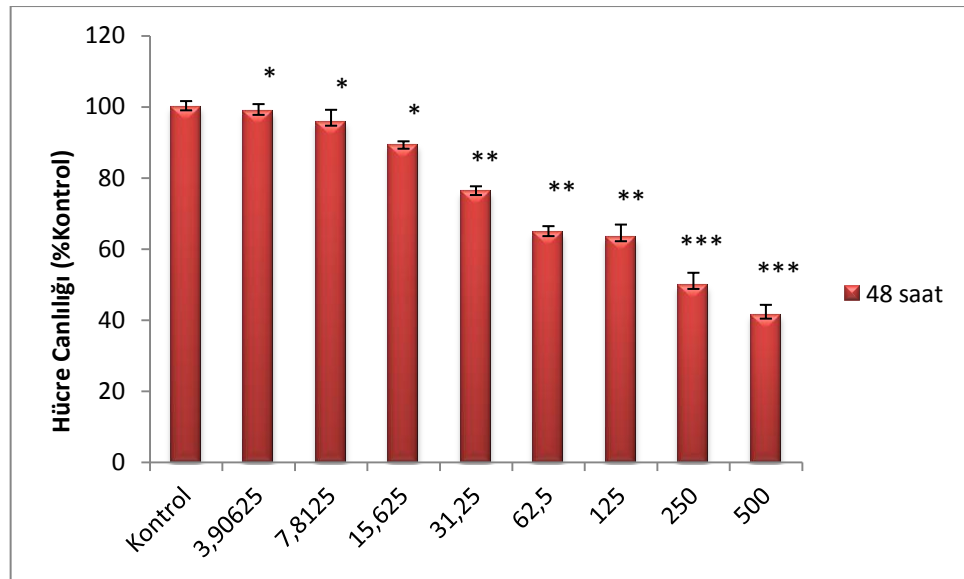
hTERT-HPNE hücrelerine Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531, 0.9765625 μ M konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon süresi sonunda MTT yöntemi ile maddelerin sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Kontrol ve maddeler ELİZA (Enzim Bağlantılı İmmunosorbent Yöntemi) cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. Her bir grubun hesaplamaları yapılarak % canlılık değerleri belirlenmiştir. Gruplara ait % canlılık değerlerinin grafikleri **Şekil 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18** 'da % canlılık değerleri **Çizelge 3.7, 3.8, 3.9** 'de belirtilmiştir.

3.1.3.1. Sisplatin'in h-TERT HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Sisplatin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Sisplatin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. hTERT-HPNE hücrelerine uygulanan Sisplatin'in 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625 μ M konsantrasyonlarının 24. saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %2258.5, 67.7, 76.7, 78.6, 87.3, 93.0, 96.2, 99.2 olarak hesaplanmıştır. Sisplatin konsantrasyonlarının 48. Saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %41.4, 49.7, 63.1, 64.6, 76.1, 89.1, 95.6, 98.7 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.7**'de gösterilmiştir.



Şekil 3.13. Sisplatin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$) ($n=5$)



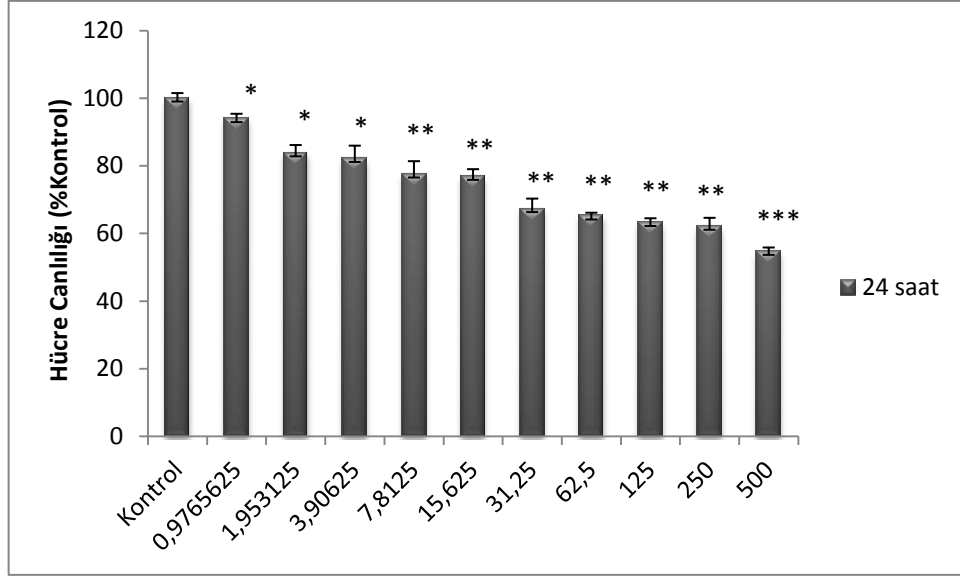
Şekil 3.14. Sisplatin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$) ($n=5$)

Çizelge 3.7. MTT yöntemine göre belirlenen Sisplatin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri

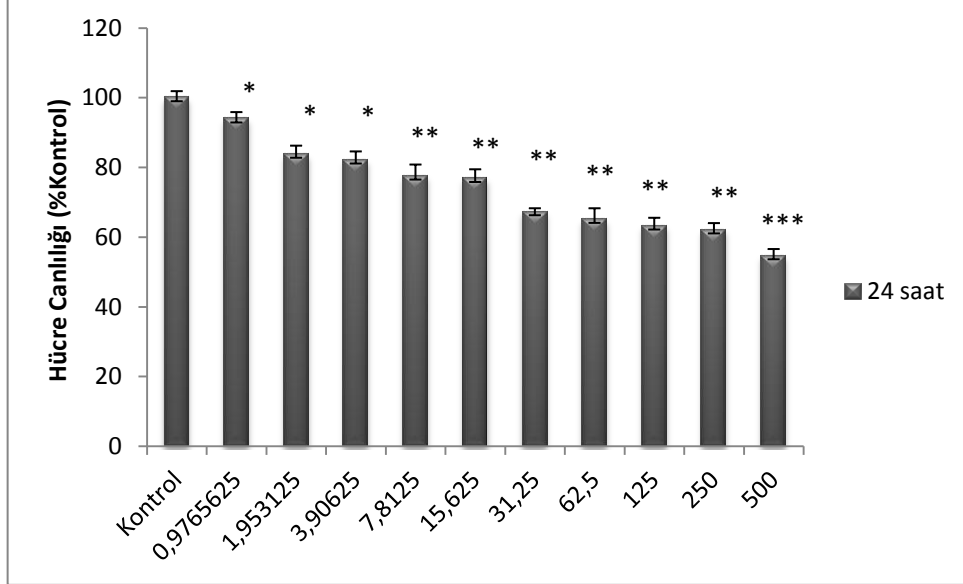
Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	58.5	41.4
250	67.7	49.7
125	76.7	63.1
62,5	78.6	64.6
31,25	87.3	76.1
15,625	93.0	89.1
7,8125	96.2	95.6
3,90625	99.2	98.7

3.1.3.2. Klomipramin'in hTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Klomipramin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Klomipramin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. hTERT-HPNE hücrelerine uygulanan Klomipramin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531, 0.9765625 µM konsantrasyonlarının 24. saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %54.6, 62.0, 63.1, 65.1, 67.3, 76.8, 77.5, 82.1, 83.7, 93.9 olarak hesaplanmıştır. Klomipramin konsantrasyonlarının 48. Saatteki etkisi kontrol grubuna göre % 58.8, 64.5, 63.1, 63.7, 67.3, 71.1., 76.7, 87.8, 91.9, 99.5 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.8** 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.15. Kломипрамин konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerlendirilmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$) ($n=6$)



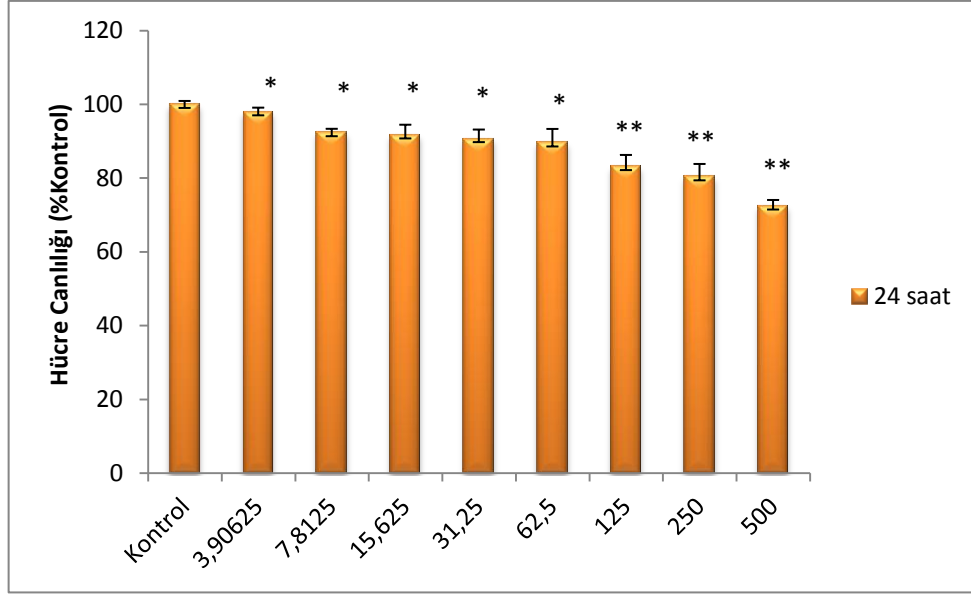
Şekil 3.16. Kломипрамин konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$) ($n=6$)

Çizelge 3.8. MTT yöntemine göre belirlenen Klomipramin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri

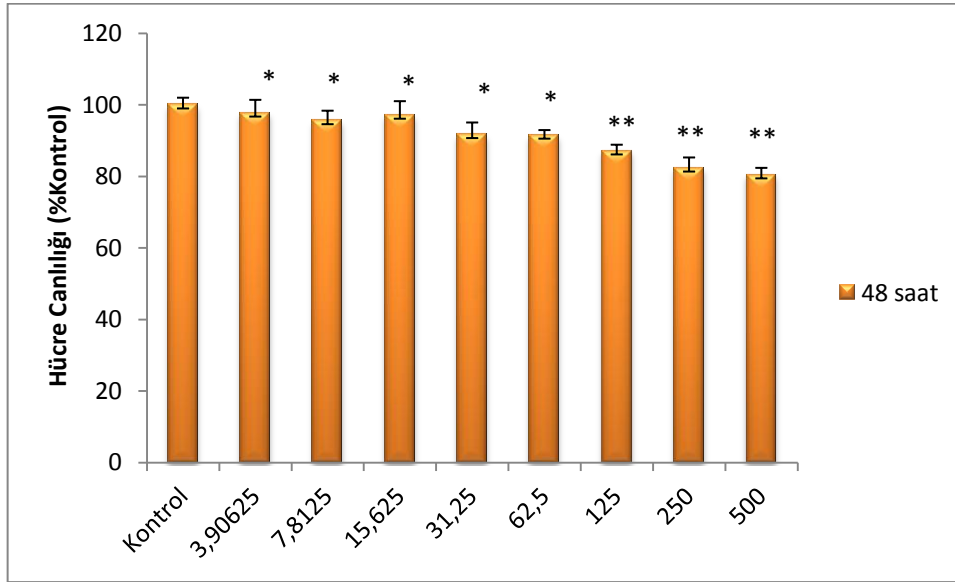
Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	54.6	58.8
250	62.0	64.5
125	63.1	63.1
62,5	65.1	63.7
31,25	67.3	67.3
15,625	76.8	71.1
7,8125	77.5	76.7
3,90625	82.1	87.8
1,953125	83.7	91.9
0,976563	93.9	99.5

3.1.3.4. Kloropiramin'in hTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Kloropiramin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Kloropiramin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. hTERT-HPNE hücrelerine uygulanan Kloropiramin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531, 0.9765625 µM konsantrasyonlarının 24. saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla % 72.4, 80.3, 83.1, 89.5, 90.7, 91.7, 92.3, 98.0 olarak hesaplanmıştır. Kloropiramin konsantrasyonlarının 48. Saatteki etkisi kontrol grubuna göre % 80.4, 82.3, 87.1, 91.5, 91.7, 97.1, 95.6, 97.8 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.9** 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.17. Kloropiramin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$)($n=5$)



Şekil 3.18. Kloropiramin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$)($n=5$)

Çizelge 3.9. MTT yöntemine göre belirlenen Kloropiramin konsantrasyonlarının hTERT-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri

Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	72.4	80.4
250	80.3	82.3
125	83.1	87.1
62,5	89.5	91.5
31,25	90.7	91.7
15,625	91.7	97.1
7,8125	92.3	95.6
3,90625	98.0	97.8

hTERT-HPNE hücrelerinde Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in 24 ve 48 saatlik sitotoksik etki belirlemek için yapılan MTT analizine göre, maddelerin ve $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Bu değerler belirlenirken Microsoft Excell grafiksel değerlendirme kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalarda Sisplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. MTT analizine göre yapılan değerlendirmeler sonucunda Sisplatin'in hTERT-HPNE hücreleri üzerindeki 24 saat sonundaki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 582.715 µM ve 1165.431 µM olarak belirlenmiştir. Sisplatin'in hTERT-HPNE hücreleri üzerindeki 48 saatlik $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 172.297 µM ve 344.595 µM olarak belirlenmiştir.

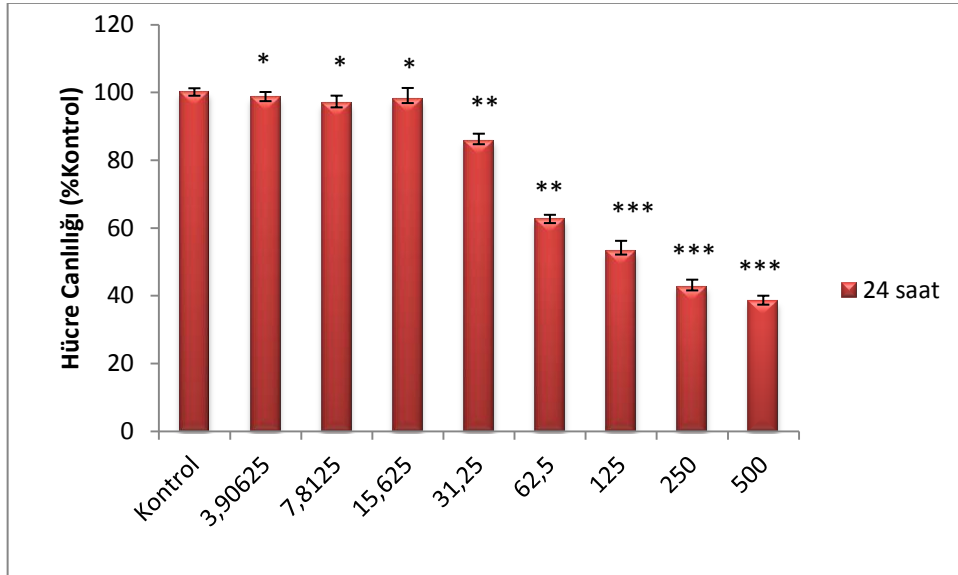
Klomipramin'in hTERT-HPNE hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile yapılan MTT analizi sonucunda $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. 24. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 283.26 µM ve 566.520 µM olarak, 48. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri ise sırası ile 399.583 µM ve 799.167 µM olarak belirlenmiştir.

Kloropiramin'in hTERT-HPNE hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile yapılan MTT analizi sonucunda $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. 24. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 495.176 μ M ve 990.352 μ M olarak, 48. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri ise sırası ile 578.024 μ M ve 1156.048 μ M olarak belirlenmiştir.

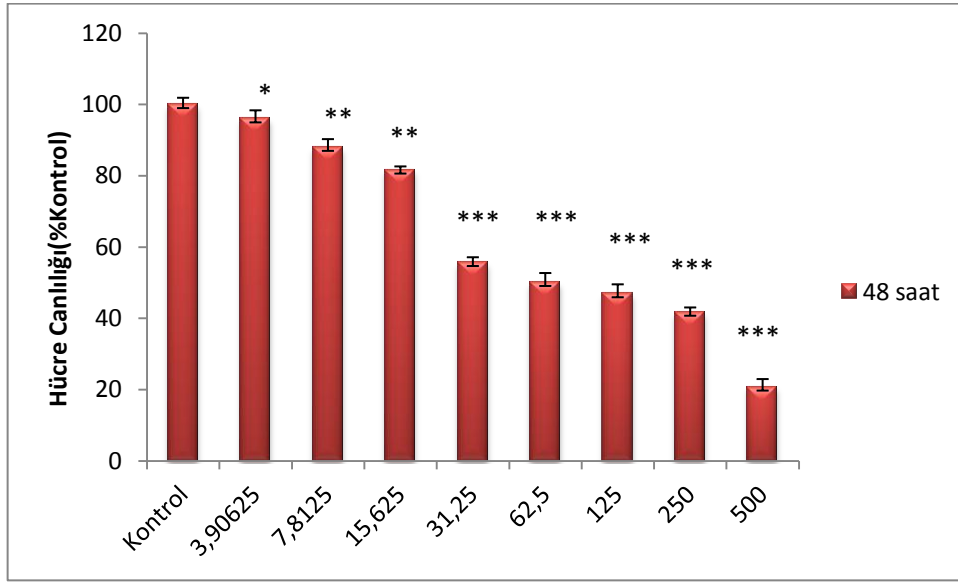
3.1.3. Sisplatin, Komipramin ve Kloropiramin'in L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

3.1.3.1. Sisplatin'in L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Sisplatin konsantrasyonlarının L929 hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Sisplatin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. L929 hücrelerine uygulanan Sisplatin'in 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531, 0.9765625 μ M konsantrasyonlarının 24. saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %38.3, 42.5, 53.1, 62.4, 85.6, 97.8, 96.5, 98.4 olarak hesaplanmıştır. Sisplatin konsantrasyonlarının 48. Saatteki etkisi kontrol grubuna göre %20.7, 41.7, 46.9, 50.0, 55.6, 81.6, 88.0, 95.9 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.10** 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.19. Sisplatin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$)($n=5$)



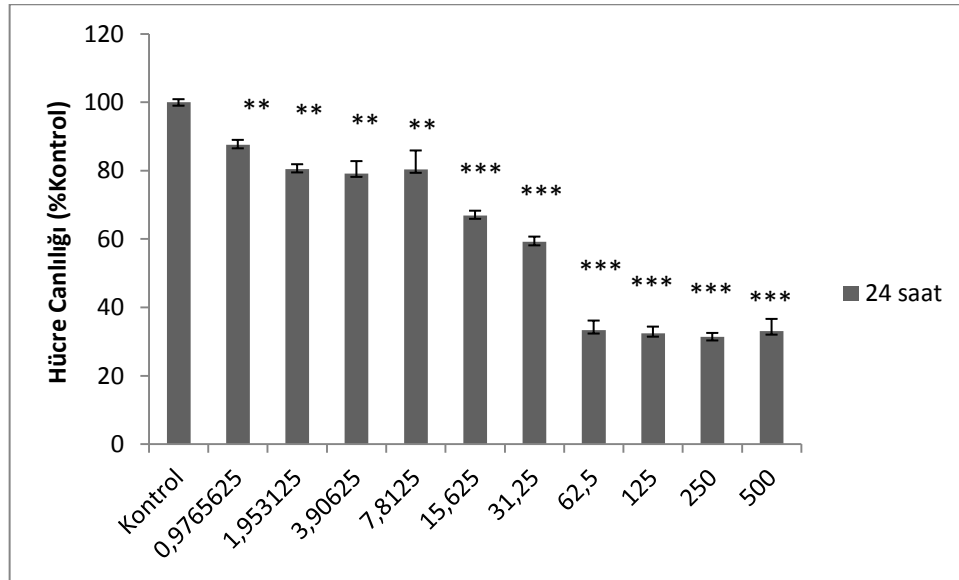
Şekil 3.20. *Sisplatin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$)($n=5$)*

Çizelge 3.10. *MTT yöntemine göre belirlenen Sisplatin konsantrasyonlarının L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri*

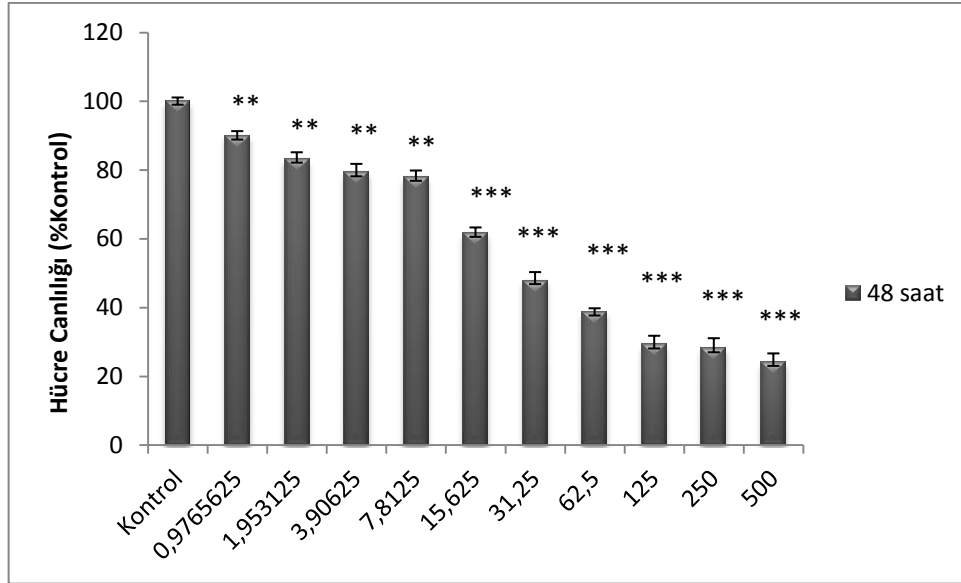
Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	38.3	20.7
250	42.5	41.7
125	53.1	46.9
62,5	62.4	50.0
31,25	85.6	55.6
15,625	97.8	81.6
7,8125	96.5	88.0
3,90625	98.4	95.9

3.1.3.2. Klomipramin'in L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Klomipramin konsantrasyonlarının L929 hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Klomipramin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. L929 hücrelerine uygulanan Klomipramin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531, 0.9765625 μ M konsantrasyonlarının 24. saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %33.4, 31.3, 32.4, 33.3, 59.1, 66.9, 80.3, 79.1, 80.4, 87.5 olarak hesaplanmıştır. Klomipramin konsantrasyonlarının 48. Saatteki etkisi kontrol grubuna göre %24.0, 28.0, 29.1, 38.6, 47.8, 61.5, 77.8, 79.1, 83.1, 89.8 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.11** 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.21. Klomipramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$)($n=6$)



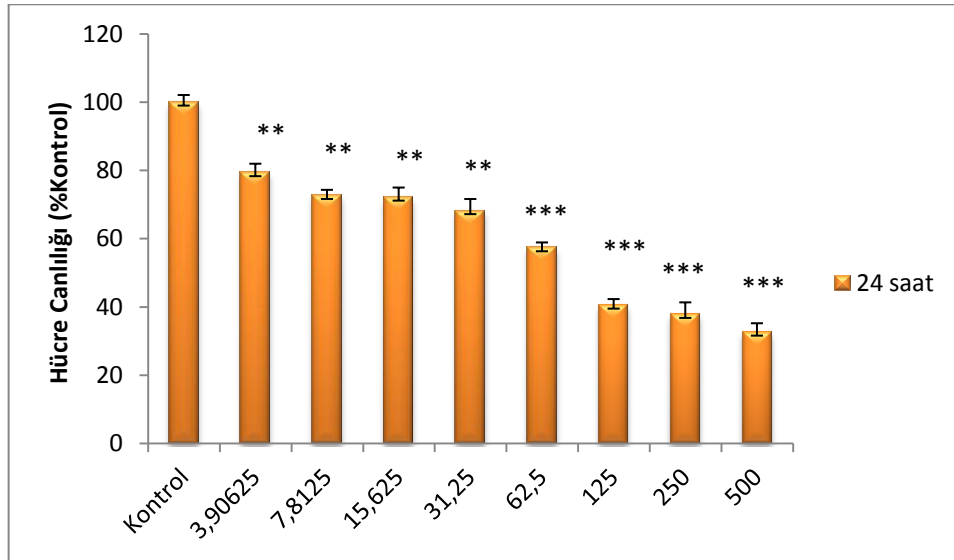
Şekil 3.22. Klomipramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$)($n=6$)

Çizelge 3.11. MTT yöntemine göre belirlenen Klomipramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri

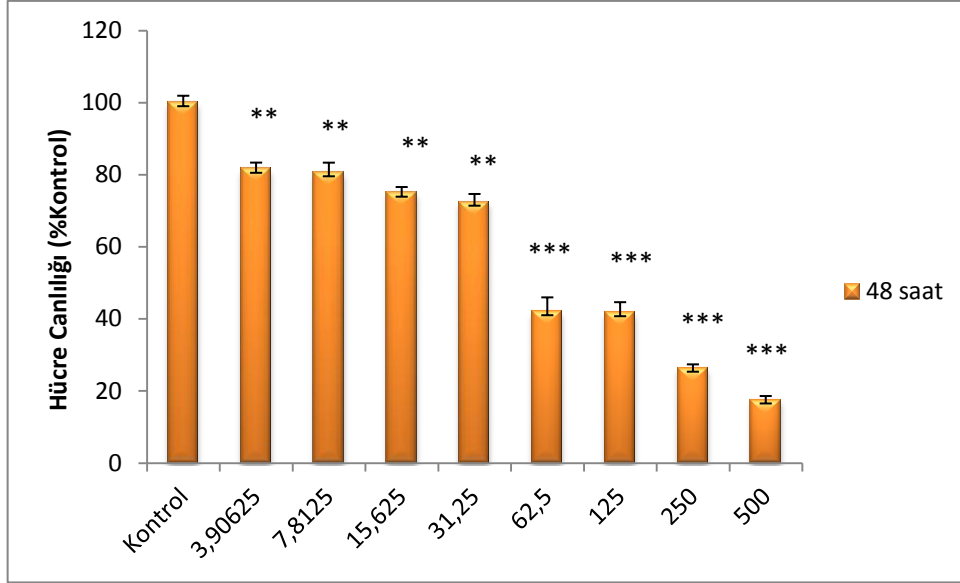
Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	33.4	24.0
250	31.3	28.0
125	32.4	29.1
62,5	33.3	38.6
31,25	59.1	47.8
15,625	66.9	61.5
7,8125	80.3	77.8
3,90625	79.1	79.1
1,953125	80.4	83.1
0,976563	87.5	89.8

3.1.3.3. Kloropiramin'in L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Kloropiramin konsantrasyonlarının L929 hücresi üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Kloropiramin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermiştir. L929 hücrelerine uygulanan Kloropiramin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531, 0.9765625 μ M konsantrasyonlarının 24. saatteki etkisi kontrol grubuna göre sırasıyla %32.6, 37.8, 40.5, 57.3, 68.2, 72.1, 72.6, 79.3 olarak hesaplanmıştır. Kloropiramin konsantrasyonlarının 48. Saatteki etkisi kontrol grubuna göre % 17.5, 26.3, 41.7, 42.0, 72.4, 74.8, 80.5, 81.5 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **Çizelge 3.12** 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.23. Kloropiramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***)($n=5$)



Şekil 3.24. Kloropiramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 48. Saatteki % % Canlılık Değerleri ve İstatiksel olarak Değerlendirilmesi ($p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$)($n=5$)

Çizelge 3.12. MTT yöntemine göre belirlenen Kloropiramin konsantrasyonlarının L929 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatteki canlılık yüzdeleri

Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık %	48 saat canlılık %
500	32.6	17.5
250	37.8	26.3
125	40.5	41.7
62,5	57.3	42.0
31,25	68.2	72.4
15,625	72.1	74.8
7,8125	72.6	80.5
3,90625	79.3	81.5

L929 hücrelerinde Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in 24 ve 48 saatlik sitotoksik etki belirlemek için yapılan MTT analizine göre, maddelerin ve $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Bu değerler belirlenirken Microsoft Excell grafiksel değerlendirme kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalarda Sisplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. MTT analizine göre yapılan değerlendirmeler sonucunda Sisplatin'in L929 hücreleri üzerindeki 24 saat sonundaki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 108.445 μM ve 216.890 μM olarak belirlenmiştir. Sisplatin'in L929 hücreleri üzerindeki 48 saatlik $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 85.866 μM ve 171.733 μM olarak belirlenmiştir.

Klomipramin'in L929 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile yapılan MTT analizi sonucunda $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. 24. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 39.142 μM ve 40.407 μM olarak, 48. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri ise sırası ile 20.203 μM ve 40.497 μM olarak belirlenmiştir.

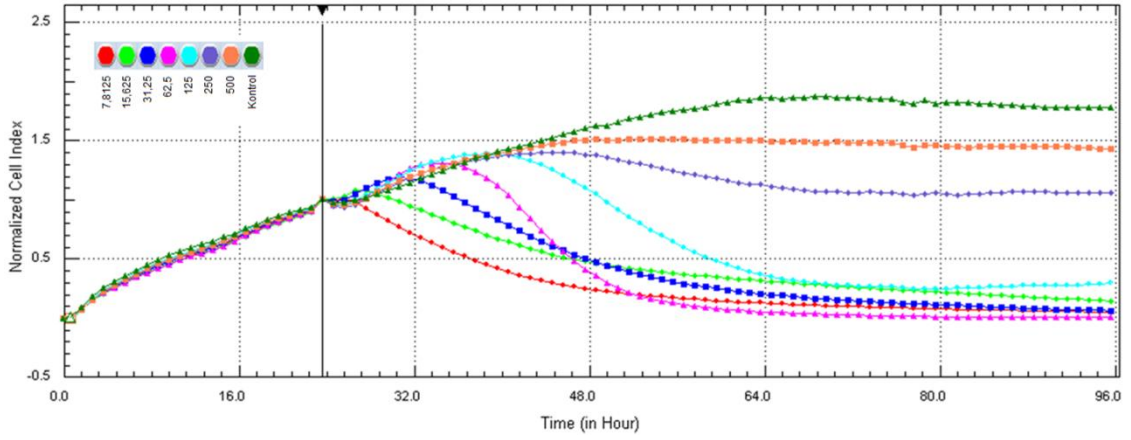
Kloropiramin'in L929 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile yapılan MTT analizi sonucunda $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. 24. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla 73.405 μM ve 146.810 μM olarak, 48. Saatteki $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri ise sırası ile 49.598 μM ve 99.197 μM olarak belirlenmiştir.

3.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sonuçları

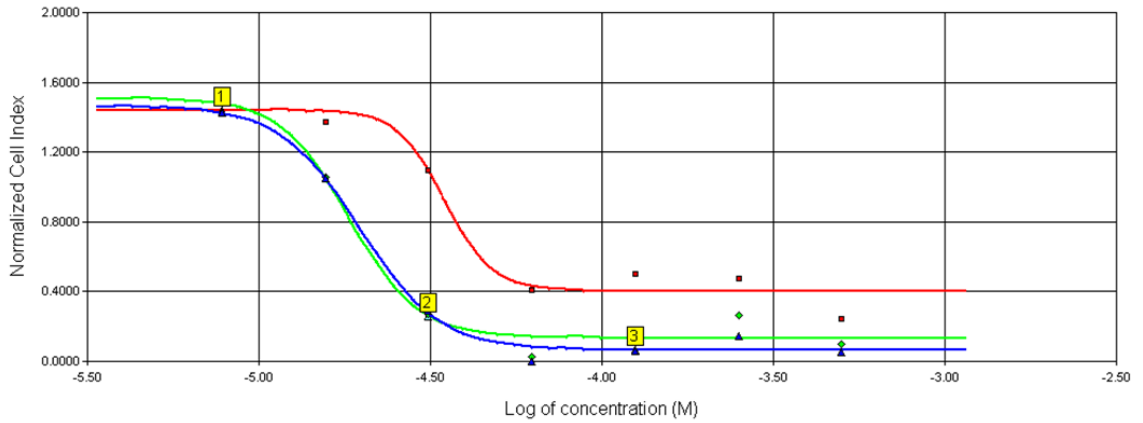
MTT analizi ile sitotoksik etkileri belirlenen Sisplatin, Klomipramin ve kloropiramin maddeleri için xCELLigence RTCA MP sistemi ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Maddelerin A549, PANC-1, hTERT-HPNE ve L929 hücre hatlarının proliferasyonuna olan etkilerini gözlemleyebilmek için sistemden veriler saat başı alınacak şekilde ayarlanmıştır.

RTCA MP Sisteminden elde edilen A549 ve PANC-1 hücrelerine ait proliferasyon grafikleri sistem üzerinden eş zamanlı olarak saat başı veri elde edilecek şekilde ayarlanmıştır. A549 hücreleri için önceden bilinen logaritmik eğri durumuna göre ilaçlar hücreye hücre indeks değeri ~1 iken 23. saatte (Normalizasyon zamanı: 23.44.46, ilaçların hücrelere verildiği andan itibaren sıfırlanma noktası) uygulanmıştır. PANC-1 hücreleri için ise aynı şekilde önceden bilinen logaritmik eğri durumuna göre ilaçlar hücreye hücre indeks değeri ~1 iken 7. saatte (Normalizasyon zamanı: 7.17.00, ilaçların hücrelere verildiği andan itibaren sıfırlanma noktası) uygulanmıştır.

3.2.1. Sisplatin'in A549 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi



Şekil 3.25. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için yapılan uygulamalarda A549 hücreleri üzerindeki Sisplatin'in normalize edilmiş 72 saatlik görüntüsü



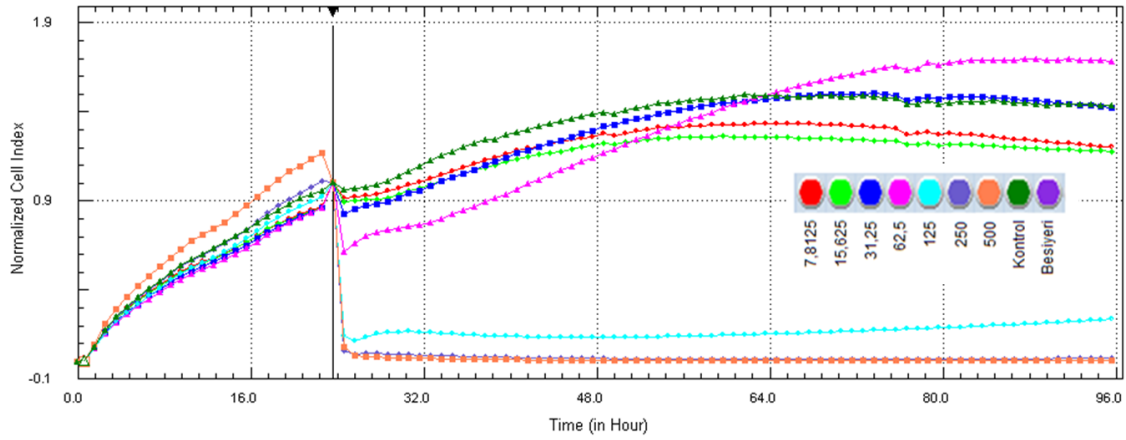
Şekil 3.26. A549 hücreleri üzerinde Sisplatin etken maddesi için 72 saatlik IC₅₀ değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72.saati temsil etmektedir.

Çizelge 3.13. A549 hücreleri üzerinde Sisplatin için sigmoidal doz cevap eğrisi (değişken eğimli) ve 24, 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri

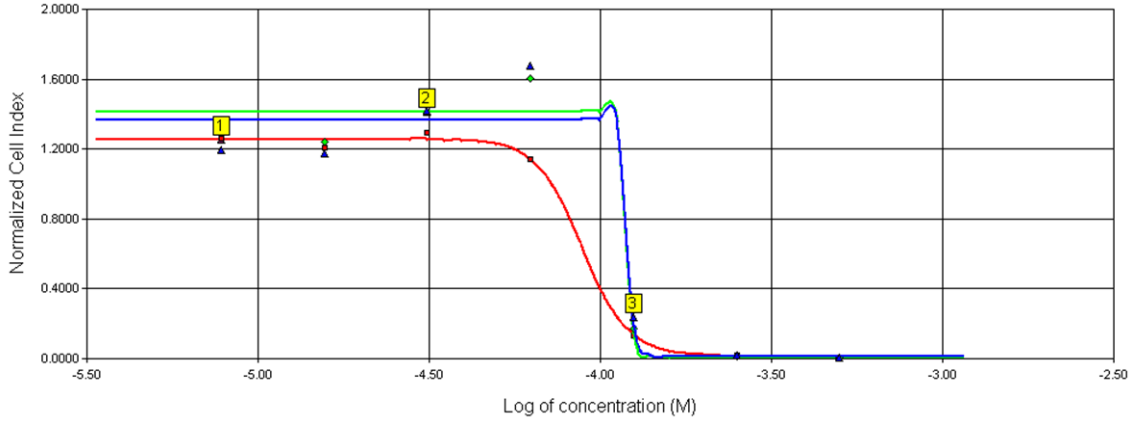
Sisplatin için Sigmoidal Doz Cevap Eğrisi ve IC_{50} Değerleri			
	24 saat	48 saat	72 saat
IC_{50} değerleri	33.91 μ M	18.42 μ M	19.78 μ M
r^2 değerleri	9.7077	9.8341	9.9316

A549 hücreleri üzerine uygulanan Sisplatin ilacının 24 saatteki IC_{50} değeri 33.91 μ M, 48. Saatteki IC_{50} değeri 18.42 μ M ve 72. Saatteki IC_{50} değeri 19.78 μ M olarak saptanmıştır. $IC_{50/2}$ değerleri ise 24, 48 ve 72 saatler için sırasıyla 16.955 μ M, 9.21 μ M, 9.89 μ M olarak belirlenmiştir. Apoptotik etki belirleme çalışmalarında hesaplanan bu değerler kullanılmıştır.

3.2.2. Klomipramin'in A549 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi



Şekil 3.27. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için yapılan uygulamalarda A549 hücreleri üzerindeki Klomipramin'in normalize edilmiş 72 saatlik görüntüsü



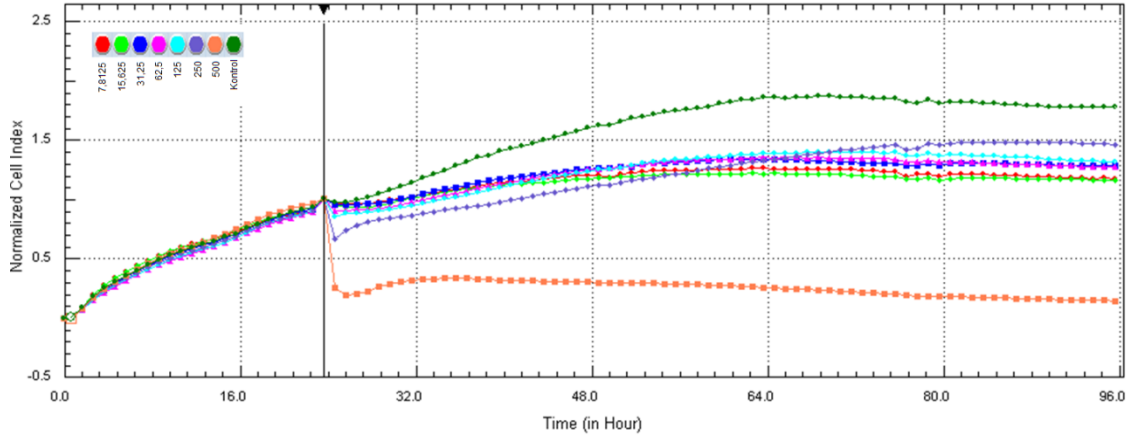
Şekil 3.28. A549 hücreleri üzerinde Klomipramin etken maddesi için 72 saatlik IC_{50} değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72. saati temsil etmektedir.

Çizelge 3.14. A549 hücreleri üzerinde Klomipramin için sigmoidal doz cevap eğrisi (değişken eğimli) ve 24, 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri

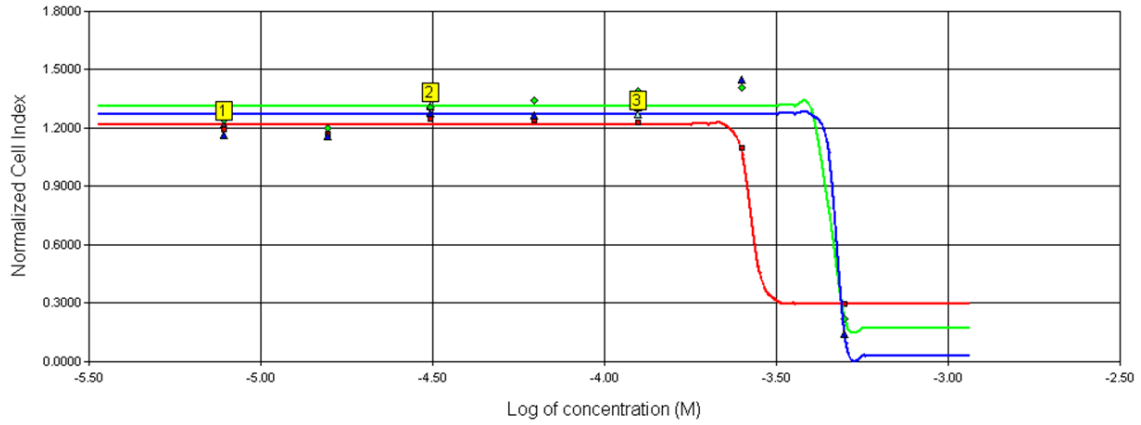
Klomipramin için Sigmoidal Doz Cevap Eğrisi ve IC_{50} Değerleri			
	24 saat	48 saat	72 saat
IC_{50} değerleri	89.16 μ M	119.71 μ M	121.51 μ M
r^2 değerleri	9.9855	9.7455	9.4502

A549 hücreleri üzerine uygulanan Klomipramin ilacının 24 saatteki IC_{50} değeri 89.16 μ M, 48. Saatteki IC_{50} değeri 119.71 μ M ve 72. Saatteki IC_{50} değeri 121.51 μ M olarak saptanmıştır. $IC_{50/2}$ değerleri ise 24, 48 ve 72 saatler için sırasıyla 44.58 μ M, 59.85 μ M, 60.755 μ M olarak belirlenmiştir. Apoptotik etki belirleme çalışmalarında hesaplanan bu değerler kullanılmıştır.

3.2.3. Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi



Şekil 3.29. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için yapılan uygulamalarda A549 hücreleri üzerindeki Kloropiramin'in normalize edilmiş 72 saatlik görüntüsü



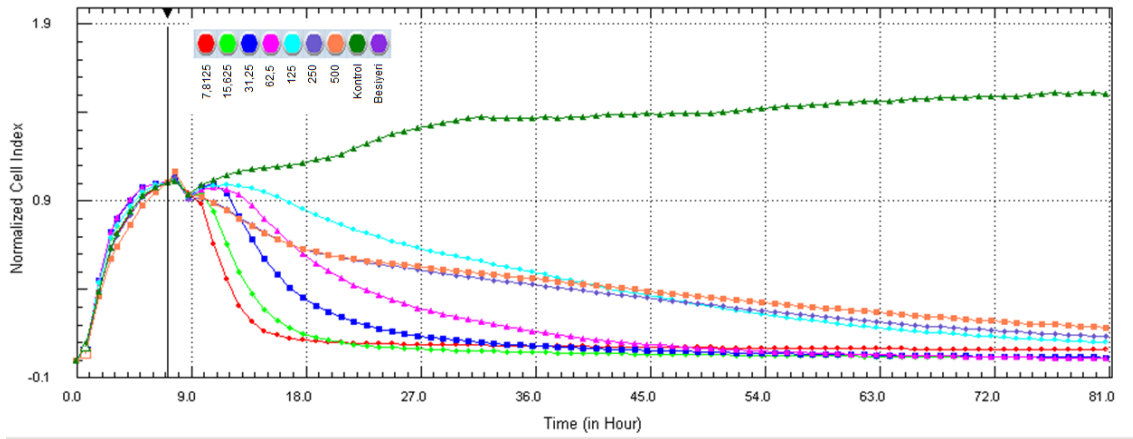
Şekil 3.30. A549 hücreleri üzerinde Kloropiramin etken maddesi için 72 saatlik IC_{50} değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72.saati temsil etmektedir.

Çizelge 3.15. A549 hücreleri üzerinde Kloropiramin için sigmoidal doz cevap eğrisi (değişken eğimli) ve 24, 48 ve 72 saatlik IC₅₀ değerleri

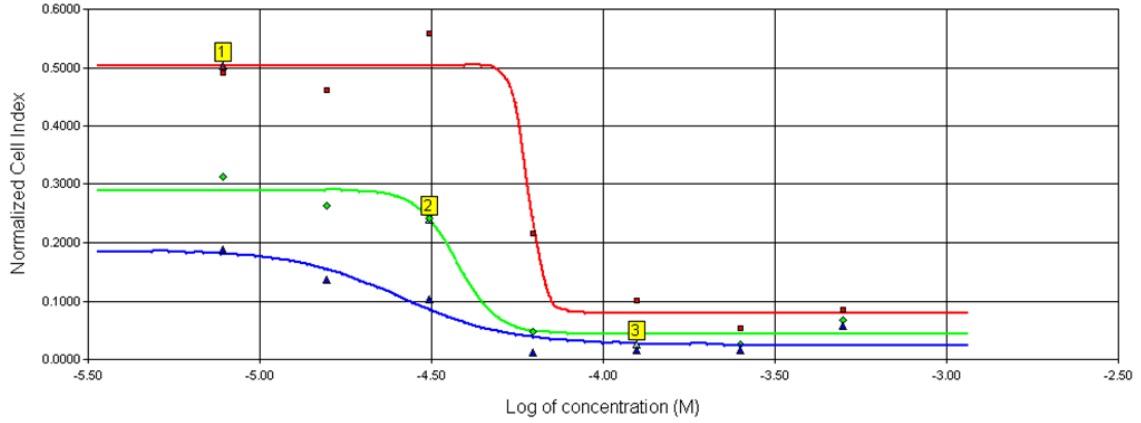
Kloropiramin için Sigmoidal Doz Cevap Eğrisi ve IC ₅₀ Değerleri			
	24 saat	48 saat	72 saat
IC ₅₀ değerleri	268.24 µM	454.76 µM	471.97 µM
r ² değerleri	9.9328	9.7455	9.497

A549 hücreleri üzerine uygulanan Kloropiramin ilacının 24 saatteki IC₅₀ değeri 268.24 µM, 48. Saatteki IC₅₀ değeri 454.76 µM ve 72. Saatteki IC₅₀ değeri 471.97 µM olarak saptanmıştır. IC_{50/2} değerleri ise 24, 48 ve 72 saatler için sırasıyla 134.12 µM, 227.38 µM, 235.985 µM olarak belirlenmiştir. Apoptotik etki belirleme çalışmalarında hesaplanan bu değerler kullanılmıştır.

3.2.4. Sisplatin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi



Şekil 3.31. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için yapılan uygulamalarda PANC-1 hücreleri üzerindeki Sisplatin'in normalize edilmiş 72 saatlik görüntüsü



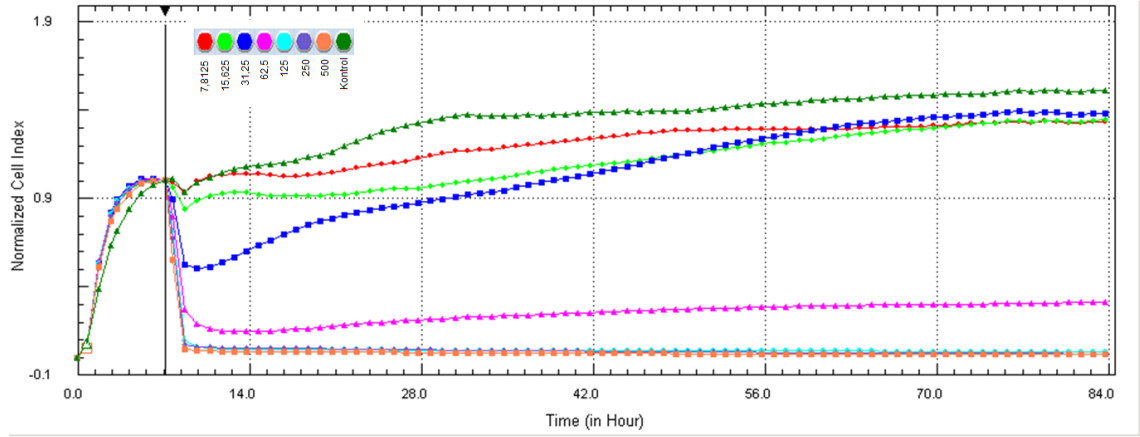
Şekil 3.32. PANC-1 hücreleri üzerinde Sisplatin etken maddesi için 72 saatlik IC_{50} değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72. saati temsil etmektedir.

Çizelge 3.16. PANC-1 hücreleri üzerinde Sisplatin için sigmoidal doz cevap eğrisi (değişken eğimli) ve 24, 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri

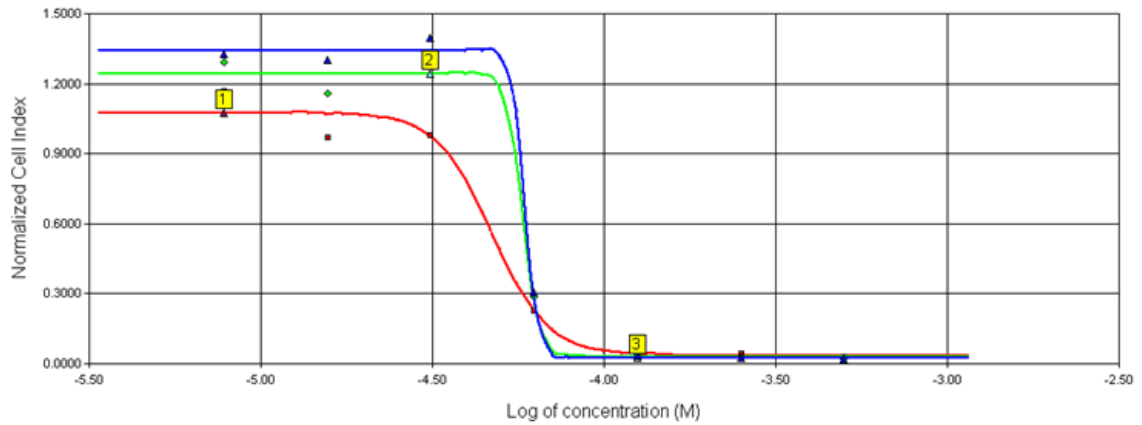
Sisplatin için Sigmoidal Doz Cevap Eğrisi ve IC_{50} Değerleri			
	24 saat	48 saat	72 saat
IC_{50} değerleri	60.98 μM	37.60 μM	25.90 μM
r^2 değerleri	9.7542	9.7718	9.0955

PANC-1 hücreleri üzerine uygulanan Sisplatin ilacının 24 saatteki IC_{50} değeri 60.98 μM , 48. Saatteki IC_{50} değeri 37.60 μM ve 72. Saatteki IC_{50} değeri 25.90 μM olarak saptanmıştır. $IC_{50/2}$ değerleri ise 24, 48 ve 72 saatler için sırasıyla 30.49 μM , 18.8 μM , 12.95 μM olarak belirlenmiştir. Apoptotik etki belirleme çalışmalarında hesaplanan bu değerler kullanılmıştır.

3.2.5. Klomipramin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi



Şekil 3.33. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için yapılan uygulamalarda PANC-1 hücreleri üzerindeki Klomipramin'in normalize edilmiş 72 saatlik görüntüsü



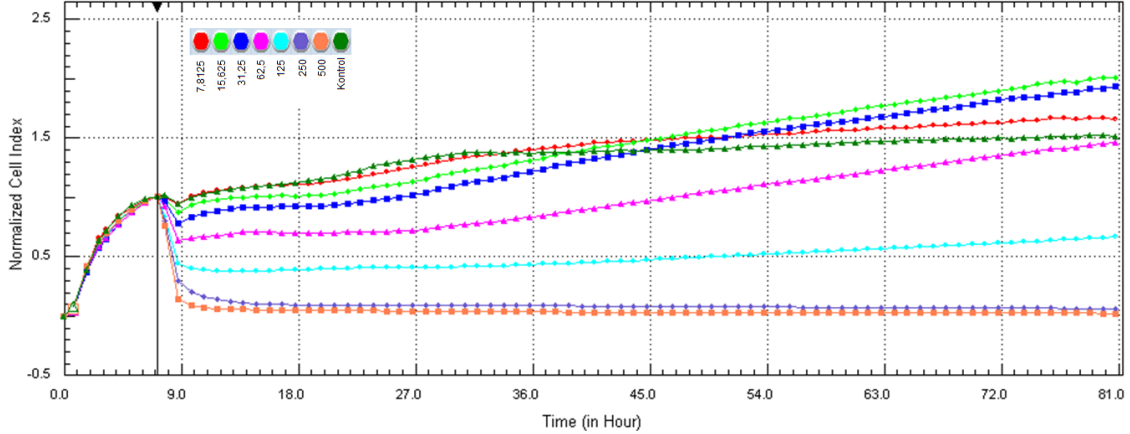
Şekil 3.34. PANC-1 hücreleri üzerinde Klomipramin etken maddesi için 72 saatlik IC_{50} değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72. saati temsil etmektedir.

Çizelge 3.17. PANC-1 hücreleri üzerinde Klomipramin için sigmoidal doz cevap eğrisi (değişken eğimli) ve 24, 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri

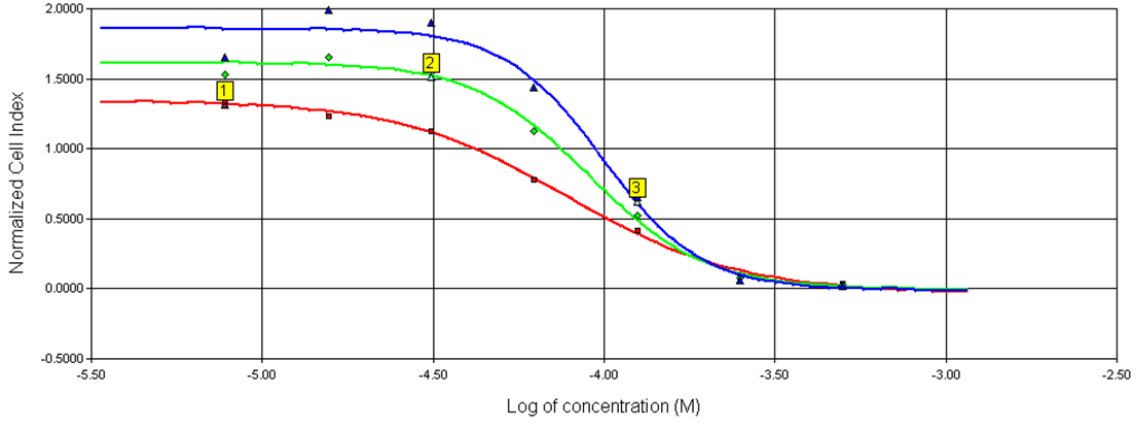
Klomipramin için Sigmoidal Doz Cevap Eğrisi ve IC_{50} Değerleri			
	24 saat	48 saat	72 saat
IC_{50} değerleri	47.46 μ M	58.28 μ M	59.11 μ M
r^2 değerleri	9.8794	9.9559	9.9807

PANC-1 hücreleri üzerine uygulanan Klomipramin ilacının 24 saatteki IC_{50} değeri 47.46 μ M, 48. Saatteki IC_{50} değeri 58.28 μ M ve 72. Saatteki IC_{50} değeri 59.11 μ M olarak saptanmıştır. $IC_{50/2}$ değerleri ise 24, 48 ve 72 saatler için sırasıyla 23.8 μ M, 29.14 μ M, 29.555 μ M olarak belirlenmiştir. Apoptotik etki belirleme çalışmalarında hesaplanan bu değerler kullanılmıştır.

3.2.6. Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki proliferasyona olan etkilerinin xcelligence cihazı ile değerlendirilmesi



Şekil 3.35. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi için yapılan uygulamalarda PANC-1 hücreleri üzerindeki Kloropiramin'in normalize edilmiş 72 saatlik görüntüsü



Şekil 3.36. PANC-1 hücreleri üzerinde Kloropiramin etken maddesi için 72 saatlik IC_{50} değerlerini gösteren sigmoidal doz cevap eğrisi. 1 numara 24. saati, 2 numara 48. saati, 3 numara 72. saati temsil etmektedir.

Çizelge 3.18. PANC-1 hücreleri üzerinde Kloropiramin için sigmoidal doz cevap eğrisi (değişken eğimli) ve 24, 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri

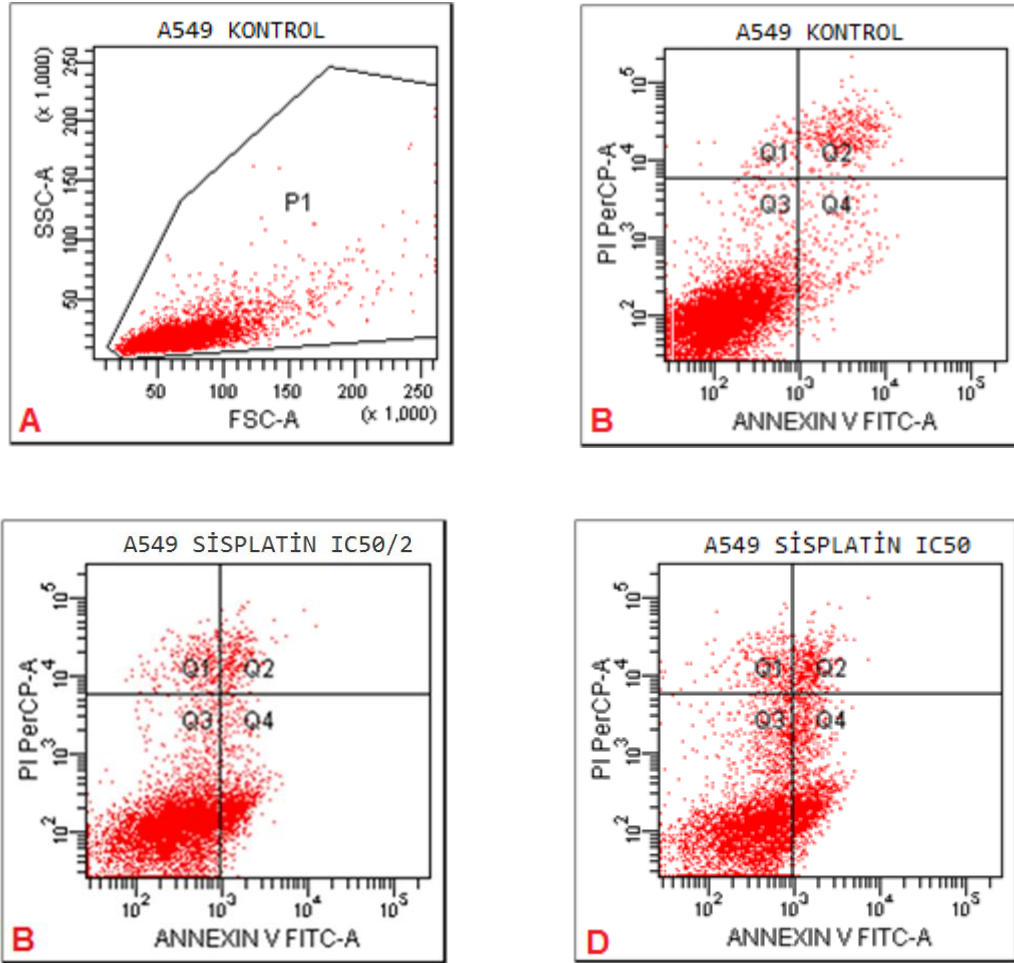
Kloropiramin için Sigmoidal Doz Cevap Eğrisi ve IC_{50} Değerleri			
	24 saat	48 saat	72 saat
IC_{50} değerleri	79.23 μ M	91.27 μ M	100.14 μ M
r^2 değerleri	9.9749	9.9423	9.8193

PANC-1 hücreleri üzerine uygulanan Kloropiramin ilacının 24 saatteki IC_{50} değeri 79.23 μ M, 48. Saatteki IC_{50} değeri 91.27 μ M ve 72. Saatteki IC_{50} değeri 100.14 μ M olarak saptanmıştır. $IC_{50/2}$ değerleri ise 24, 48 ve 72 saatler için sırasıyla 39.615 μ M, 29.14 μ M, 45.635 μ M, 55.7 μ M olarak belirlenmiştir. Apoptotik etki belirleme çalışmalarında hesaplanan bu değerler kullanılmıştır.

3.3. Klomipramin, Kloropiramin ve Sisplatin'in A549 ve PANC-1 Hücrelerinde Apoptotik Etkilerinin Akım Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi

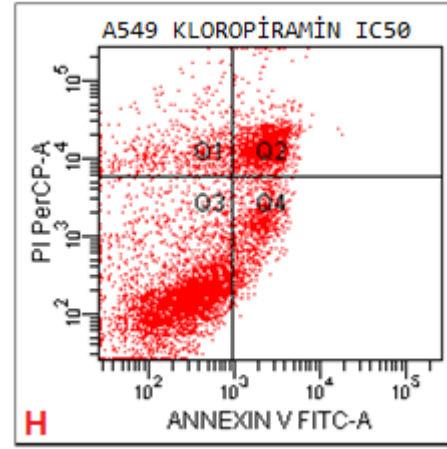
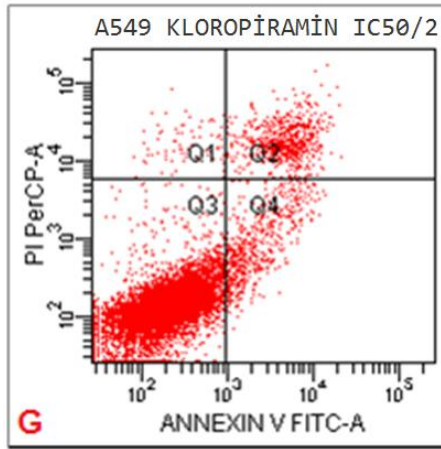
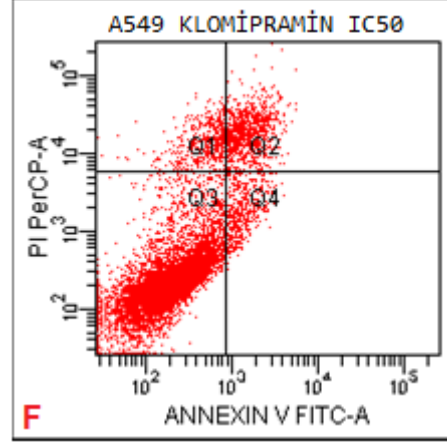
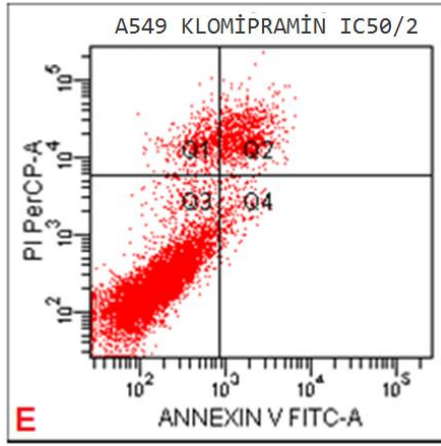
3.3.1. Akım sitometri'de Annexin V FITC-PI yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

3.3.1.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi



Şekil 3.37. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 24. saatteki apoptotik etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀.

(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)



Şekil 3.37. (Devam) *Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 24. saatteki apoptotik etkileri* A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin $IC_{50/2}$ D) Sisplatin IC_{50} E) Klomipramin $IC_{50/2}$ F) Klomipramin IC_{50} G) Kloropiramin $IC_{50/2}$ H) Kloropiramin IC_{50} . (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

Çizelge 3.19. A549 hücrelerinin 24. Saatteki % canlılık değerleri

(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

A549 24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	0.8	4.2	92.4	2.5

Çizelge 3.20. Sisplatin'in A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri

(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

A549 24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Sisplatin IC _{50/2}	3.5	3.5	79.0	14.0
Sisplatin IC ₅₀	4.7	5.9	68.1	21.4

Çizelge 3.21. Klomipramin'in A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri

(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

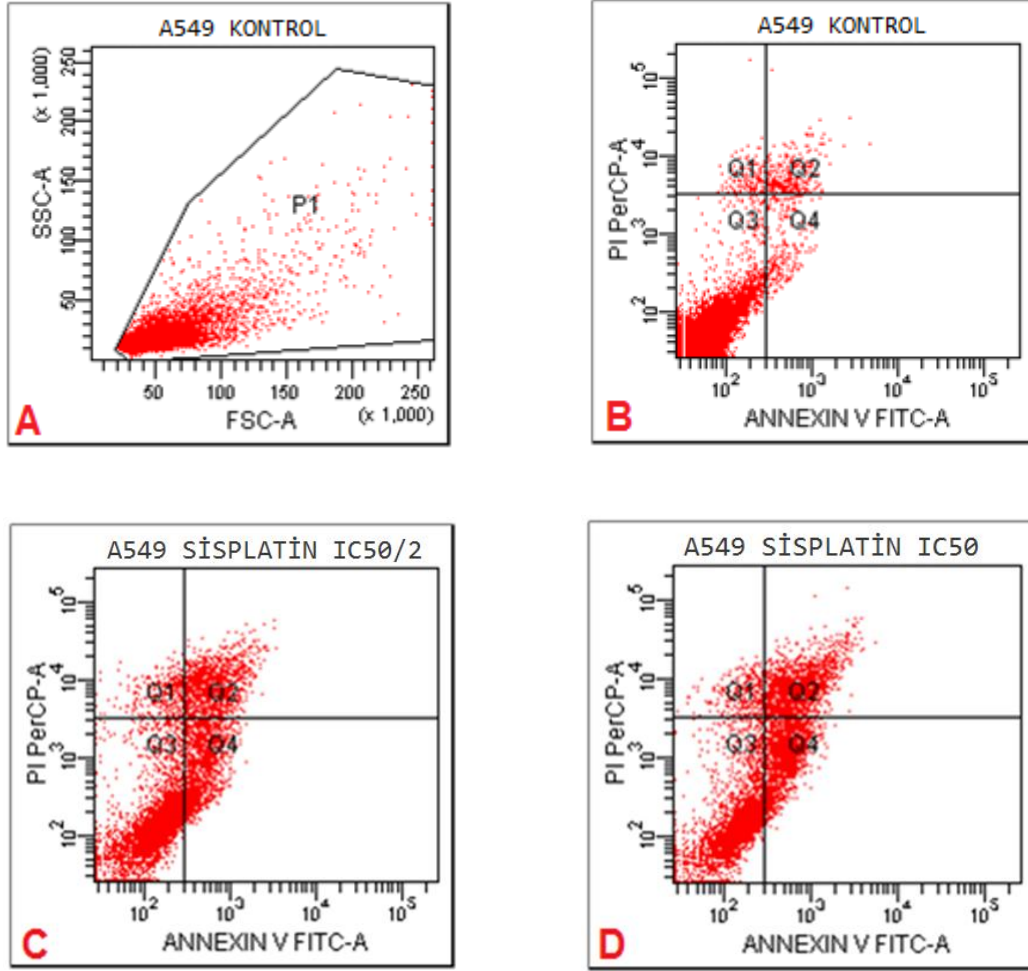
A549 24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Klomipramin IC _{50/2}	5.2	9.0	83.9	1.9
Klomipramin IC ₅₀	6.3	10.3	77.9	5.5

Çizelge 3.22. Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri

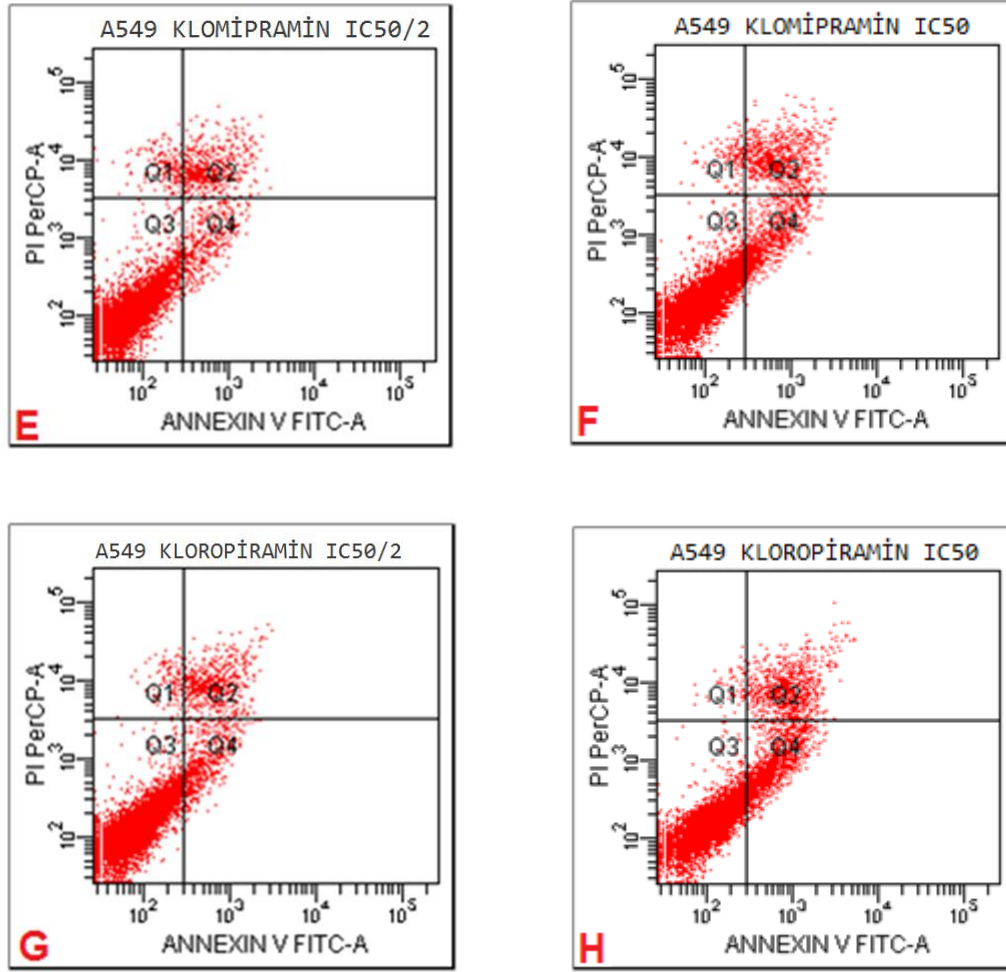
(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

A549 24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kloropiramin IC _{50/2}	0.8	7.8	84.7	6.8
Kloropiramin IC ₅₀	7.9	21.5	58.0	12.6

3.3.1.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi



Şekil 3.38. *Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 48. saatteki apoptotik etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀. (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)*



Şekil 3.38 (Devam) Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 48. saatteki apoptotik etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin $IC_{50/2}$ D) Sisplatin IC_{50} E) Klomipramin $IC_{50/2}$ F) Klomipramin IC_{50} G) Kloropiramin $IC_{50/2}$ H) Kloropiramin IC_{50} .

(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

Çizelge 3.23. A549 hücrelerinin 48. Saatteki % canlılık değerleri

(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

A549 48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	1.6	3.5	92.6	2.3

Çizelge 3.24. *Sisplatin'in A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)*

A549 48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Sisplatin IC _{50/2}	4.8	16.4	59.4	19.4
Sisplatin IC ₅₀	4.6	24.2	45.3	25.9

Çizelge 3.25. *Klomipramin'in A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)*

A549 48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Klomipramin IC _{50/2}	2.4	6.5	86.6	4.4
Klomipramin IC ₅₀	1.6	8.7	80.1	9.6

Çizelge 3.26. *Klomipramin'in A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)*

A549 48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kloropiramin IC _{50/2}	1.5	6.8	84.9	6.8
Kloropiramin IC ₅₀	0.8	9.7	73.9	15.6

Çizelge 3.19, 3. 20, 3.21, 3.22'de belirtilen sonuçlara göre, Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerinde 24. saatteki erken apoptotik etkisi kontrol grubuna göre uygulanan her iki konsantrasyon için de arttığı gözlenmiştir. 24. saatteki kontrol grubu erken apoptoz miktarı %92.4, geç apoptoz miktarı ise %4.2'dir.

Sisplatin'in IC_{50/2} ve IC₅₀ dozlarının 24. saatteki erken apoptoz miktarları sırasıyla; %79.0, 68.1 ve geç apoptoz miktarları sırasıyla; 3.5, 5.9'dur.

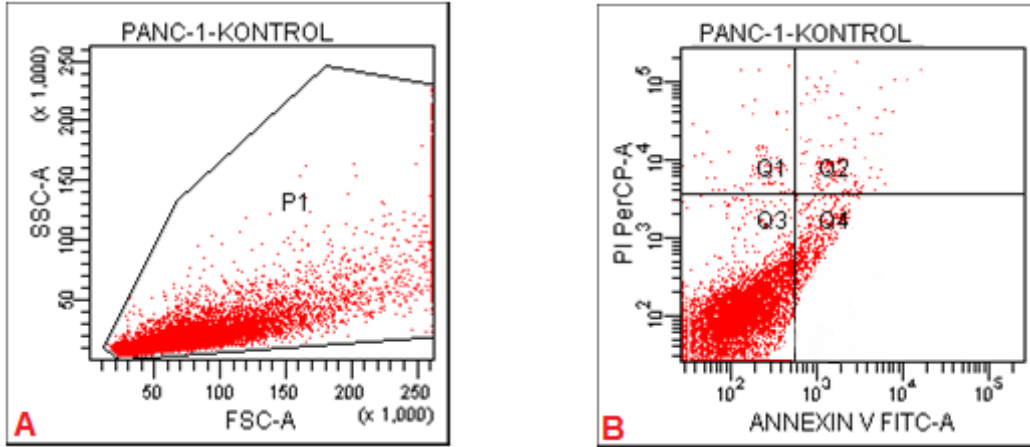
Klomipramin'in IC_{50/2} ve IC₅₀ dozlarının 24. saatteki erken apoptoz miktarları sırasıyla; %83.9, 77.9, geç apoptoz miktarları sırasıyla; 9.0, 10.32'dir.

Kloropiramin'in $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozlarının 24. saatteki erken apoptoz miktarları sırasıyla; %84.7, 58.0, geç apoptoz miktarları sırasıyla; 7.8, 21.5'dir.

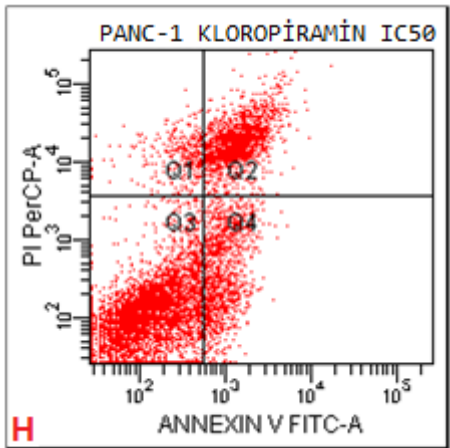
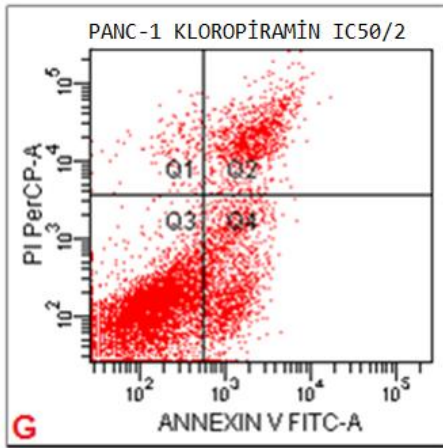
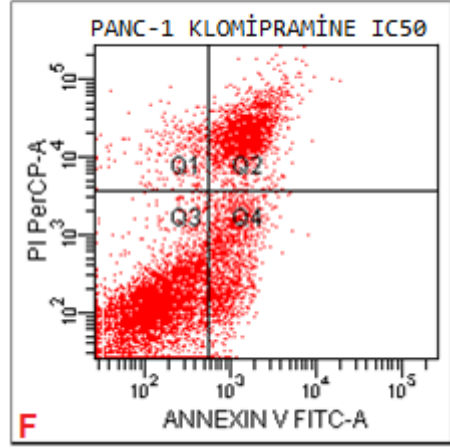
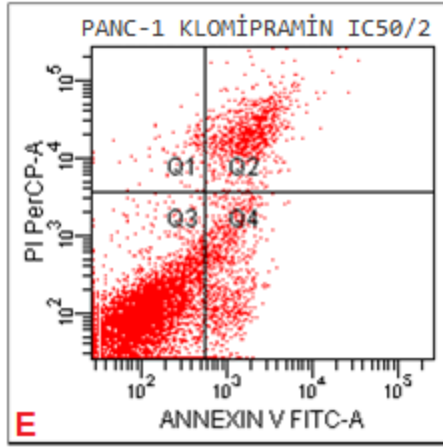
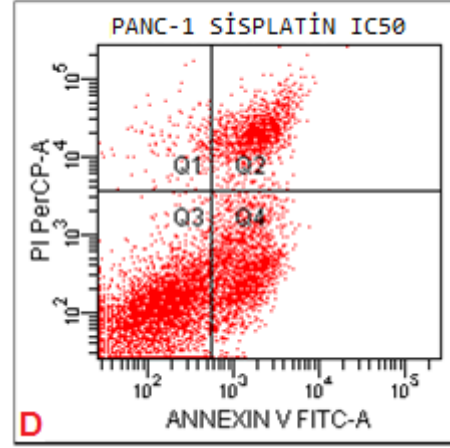
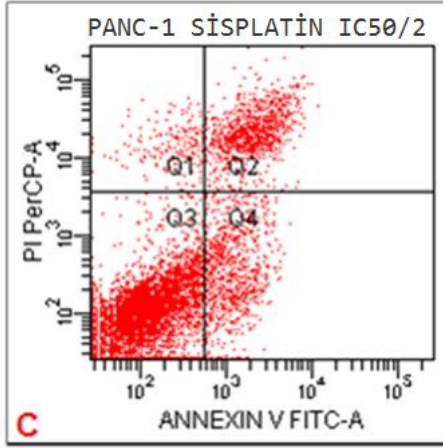
Çizelge 3.23, 3.24, 3.25, 3.26'de belirtilen sonuçlara göre Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerinde 48. saatteki erken apoptotik etkisi kontrol grubuna göre uygulanan her iki konsantrasyon için de arttığı gözlenmiştir. 48. saatteki kontrol grubu erken apoptoz miktarı %92.6, geç apoptoz miktarı ise %3.5'tir.

Sisplatin'in $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozlarının 48. saatteki erken apoptoz miktarları sırasıyla; %59.4, 45.3 ve geç apoptoz miktarları sırasıyla; 16.4, 24.2'dir.

3.3.1.3. PANC-1 hücreleri üzerindeki 24 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi



Şekil 3.39. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 24. saatteki apoptotik etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin $IC_{50/2}$ D) Sisplatin IC_{50} E) Klomipramin $IC_{50/2}$ F) Klomipramin IC_{50} G) Kloropiramin $IC_{50/2}$ H) Kloropiramin IC_{50} . (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)



Şekil 3.39. (Devam) Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 24. saatteki apoptotik etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin $IC_{50/2}$ D) Sisplatin IC_{50} E) Klomipramin $IC_{50/2}$ F) Klomipramin IC_{50} G) Kloropiramin $IC_{50/2}$ H) Kloropiramin IC_{50} . (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

Çizelge 3.27. PANC-1 hücrelerinin 24. Saatteki % canlılık değerleri
(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

PANC-1 24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	2,65	3.0	85,9	5.8

Çizelge 3.28. Sisplatin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri
(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

PANC-1 24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Sisplatin IC _{50/2}	2.3	22.6	75.7	10.4
Sisplatin IC ₅₀	2.0	15.0	57.6	25.5

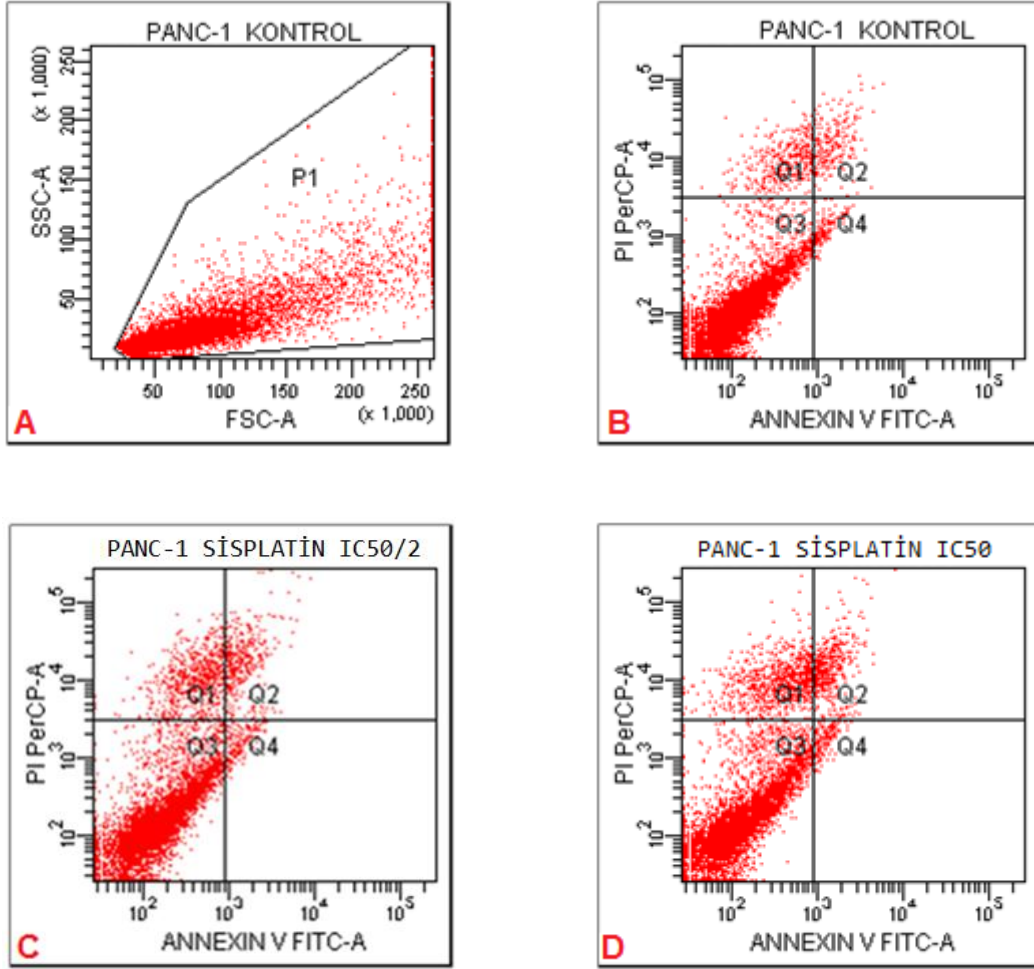
Çizelge 3.29. Klomipramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri
(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

PANC-1 24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Klomipramin IC _{50/2}	5.2	9.0	83.9	1.9
Klomipramin IC ₅₀	3.0	21.8	59.1	16.0

Çizelge 3.30. Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

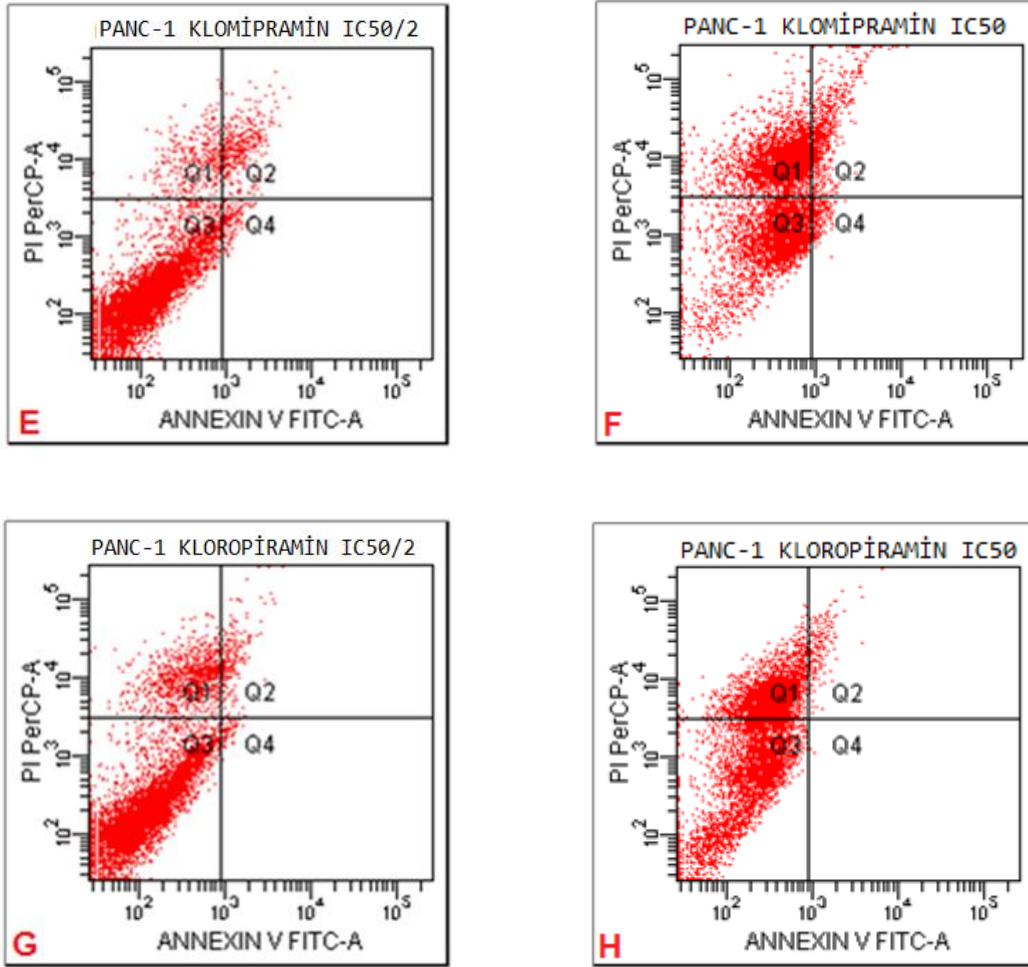
PANC-1 24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kloropiramin IC _{50/2}	1.7	12.9	68.6	16.8
Kloropiramin IC ₅₀	4.2	20.2	61.7	13.9

3.3.1.4. PANC-1 hücreleri üzerindeki 48 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi



Şekil 3.40. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 48. saatteki apoptotik etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀.

(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)



Şekil 3.40. (Devam) Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 48. saatteki apoptotik etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin $IC_{50/2}$ D) Sisplatin IC_{50} E) Klomipramin $IC_{50/2}$ F) Klomipramin IC_{50} G) Kloropiramin $IC_{50/2}$ H) Kloropiramin IC_{50} . (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

Çizelge 3.31. PANC-1 hücrelerinin 48. Saatteki % canlılık değerleri (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

PANC-1 48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	4.7	2.5	91.3	1.5

Çizelge 3.32. *Sisplatin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)*

PANC-1 48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Sisplatin IC _{50/2}	8.7	4.3	84.7	2.2
Sisplatin IC ₅₀	11.4	5.6	80.9	2.2

Çizelge 3.33. *Klomipramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri*

(Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

PANC-1 48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Klomipramin IC _{50/2}	4.2	4.2	90.1	1.5
Klomipramin IC ₅₀	46.2	8.3	43.1	2.4

Çizelge 3.34. *Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)*

PANC-1 48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kloropiramin IC _{50/2}	11.5	2.4	85.5	0.7
Kloropiramin IC ₅₀	49.1	1.8	49.1	0.0

Çizelge 3.27, 3. 28, 3.29, 3.30'de belirtilen sonuçlara göre, Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 24. saatteki erken apoptotik etkisi kontrol grubuna göre uygulanan her iki konsantrasyon için de arttığı gözlenmiştir. 24. saatteki kontrol grubu erken apoptoz miktarı %85.9, geç apoptoz miktarı ise %3.0'dır.

Sisplatin'in $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozlarının 24. saatteki erken apoptoz miktarları sırasıyla; %75.7, 57.6 ve geç apoptoz miktarları sırasıyla; 22.6, 15.0'dır.

Klomipramin'in $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozlarının 24. saatteki erken apoptoz miktarları sırasıyla; %83.9, 59.1 ve geç apoptoz miktarları sırasıyla; 9.0, 21.8'dir.

Kloropiramin'in $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozlarının 24. saatteki erken apoptoz miktarları sırasıyla; %68.6, 61.7 ve geç apoptoz miktarları sırasıyla; 12.9, 20.2'dir.

Çizelge 3.31, 3.32 3.33, 3.34 'de belirtilen sonuçlara göre, Sisplatin'in uygulanan her iki dozunun da PANC-1 hücreleri üzerinde kontrol grubuna göre 48. saatteki erken apoptoz miktarını arttırdığı gözlenmiştir. Klomipramin'in kontrol grubuna göre $IC_{50/2}$ dozunun erken apoptoz miktarında herhangi bir etkisi olmadığı ancak IC_{50} dozunun erken apoptoz miktarını arttırdığı görülmüştür. Kloropiramin'in ise her iki doz için de kontrol grubuna kıyasla erken apoptoz miktarını arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. 48. saatteki kontrol grubu erken apoptoz miktarı %91.3, geç apoptoz miktarı ise %2.5'tir.

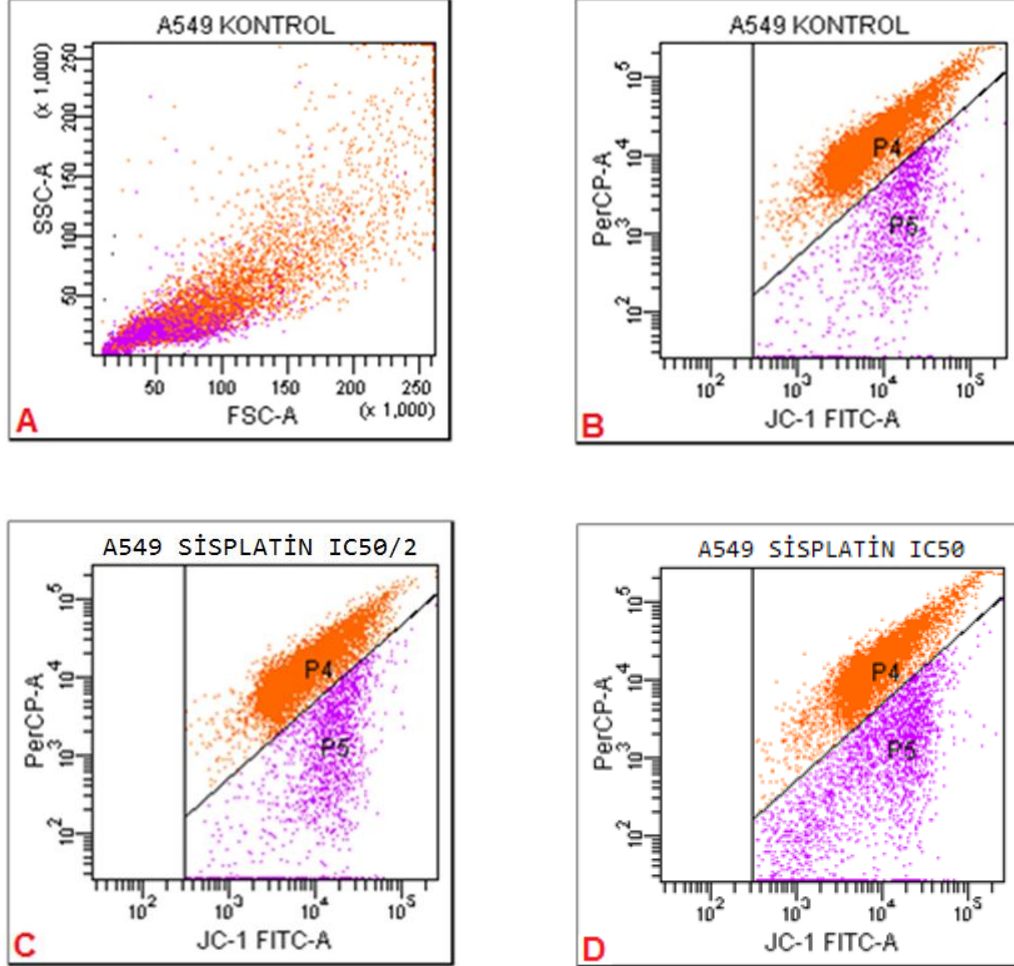
Sisplatin'in $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozlarının 48. saatteki erken apoptoz miktarları sırasıyla; %84.7, 80.9 ve geç apoptoz miktarları sırasıyla; 4.3, 5.6'dır.

Klomipramin'in $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozlarının 48. saatteki erken apoptoz miktarları sırasıyla; %90.1, 43.1 ve geç apoptoz miktarları sırasıyla; 4.2, 8.3'tür.

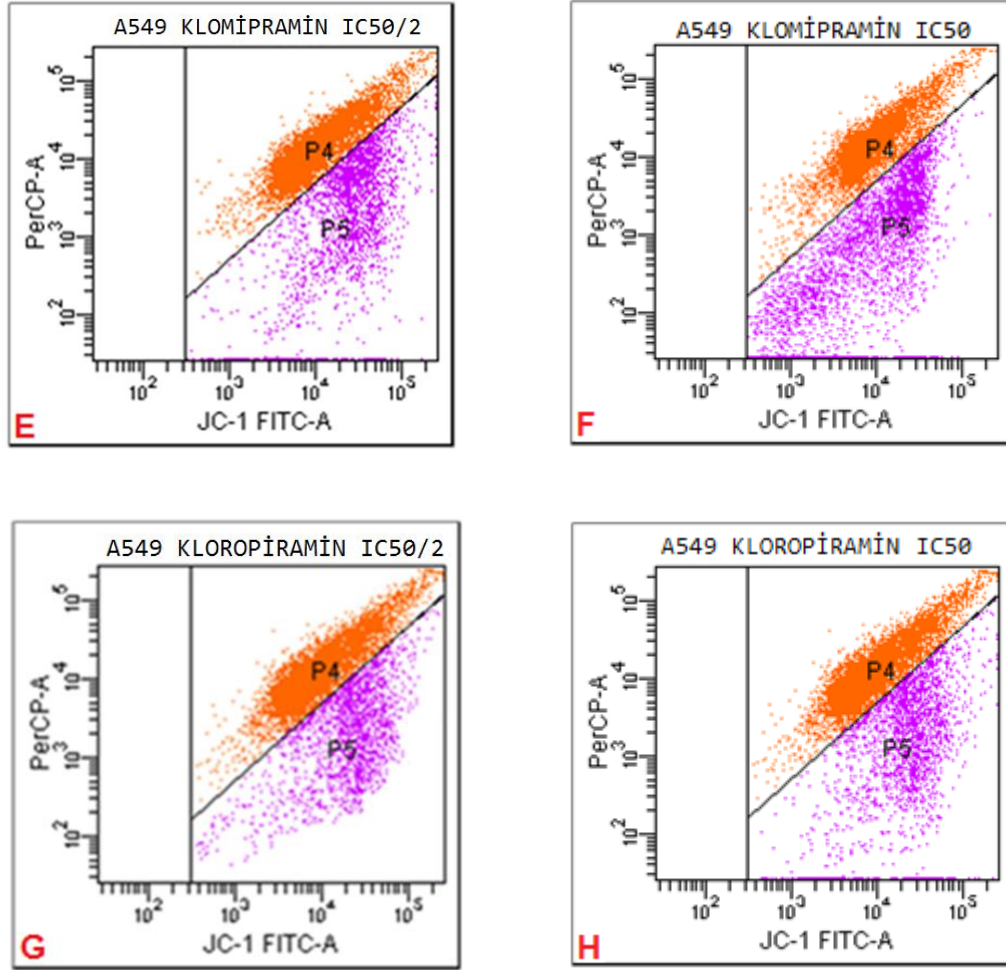
Kloropiramin'in $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozlarının 48. saatteki erken apoptoz miktarları sırasıyla; %85.5, 49.1 ve geç apoptoz miktarları sırasıyla; 2.4, 1.8'dir.

3.3.2. Flow sitometri’de JC-1 yöntemi ile mitokondriyal membran aktivitesinin değerlendirilmesi

3.3.2.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerin değerlendirilmesi



Şekil 3.41. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀. (P4=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P5=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



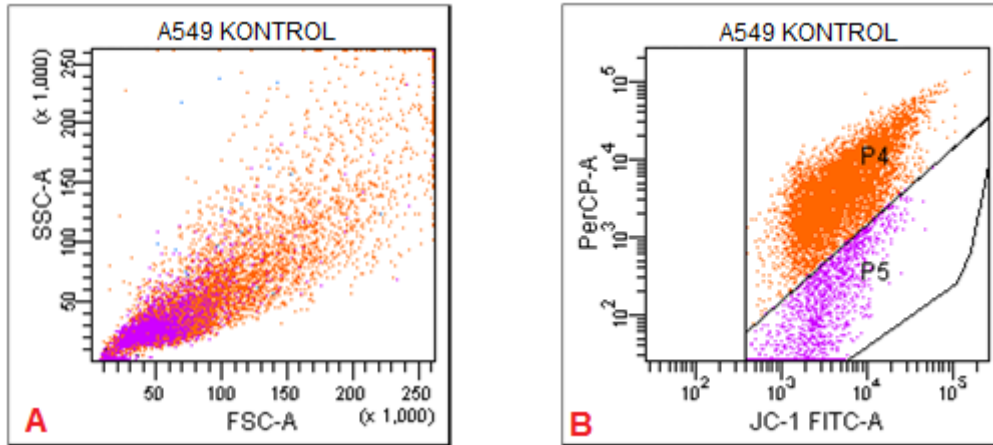
Şekil 3.41. (Devam) *Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀. (P4=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P5=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)*

Çizelge 3.35. *Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerinde 24 Saatteki % canlılık değerleri*

(**P4**=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, **P5**=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

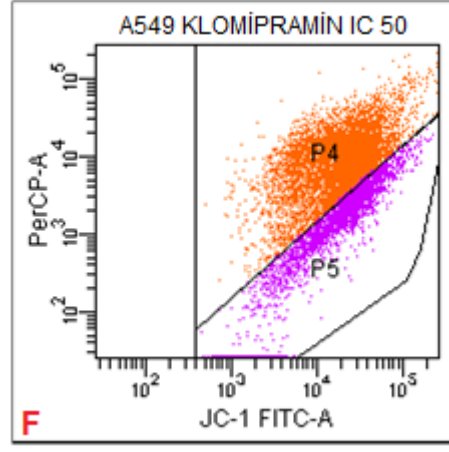
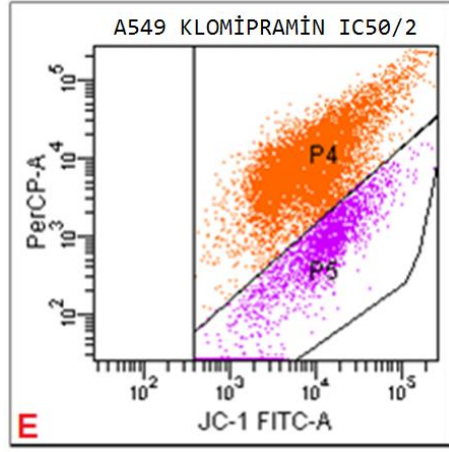
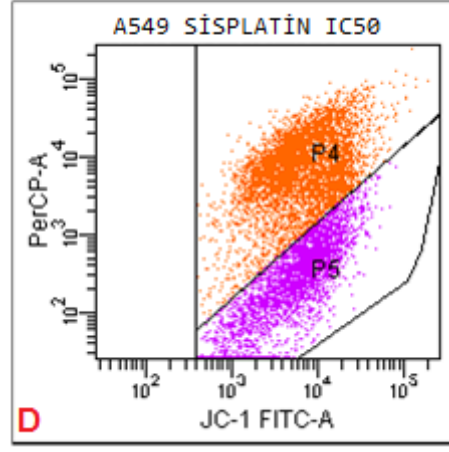
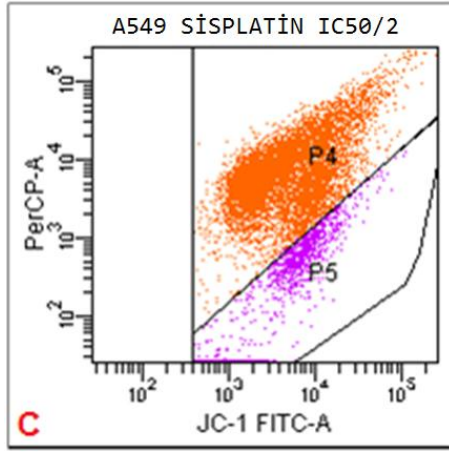
A549 24. Saat	P4 (%)	P5 (%)
Kontrol	86.4	13.5
Sisplatin IC _{50/2}	83.1	16.9
Sisplatin IC ₅₀	70.6	28.6
Klomipramin IC _{50/2}	73.3	26.9
Klomipramin IC ₅₀	58.8	40.4
Kloropiramin IC _{50/2}	78.5	21.3
Kloropiramin IC ₅₀	76.1	23.8

3.3.2.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerin değerlendirilmesi

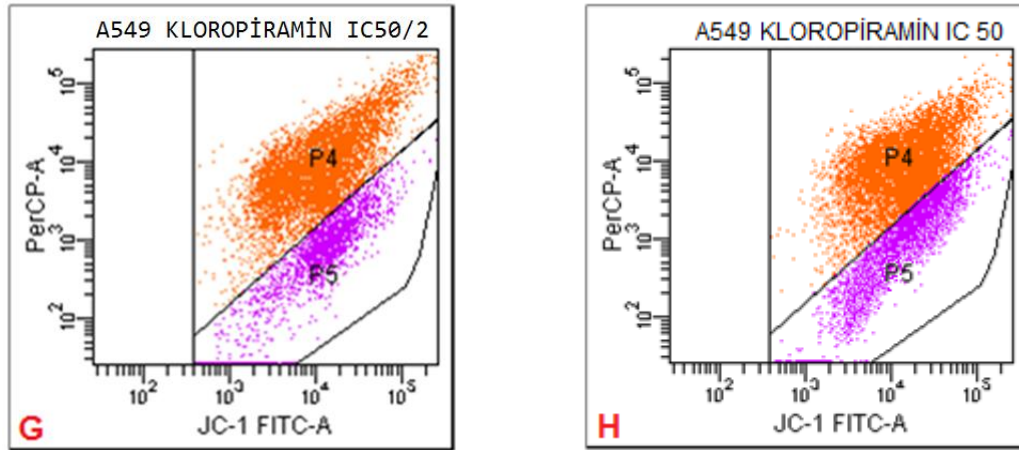


Şekil 3.42. *Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀.*

(**P4**=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, **P5**=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



Şekil 3.42. (Devam) Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin $IC_{50/2}$ D) Sisplatin IC_{50} E) Klomipramin $IC_{50/2}$ F) Klomipramin IC_{50} G) Kloropiramin $IC_{50/2}$ H) Kloropiramin IC_{50} . (P4=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P5=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

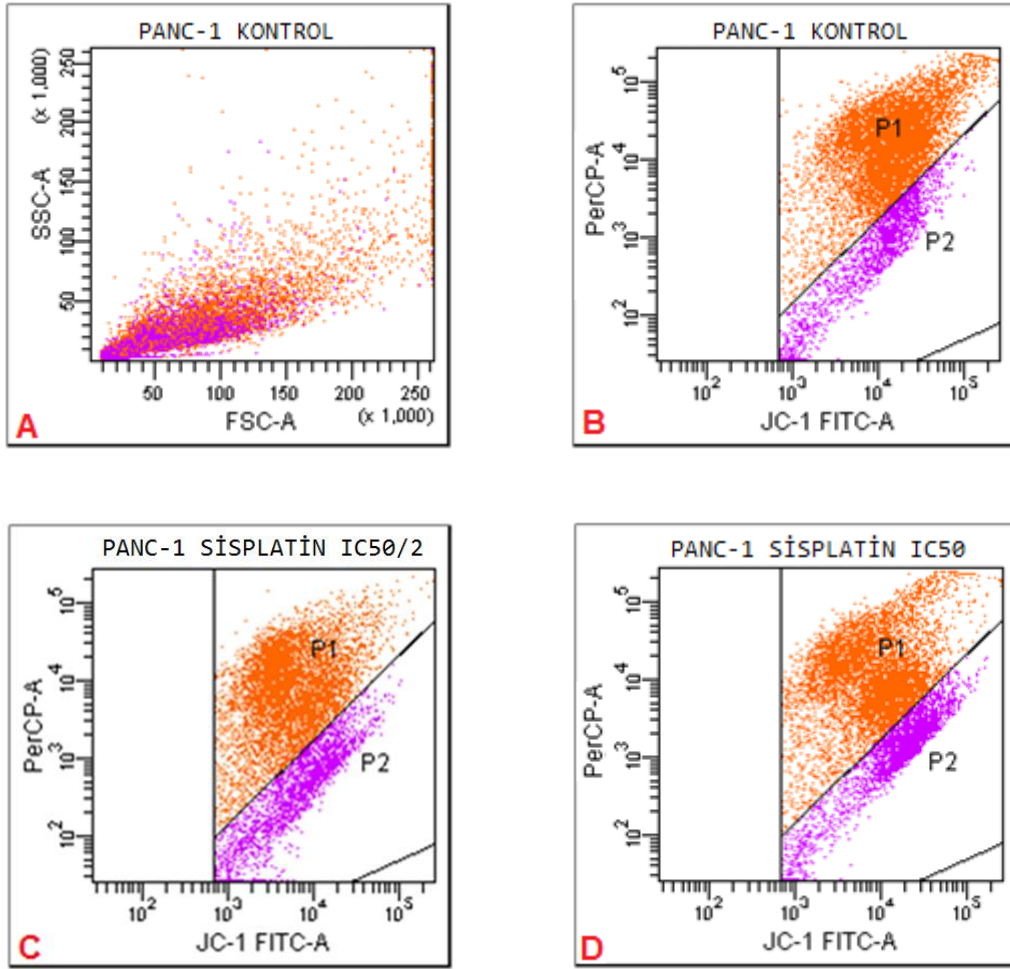


Şekil 3.42. (Devam) *Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀. (P4=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P5=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)*

Çizelge 3.36. *Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri (P4=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P5=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)*

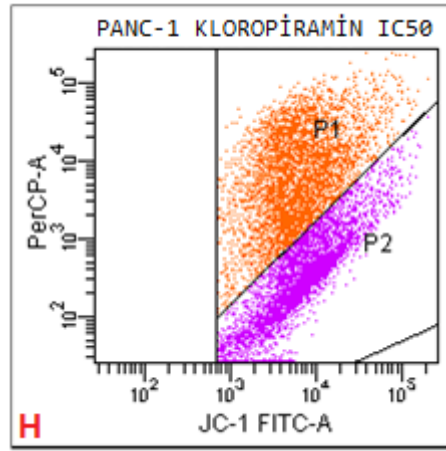
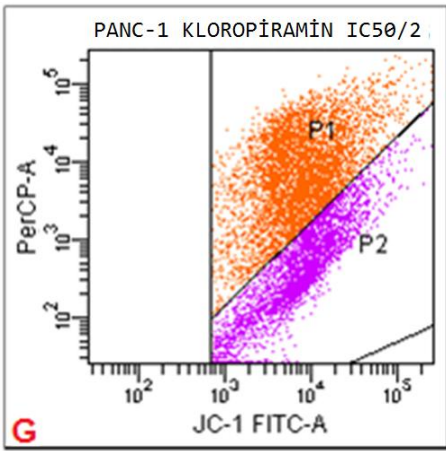
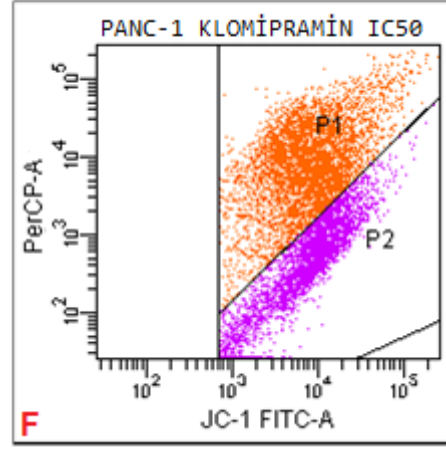
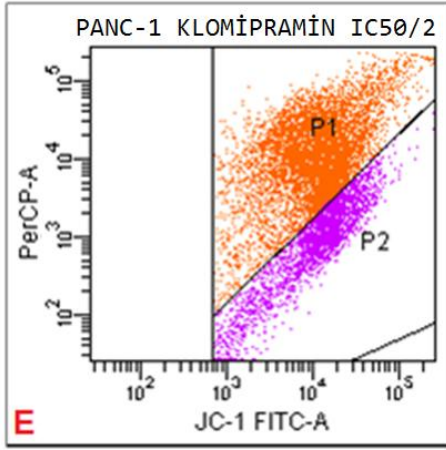
A549 48. Saat	P4 (%)	P5 (%)
Kontrol	87.0	12.6
Sisplatin IC _{50/2}	86.4	13.2
Sisplatin IC ₅₀	58.2	40.2
Klomipramin IC _{50/2}	75.6	24.2
Klomipramin IC ₅₀	69.4	31.2
Kloropiramin IC _{50/2}	74.8	24.9
Kloropiramin IC ₅₀	63.2	36.4

3.3.2.3. PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerin değerlendirilmesi



Şekil 3.43. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀.

(P1=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P2=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



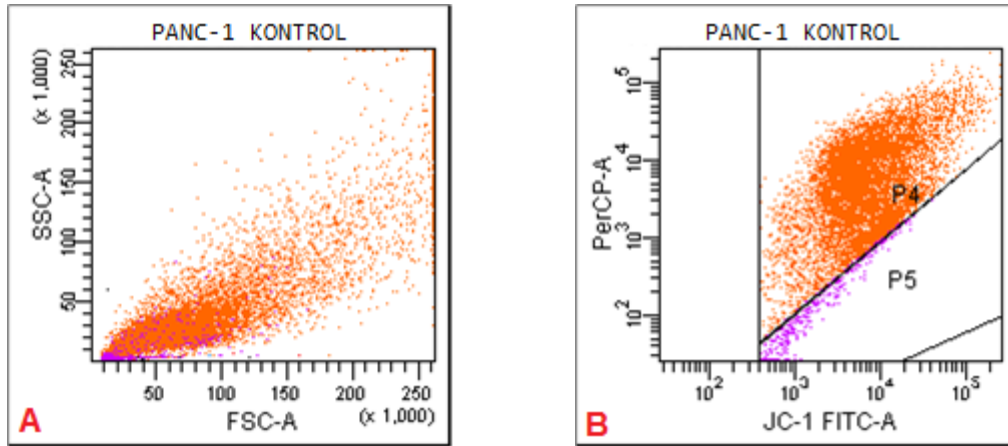
Şekil 3.43. (Devam) *Sisplatin, Kломipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Kломipramin IC_{50/2} F) Kломipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀. (P1=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P2=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)*

Çizelge 3.37. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki % canlılık değerleri

(**P1**=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, **P2**=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

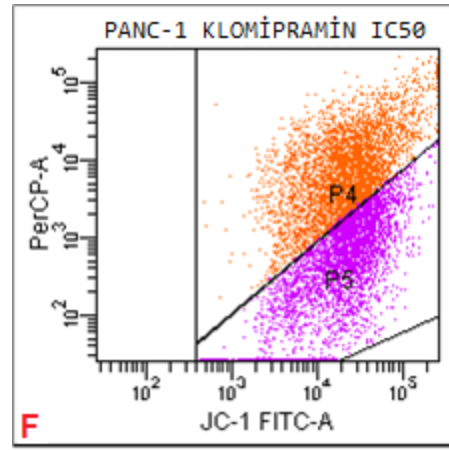
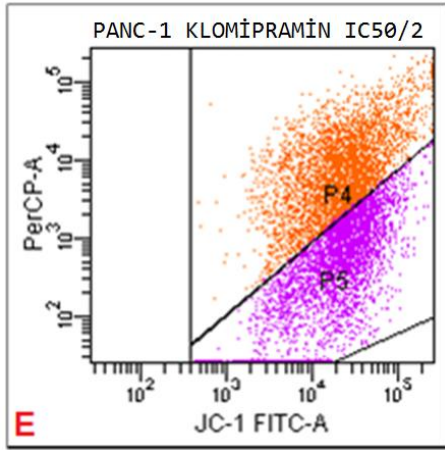
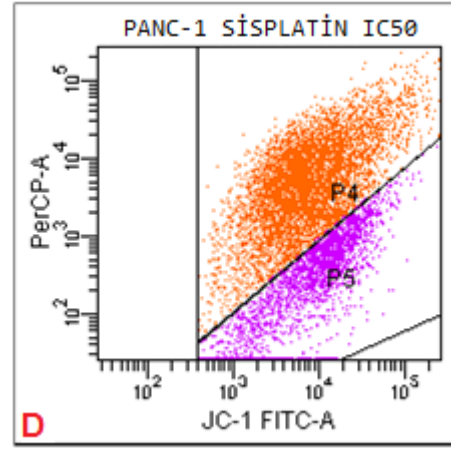
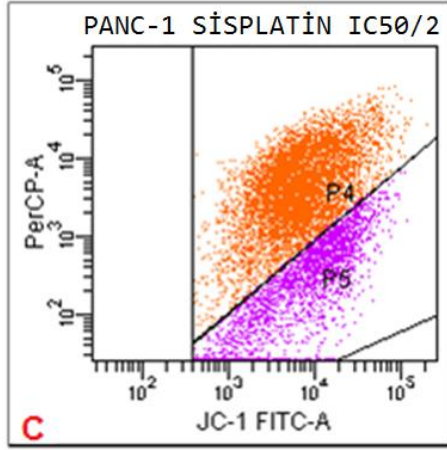
PANC-1 24. Saat	P1 (%)	P2 (%)
Kontrol	76.6	18.8
Sisplatin IC _{50/2}	64.4	24.7
Sisplatin IC ₅₀	65.1	27.6
Klomipramin IC _{50/2}	67.3	26.7
Klomipramin IC ₅₀	53.0	38.5
Kloropiramin IC _{50/2}	55.9	37.2
Kloropiramin IC ₅₀	45.2	46.2

3.3.2.4. PANC-1 hücrelerindeki 48 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerin değerlendirilmesi

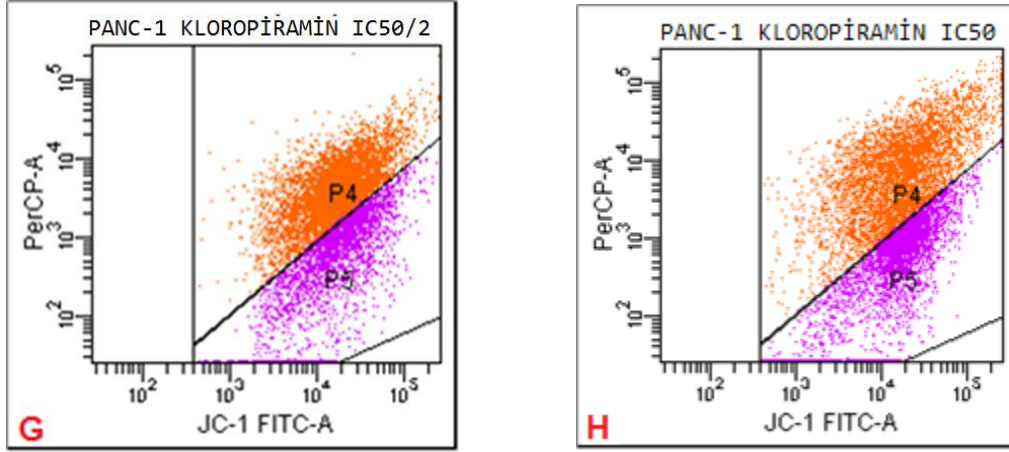


Şekil 3.44. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀.

(**P4**=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, **P5**=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



Şekil 3.44. (Devam) Sisplatin, Klorpiramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀/2 D) Sisplatin IC₅₀ E) Klorpiramin IC₅₀/2 F) Klorpiramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC₅₀/2 H) Kloropiramin IC₅₀. (P4=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P5=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



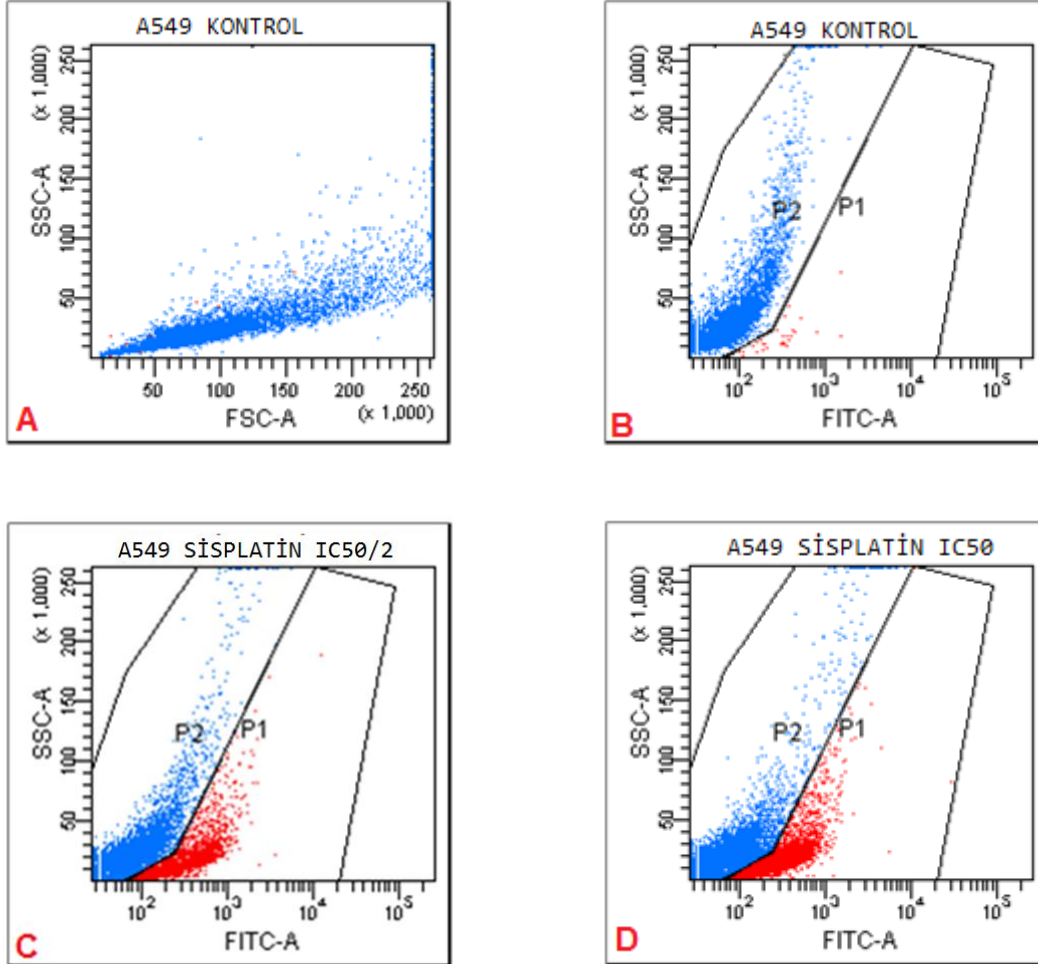
Şekil 3.44. (Devam) Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin $IC_{50/2}$ D) Sisplatin IC_{50} E) Klomipramin $IC_{50/2}$ F) Klomipramin IC_{50} G) Kloropiramin $IC_{50/2}$ H) Kloropiramin IC_{50} . (P4=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P5=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

Çizelge 3.38. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki % canlılık değerleri (P4=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P5=Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

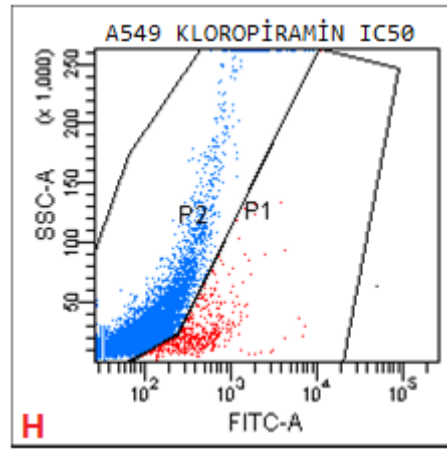
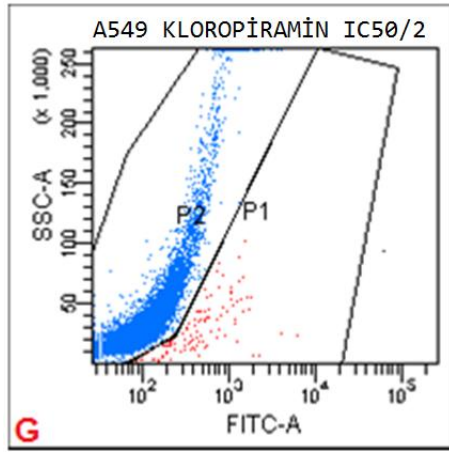
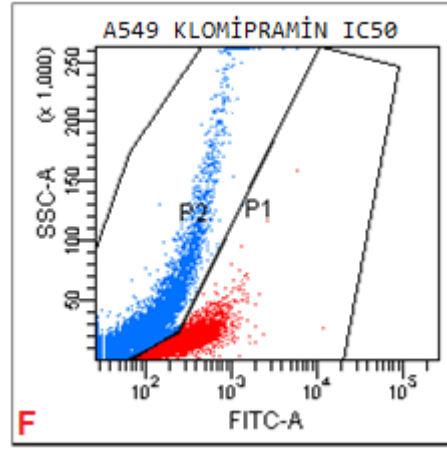
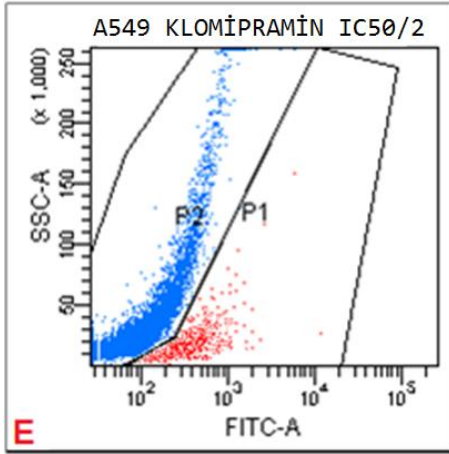
PANC-1 48. Saat	P4 (%)	P5 (%)
Kontrol	95.2	4.3
Sisplatin $IC_{50/2}$	68.0	30.8
Sisplatin IC_{50}	69.0	29.7
Klomipramin $IC_{50/2}$	62.1	37.3
Klomipramin IC_{50}	42.0	46.4
Kloropiramin $IC_{50/2}$	64.1	34.3
Kloropiramin IC_{50}	54.4	44.4

3.3.3. Flow sitometri’de kaspaz 3 yöntemi ile mitokondriyal membran aktivitesinin değerlendirilmesi

3.3.3.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik kaspaz 3 aktivitesinin değerlendirilmesi



Şekil 3.45. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀. (P1= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, P2= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)

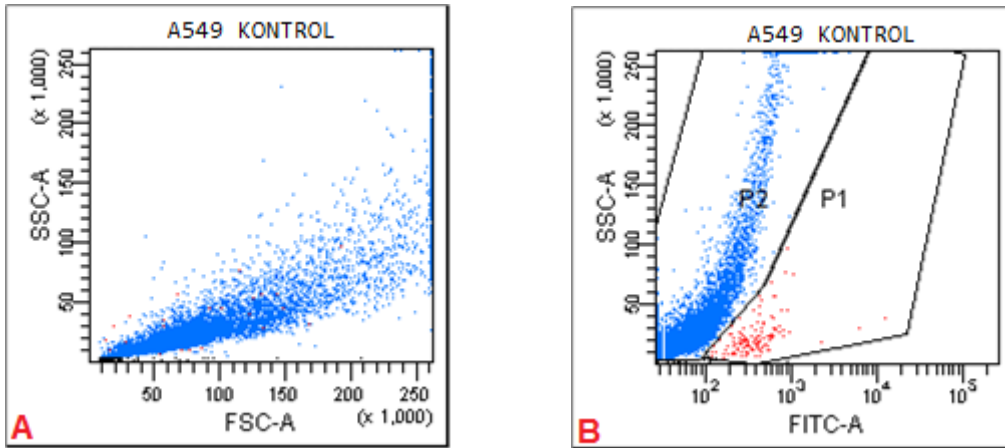


Şekil 3.45. (Devam) Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin $IC_{50/2}$ D) Sisplatin IC_{50} E) Klomipramin $IC_{50/2}$ F) Klomipramin IC_{50} G) Kloropiramin $IC_{50/2}$ H) Kloropiramin IC_{50} . (P1= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, P2= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)

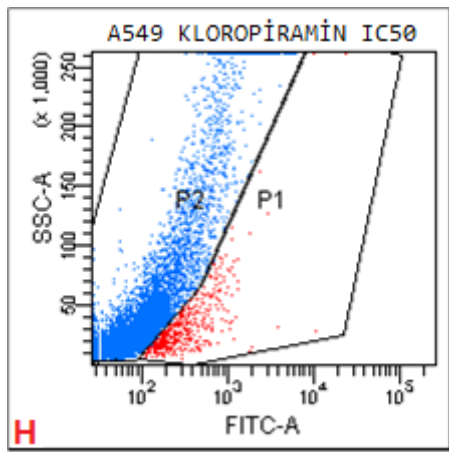
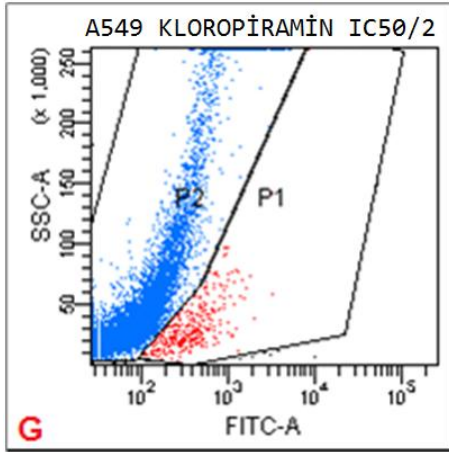
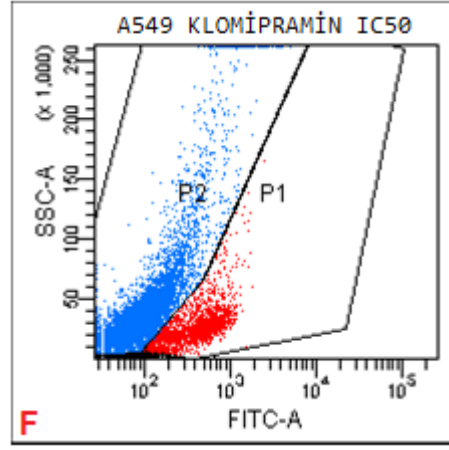
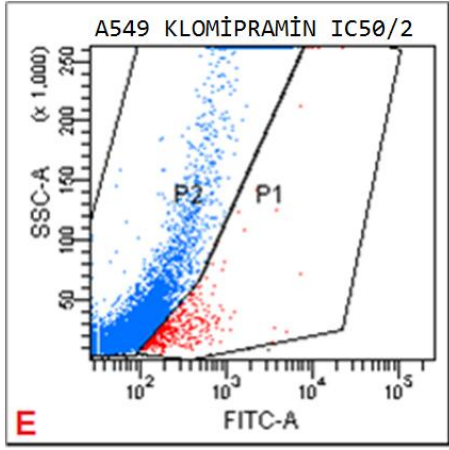
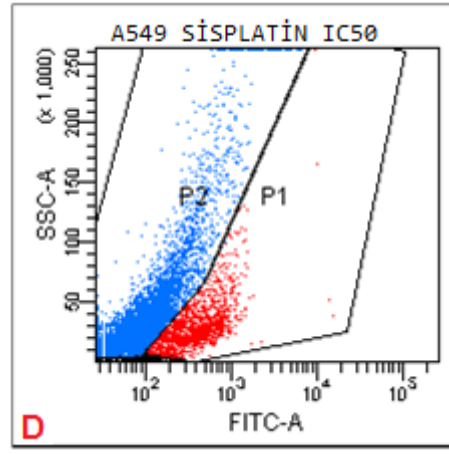
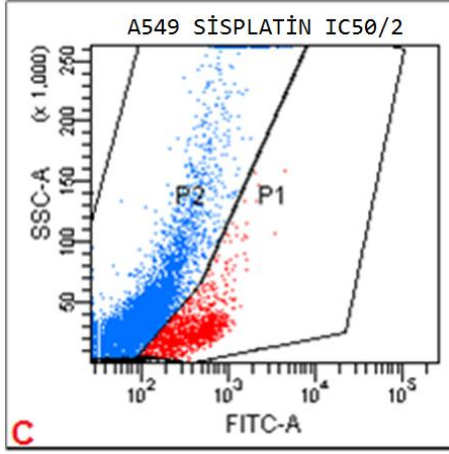
Çizelge 3.39. *Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun % canlılık değerleri*
(**P1**= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, **P2**= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)

A549 24. Saat	P2 (%)	P1(%)
Kontrol	99.6	0.3
Sisplatin IC _{50/2}	73.7	27.6
Sisplatin IC ₅₀	66.9	35.2
Klomipramin IC _{50/2}	81.4	18.6
Klomipramin IC ₅₀	63.3	36.7
Kloropiramin IC _{50/2}	98.8	1.2
Kloropiramin IC ₅₀	94.9	5.4

3.3.3.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik kaspaz 3 aktivitesinin değerlendirilmesi



Şekil 3.46. *Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀*
(**P2**= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, **P1**= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)



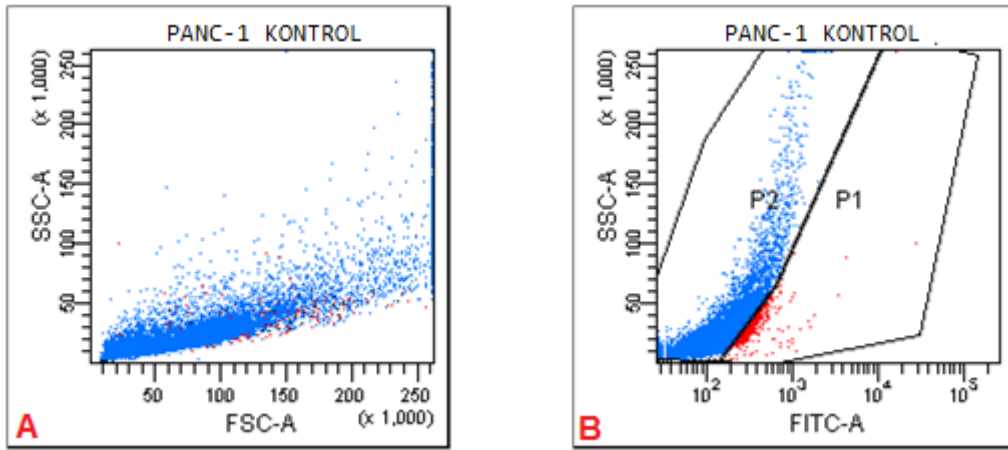
Şekil 3.46. (Devam) Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin $IC_{50/2}$ D) Sisplatin IC_{50} E) Klomipramin $IC_{50/2}$ F) Klomipramin IC_{50} G) Kloropiramin $IC_{50/2}$ H) Kloropiramin IC_{50} (P2= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, P1= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)

Çizelge 3.40. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun % canlılık değerleri

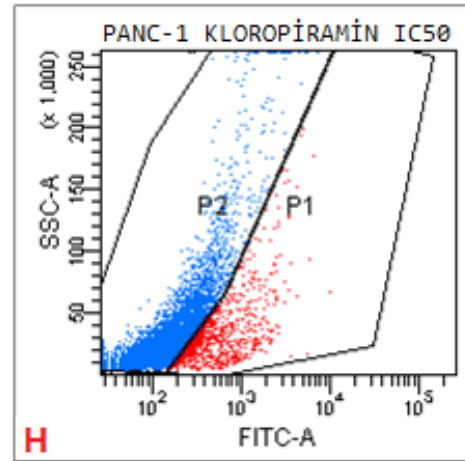
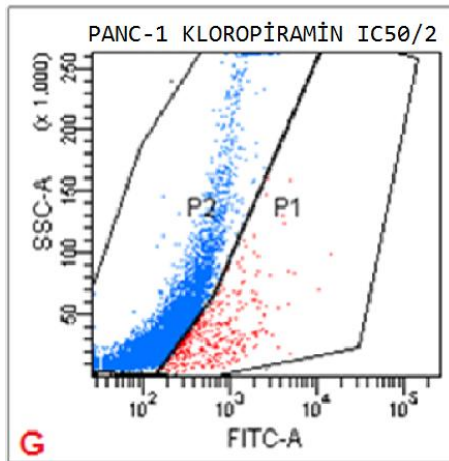
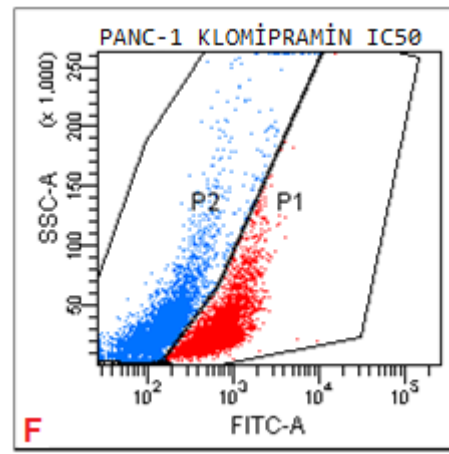
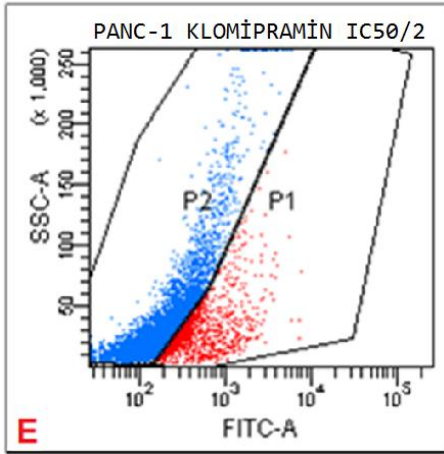
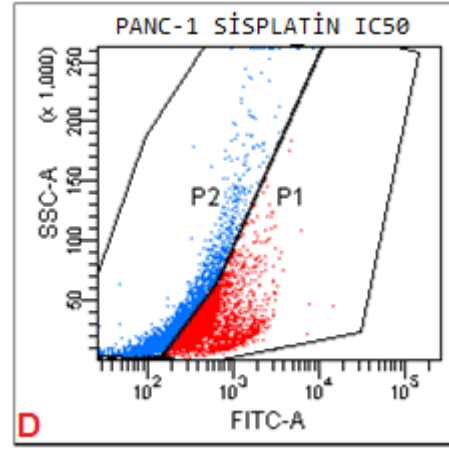
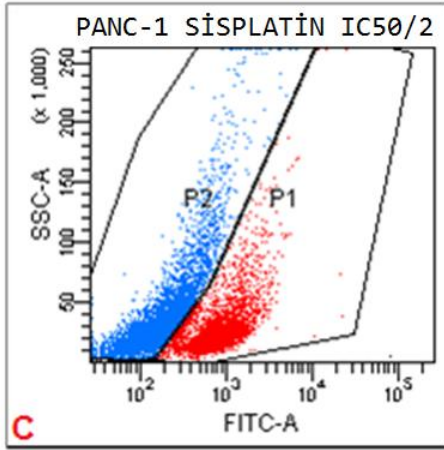
(**P2**= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, **P1**= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)

A549 48. Saat	P2 (%)	P1(%)
Kontrol	96.0	1.4
Sisplatin IC _{50/2}	78.4	13.7
Sisplatin IC ₅₀	76.9	16.5
Klomipramin IC _{50/2}	93.1	4.8
Klomipramin IC ₅₀	73.3	17.7
Kloropiramin IC _{50/2}	94.7	3.7
Kloropiramin IC ₅₀	92.7	5.8

3.3.3.3. PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik kaspaz 3 aktivitesinin değerlendirilmesi



Şekil 3.47. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀. (**P1**= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, **P2**= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)



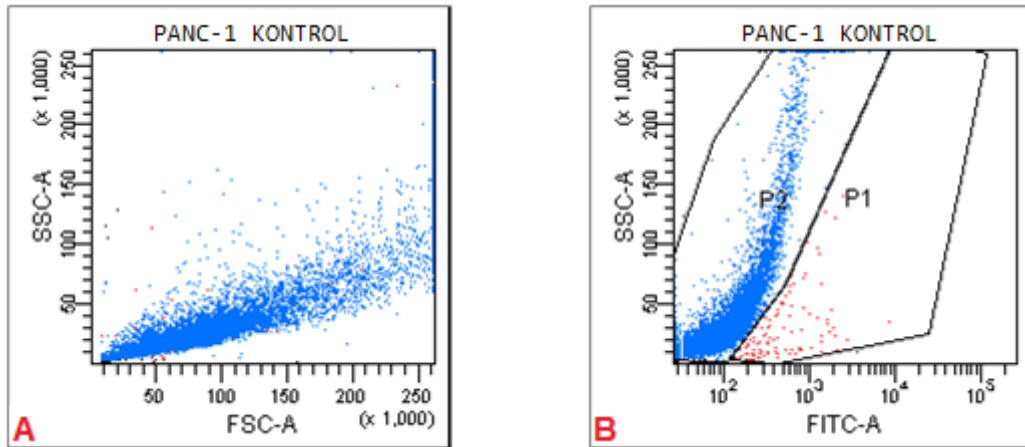
Şekil 3.47. (Devam) Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin $IC_{50/2}$ D) Sisplatin IC_{50} E) Klomipramin $IC_{50/2}$ F) Klomipramin IC_{50} G) Kloropiramin $IC_{50/2}$ H) Kloropiramin IC_{50} . (P1= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, P2= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)

Çizelge 3.41. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun % canlılık değerleri

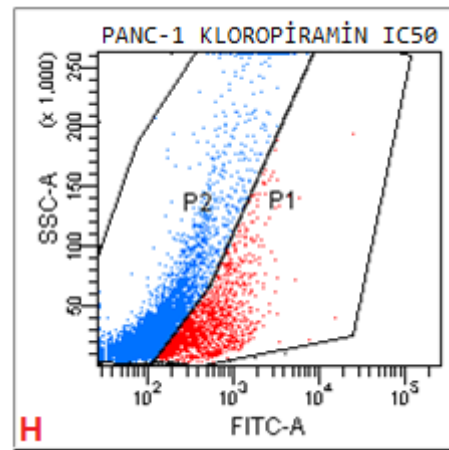
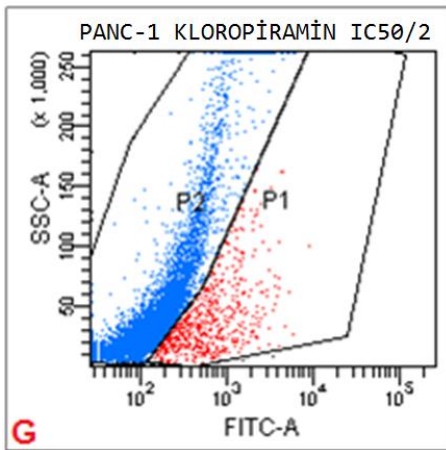
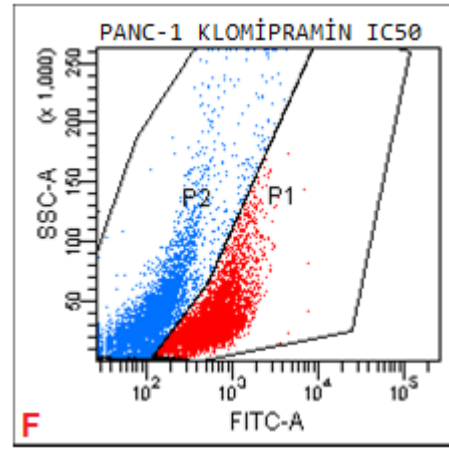
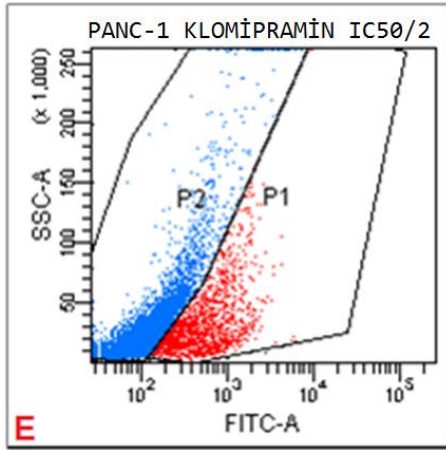
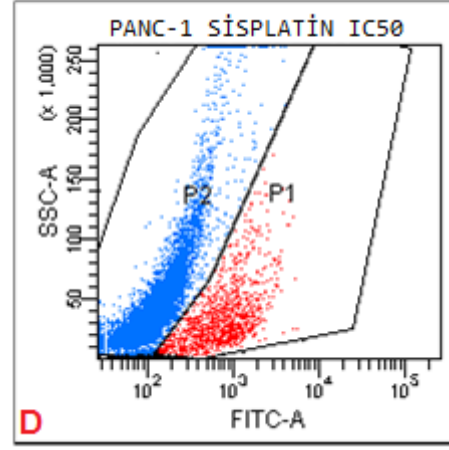
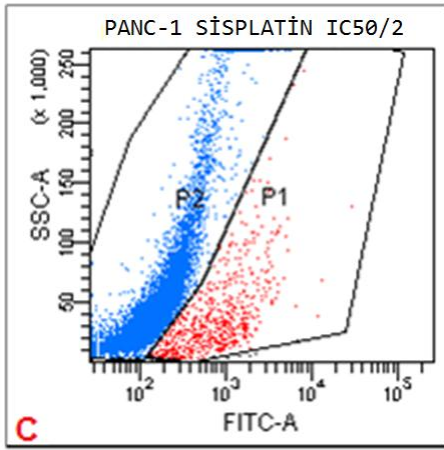
(**P1**= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, **P2**= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)

PANC-1 24. Saat	P2 (%)	P1%
Kontrol	94.7	5.3
Sisplatin IC _{50/2}	64.1	32.4
Sisplatin IC ₅₀	41.6	52.6
Klomipramin IC _{50/2}	80.4	15.9
Klomipramin IC ₅₀	49.5	48.0
Kloropiramin IC _{50/2}	93.3	4.5
Kloropiramin IC ₅₀	84.6	12.5

3.3.3.4. PANC-1 hücrelerindeki 48 saatlik kaspaz 3 aktivitesinin değerlendirilmesi



Şekil 3.48. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50/2} D) Sisplatin IC₅₀ E) Klomipramin IC_{50/2} F) Klomipramin IC₅₀ G) Kloropiramin IC_{50/2} H) Kloropiramin IC₅₀. (**P1**= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, **P2**= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)



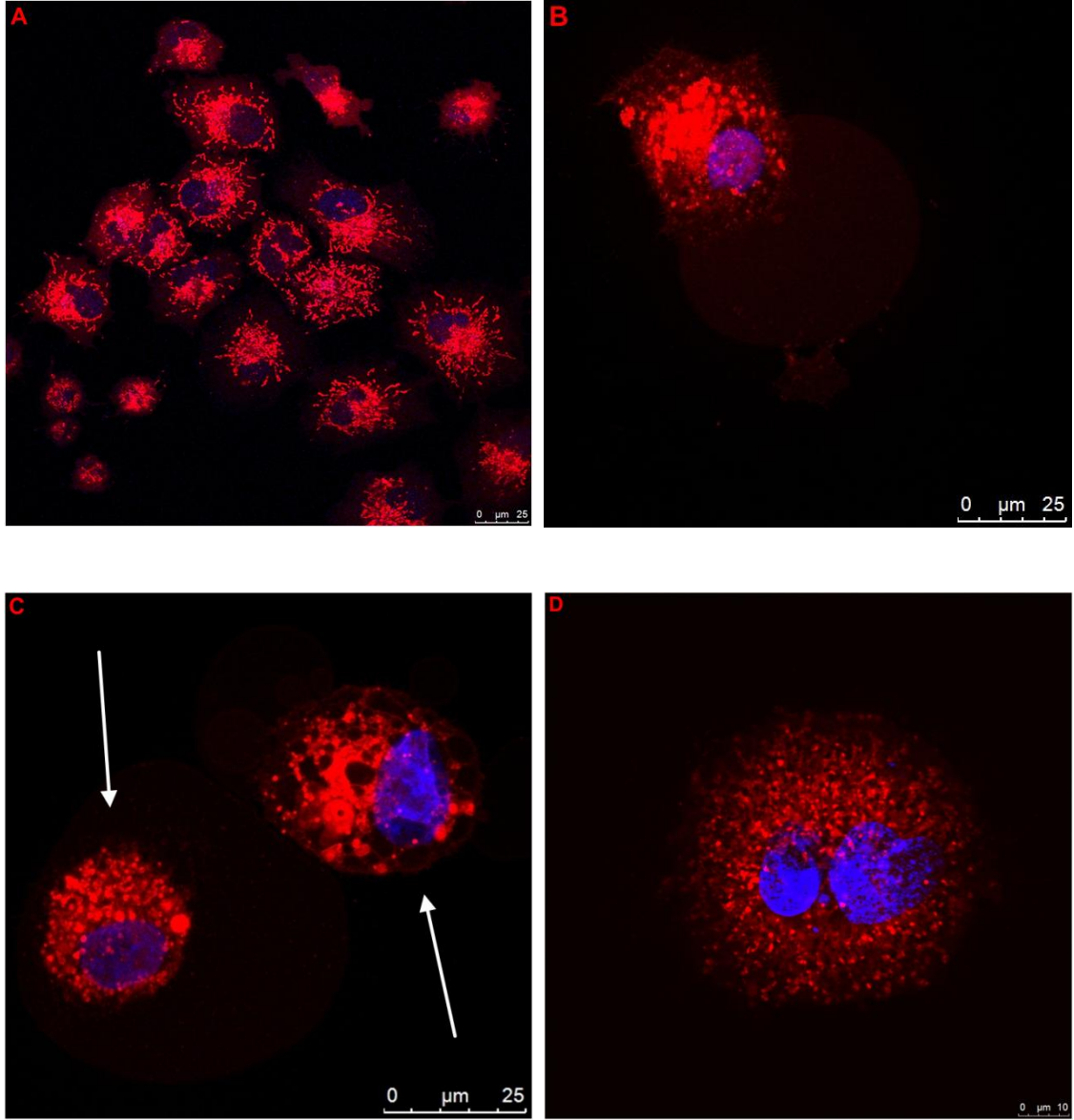
Şekil 3.48. (Devam) Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun etkileri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin $IC_{50/2}$ D) Sisplatin IC_{50} E) Klomipramin $IC_{50/2}$ F) Klomipramin IC_{50} G) Kloropiramin $IC_{50/2}$ H) Kloropiramin IC_{50} . (P1= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, P2= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)

Çizelge 3.42. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki kaspaz 3 aktivasyonunun % canlılık değerleri
(**P1**= Pozitif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık, **P2**= Negatif Kaspaz 3 aktivasyonu gösteren canlılık)

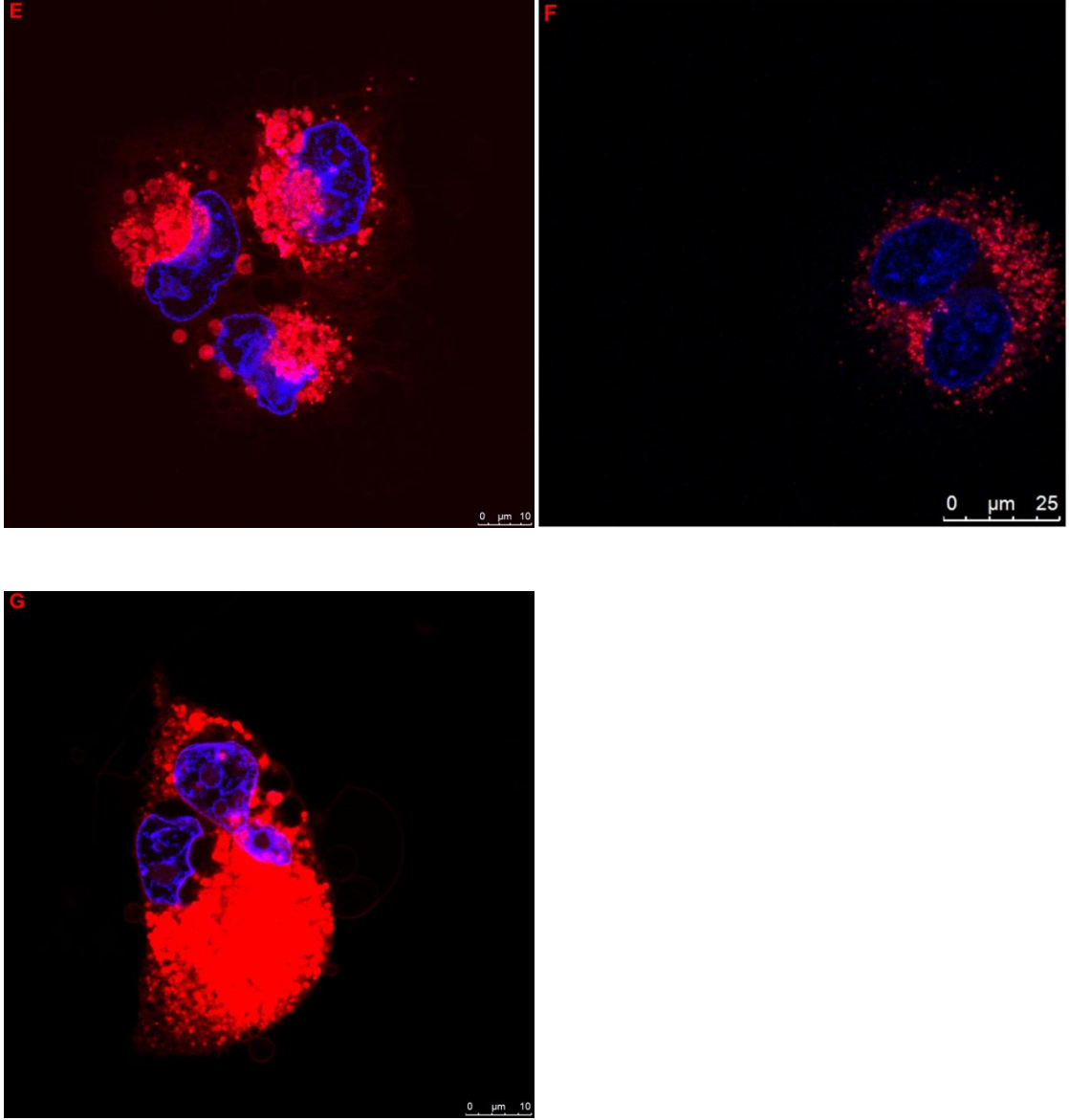
PANC-1 48. Saat	P2 (%)	P1%)
Kontrol	98.6	0.5
Sisplatin IC _{50/2}	92.0	6.5
Sisplatin IC ₅₀	85.5	12.5
Klomipramin IC _{50/2}	80.3	17.8
Klomipramin IC ₅₀	50.6	45.5
Kloropiramin IC _{50/2}	91.6	7.1
Kloropiramin IC ₅₀	79.5	18.5

3.4. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin A549 ve PANC-1 Hücrelerinde Meydana Getirdiği Morfolojik Değişimlerin Konfokal Mikroskobu ile Değerlendirilmesi

3.4.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik morfolojik değişimlerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi

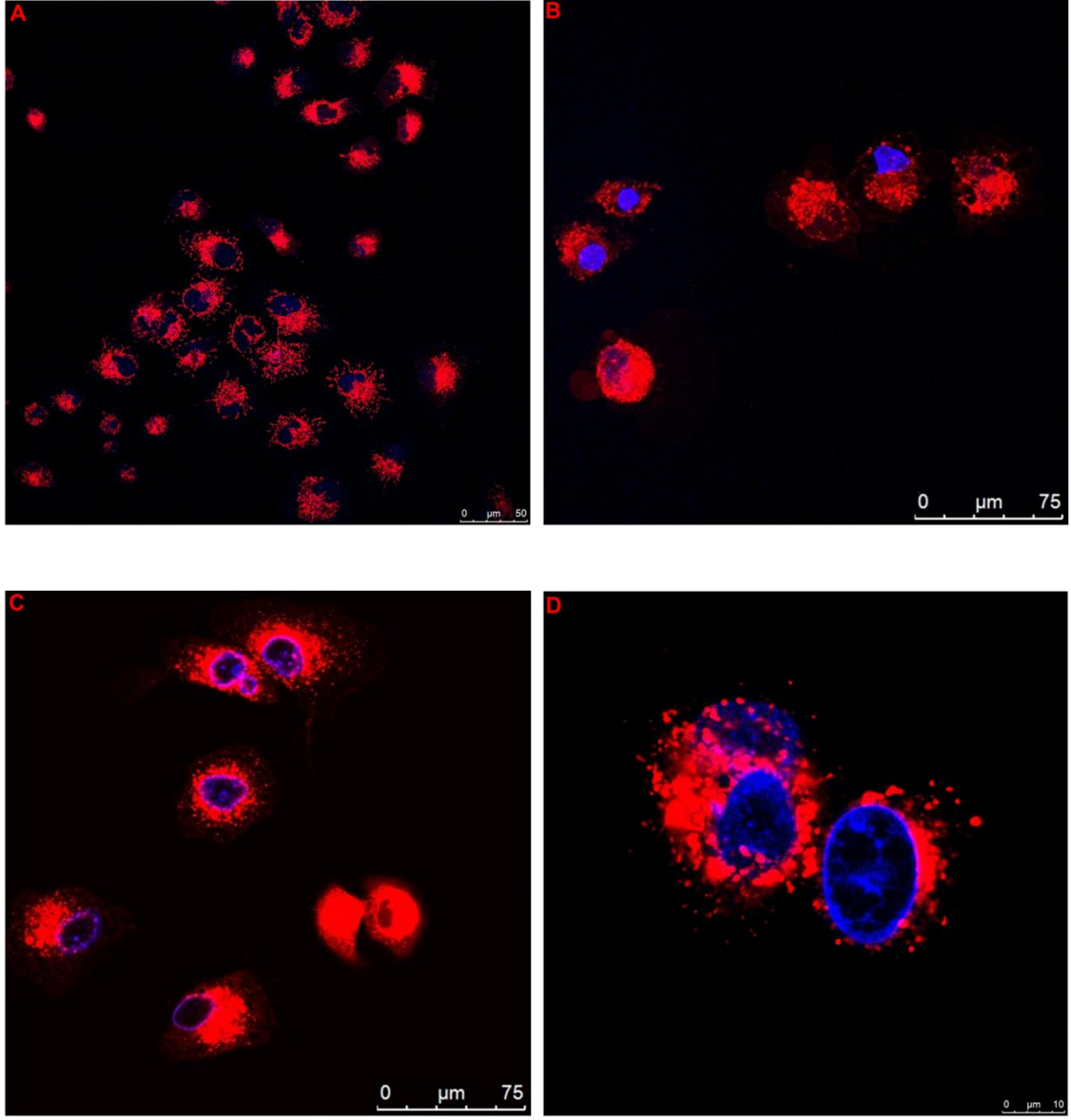


Şekil 3.49. A549 hücrelerinin üzerinde 24 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boyları kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin $IC_{50/2}$ C) Sisplatin IC_{50} D) Klomipramin $IC_{50/2}$ E)Klomipramin IC_{50} F) Kloropiramin $IC_{50/2}$ G) Kloropiramin IC_{50}

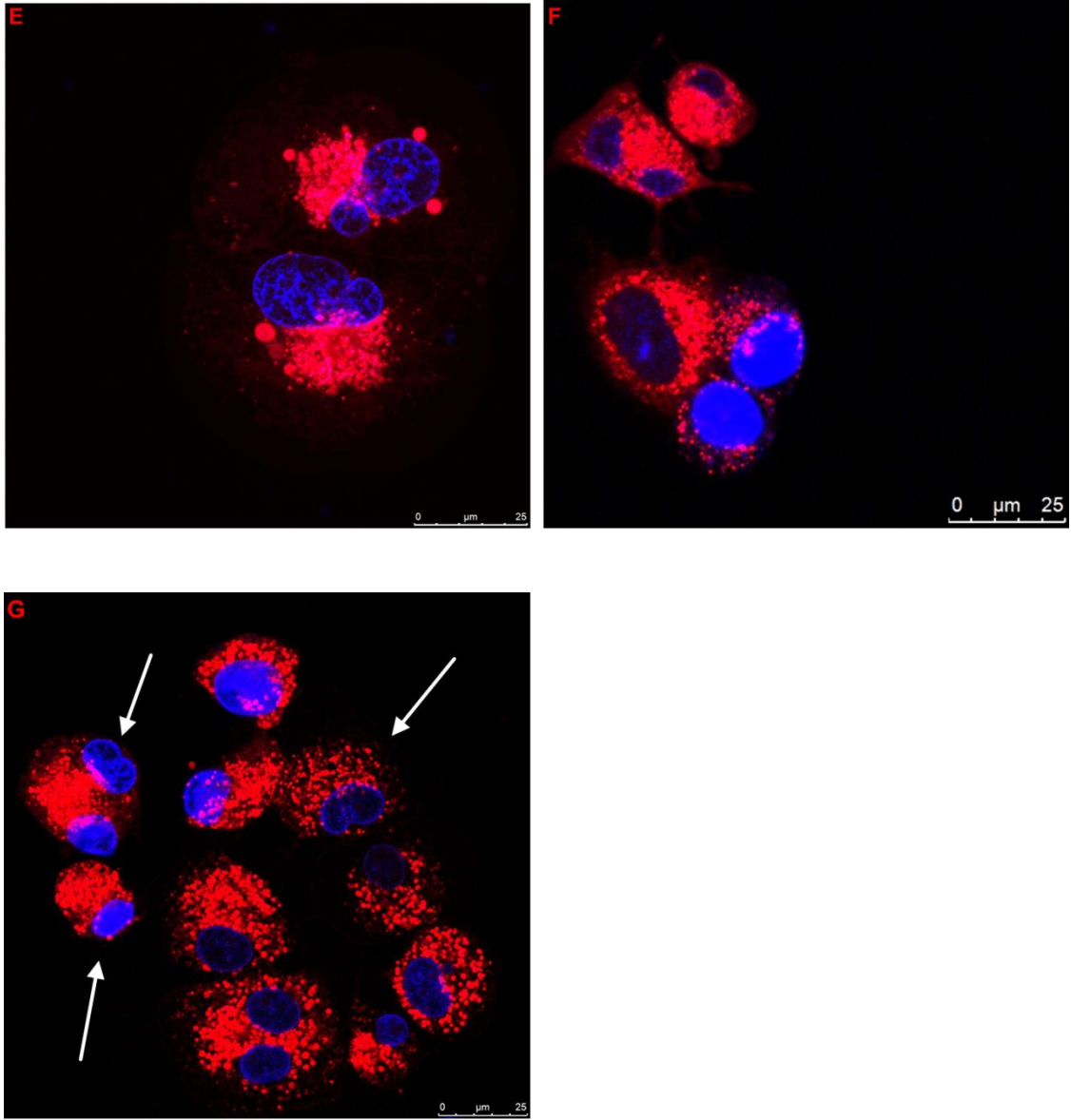


Şekil 3.49. (Devamı) A549 hücrelerinin üzerinde 24 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boyları kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin $IC_{50/2}$ C) Sisplatin IC_{50} D) Klomipramin $IC_{50/2}$ E)Klomipramin IC_{50} F) Kloropiramin $IC_{50/2}$ G) Kloropiramin IC_{50}

3.4.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik morfolojik değişimlerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi

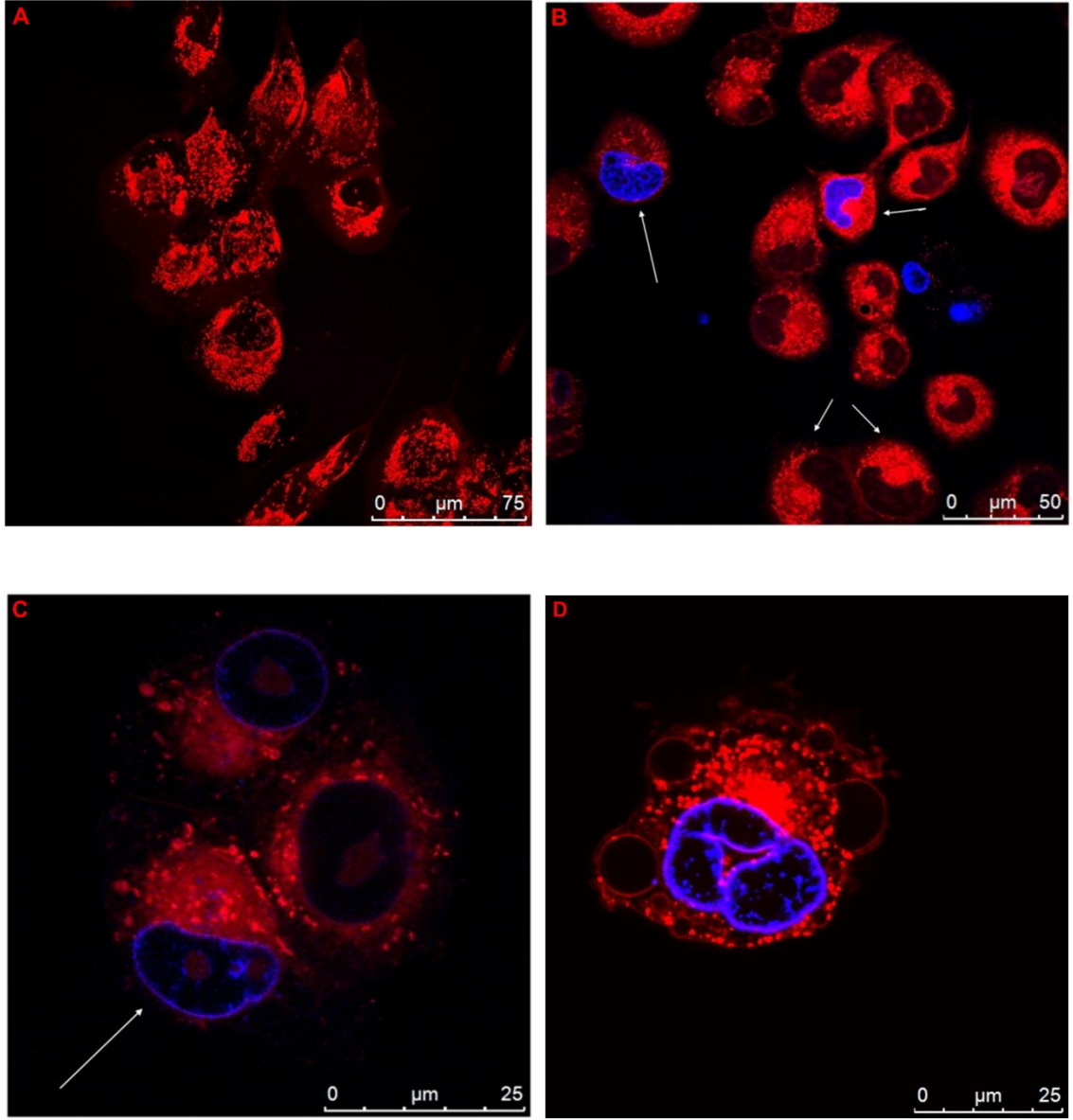


Şekil 3.50. A549 hücrelerinin üzerinde 48 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boyları kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin $IC_{50/2}$ C) Sisplatin IC_{50} D) Klomipramin $IC_{50/2}$ E)Klomipramin IC_{50} F) Kloropiramin $IC_{50/2}$ G) Kloropiramin IC_{50}

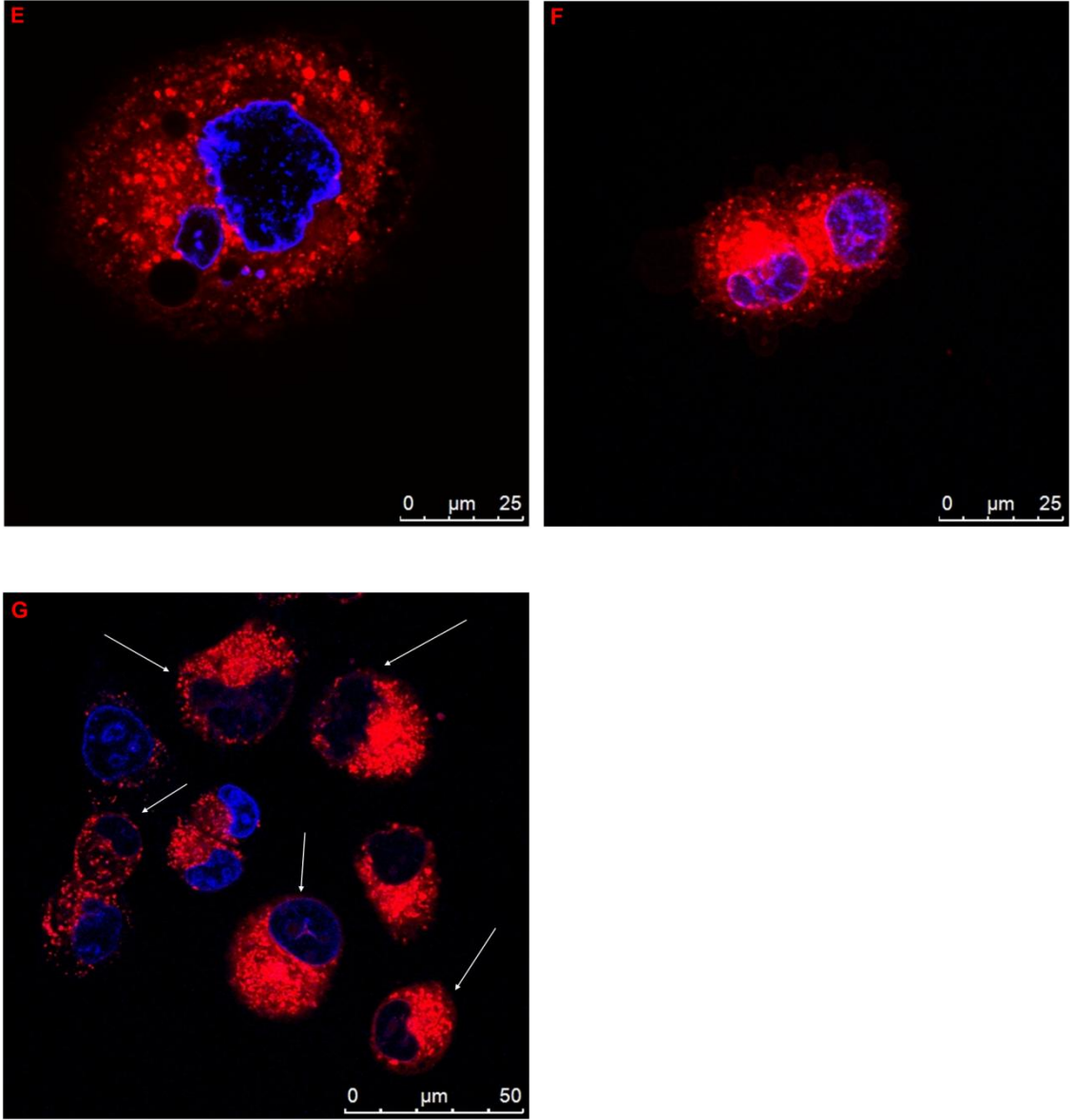


Şekil 3.50. (Devam) A549 hücrelerinin üzerinde 48 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boyaları kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin $IC_{50/2}$ C) Sisplatin IC_{50} D) Klomipramin $IC_{50/2}$ E)Klomipramin IC_{50} F) Kloropiramin $IC_{50/2}$ G) Kloropiramin IC_{50}

3.4.3. PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik morfolojik değişimlerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi

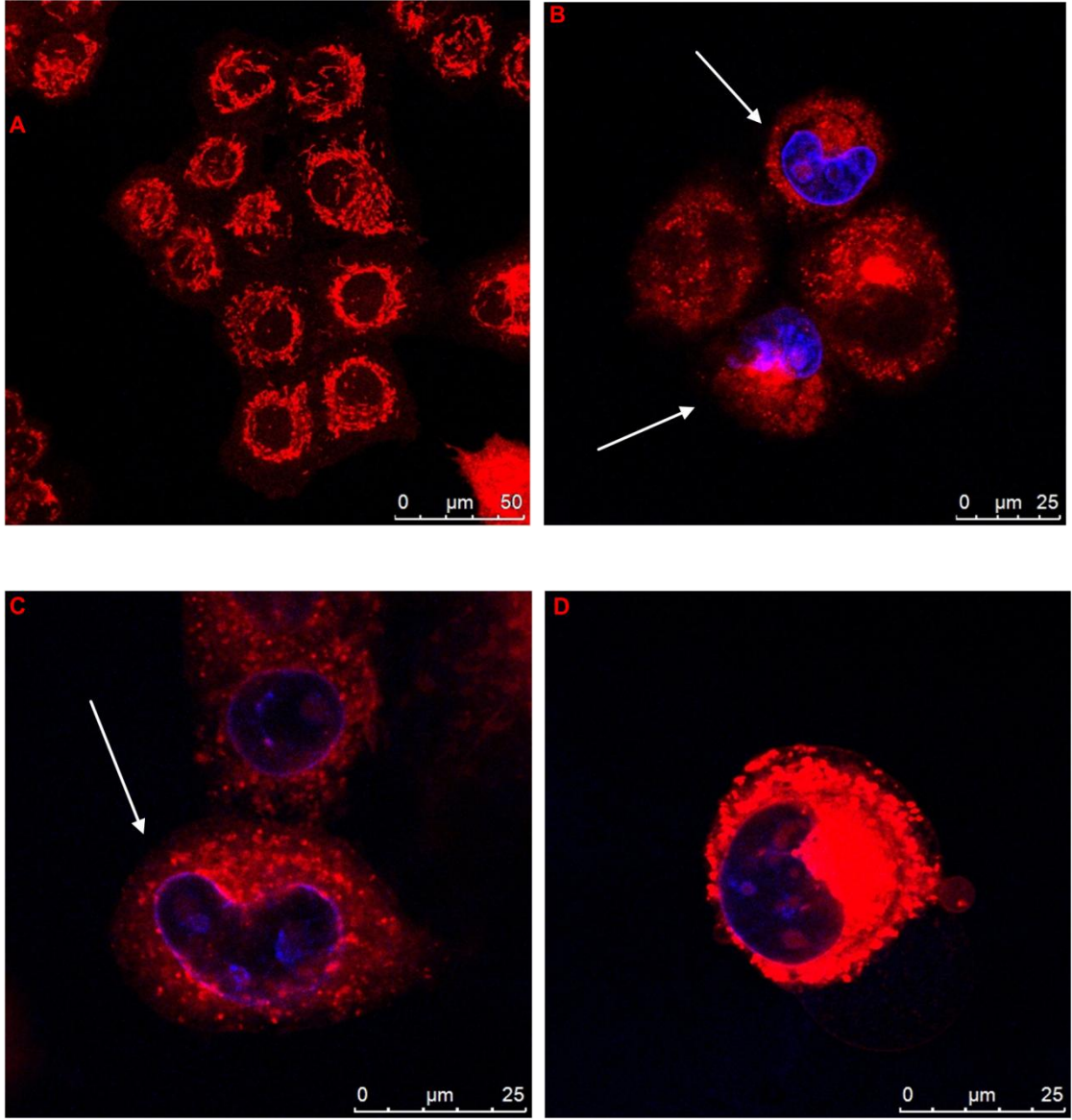


Şekil 3.51. PANC-1 hücrelerinin üzerinde 24 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boyaı kullanarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin IC_{50/2} C) Sisplatin IC₅₀ D) Klomipramin IC_{50/2} E)Klomipramin IC₅₀ F) Kloropiramin IC_{50/2} G) Kloropiramin IC₅₀

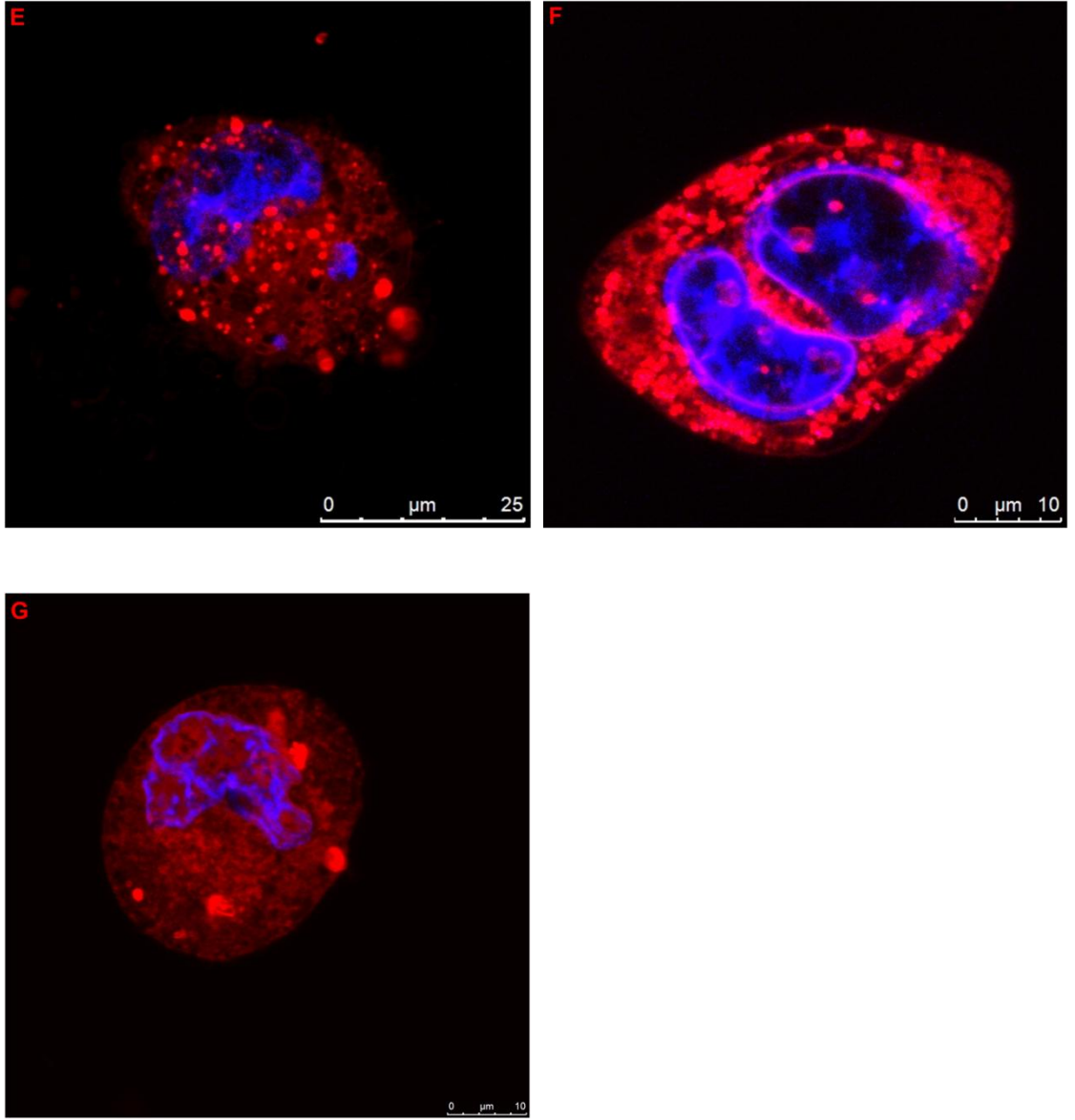


Şekil 3.51. (Devam) PANC-1 hücrelerinin üzerinde 24 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin *DAPI*(mavi) ve *MitoTracker CMXRos*(kırmızı) boyları kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin $IC_{50/2}$ C) Sisplatin IC_{50} D) Klomipramin $IC_{50/2}$ E)Klomipramin IC_{50} F) Kloropiramin $IC_{50/2}$ G) Kloropiramin IC_{50}

3.4.4. PANC-1 hücrelerindeki 48 saatlik morfolojik değişimlerin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi



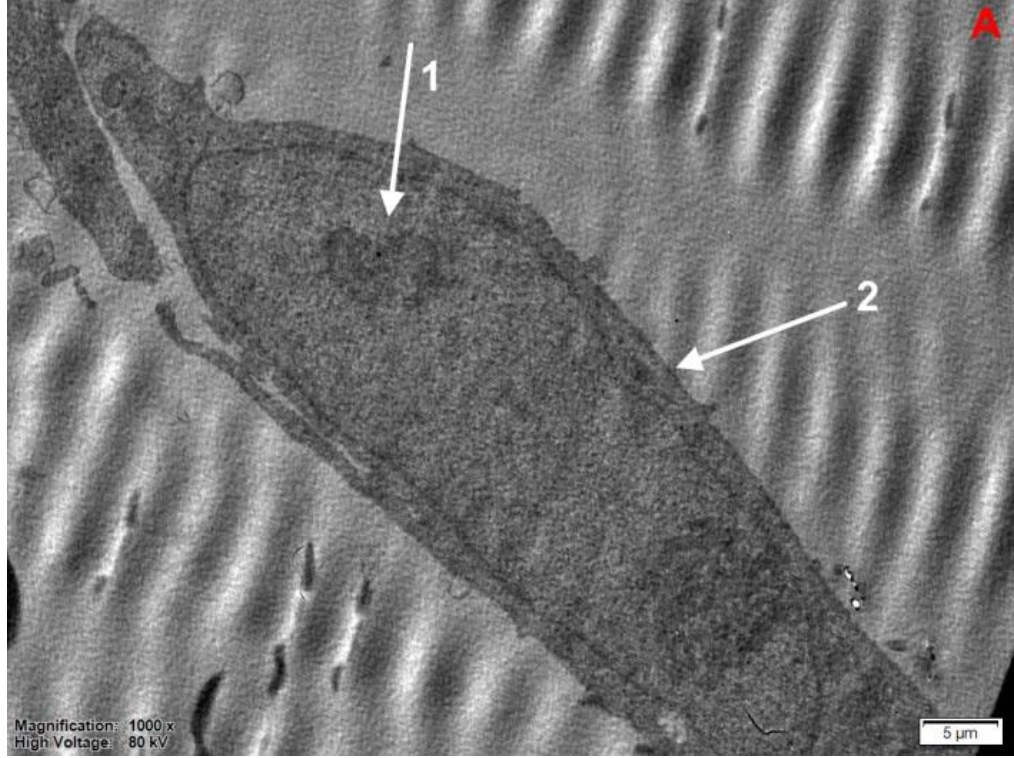
Şekil 3.52. PANC-1 hücrelerinin üzerinde 48 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boyaları kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin $IC_{50/2}$ C) Sisplatin IC_{50} D) Klomipramin $IC_{50/2}$ E)Klomipramin IC_{50} F) Kloropiramin $IC_{50/2}$ G) Kloropiramin IC_{50}



Şekil 3.52. (Devam) PANC-1 hücrelerinin üzerinde 48 saatlik Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin maddelerinin etkilerinin DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boyaları kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40x) A) Kontrol B) Sisplatin $IC_{50/2}$ C) Sisplatin IC_{50} D) Klomipramin $IC_{50/2}$ E)Klomipramin IC_{50} F) Kloropiramin $IC_{50/2}$ G) Kloropiramin IC_{50}

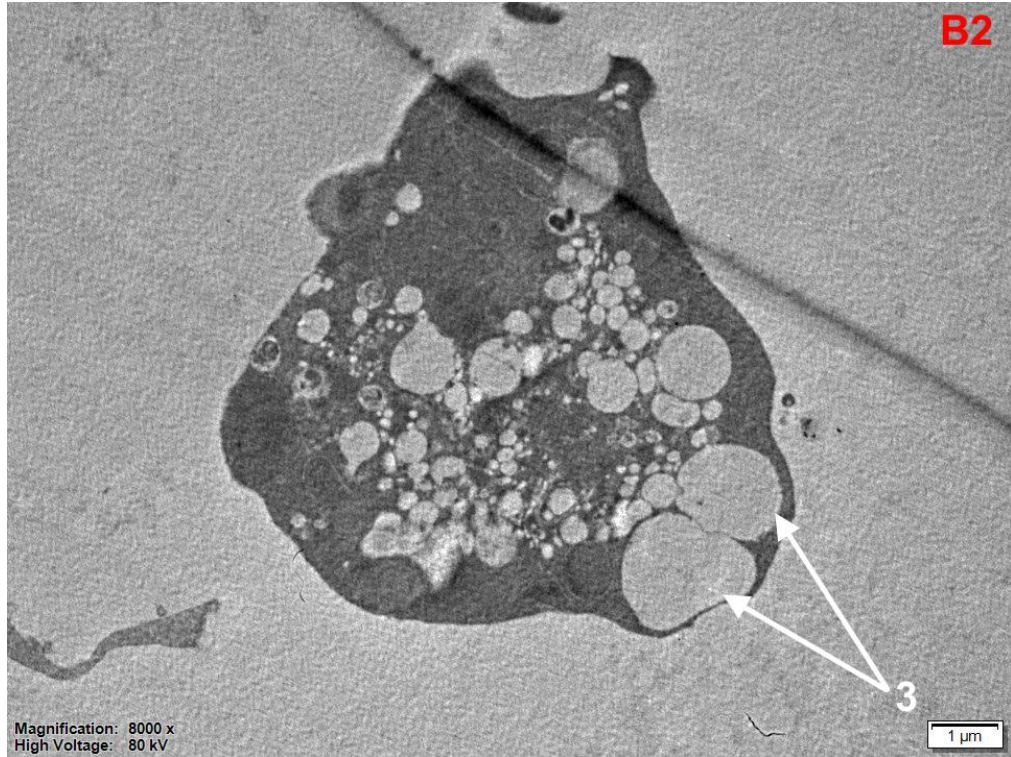
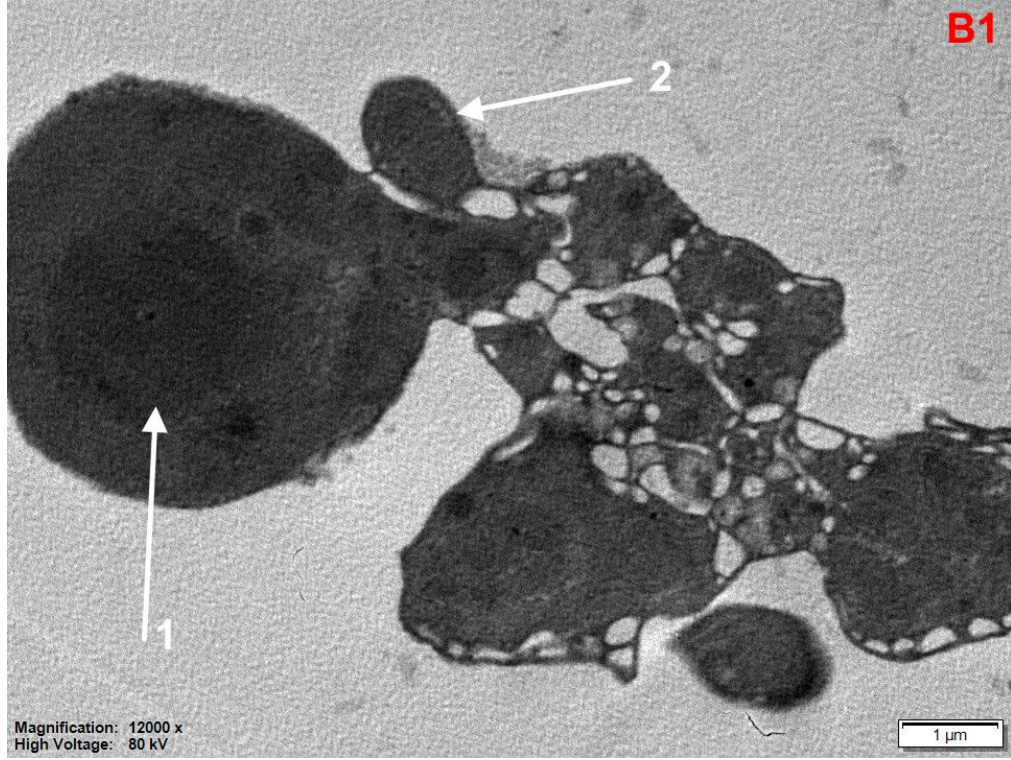
3.5. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin A549 ve PANC-1 Hücrelerinde Meydana Getirdiği Morfolojik Değişimlerin Geçirimli Elektron Mikroskobu ile Değerlendirilmesi

3.5.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik morfolojik değişimlerin geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi



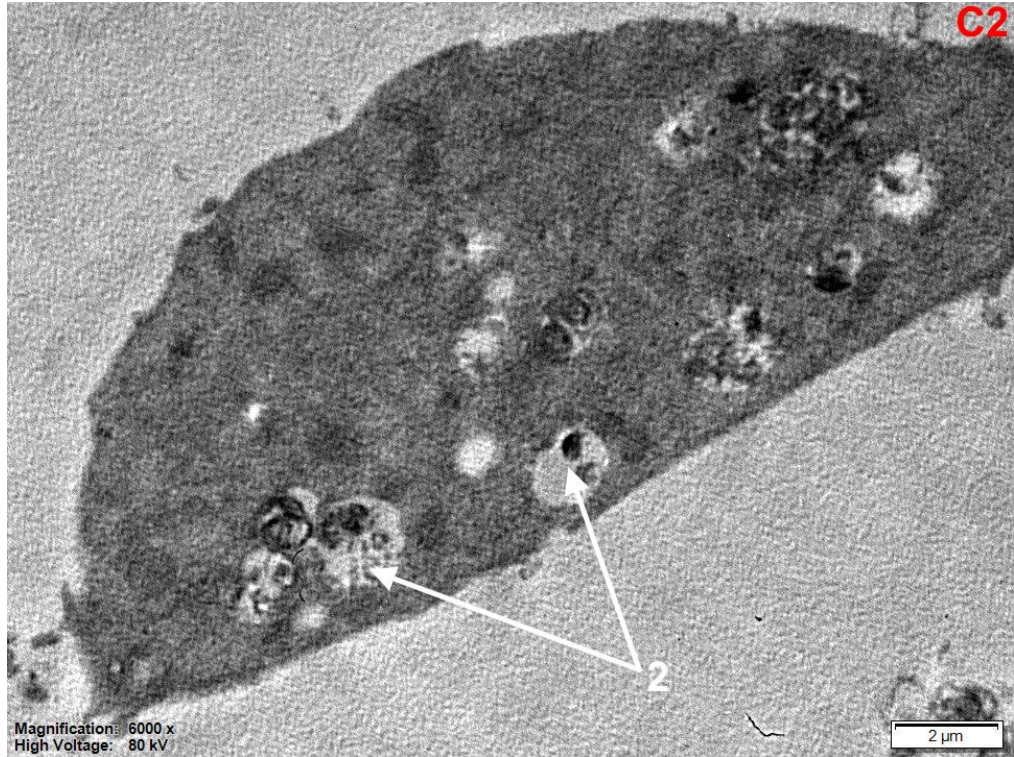
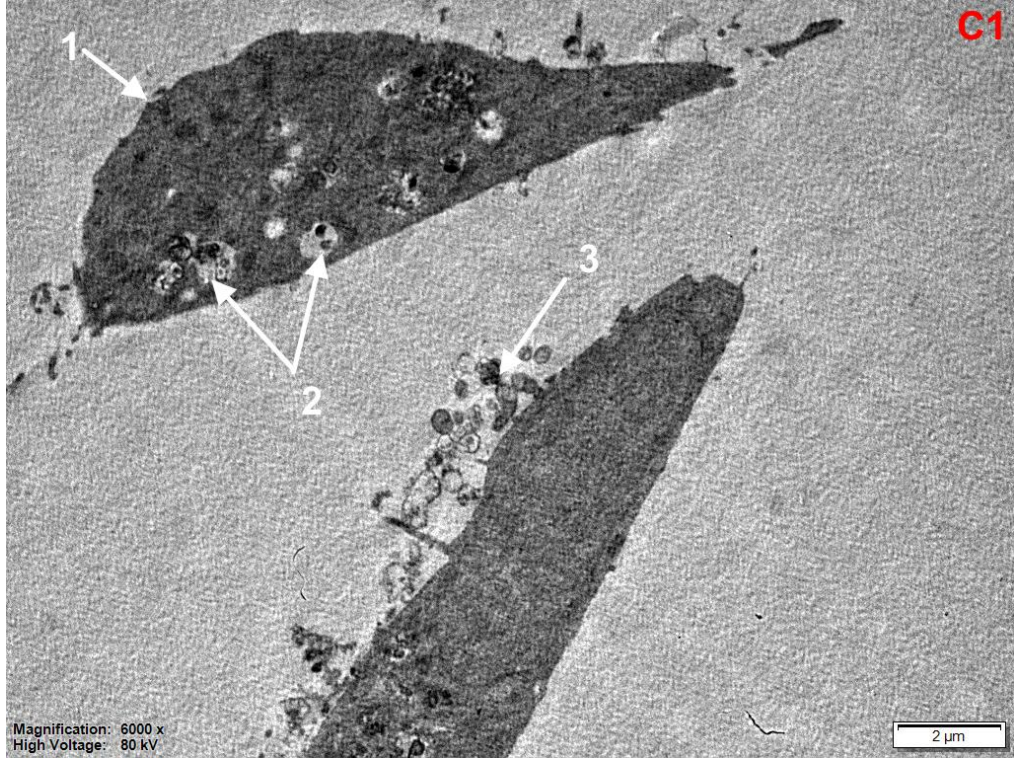
Şekil 3.53. A549 hücresinin 24 saatlik morfolojisinin TEM ile görüntülenmesi (kontrol)

1) Çekirdekçik 2) Hücre membranı



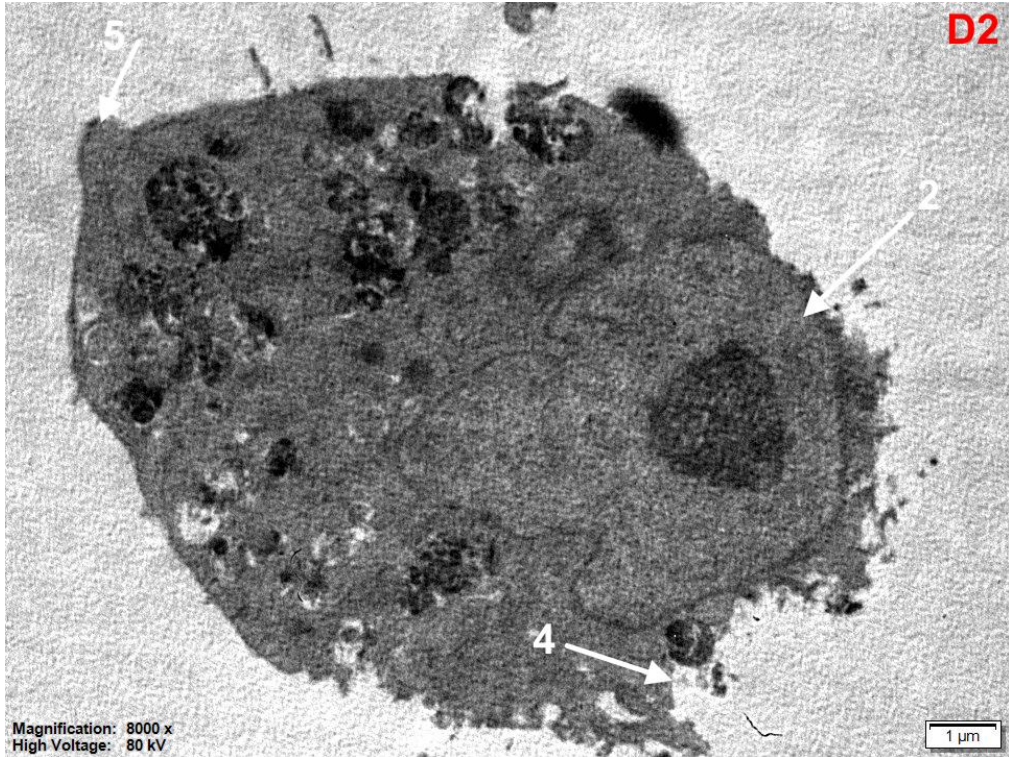
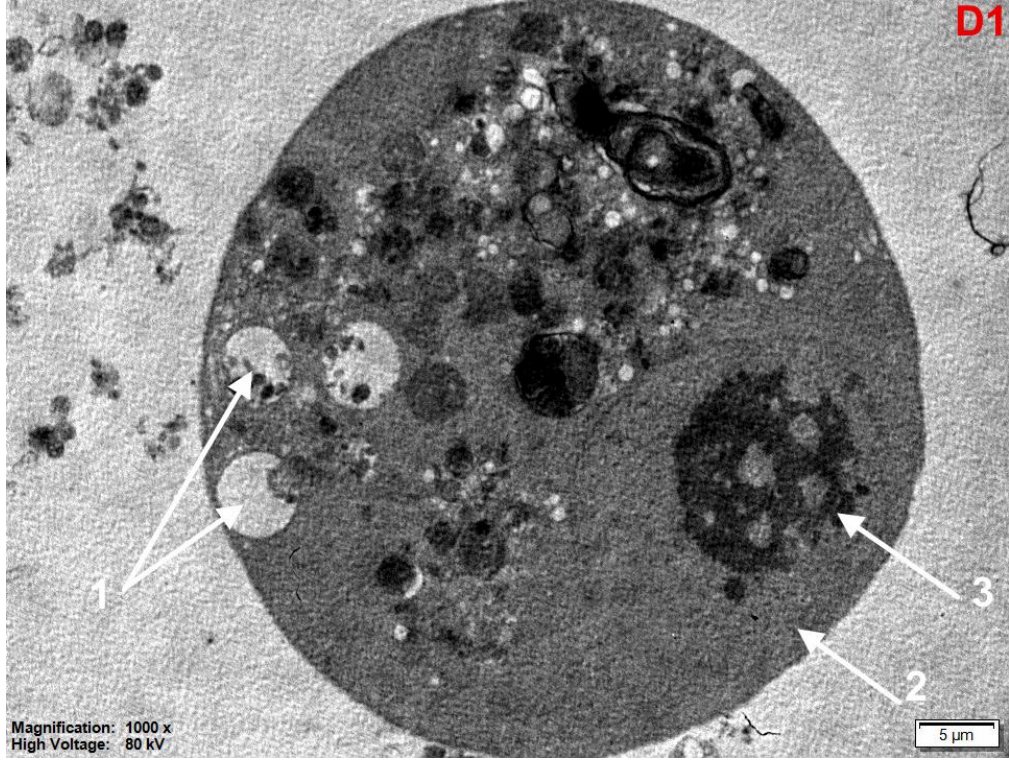
Şekil 3.54. *Sisplatin'in A549 hücresi üzerindeki morfolojik değişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (B1-B2)*

1) Çekirdek 2) Apoptotik Blebler 3) Vakuoller



Şekil 3.55. Klomipramin'in A549 hücresi üzerindeki morfolojik değişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (C1-C2)

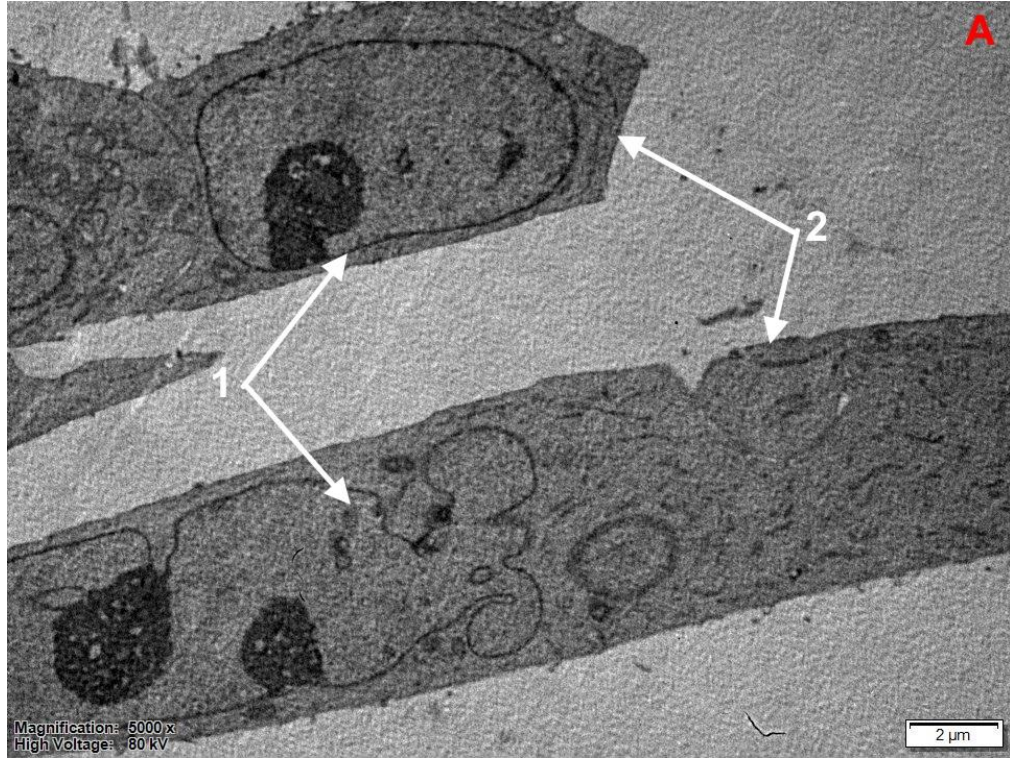
1) Membran rüptürü 2) Lizozomlar 3) Apoptotik blebler



Şekil 3.56. Kloropiramin'in A549 hücresi üzerindeki morfolojik değişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (D1-D2)

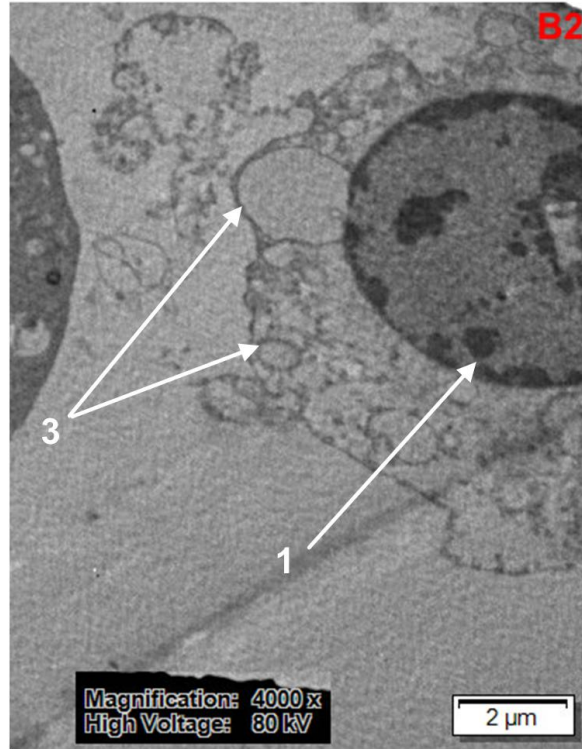
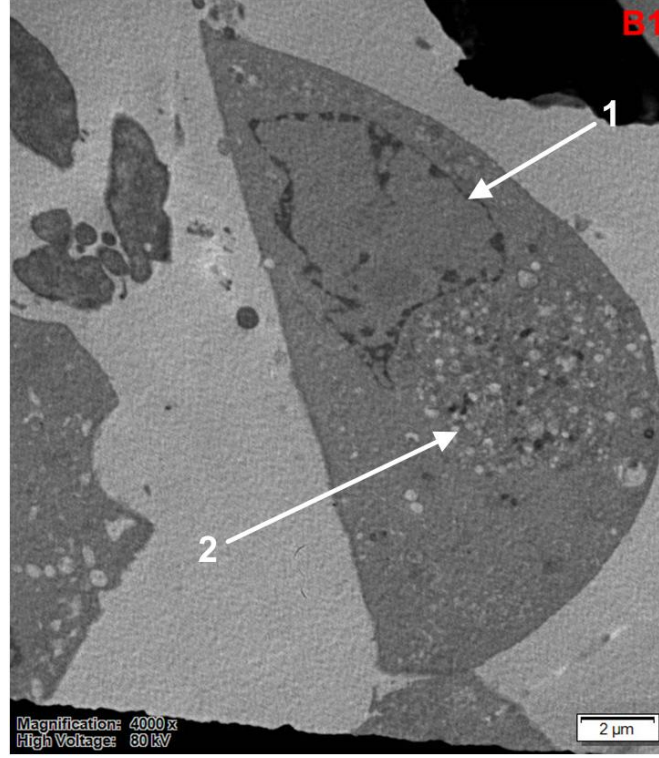
1) Lizozomlar 2) Çekirdek 3) Çekirdekçik 4) Membran rüptürü 5) Apoptotik bleb

3.5.3. PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik morfolojik değişimlerin geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi



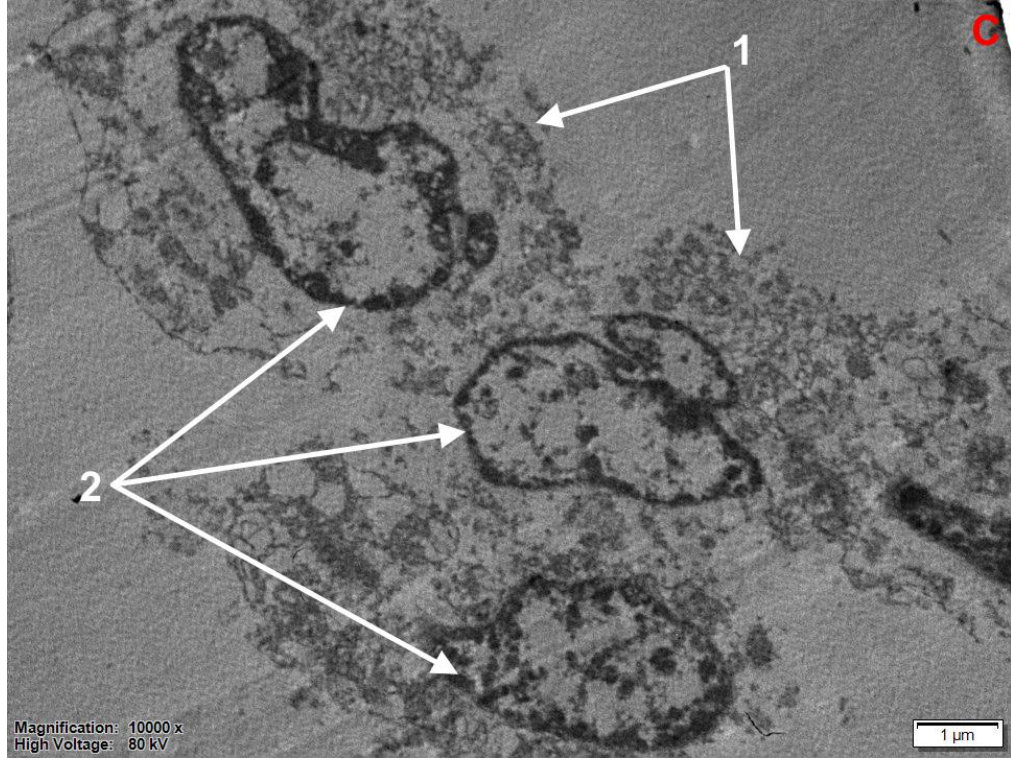
Şekil 3.57. PANC-1 hücresinin 24 saatlik morfolojisinin TEM ile görüntülenmesi
(kontrol)

1) Çekirdek ve çekirdekçik 2) Hücre membranı



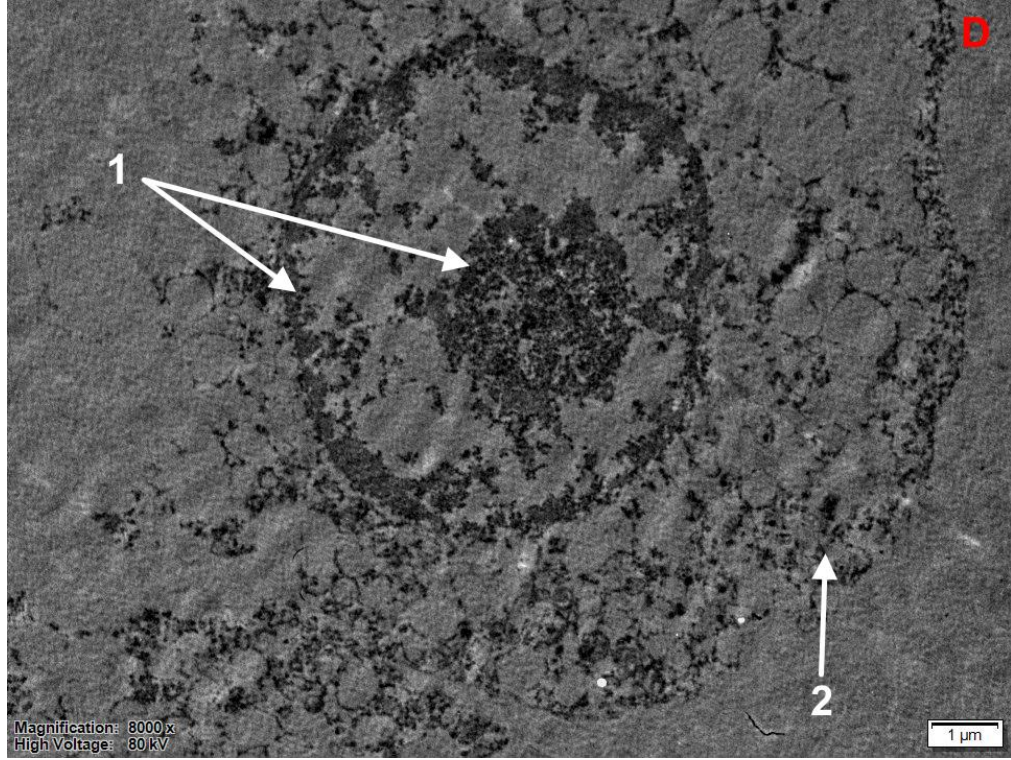
Şekil 3.58. *Sisplatin'in PANC-1 hücresi üzerindeki morfolojik değişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (B1-B2)*

1) Çekirdek 2) Lizozomlar 3) Vakuoller



Şekil 3.59. *Klomipramin'in PANC-1 hücresi üzerindeki morfolojik değişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (C)*

1) Lizozomlar-Vakuoller 2) Çekirdek



Şekil 3.60. Kloropiramin'in PANC-1 hücresi üzerindeki morfolojik değişimlerinin TEM ile görüntülenmesi (D)

1) Çekirdek ve Çekirdekçik 2.) Lizozomlar

4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Kanser tedavisinde bir antikanser ilaç olarak kullanılan Sisplatin, antikanser ilaçlar arasında en iyi bilinenlerdendir. Ancak Sisplatin bulantı, kusma, nefrotoksisite ve genotoksisite gibi yan etkilere sahiptir ve bu da tedavilerde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle daha az toksik fakat daha etkili olabilecek yeni antikanser ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır [124].

Bu tez çalışması, A549 insan akciğer karsinoma epitelial hücre hattı ve PANC-1 insan pankreas karsinoma hücre hattı üzerinde pozitif kontrol olarak Sisplatin'i baz alıp Klomipramin ve Kloropiramin ilaçlarının sitotoksik, apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amacıyla *invitro* yöntemler kullanılarak yapılmıştır.

A549, PANC-1, L929 ve hTERT-HPNE hücreleri üzerinde Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in ilaçlarının MTT yöntemi kullanarak zaman ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Konsantrasyonlar 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 μ M olarak seçilmiş ve bu konsantrasyonların 24, 48 saatlik etkileri gözlenmiştir. Her bir ilacın kontrol grubuna göre % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır. L929 ve hTERT-HPNE hücre hatları sağlıklı olmaları sebebi ile ilaçların sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacı ile seçilmiştir.

A549 hücreleri ile yapılan MTT analizi sonucunda Sisplatin ve Kloropiramin'in hem konsantrasyon artışına bağlı olarak hem de zaman artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Klomipramin'in konsantrasyon artışına bağlı olarak sitotoksik etkisinin arttığı ancak zamana bağlı olarak önemli bir değişiklik göstermediği gözlenmiştir. Klomipramin ve Kloropiramin'in hücre proliferasyonunun IC_{50} değerleri Sisplatin'in IC_{50} değerleri ile karşılaştırıldığında Klomipramin'in 24 saatte daha fazla etkili olduğu ancak 48 saatte etkisinin olmadığı, Kloropiramin'in ise hem 24 saatte hem de 48 saatte daha düşük bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

PANC-1 hücreleri ile yapılan MTT analizi sonucuna göre Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin ilaçlarının üçünüde hem konsantrasyon artışına bağlı olarak hem de zamana bağlı olarak proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Klomipramin ve Kloropiramin'in belirlenen IC_{50} değerleri Sisplatin'in IC_{50} değeri ile karşılaştırıldığında Klomipramin'in hem 24 saatte hem de 48 saatte daha etkili olduğu ancak Kloropiramin'in 24 ve 48 saatte Sisplatin kadar etkili olmadığı belirlenmiştir.

Sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenmesi amacı ile L929 normal fare fibroblast hücre hattı ve hTERT-HPNE normal pankreas hücre hattı kullanılmıştır. Sitotoksite belirlemek amacı ile MTT analizi yapılmış ve analiz sonuçlarına göre Sisplatin'in hTERT-HPNE hücreleri üzerinde 24 saatte düşük konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunda artışa neden olduğu ancak 48 saatte konsantrasyona bağlı

olarak hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Klomipramin ve Kloropiramin'in ise zamana bağlı olarak proliferasyonu arttırdığı belirlenmiştir. Buna karşılık Klomipramin ve Kloropiramin hem 24 saatlik hem de 48 saatlik IC_{50} değerleri Sisplatin'in IC_{50} değerine göre daha yüksektir. Bu da bize Klomipramin ve Kloropiramin ilaçlarının normal pankreas hücreleri üzerinde kanserli hücrelerdeki sitotoksite oranına göre daha az sitotoksitaya sahip olduğunu göstermektedir.

L929 hücre hattı üzerinde yapılan MTT analizlerine göre Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin konsantrasyon artışına ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisi artmaktadır. Klomipramin hem 24 saatte hem de 48 saatte Kloropiramin kadar, Kloropiramin ise Sisplatin kadar düşük bir sitotoksite göstermemiştir. Klomipramin ve Kloropiramin'in kanserli hücre proliferasyonunu sağlıklı hücrelere göre daha fazla oranda durdurduğu tespit edilmiştir. Bu ilaçlar üzerinde yapılacak olan daha ileri çalışmalar ile etkilerinin tam mekanizması belirlenebilir ve antikanser özelliklerinin de var olduğu tespit edilebilir.

RTCA MP Sisteminden elde edilen A549 ve PANC-1 hücrelerine ait proliferasyon grafikleri sistem üzerinden eş zamanlı olarak saat başı veri elde edilecek şekilde ayarlanmıştır. A549 hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan Sisplatin'in 24, 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerleri analiz sonunda cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. 24 saatlik IC_{50} değerleri 48 ve 72 saatlere göre sırasıyla yaklaşık olarak %46 ve %45 oranından bir azalma gösterirken, 48 ve 72 saatler arasındaki IC_{50} değerlerinde önemli bir fark gözlemlenmemiştir. A549 hücreleri üzerinde apoptotik etki belirleme çalışmalarında kullanılmış olan $IC_{50/2}$ ve IC_{50} değerleri, RTCA sistemi üzerinden elde edilmiş ilaç konsantrasyonlarıdır.

A549 hücreleri üzerine uygulanan Klomipramin ilacının eş zamanlı olarak 24, 48 ve 72 saatlik hücre proliferasyon üzerine olan etkileri gözlenmiştir. Sistem üzerinden alınan verilere göre Klomipramin'in IC_{50} değerleri zamana bağlı olarak bir artış göstermiştir. 24 saatteki IC_{50} değerleri 48 saatte yaklaşık olarak %33'lük, 72 saatte ise yaklaşık olarak %36'lık bir artış gözlenmiştir. Bu değerler üzerinden $IC_{50/2}$ değerleri hesaplanmış ve ileri çalışmalar için kullanılmıştır.

RTCA MP sistemi ile A549 hücreleri üzerine uygulanan Kloropiramin ilacının hücre proliferasyon üzerine olan etkileri 24, 48 ve 72 saat olarak belirlenmiştir. Kloropiramin 24 saatte en düşük IC_{50} değerine sahipken, 24 ve 48 saatlik IC_{50} değerlerinde artış göstermektedir. 24 saatlik IC_{50} değeri %69'luk bir artış ile 48 saatlik IC_{50} 'ye, %75'lik bir artış ile 72 saatlik IC_{50} değerine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu değerler baz alınarak $IC_{50/2}$ değerleri hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar da hem

Klomipramin hem de Kloropiramin'in IC_{50} değerlerinin Sisplatin kadar düşük bir konsantrasyona sahip olmadığı sonucuna varılmıştır.

A549 için yapılan çalışmalar PANC-1 hücreleri için de yapılmıştır. PANC-1 hücrelerine pozitif kontrol olarak kullanmak üzere verilen Sisplatin ilacının hücre proliferasyonunu zamana bağlı olarak azalttığı gözlenmiştir. Sisplatin ilacının 24 saatlik IC_{50} değeri 48 saat ve 72 saate göre sırasıyla yaklaşık olarak %39 ve %58 daha fazladır.

Klomipramin'in PANC-1 hücrelerindeki proliferasyon etkileri zamana bağlı olarak bir artış göstermiştir. 24 saatlik IC_{50} değerleri 48 saat ve 72 saate göre sırasıyla yaklaşık olarak %22 ve %24'lük bir artış göstermiştir. 48 ve 72 saat arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir.

PANC-1 hücre proliferasyonu üzerinde etkisine bakılmak amacı ile uygulanan Kloropiramin ilacı zamana bağlı olarak artış göstermiştir. 24 saatlik IC_{50} değeri 48 saatte %15'lik, 72 saatte ise %26'lık bir artış göstermiştir.

Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücre proliferasyonuna olan etkileri incelendiğinde, Klomipramin'in IC_{50} değeri pozitif kontrol olarak kullanılan Sisplatin'e göre 24 saatte daha düşük olduğu ancak 48 ve 72 saatte daha yüksek bir değere sahip olduğu gözlenmiştir. Kloropiramin'in ise Sisplatine göre tüm saatlerde daha yüksek bir IC_{50} değerine sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışmalarda kullanılmak üzere A549 ve PANC-1 hücrelerinin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozları Xcelligence gerçek zamanlı analiz cihazı sonuçlarına göre seçilmiştir. A549 hücrelerinde 24 saatlik Sisplatin'in IC_{50} değeri: 33.91 μM olarak, Klomipramin 89.16 μM olarak ve Kloropiramin 268 μM olarak seçilmiştir. A549 için 24 saatlik $IC_{50/2}$ değerleri bunların doğrultusunda Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin için sırasıyla 16.955 μM , 44.58 μM , 134.12 μM olarak belirlenmiştir. 48 saatlik analiz sonucuna göre Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 18.42 μM , 119.71 μM , 454 μM iken, $IC_{50/2}$ değerleri 9.21 μM , 59.85 μM , 227.38 μM 'dir.

PANC-1 hücrelerinde 24 saatlik Sisplatin'in IC_{50} değeri: 60.98 μM olarak, Klomipramin 47.46 μM olarak ve Kloropiramin 79.23 μM olarak seçilmiştir. PANC-1 hücreleri için 24 saatlik $IC_{50/2}$ değerleri bunların doğrultusunda Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin için sırasıyla 30.49 μM , 23.8 μM , 39.615 μM olarak belirlenmiştir. 48 saatlik analiz sonucuna göre Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 37.60 μM , 58.28 μM , 91.27 μM iken, $IC_{50/2}$ değerleri 18.8 μM , 29.14 μM , 29.14 μM 'dir.

C6 fare beyin glioma hücreleri üzerinde Klomipramin ile yapılan çalışmada 72 saatte %87 öldürdüğü ve doza bağlı bir sitotoksosite gözleendiği belirtilmiştir [125].

Zhenlei ve arkadaşları ise HL-60 İnsan myeloid lösemi hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda Klomipramin'in IC₅₀ dozunu 35 µM olarak kullanmışlardır [81].

Çalışmamızda Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in A549 ve PANC-1 hücrelerinde proliferasyon testleri ile belirlenen konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik apoptotik etkileri Annexin V-PI yöntemi ile akım sitometri cihazında analiz edilmiştir.

A549 hücreleri üzerinde yapılan erken ve geç apoptotik belirleme analizine göre Klomipramin için 48 saatte erken apoptoz %'sinde artış gözlenirken geç apoptozda düşüş tespit edilmiştir. Bu nedenle Klomipramin'in etkisi için erken apoptozda hem konsantrasyona hem de zamana bağlı olarak bir artış yaptığı söylenebilir. Kloropiramin'in IC_{50/2} ve IC₅₀ dozları arasında konsantrasyon artışına bağlı olarak erken ve geç apoptoz oranlarında bir artış görülürken, 24 ve 48 saatlik analizler arasında herhangi bir artış gözlemlenmemiştir. Bu nedenle Kloropiramin'in A549 hücreleri üzerindeki etkisi zamana bağlı değil doza bağımlıdır. Sisplatin'in hem doza hemde zamana bağlı olarak erken ve geç apoptoz %'lerinde bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Klomipramin ve Kloropiramin'in hem IC_{50/2} ve IC₅₀ dozlarında 24 saat sonrasında Sisplatin'e göre kıyaslandığında geç apoptoz %'lerinde artış olduğu belirlenmiştir. Klomipramin'in Sisplatin'e göre IC_{50/2} dozlarında geç apoptoz %'lerinde 2.57 kat, IC₅₀ dozlarında 1.7 kat bir artış gözlenirken, Kloropiramin'in Sisplatin'e göre IC_{50/2} ve IC₅₀ dozlarında sırasıyla 2.22 ve 3.64 kat bir artış olduğu gözlenmiştir. Bunlara karşın, Klomipramin ve Kloropiramin'in erken apoptotik %'lerinde Sisplatin'e kıyasla düştüğü tespit edilmiştir. Klomipramin ve Kloropiramin'in hem erken hem de geç apoptotik %'lerinde Sisplatin'e kıyasla düşüş olduğu görülmüştür.

PANC-1 hücreleri ile yapılan erken ve geç apoptozu belirleme analiz sonuçlarına göre, Sisplatin'in 24 saat sonunda doza bağlı olarak erken apoptoz %'sinde bir artışa ancak geç apoptoz %'sinde düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. Klomipramin'in 24 saat sonunda doza bağlı olarak hem erken hem de geç apoptoz %'lerini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Kloropiramin ise 24 saat sonunda doza bağlı olarak erken apoptoz %'sini azaltırken, geç apoptoz %'sini arttırmıştır. Maddeler Sisplatin ile kıyaslandığında, Kloropiramin'in 24 saat sonunda geç apoptoz %'sini yaklaşık olarak 1.45 kat arttırdığı görülmüştür. Kloropiramin'in ise 24 saat sonunda IC_{50/2} dozunun erken apoptoz % miktarı yaklaşık 1.6 kat daha fazla bulunmuştur.

Hem Klomipramin hem de Kloropiramin'in 48 saat sonunda hücre canlılığının doza bağlı olarak %50'den fazlasını azalttığı gözlenmiştir. Kloropiramin'in 48 saat sonunda geç apoptoz %'si hem IC_{50/2} hem de IC₅₀ dozları için düşüktür. Klomipramin'in erken apoptoz %'si Sisplatin ile benzemekte iken Kloropiramin'in erken apoptoz %'si Sisplatin'e göre düşük olduğu sonucuna varılmıştır. 48 saat sonunda PANC-1 hücreleri

üzerindeki Klomipramin'in IC_{50} dozunun geç apoptoz %'si Sisplatin'e kıyasla yaklaşık 1.5 kat artmıştır. Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in 48 saatlik hem erken hem geç apoptoz %'leri 24 saatlik %'lere göre düşüş göstermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda hem Klomipramin hem de Kloropiramin'in PANC-1 hücrelerinde 24 saat sonunda daha etkili oldukları görülmüştür. Değişik çalışmalarda Klomipramin'in apoptotik özellikleri kanserli hücre hatlarında değerlendirilmiştir. Bilir ve arkadaşları tarafından C6 fare beyin glioma hücreleri ile yapılan çalışma da, Klomipramin'in apoptozu kontrol grubuna göre 24 ve 96 saatlerde sırasıyla %35.49 ve %80.49 olarak indüklediği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise A549 hücreleri üzerinde uygulanan Klomipramin ilacının IC_{50} dozundaki erken ve geç apoptoz (Q4+Q2) etkisi 24 saatte %15.8 iken 48 saatte %18.3 ile daha az etkili olduğu gözlenmiştir. Ancak PANC-1 hücrelerinde IC_{50} dozlarının erken ve geç apoptoz (Q4+Q2) etkisi 24 saatte % 37.8'e ulaşarak bu hücre hattı üzerinde daha etkili olduğunu göstermiştir [125]. Ayrıca, Klomipramin'in akut miyeloid lösemi hücrelerini apoptoza teşvik ettiği belirtilmiştir. Klomipramin'in mitokondride bulunan solunum zincirindeki Kompleks III'ü inhibe ederek ROS seviyelerini yükselttiği, sitokrom c salınması artırdığı ve böylece kaspaz aracılı apoptozu indüklediği savunulmaktadır [83].

T47D, BT549, MDA-MB-231 meme kanser hücre hatları üzerinde Kloropiramin ile yapılan 48 saatlik annexin V/PI analizinde apoptozu indüklediği sonucuna varılmıştır [102]

Tez çalışması kapsamında Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozları 24 ve 48 saat süresince A549 ve PANC-1 hücreleri üzerinde mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri JC-1 boyama yöntemi ile akım sitometri cihazında belirlenmiştir.

A549 hücreleri ile yapılan çalışmalarda, Klomipramin ve Kloropiramin'in $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozlarında Sisplatin'in IC_{50} dozunda hem 24 saat hem de 48 saatte kontrol grubuna göre mitokondriyal membran depolarizasyonunda artış görülmüştür. 24 saat sonunda Klomipramin Sisplatin'e göre mitokondriyal membran depolarizasyonunda $IC_{50/2}$ dozunda yaklaşık olarak 1.6 kat, IC_{50} dozunda yaklaşık olarak 1.4 kat artış göstermiştir. Kloropiramin ise 24 saatte Sisplatin'e kıyasla $IC_{50/2}$ dozunda yaklaşık olarak 1.2 kat artış gösterirken, IC_{50} dozunda yaklaşık olarak 1.2 kat azalma gösterdiği sonuçlarına ulaşılmıştır.

A549 hücreleri ile 48 saatlik JC-1 analiz sonuçlarına göre Sisplatin dozla bağlı olarak mitokondriyal membran depolarizasyonu yüzdesinde 3 kat bir artış göstermiştir. Klomipramin ve Kloropiramin Sisplatin'e benzer şekilde doz artışına bağlı olarak depolarizasyon % miktarında da artışa neden olduğu gözlenmiştir. Klomipramin'in

Sisplatin'e göre $IC_{50/2}$ dozunda mitokondriyal membran depolarizasyonunu arttırdığı, IC_{50} dozunda ise azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Kloropiramin ise $IC_{50/2}$ dozunda Klomipramin ile benzerlik gösterirken, IC_{50} dozunda 1.2 kat artış göstermiştir.

Klomipramin'in A549 hücrelerinde mitokondriyal membran depolarizasyonunda 24 saatte IC_{50} dozunda daha fazla olduğu, Sisplatin ve Kloropiramin'in ise her iki dozunda da 48 saatte iyi olduğu gözlenmiştir.

PANC-1 hücrelerinde yapılan 24 ve 48 saatlik mitokondriyal membran depolarizasyonu belirleme analiz sonuçlarına göre, 24 saatte Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in her iki dozu da mitokondriyal membran depolarizasyonunu arttırmıştır. Hem Klomipramin hem de Kloropiramin hem $IC_{50/2}$ hem de IC_{50} dozlarında Sisplatine kıyasla mitokondriyal membran depolarizasyon %'sini daha fazla arttırdığı belirlenmiştir. Kloropiramin Klomipramin'e göre her iki dozda da depolarize olan hücre %'sini arttırdığı gözlenmiştir.

48 saat sonunda PANC-1 hücrelerinde Klomipramin'in meydana getirdiği mitokondriyal depolarizasyon %'si Sisplatin'e göre $IC_{50/2}$ dozunda ortalama 1.2 kat, IC_{50} dozunda ise ortalama 1.62'lik bir artış göstermiştir. Kloropiramin ise Sisplatin'e göre $IC_{50/2}$ dozunda ortalama 1.1 kat, IC_{50} dozunda ise ortalama 1.5 kat artış göstermiştir. Sisplatin ise doza bağlı olarak depolarizasyon %'sinde bir artış göstermediği belirlenmiştir. 48 saatte en yüksek mitokondriyal membran depolarizasyonu Klomipramin'in IC_{50} dozunda olduğu görülmüştür.

24 ve 48 saatlik mitokondriyal membran depolarizasyon sonuçlarına göre Kloropiramin 24 saatte her iki doz için de daha etkili olduğu gözlemlenirken, Sisplatin ve Klomipramin için 48 saatte her iki doz için daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Tez çalışmamız da A549 ve PANC-1 hücrelerinde 24 ve 48 saat süresi boyunca Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozlarının kaspaz 3 aktivasyonu üzerinde etkileri akım sitometri cihazı ile araştırılmıştır. Kaspazlar ailesinden kaspaz 3 apoptoz mekanizmasının son aşamasında görev alan sonlandırıcı bir enzimdir. Kaspaz-3 dış yolak, iç yolak ve endoplazmik retikulum yolağı üzerinden aktifleşebilmektedir [114].

A549 hücreleri üzerinde yapılan 24 saatlik kaspaz 3 aktivasyonu belirleme çalışmalarında, Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin'in bütün dozlarının aktif kaspaz 3 %'sinde kontrole göre artış gösterdiği tespit edilmiştir. En çok kaspaz 3 aktivasyonu Klomipramin'in IC_{50} dozunda görülmektedir. Klomipramin'in 24 saatte Sisplatin'e göre IC_{50} dozunda, Kloropiramin'e göre hem $IC_{50/2}$ hem de IC_{50} dozlarında daha yüksek aktif kaspaz 3 %'sine sahip olduğu gözlenmiştir. Kloropiramin $IC_{50/2}$ dozunda Sisplatin'den 23 kat daha azken, IC_{50} dozunda 6.5 kat daha azdır.

48 saatlik kaspaz 3 analizi sonuçlarına göre, üç madde de kontrole göre kaspaz 3 aktivasyonu %'sinde artış göstermiştir. Sisplatin'in doza bağlı olarak kaspaz 3 aktivasyonunda artış gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Kloropiramin doza bağlı olarak aktif kaspaz 3 %'sinde bir artış gösterirken, Sisplatine kıyasla artış gözlenmemiştir. Klomipramin ise doza bağlı olarak bir artış göstermiş ve hem Sisplatin'den hem de Kloropiramin'den daha fazla aktivasyon göstermiştir. 48 saatlik aktif kaspaz 3 analizinde en yüksek % Klomipramin'in IC₅₀ dozunda görülmektedir.

24 ve 48 saatlik kaspaz 3 aktivasyonu değerlendirildiğinde Sisplatin ve Klomipramin'de herhangi bir artış görülmemiştir. Kloropiramin de ise önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Kaspaz 3 aktivasyonu üç madde içinde 24 saatte daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Klomipramin A549 hücresi için en aktif sonucu 24 saatte vermesi nedeniyle hem Annexin V-PI analizi ile hem de JC-1 analizi ile paralellik göstermektedir. Ancak Klomipramin ile PANC-1 hücrelerinde yapılan Annexin V-PI analizi ile paralellik gösterirken, JC-1 analizinde göstermemiştir. Kloropiramin'in A549 hücreleri ile yapılan Annexin V-PI analizi ile paralellik göstermiş ancak JC-1 analizinde göstermemiştir. Kloropiramin ile PANC-1 hücrelerinde yapılan Annexin V-PI, JC-1 ve kaspaz 3 analizi hepsinde uyum göstermiştir. Sisplatin ise PANC-1 hücrelerinde Klomipramin ile benzerlik göstermektedir. Ancak A549 hücrelerinde Annexin V-PI analizi ile paralellik gözlenirken, JC-1 analizinde gözlenmemiştir.

Bilir ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Klomipramin HL-60 insan miyeloid lösemi hücrelerinde ROS seviyesini artırarak kaspaz 3 aktivasyonunun artmasını sağladığı ve böylece apoptozu indüklediği belirtilmiştir [125].

Xia ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Klomipramin'in C6 fare glioma hücrelerinde sitokrom c salınımı ile kaspaz 3 aktivasyonuna neden olarak apoptoza sürüklediği bildirilmiştir [81]. Daley ve arkadaşlarının yürüttüğü bir başka çalışma da ise Klomipramin'in etkisi insanlardan biyopsi ile alınan glioblastoma hücrelerinin primer kültür haline getirilip, araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda Klomipramin'in solunum zincirindeki kompleks III'e bağlandığını ve oksijen tüketimini azalttığı böylece kaspaz 3 aktivasyonuna neden olduğu belirtilmiştir [83].

Çalışmamızda Kloropiramin'in apoptotik etkilerini araştırmak için kullandığımız A549 ve PANC-1 hücreleri ile ilgili herhangi bir literatür bulunmamaktadır. Bu nedenle bulgularımız bu kanser hücrelerindeki etkileri göstermesi bakımından bir ilktir. Ancak kaspaz yolağındaki kaspaz-3 enzimini aktifleştirmesi bakımından benzerlik göstermektedir. Ayrıca mitokondriyal membran potansiyelinde bozulmaya neden olarak içsel yolağı aktifleştirdiğini düşündürmektedir.

A549 ve Panc-1 hücrelerinin morfolojik değişimlerinin gözlemlenebilmesi için 24 ve 48 saat süre boyunca Sisplatin, Klomipramin ve Kloropiramin ile muamele edilmiştir. Bu süreler sonunda hücreler DAPI(mavi) ve MitoTracker CMXRos(kırmızı) boyası ile boyanarak konfokal mikroskobunda morfolojik değişimleri görüntülenmiştir. Dapi ölü hücrelerde çift zincirli DNA'yı ya da RNA'yı boyayan bir boyadır [126]. Bu nedenle kontrol hücrelerinde DAPI boyaması ya gözükmemekte ya da mat gözükmektedir. Hücrelerde kromatin kondensasyonu, böbrek şeklini alma tipik apoptotik belirteçlerindendir. A549 ve PANC-1 hücrelerine 24 ve 48 saatlik madde uygulaması sonucunda her iki dozda da çekirdekler de kromatin kondensasyonu ve böbrek yapısı görülmektedir. Kontrol grubunda ise DAPI boyanmamış ve mitokondriler normal şeklindedir.

Mitokondri fizyon ve füzyon arasındaki hassas bir denge ile düzenlenen bir hayli dinamik bir organeldir. Mitokondriyal fizyonun bozulması mitokondriyal ağın çökmesine neden olurken, mitokondriyal füzyontaki kusurlar mitokondriyal parçalanmaya ve mitokondriyal DNA kaybına yol açar. Böylece hücre ölüm yoluna gider [127].

A549 hücrelerinin 24 saatlik morfolojik değişimleri geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. A549 hücreleri kontrol grubunun morfolojisi incelendiğinde; çekirdeğin normal konumunda olduğu, çekirdek zarının sağlam olduğu, membran bütünlüğünün bozulmadığını ve genel olarak hücrelerin normal hücre yapısına sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.53).

Pozitif kontrol olarak kullanılan Sisplatin'in (IC_{50}) A549 hücreleri üzerindeki 24 saatlik morfolojik görüntülerini incelediğimizde (Şekil 3.54), apoptotik bleblerin oluştuğunu, membran rüptürü olduğunu hatta membran yapısının kaybolduğu ve vakuollerin oluştuğu gözlenmiştir. Ayrıca hücre morfolojisinde kontrol grubuna göre bir yuvarlaklaşma olduğu tespit edilmiştir.

Klomipramin'in (IC_{50}) A549 hücreleri üzerindeki morfolojik değişimleri Şekil 3.55'de de gösterildiği üzere, apoptotik bleblerin oluştuğu, membran bütünlüğünün bozulduğu, lizozomların aktifleştiği ve otofagozom oluştuğu gözlenmektedir. Lizozomların aktifleşerek otofagozom oluşturması otofajinin ana göstergelerinden birisidir [129]. Klomipramin'in otofagozomlar oluşturması otofajiyi aktifleştirerek hücreleri ölüm yolağına sürükleyebileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda apoptotik bleblerin oluşması, membran rüptürü ve çekirdeğin kaybolması apoptoza da neden olduğunu göstermektedir.

A549 hücre hattının Kloropiramin (IC_{50}) ile 24 saatlik muamelesi sonucunda, lizozomların aktifleştiği, otofagozomların oluştuğu, çekirdeğin kenara çekildiği, apoptotik bleblerin oluştuğunu ve membranda rüptür meydana geldiği gözlenmiştir

(3.56). Bu gözlemler, Kloropiramin'in A549 hücrelerini apoptoza ve beraberinde otofajiye sürüklediğini düşündürmektedir.

PANC-1 hücre hattının 24 saat sonundaki morfolojik görüntüleri geçirimli elektron mikroskobu ile gözlenmiştir. Bu süre sonunda PANC-1 hücrelerinin ilaçla muamele edilmemiş olan kontrol grubu normal morfolojisinde gözlemlenmiştir. Hücre iğsi formda, çekirdek zarı sağlam bir şekilde ve normal konumunda yer almaktadır. Herhangi bir membran rüptürü gözlenmemiştir (Şekil 3.57).

Sisplatin'in (IC_{50}) PANC-1 hücreleri üzerindeki 24 saatlik morfolojik görüntülerini incelediğimizde (Şekil 3.58), vakuollerin oluştuğunu, lizozomların aktifleştiği ve otofagozomların oluştuğunu, çekirdekte kontrol grubuna göre değişimlerin meydana geldiği sonucuna ulaşılmıştır.

PANC-1 hücrelerinin Klomipramin'in (IC_{50}) ile 24 saatlik muamelesi sonucunda lizozomların aktifleştiğini, çekirdek zarının ve hücre membranının kaybolduğu gözlenmiştir.

Kloropiramin (IC_{50}) ile 24 saatlik inkübasyon sonucunda PANC-1 hücrelerinde, çekirdek yapısının kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde değiştiği ve lizozomların aktifleştiği görülmektedir.

Bu gözlemler sonucunda Klomipramin ve Kloropiramin'in PANC-1 hücre hatları üzerinde hem apoptotik ve hem otofajik etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Rossi ve ekibinin yaptıkları validasyon ve analiz sonuçlarında Klomipramin'in Hela ve MEF hücre hatlarında otofaji regülatörü olarak iş yaptığını belirtmişlerdir [130]. Xia ve arkadaşları, insan periferik lenfositlerinde ve lenfoblastoid hücrelerinde Klomipramin ile yaptıkları çalışmalarında apoptozu indüklediğini belirtmişlerdir [82]. Bu sonuçlar bizim çalışmamızın sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tezdeki çalışmalar ve öngörüler doğrultusunda Klomipramin'in hem PANC-1 hücre hattı üzerinde hem A549 hücre hattı üzerinde hem doz hem de zamana bağlı olarak hücre ölümleri üzerinde (apoptoz, otofaji, nekroz) iyi bir sonuç verdiği gözlenmiştir. Kanser hastalarında kemoterapi uygulanması esnasında hastalarda gözlenen depresyon tedavisinde kullanılan Klomipramin'in aynı zamanda kanser tedavisine de katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Tekli ya da kombine ajanlar ile çalışılarak etkisinin artırılabilir ve antikanser ilaçların keşfine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Kloropiramin kanserli hücre hatları üzerinde Klomipramin kadar etkili bir sonuç vermemiş olmasına rağmen sağlıklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin çok az oluşu nedeniyle çeşitli ajanlar ile kombinlenerek, etki mekanizması aydınlatılarak hedeflendirilebilir ve apoptotik etkili bir ilaç olarak kullanılabilir. Böylece günümüz

antikanser ilaçlarının en büyük sorunu olan sağlıklı dokuya zarar vermenin minimuma indirilebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

- [1] Dholakia, S.P., Suhagia, B., Patel A., Kapupara, P.P., and Sureja, D.K. (2011). Review: novel target for cancer therapy. *J Chem Pharm Res*, 3(4):315-32.
- [2] Vivek, R.Y., Prasad, S., Sung, B., and Bharat, B.A. (2011). The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. *International Immunopharmacology*, 11:295–309.
- [3] Kayaalp S.O. (1998). Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçları. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 1(8), 1007- 1072.
- [4] GIBBS, JB. (2000). Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research. *Science*, 287, 1969-19.
- [5] Yılmaz H.H., Yazıhan, N.D., Tunca, A., Sevinc, E., Olcayto, N., and Ozgul Tuncer, M., (2011). Cancer Trends and Incidence and Mortality Patterns in Turkey, *Jpn J Clin Oncol*, 41(1), 10–16.
- [6] *TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ*, (2016).
- [7] OZ, B., and Kepil, N. (2007). Akciğer Karsinomlarının Patolojisi. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*, 58, 119-122.
- [8] WANG, C., Zhang, H., Chen, Y., Shi, F., and Chen,B. (2012). Gambogic acid-loaded magnetic Fe₃O₄ nanoparticles inhibit Panc-1 pancreatic cancer cell proliferation and migration by inactivating transcription factor ETS1. *Int J Nanomedicine*, (7), 781-787.
- [9] Gnoni, A., Licchetta, A., Scarpa, A., Azzariti, A., Brunetti, A., Simone, G., Nardulli, P., Santini, D., Aieta, M., Delcuratolo, S., and ve Silvertes, N. (2013). Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursor lesions. *Int J Mol Sci*, 30;14(10), 19731-62.
- [10] Hitchings, G.H., (1983). Rational design of anticancer drugs: here, imminent or illusive. In,Development of Target-Oriented Anticancer Drugs. *Progress in Cancer Research and Theraphy*. (28). 227-238.
- [11] TANG, H.L., Yuen, K. L., Tang, H.M., and Fung, M., (2009). Reversibility of apoptosis in cancer cells. *British Journal of Cancer*, 100, 118.
- [12] Austoker, J., Bankhead, C., Forbes, L., Atkins, L., Martin, F., Robb, K., Wardel J., ve Ramirez, A. (2009). Interventions to promote cancer awareness and earlypresentation: systematic review. *British Journal of Cancer*, 101(S3) S31-S39.

- [13] COŞKUN, G., and ÖZGÜR, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ARŞİV* 20: 145.
- [14] Kasibhatla, S., ve Tseng, B. (2003). Why Target Apoptosis in Cancer Treatment?, *Maxim Pharmaceuticals, (2)*, 573–580.
- [15] Florea, A. M., and Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*, 1/23, 1351-1371.
- [16] Blake, D. M., Maness, P.C., Huang, Z., Wolfrum, E. J. And Huang, J. (1999). The National Renewable Laboratory, application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells. *Seperation and Purification Methods*, 28(1),1-50.
- [17] Hyland, K. M. Tumor Suppressor Genes and Oncogenes: Genes that Prevent and Cause Cancer, *Biochemistry/Molecular Biology Lecture*.
- [18] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008). Molecular Biology of the Cell. *Garland Science*, 5th Edition.
- [19] Almond, J., and Cohen, G.(2002). The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* , 16, 433-43.
- [20] Dick, L. R., and Fleming, P.E. (2010). Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 15, 5-6.
- [21] Cancer Facts & Figures. (2016). Special Section: Cancer in Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders. *Cancer Facts & Figures*, 25.
- [22] Wolfgang, C. L., Herman, J., Laheru, D., Klein, A., Erdek, M., Fishman, E., and Hruban, R. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin*, 63(5):318-48.
- [23] Hotchkiss, R. (2009). Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *N Engl J Med*. 361, 1570-1583.
- [24] Galluzzi, L., Maiuri, M., Vitale, L., Zischka, H., Costedo, M., Zitvogel, L., ve Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, (14), 1237-1243.
- [25] Gozuacik, D. ve Adi, K. (2016) Autophagy and Cell Death. *Current Topics in Developmental Biology*, 78. 0070-2153/07.

- [26] Öz Arslan, D., Korkmaz, G., ve Gözüaık, D. (2011). Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(4).
- [27] Golstein, P., ve Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32:37-43 .
- [28] Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., ve Rzeszowska-Wolny, J. (2013). Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 61:43-58.
- [29] Zaru, R., Micheau, O., and Holler, N. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecular. *Nat Immunol*, (1),489–495.
- [30] Vercammen, D., Steemans, M., and Denecker, G. (2001). Death receptorinduced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ* ,(8),829–840 .
- [31] Gewies, A. (2003). Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, 1-26.
- [32] Gerschenson, L., and Rotello, R. (1992). Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J*, (6), 2450-55.
- [33] Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30:87.
- [34] Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495–516.
- [35] Ashe, P. C., and Berry, M. D. (2003). Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27, 199– 214.
- [36] Guicciardi M., and. Gores, G. (2009). The Death Receptor Pathway. *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*, 119-150.
- [37] Ashkenazi, A., and Dixit, V.,(1998). Death receptors: signaling and modulation, *Science*, 281, 1305-1308.
- [38] Cory, S., and Adams, J.M., (2002). The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2, 647-656 .
- [39] Campello, S., ve Scorrano, L., (2009). The mitochondrial pathway: focus on shape changes, *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*, 151-175.

- [40] Wang, X., (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes, Development*, 15, 2922-2933.
- [41] Indran, I.R., Tufo, G., Pervaiz S., and Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Bioenergetics of Cancer*, 735–745.
- [42] Logue, S. E., Gorman, A. M., Cleary, P., Keogh N., and Samali, A. (2013). Current Concepts in ER Stress-Induced Apoptosis. *J Carcinogene Mutagene*, 6.
- [43] Tabas, I. and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stres, *nature cell biology*, 3.
- [44] Sefa, Ç., Şen, S., and Hazman, Ö. (2015). Endoplasmik Retikulum Stresine Cevap Yolakları ve Tip 2 Diyabet Patogenezinde Endoplasmik Retikulum Stres Aracılı Beta Hücre Apoptosisinin Rolü, *Kocatepe Medical Journal*, 16, 227-237.
- [45] Seydel, Ş., and Aksoy, K. (2012). Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis Mechanisms, *Archives Medical Review Journal*, 21(4), 221-235.
- [46] Li, j., and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond, *Oncogene*, 27.
- [47] Papaliagkas, V., Anogianaki, A., Anogianakis, G., and Ilonidis, G. (2007). The proteins and the mechanisms of apoptosis: A mini-review of the Fundamentals, *HIPPOKRATIA*, 11, 3: 108-113.
- [48] Reed, J. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157, 1415-1430 .
- [49] Akşit, H., and Bildik, A. (2008). Apoptosis. *YYÜ. VET. FAK. DER*, 19(1), 55-63.
- [50] Kandaş, N. (2004). Apoptosis, Programlı Hücre Ölümü, *Ankara Üniv. Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 5(1), 7-10.
- [51] Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, M., and Rehemtulla, A. (2001). Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system, *Oncogene*, 20 (2), 167-77.
- [52] Pınarbaşı, E. (2007). Apoptosiz (Programlı Hücre Ölümü) Moleküler Biyoloji, (Ed: Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.). *Nobel Yayın Dağıtım*, 423-467.
- [53] Middendor, J.J.V., Sanchez, G. M., and Burrridge, A.L. (2010). The Edwin Smith papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries. *Eur Spine J*, 19, 1815–1823 .

- [54] Özbek Güni, Ö., Özşenol, F., Oysul, K., and Beyzadeoğlu, M. Kanser Tedavisinde Radyoterapi Uygulanan Hastaların Psikososyal Durumu ile Etkilenen Sistemler Arasındaki ilişkinin Değerlendirilmesi. *GATA Radyasyon Onkolojisi A.D.*
- [55] Auyang, Y. (2006). Cancer Causes and Cancer Research on Many Levels of Complexity, <http://www.creatingtechnology.org/biomed> (Erişim tarihi: 24.01.2017)
- [56] Mucci, A., Wedren, S., Tamimi, M., Trichopoulos, D., and Adami, O. (2001). The Role Of Gene – Environment Interaction in the Aetiology of Human Cancer. *Journal of Internal Medicine J*, 289, 1711 – 1715.
- [57] Sharon, P., and Ephrat, L. (2003). A Risky Business – Accessing Breast Cancer Risks. *Science*, 302, 574 – 575.
- [58] Freter, C., and Perry, M., (2008). Principles of chemotherapy. In: The Chemotherapy SourceBook. 4nded.(Ed.:M.C. Perry), philedelpia, 30-37.
- [59] Oh, K., and Baik, H. (2009). The reversal of drug-resistance in tumors using a drug-carrying nanoparticulate system. *Int. J. Mol. Sci*, 10, 3776-3792.
- [60] <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-tedavisi/36-radyasyon.html>. (Erişim tarihi: 24.01.2017)
- [61] Carroll, W.L., and Finlay, J. (2010). Cancer In Children And Adolescents. United Kingdom: *Jones and Bartlett Publishers*.
- [62] Atıclı, E. (2007). Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk onkoloji dergisi*, 22:197-204.
- [63] İçli, F. (1997). Ankara Tıbbi onkoloji. *Anıtip A. Ş.Tıp kitapları*.
- [64] Erkurt, M., Kuku, İ., Kaya, E., and Aydoğdu, İ. (2009). Kanser kemoterapisi ve böbrek. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16, 63-68.
- [65] Arslan, S. (2000). Kanserli Hastalarda Yaşam Kalitesinin Değerlendirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahi Hastalıkları Hemşireliği Anabilim Dalı*.
- [66] Hasler, G.(2010). Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians?. *World Psychiatry*, 9,155-161.
- [67] Kayaalp, O. (2009). Akılcı Tedavi Yönünde Tıbbi Farmakoloji. *Ankara: Pelikan Yayınevleri*, 12. Baskı, 770-795.
- [68] Duman, R., Heninger, G., and Nestler, E. (1997). Molecular and Cellular Theory of Depression. *Archives of General Psychiatry*, 54(7), 597-606.

- [69] Kayaalp, O. (2002). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. *Hacettepe-Taş Yayınevi* ,10. Baskı, 6, 890-915.
- [70] Erkekoğlu, P., Giray, B., and Şahin, G. (2008). Trisiklik antidepresanların riskli gruplarda kullanımının toksikolojik açıdan değerlendirilmesi. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39:22-30.
- [71] Gareri, P., Falconi, U., De Fazio, P., and De Sarro, G. (2000). Conventional and new antidepressant drugs in elderly. *Prog Neurobiol*, 61, 353-96.
- [72] Flint. AJ., (1997). Pharmacological treatment of depression in late life. *Can Med Assoc*, 157, 1061-7.
- [73] Baldessarini, R. (1996). Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff P, eds. *Goodman and Gilman's the pharmacological of the therapeutics. 9th ed.*New York: Mcgraw-Hill Press, 431-59.
- [74] Sengwee, T., Luis, A., Rodriguez, G., and Hernandez-Diaz, S. (2007). Use of antidepressants and risk of lung cancer. *Cancer Causes Control*, 18, 1055–1064 (DOI 10.1007/s10552-007-9045-1).
- [75] Linstead, D., and Wilkie, D. (1971). A comparative study of in vivo inhibition of mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae* by tricyclic and other centrally- acting drugs. *Biochem Pharmacol*, 20, 839-46.
- [76] Wilkie, D. (1979). Antimitochondrial drugs in cancer chemotherapy: preliminary communication. *J Roy Soc Med*, 72: 599-601.
- [77] Rooprai, H., Christidou, M., and Pilkington, G. (2003). The potential for strategies using micronutrients and heterocyclic drugs to treat invasive gliomas. *Acta Neurochir (Wien)*, 145, 683-90.
- [78] Eto, K., Fukuda, T., Araki, Y., Inoue, B., and Ogata, M. (1985). Effect of tricyclic drugs on mitochondrial membrane. *Acta Med Okayama*, 39, 289-95.
- [79] Orrenius, S. (2004). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett*, 149, 19-23.
- [80] Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-14.
- [81] Pilkington, G. J., Akinwunmi, J., and Amar, S. (2006). The role of tricyclic drugs in selective triggering of mitochondrially-mediated apoptosis in neoplastic glia: a therapeutic option in malignant glioma?. *Radiol Oncol*, 40(2), 73-85.

- [82] Xia, Z., Bergstrand, A., DePierre, J., and Nassberger, L. (1999). The antidepressants imipramine, clomipramine and citalopram induce apoptosis in human acute myeloid leukemia HL- 60 cells via caspase-3 activation. *J Biochem Mol Toxicol*, 13, 338-47.
- [83] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clomipramine_hydrochloride . (Erişim tarihi: 24.01.2017)
- [84] Daley, E., Wilkie, D., Loesch, A., Hargreaves, I., Kendal, D., Pilkington, G. (2005). Chlorimipramine: a novel anticancer agent with mitochondrial target. *Biochem Biophys Res Commun*, 328, 623-32.
- [85] Z. Xia, Lundgren, B., Bergstrand, A., DePierre, J., and Nassberger, L. (1999). Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Biochem Pharmacol*, 57, 1199-208.
- [86] Gil-Ad, I., Zeldich, E., Dayag, M., and Levkovitz, Y. (2005). Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines: evidence for p-c-Jun, cytochrome c, and caspase-3 involvement. *J Mol Neurosci* , 27, 29-42.
- [87] Salihođlu Dođan, Z. (2009). Rejyonel Anestezi Uygulanan Hastalarda Difenhidraminin Sedasyon Ve Postoperatif Analjeziye Etkisi. *Uzmanlık Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakóltesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı* .
- [88] Parsons, M., and Ganellin, C. (2006) Histamine and its receptors. *British Journal of Pharmacology*, 147, 127–135.
- [89] Estelle, F., Simons, R., and Simons, K.J. (2008). H1 Antihistamines Current Status and Future Directions, Review article, *WAO Journal & September*, 145-155.
- [90] Leurs, R., Church, M., and Taglialatela, M. (2002). H1-antihistamines: inverse agonism, antiinflammatory actions and cardiac effects. *Clin Exp Allergy*, 32(4), 489-98.
- [91] Brunton, L. (2008). Tedavinin farmakolojik temeli: Goodman & Gilman., İstanbul: Nobel Tıp, 629.
- [92] Camelo-Nunes, I.C. (2006). New antihistamines: a critical view. *J Pediatr (Rio J)*, 82(5), 173-80.

- [93] Carson, S., Lee, N., and Thakurta, S. (2010). Drug Class Review: Newer Antihistamines: Final Report 2. Portland (OR).
- [94] Golightly, L., and Greos, L. (2005). Second-generation antihistamines: actions and efficacy in the management of allergic disorders, *Drugs*, 65(3), 341-84.
- [95] Kiremitçi, Ü. (2004). Antihistaminikler ve dermatolojide kullanımı, *İstanbul Tıp Dergisi*, 4, 25-28.
- [96] Jangi, S., Díaz-Pérez, J., Ochoa-Lizarralde, B., Gardeazabal, J., Díaz-Ramón, J., and Boyano, M. (2006). H1 histamine receptor antagonists induce genotoxic and caspase-2-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Carcinogenesis*, 27(9), 1787-1796.
- [97] Snyder, R. (1998). A review and investigation into the mechanistic basis of the genotoxicity of antihistamines. *Mutation Research*, 411, 235–248.
- [98] Turner, N., Woolley, J., Hozier, J., Sawyer, J., and Clive, D. (1987). Methapyrilene is a genotoxic carcinogen: studies on methapyrilene and pyrillamine in the L5178Y/TK +/- mouse lymphoma assay, *Mutation Research*, 189(3), 285-297.
- [99] Steinmetz, K., Tyson, K., Meierhenry, E., Spalding, J., and Mirsalis, J. (1988). Examination of genotoxicity, toxicity and morphologic alterations in hepatocytes following in vivo or in vitro exposure to methapyrilene. *Carcinogenesis*, 9, 959-963.
- [100] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloropyramine_hydrochloride. (Erişim tarihi: 24.01.2017)
- [101] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08800>. (Erişim tarihi: 24.01.2017)
- [102] Kurenova, E. V., Hunt, D. L., He, D., Magis, A.T., Ostrov, D.A., and Cance, W.G. (2009). The Small Molecule Chloropyramine Hydrochloride (C4) Targets the Binding Site of Focal Adhesion Kinase and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 and Suppresses Breast Cancer Growth in vivo. *J Med Chem*, 13; 52(15), 4716-4724.
- [103] Burgess, J.T., Bolderson, E., Saunus, J. M., Zhang, S., Reid, L.E., McNicol, A.M., Lakhani, S.R., Cuff, K., Richard, K., Richard, D.J., and O'BYRINE, K.J. (2016). SASH1 mediates sensitivity of breast cancer cells to chloropyramipramine and is associated with prognosis in breast cancer. *Oncotarget*, 7, 45.

- [104] Cance, W., Golubovskaia, V., Kurenova, E., and Ostrov. D. (2008). Focal Adhesion Kinase Protein Binding Inhibitors. Provisional Patent 61/192.
- [105] Garces, C., Kurenova, E., Golubovskaya, V., and Cance, W. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-3 and focal adhesion kinase bind and suppress apoptosis in breast cancer cells [PubMed: 16452200], *Cancer Res*, 66, 1446–1454.
- [106] T. Mossman, «(1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay,» *J. Immunol Method*, pp. 65, 55-63..
- [107] Fotokis, G., and Timbrell, A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171–177.
- [108] Çelik, N. (2011). Farklı polimer membran yüzeylerde sıçan neonatal siyatik sinir hücresi çoğalması. *yüksek lisans tezi. ankara üniversitesi fen bilimLeri enstitüsü* .
- [109] Overbeeke, R., Steffens-Nakken, R., Vermes, I., Reutelingsperger, C., and Haanen, C. (1998). Early Features of Apoptosis Detected by Four Different Flow Cytometry Assays. *Apoptosis*, 3(2), 115-121.
- [110] Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S., and Yan, G. (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotcheniques*, 23, 525-531.
- [111] Boğa, C. (2009). Akım sitometri ile apoptozis tayini. Sözer O, Ed. Klinik ve pratikte akım sitometri. *Haberal Eğitim Vakf*, 155-158.
- [112] <http://www.dojindo.com/store/p/847-Annexin-V-FITC-Apoptosis-Detection-Kit.html>. (Erişim tarihi: 24.01.2017)
- [113] Chen, T.K., Ming, J., Bing, C., Chien, C., Che, M., Shiow, L., and Chien, H. (2008). Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, Bad activation, and mitochondrial dysfunction, *Toxicology Letters*, 177, 48-58.
- [114] Kaufmann, S., and Hengartner, M. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol*, 11, 526-34.
- [115] Slee, E., Adrain, C., and Martin, S. (2001). Executioner caspases-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276 :7320-6.
- [116] Kapuscinski, J. (1990). Interaction of nucleic acid with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes. *J. Histochem. Cytochem*, 38, 1323-1329.

- [117] Kapuscinski, J., Darzynkiewicz, Z., and Melamed, M. (1982). Luminescence of the solid complexes of acridine orange with RNA. *Cytometry*, 2, 201-211.
- [118] Claxton, N. S., Fellers, T. J., and Davidson, M. W. (2005) Laser scanning confocal microscopy. *Florida State University Unpublished*, 37.
- [119] <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01306.pdf> (Erişim tarihi: 24.01.2017)
- [120] <https://media.cellsignal.com/pdf/9082.pdf> (Erişim tarihi: 24.01.2017)
- [121] Cotter, T. And Martin, S. (1996). Techniques in Apoptosis (A User's Guide). *Portland Press, London*.
- [122] Ruska, E. (1986). The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Nobel Lecture*.
- [123] Boer, P.D., Hoogenboom J.P., and Giepmans, B.N. (2015). Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up!. *nature methods*, 6,12.
- [124] İşcan, A. (2013). Elektrostimulasyon Mesobuthus gibbosus Akrep Türüne Ait Venom Bezi Yapısı Üzerindeki Etkisinin Işık ve Elektron Mikroskobu ile Araştırılması, *Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi*.
- [125] Thatia, B., Noblea, A., Creavena, B. S., Walsha, M., McCanna, M., Devereuxa, M., Kavanagha, K., and Egan, D. A. (2009). Role of Cell Cycle Events and Apoptosis in Mediating the Anti-Cancer Activity of a Silver(I) Complex of 4 Hydroxy-3-nitro-Coumarin-Bis(phenanthroline) in Human Malignant Cancer Cells. *European Journal of Pharmacology*, %1 / %22-3, 602, 203-204.
- [126] Bilir, A., Erguven, M., Oktem, G., Ozdemir, A., Uslu, A., Aktas, E., and Bonavida, B. (2008). Potentiation of cytotoxicity by combination of imatinib and chlorimipramine in glioma. *international journal of oncology*, 32,829-839.
- [127] Orłowska, J., Kurczewska, U., Derwinska, K., Orłowski, W., and Orszulak-Michalak, D. (2015). The use of biodegradable polymers in design of cellular scaffolds. *Postepy Hig Med Dosw*, 69:,294-301.
- [128] Akita, M., Suzuki Karasaki, M., Fujiwara, K., Nakagawa, C., Soma, M., Yoshida, Y., Ochiai, T., Tokuhashi, Y., and Suzuki-Karasaki, Y. (2014). Mitochondrial division inhibitor-1 induces mitochondrial hyperfusion and sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *International Journal Of Oncology*, 1901-1912.

- [129] Swanlund, J.M., Kregel, K.C., and Oberley, T.D. (2010). Investigating autophagy: Quantitative morphometric analysis using electron microscopy. *Autophagy*, 6(2), 270–277.
- [130] Rossi, M., Rotblat, B., Ansell, K., Amelio, I., Caraglia, I., Misso, G., Bernassola, F., Cavasotto, C.N., Knight, R.A., Ciechanover, A., and Melino, G. (2014). High throughput screening for inhibitors of the HECT ubiquitin E3 ligase ITCH identifies antidepressant drugs as regulators of autophagy. *Cell Death and Disease*, 2041-4889/14.