



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



HEPG2 HÜCRELERİNDE SELENYUM VE VİTAMİN C'NİN APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Burcu Menekşe ALPASLAN BALKAN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tevhide SEL

2012- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPG2 HÜCRELERİNDE SELENYUM VE VİTAMİN C'NİN
APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Burcu Menekşe ALPASLAN BALKAN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tevhide SEL

2012- ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	
İçindekiler	i
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Vitamin C	1
1.1.1. Vitamin C'nin Kimyasal Yapısı	2
1.1.2. Vitamin C'nin Fonksiyonları	3
1.1.3. Vitamin C ve Kanser	5
1.2. Selenyum	6
1.2.1. Selenyumun Kimyasal Yapısı	6
1.2.2. Selenyum ve Kanser	8
1.3. Apoptozis	8
1.3.1. Apoptotik Hücre Ölümü Aşamaları	10
1.3.1.1. Apoptozisin Başlatılması	11
1.3.1.1.1. Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller, Çevresel Yaşam Sinyallerinin ve Büyüme Faktörlerinin Yetersizliği	11
1.3.1.1.2. Ölüm Reseptörlerinin Aktivasyonu (Reseptör-Ligand etkileşmesi)	12
1.3.1.1.2.1. Fas-Fas Ligand Aracılı Apoptozis	13
1.3.1.1.2.2. Tümör Nekroz Faktör (TNF) Aracılı Apoptozis	13
1.3.1.1.3. Sitotoksik T lenfosit Aracılı Apoptozis	14
1.3.1.1.4. Hücrelerin Maruz Kaldığı Dış Etkenler	14
1.3.1.1.5. Hücre İçinden Kaynaklanan Sinyaller	14
1.3.2. Apoptozisin Modülatörleri	15
1.3.2.1. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu	16

1.3.3. Hücrede Oluşan Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler	24
1.3.3.1. Biyokimyasal Değişiklikler	24
1.3.3.2. Morfolojik Değişiklikler	25
1.3.4. Fagositoz	26
1.4. Kanser ve Apoptozis	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	29
2.1. Gereç	29
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	30
2.1.3. Kullanılan Kitler	30
2.1.4. Kullanılan Cihazlar	31
2.2. Yöntem	31
2.2.1. HepG2 Hücre Kültürünün Hazırlanması	31
2.2.2. Quick Cell Hücre Canlılık Testi	32
2.2.3. Hücrelerin Sayımı ve Kaplama Yoğunluğunun Belirlenmesi	33
2.2.4. Kaspaz 1 Kolorimetrik Analizi	34
2.2.5. Kaspaz 3 Kolorimetrik Analizi	36
2.2.6. Kaspaz 9 Kolorimetrik Analizi	38
2.2.7. Bradford Protein Tayin Yöntemi	40
2.2.8. Sitokrom c Tayin Yöntemi	40
2.2.8.1. SDS-PAGE ve Western Blot	41
2.2.9. İstatistik Analiz	43
3. BULGULAR	44
3.1. Farklı Dozlarda Vitamin C Uygulanan HepG2 Hücrelerinde Hücre Canlılık Testi Sonuçları	44
3.2. Farklı Dozlarda Vitamin C Uygulanan HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 1 Aktivitesi	45
3.3. Farklı Dozlarda Vitamin C Uygulanan HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 9 Aktivitesi	46
3.4. Farklı Dozlarda Vitamin C Uygulanan HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 3 Aktivitesi	47
3.5. Organik Selenyumun HepG2 Hücrelerinde Hücre Canlılık Testi Sonuçları	47

3.6. Organik Selenyumun HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 1 Aktivitesi	48
3.7. Organik Selenyumun HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 9 Aktivitesi	49
3.8. Organik Selenyumun HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 3 Aktivitesi	50
3.9. SeO ₂ 'nin HepG2 Hücrelerinde Hücre Canlılık Testi Sonuçları	51
3.10. SeO ₂ 'nin HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 1 Aktivitesi	52
3.11. SeO ₂ 'nin HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 9 Aktivitesi	53
3.12. SeO ₂ 'nin HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 3 Aktivitesi	54
3.13. Na ₂ SeO ₃ 'ün HepG2 Hücrelerinde Hücre Canlılık Testi Sonuçları	55
3.14. Na ₂ SeO ₃ 'ün HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 1 Aktivitesi	57
3.15. Na ₂ SeO ₃ 'ün HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 9 Aktivitesi	57
3.16. Na ₂ SeO ₃ 'ün HepG2 Hücrelerinde Kaspaz 3 Aktivitesi	58
3.17. Farklı Dozlarda Vitamin C Uygulanan HepG2 Hücrelerinde Sitokrom c Sonuçları	59
3.18. Farklı Formlarda Selenyum Uygulanan HepG2 Hücrelerinde Sitokrom c Sonuçları	61
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	74
ÖZET	78
SUMMARY	79
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	87

ÖNSÖZ

Malignant tümörlerin gelişimi hücre proliferasyonundaki bozukluklar veya hücrelerin apoptotik hücre ölümüne gitmesindeki yetersizlikler sonucunda oluşmaktadır.

Apoptozis ya da programlanmış hücre ölümü birçok fizyolojik ve patolojik durumda rol oynayan intrinsik hücre ölümü çeşididir. Hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin sağlanarak doku homeostazının sağlanmasında anahtar düzenleyicidir. Son yıllarda yapılan kanser araştırmalarının sonucunda, apoptozisin hem tümör oluşumunda hem de tedaviye cevapta önemli rol oynadığı belirlenmiştir.

Apoptozis pek çok farklı yolla uyarılabilir. Bu yollar, hücre membranındaki ölüm reseptörlerinin uyarılması, büyüme faktörü eksikliği, toksinler, oksidatif stres, antikanser ajanlar, radyasyon ve hücre dışından fazla miktarda Ca^{++} iyonlarının girişi ya da endoplazmik retikulumdan Ca^{++} 'un sitoplazmaya salınması olarak sıralanabilir.

Güçlü antioksidan özelliğinin yanında Vitamin C (askorbik asit), kanser hücrelerinde prooksidan olarak etki ederek hücrelerde oksidatif stres oluşturur, hücre büyümesini inhibe eder ve yüksek yoğunluklarda apoptozisi indükler. Vitamin C bazı kanser türleri üzerinde koruyucu rolü olduğu gösterilmiş birkaç vitaminden biridir.

Selenyum (Se) insan ve hayvan beslenmesinde esansiyel bir mineraldir. Önceleri toksik ve karsinogenik olarak bilinen selenyum günümüzde yapılan çalışmalar sonucunda memeliler için önemli bir esansiyel iz element olduğu bilinmekle birlikte antioksidan enzim sistemlerinde yer alarak kanser, kardiyovasküler rahatsızlıklar, nörolojik problemler, yaşlanma, tiroid fonksiyonu gibi önemli dejeneratif durumların oluşumunu engellenmesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Çok sayıda epidemiyolojik çalışmada, klinik öncesi araştırmada ve deneysel hayvan modellerindeki çalışmalar Selenyum bileşenlerinin kemopreventif rol oynadığı desteklemektedir.

Apoptoziste en önemli biyokimyasal olaylardan biri endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile DNA'nın kırılmasıdır. Bu enzim Ca^{++} ve Mg bağımlı olduğundan aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekmektedir. Enzim, DNA'yı 180-200 baz çiftlik parçalara ayırarak kırılmalar oluşturur ve jel elektroforezinde merdiven paterninin oluşmasına yol açar.

Apoptozis süresince mitokondri dış membranında geçirgenlik artışı meydana gelir. Bunun sonucunda da mitokondri iç ve dış membranı arasında bulunan sitokrom c ve diğer proteinler sitozole çıkarlar.

Kaspazlar hücrede inaktif prekürsör olarak sentezlenirler. Hücrenin maruz kaldığı apoptotik uyarı ile kaspazlar aktif hale gelir. Apoptoziste görev alan kaspazlar ise kendi aralarında başlatıcı (kaspaz 2, 8, 9, 10, 12) ve efektör (kaspaz 3, 6, 7, 14) olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örn.; aktin, nükleer membran proteini lamin A, DNA rejenerasyonunda rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar.

Bu çalışma kapsamında, bazı kanser türleri üzerinde koruyucu rolü olduğu gösterilmiş birkaç vitamenden biri olan Vitamin C (askorbik asit)'in ve insan ve hayvan beslenmesinde esansiyel bir mineral olan ve çok sayıda epidemiyolojik çalışmada, klinik öncesi araştırmada ve deneysel hayvan modellerindeki çalışmalarda kemopreventif rol oynadığı gösterilmiş Selenyum bileşiklerinin hepatosellüler karsinom hücrelerinden HepG2 hücre hattında invitro koşullarda apoptozis üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Apoptozis belirteci olarak kaspaz 1, kaspaz 3, kaspaz 9 enzim aktivite ve sitokrom c analizleri yapılmıştır.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hilal Karagül Hocam'a, her konuda bana destek olan Biyokimya Anabilim Dalının öğretim üyelerine, katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen tez izleme komitesi üyelerine ve doktora eğitimim süresince desteklerini her zaman hissettiğim Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlileri, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma, hayatımın her aşamasında sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen aileme ve eşime teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	Adenozin di fosfat
AIDS	Edinilmiş immun yetmezlik sendromu
Apaf 1	Apoptozis proteaz aktive edici faktör 1
Asc-S	Askorbil Stearat (Ascorbyl Stearate)
Asp	Aspartik asit
ATP	Adenozin tri fosfat
CARD	Caspase recruitment domain
cm ²	Santimetrekare
CO ₂	Karbondioksit
CTL	Sitotoksik T lenfosit
DED	Death effector domain
DHA	Dehidroksi askorbik asit
DISC	Death-inducing signaling complex
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
ER	Endoplazmik retikulum
FADD	Fas adapter protein with a death domain
FasL	Fas ligand
FBS	Fetal dana serumu
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutatyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IAPs	Apoptozis inhibitörleri
ICE	Interleukin çevirici enzim (Interleukin-1 beta coverting)
IFN	Inducing factor
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	İnterlökin
kDa	Kilodalton
Leu	Lösin
MDA	Malondialdehit
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MTT	Dimethyltiazol
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid

NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NFkB	Nükleer faktör -kB
NGF	Nöron büyüme faktörü (Nerve growth factor)
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
PARP	poli (ADP-Riboz) polimeraz
PBS	Phosphate buffered saline
pNA	p-nitroanilin
ROS	Reaktif oksijen türleri
Se	Selenyum
sFasL	Soluble Fas ligand
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
SOD	Süperoksit dismutaz
sTNF	Soluble tümör nekroz faktör
TNF	Tümör nekroz faktör
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TPA	12-O- tetradekonilforbol-13-asetat
TRADD	TNFR adaptör protein with a death domain
TRAIL	Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Trp	Triptofan
TUNEL	Terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP nick end labeling
Tyr	Tirozin
U.V.	Ultra Virole
WST	Water Solubl Tetrazolium
Val	Valin
Vit C	Vitamin C
µl	Mikro litre
µM	Mikromolar
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Sekil 1.1. L- Askorbik Asidin yapısı	2
Şekil 1.2. Apoptitik süreç	10
Şekil 1.3. Apoptozisin başlamasında rol oynayan hücre içi veya dışı yollar	12
Şekil 1.4. Kaspaz aktivasyon süreci	17
Şekil 1.5. Apoptoziste meydana gelen morfolojik değişiklikler	26
Şekil 3.1. Vitamin C'nin Hücre Canlılık Testi Sonuçları	44
Şekil 3.2. Vitamin C'nin farklı dozlarının kaspaz 1 aktivitesi üzerine etkisi	45
Şekil 3.3. Vitamin C'nin farklı dozlarının Kaspaz 9 aktivitesi üzerine etkisi	46
Şekil 3.4. Vitamin C'nin farklı dozlarının Kaspaz 3 aktivitesi üzerine etkisi	47
Şekil 3.5. Organik Selenyumun Hücre Canlılık Testi sonuçları	48
Şekil 3.6. Organik Se'un Kaspaz 1 aktivitesine etkisi	49
Şekil 3.7. Organik Se'un Kaspaz 9 aktivitesine etkisi	50
Şekil 3.8. Organik Se'un Kaspaz 3 aktivitesine etkisi	51
Şekil 3.9 SeO ₂ 'nin Hücre Canlılık Testi sonuçları	52
Şekil 3.10. SeO ₂ 'in Kaspaz 1 aktivitesine etkisi	53
Şekil 3.11. SeO ₂ 'in Kaspaz 9 aktivitesine etkisi	54
Şekil 3.12. SeO ₂ 'nin Kaspaz 3 aktivitesine etkisi	55
Şekil 3.13. Na ₂ SeO ₃ Hücre Canlılık Testi sonuçları	56
Şekil 3.14. Na ₂ SeO ₃ Kaspaz 1 aktivitesine etkisi	57
Şekil 3.15. Na ₂ SeO ₃ Kaspaz 9 aktivitesine etkisi	58
Şekil 3.16. Na ₂ SeO ₃ Kaspaz 3 aktivitesine etkisi	59
Şekil 3.17. Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde Sitokrom c sonuçları	59
Şekil 3.18. Farklı Formlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde Sitoplazmik fraksiyonuna ait Western blot verilerinin oransal değişimleri	60
Şekil 3.19. Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinin Mitokondrial fraksiyonuna ait Western blot verilerinin oransal değişimleri	61

Şekil 3.20. Şekil 3.20. Farklı formlarda Selenyum uygulanan HepG2 hücrelerinde Sitokrom c sonuçları 61

Şekil 3.21. SeO_2 , Na_2SeO_3 ve Org. Se uygulanan HepG2 hücrelerinde sitoplazmik fraksiyonlara ait Western Blot Analiz verileri 61

Şekil 3.22. SeO_2 , Na_2SeO_3 ve Org. Se uygulanan HepG2 hücrelerinde Mitokondriyal fraksiyonlara ait Western Blot Analiz verileri 62

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Memeli Kaspazların Fonksiyonuna Göre Sınıflandırılması

24

1. GİRİŞ

Vitamin C (Vit C), serbest radikaller tarafından oluşturulan hücrel hasara karşı savunmada rol oynar (Chan, 1993). Güçlü bir antioksidan olan Vit C bazı kanser türlerine karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiş birkaç vitaminden biridir (Head, 1998). Kanserden koruyucu etkinliğinin yanında Vit C'nin malignant hücre hatlarında sitotoksik etkinliği bildirilmiştir (Leung, 1993).

Birçok biyolojik fonksiyon için esansiyel bir element olan Selenyumun epidemiyolojik ve deneysel hayvan çalışmalarında kanserden koruyucu etkisi olduğu gösterilmektedir (Combs, 2004; Knekt, 1998). Kanserden koruyucu etkisinin yanında Selenyum prooksidan etkinlik göstererek kanser hücrelerinde apoptozisi arttırmaktadır (Drake, 2006).

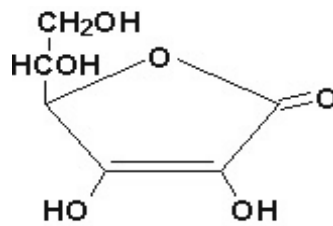
1.1. Vitamin C (Vit C)

Suda çözünen bir madde olan Vit C, enzimatik olmayan antioksidandır (Sinclair ve ark. 1990), diğer suda çözünen antioksidanlar gibi plazmada bulunan radikallere karşı ilk koruyucu sistem olarak hareket eder. Güçlü antioksidan özelliğinin yanında Vit C indirgeyici ajan, serbest radikal yakalayıcı ve enzim kofaktörü olarak önemli fizyolojik olaylarda rol oynamaktadır (Song ve ark., 2001).

Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler (Bekerecioglu ve ark., 1998).

1.1.1. Vit C'nin Kimyasal Yapısı

Vit C, kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Kimyasal yapısı monosakkaritlere benzer. Askorbik asit olarak da adlandırılır. L-askorbik asit ve D- askorbik asit olmak üzere iki şekli vardır. D-askorbik asit inaktiftir. L izomeri ise biyolojik olarak aktif formudur. C vitamini denildiği zaman aktif olan L-askorbik asit anlaşılır (Aras ve ark., 1976).



Şekil 1.1. L- Askorbik Asidin yapısı (Decker and Clarkson, 1999).

Vit C, kuvvetli indirgen bir bileşiktir. Bu özellik enediol (C-2, C-3) hidroksil gruplarından hidrojen atomlarının ayrışmasına bağlıdır. Oksitlenmenin ilk ve reversible ürünü, dehidroaskorbik asittir. Askorbik asit oksitlenmekle iki hidrojen atomunu yitirir ve dehidroaskorbik asit oluşur. Bu reaksiyon geri dönüşümlü olduğundan uygun koşullar altında dehidroaskorbik asidin redüksiyona uğramasıyla yeniden askorbik asit oluşur. Her iki şekilde fizyolojik olarak aktiftir. Hem askorbik asit hem de dehidroaskorbik asit vücut doku ve sıvılarında bulunur (Aras ve ark., 1976).

Askorbik asit bitkilerde ve hayvanlarda sentezlenebilir. Fakat insanlar, primatlar, kobaylar, yarasalar ve bazı balık türlerinde sentezlenemez. Bunun sebebi bunlarda askorbik asit biyosentezinin son reaksiyonunu katalizleyen gulonolakton oksidaz enziminin olmayışıdır. Bu yüzden insanlarda C vitaminin dışarıdan alınması zorunludur (Decker ve Clarkson, 1999).

1.1.2. Vit C'nin Fonksiyonları

Vit C birçok biyolojik fonksiyona sahiptir. Güçlü bir indirgeyicidir. Askorbik asit ile dehidroaskorbik asit bir redoks sistem oluşturur. Standart şartlarda oksidan ve redüktan kapasite eşittir. Ancak fizyolojik şartlarda bu eşitlik sağlanamadığı için elektron vericisi olarak görev yapar. Bu özelliğinden dolayı biyolojik sistemlerde hidrojen taşıyıcısı olarak rol oynamaktadır (Asard ve ark., 2004; Combs, 1998).

Vit C suda çözünen süperoksit, hidroksil radikalleri ve singlet oksijen ile direkt olarak reaksiyona girerek zincir kıran bir antioksidandır (Asard ve ark., 2004; Combs 1998).

Vit C'nin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında prooksidan etki de göstermesidir. Metal iyonları varlığında prooksidan gibi rol oynar. Ferri demiri (Fe^{+3}) ferro demire (Fe^{+2}) indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek sellüler ajandır. Bu yolla proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek fenton reaksiyonunda hidrojen peroksitle etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani süperoksit üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak değerlendirilir (Paolini ve ark., 1999).

İndirgenmiş Glutatyon (GSH) birçok hücrel olayda önemli rol oynayan bir tripeptittir. Hücrelerin serbest oksijen radikallerine karşı korunması hücre içi GSH sistemine bağlıdır. Askorbik asit, E vitaminini redükte forma çevirirken kendisinde oksitlenerek DHA şekline çevrilir. GSH, DHA'yı rejenere ederek askorbik asidin yenilenmesini sağlar. Bu nedenle GSH ile DHA arasında enzimatik olmayan bir etkileşim olduğu ileri sürülmekte ve bir redoks potansiyeli düşünülmektedir. GSH ve DHA arasındaki spontan enzimatik olmayan reaksiyonlar askorbik asidin hücrel konsantrasyonunun sağlanmasında önemlidir ve antioksidan reaksiyonlara katılan askorbik asidin tüketimini engellemektedir (Iqbal ve Khan, 2004).

Vit C organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kollojen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Kemiğin organik matriksi kollojen içerdiğinden kemik oluşumu için Vit C varlığı önemlidir. Kapiller damar çeperinin temel yapı taşında kollojen yer aldığından Vit C eksikliği frajiliteye de yol açar (Iqbal ve Khan, 2004). Ayrıca askorbik asit kan merkezlerini uyararak alyuvarların yapım ve olgunlaşmasında etkilidir (Emadi-Konjin ve ark., 2005).

Midede enzimatik olmayan bir yol ile ferri demiri ferro demire indirgeyerek demirin emiliminde görev alır. Vit C yalnız demirin emilimini değil aynı zamanda demirin kan yapımına katılmasını da kolaylaştırır. İmmünite ve yara iyileşmesinde de etkilidir. Askorbik asidin önemli fonksiyonlarından biri de enfeksiyöz hastalıklara karşı organizmanın direncini artırıcı rolü bulunmasıdır. Bu nedenle bu vitamine antienfeksiyöz vitamin de denmiştir. Antienfeksiyöz etkisini toksinleri inaktive ederek, antikorların yapımını kolaylaştırarak ve lökositlerin bakterileri fagosite etme yeteneklerini artırarak yapar. Bazı bakterilerin etkilerini engelleyici veya yok edici etkisi de vardır (Iqbal ve Khan, 2004). Vit C'nin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir. Solunumsal patlama sırasında nötrofiller C vitamini alırlar ve aktivasyonu takiben Vit C konsantrasyonları azalır. Solunumsal patlama sırasında, reaktif moleküller çevreye yayılarak mutasyonlara, hücre hasarına, inflamasyona sebep olurlar. Vit C reaktif bakterisidal moleküllerin intrasellüler konsantrasyonlarında azalmaya sebep olmadan oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini engeller. Sinir sisteminde antioksidan rolü, diyet ile yüksek miktarda Vit C alınımı ve kanda yüksek düzeyde askorbat bulunmasının felçten ölüm riskini azalttığının tespit edilmesiyle gösterilmiştir (Combs, 1998; Michels ve ark., 2003).

Paolini ve arkadaşları ratlar üzerinde yapmış olduğu çalışmada yüksek doz Vit C uygulamasının, prooksidan etki yaratarak oksidatif strese neden olduğunu göstermişlerdir (Paolini ve ark., 1999).

H₂O₂ membrandan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Serbest radikal olmadığı halde reaktif türler içinde yer alır. Lipit peroksidasyonunu başlatabilen en zararlı ve reaktif tür olan hidroksil radikalini oluşturabilme özelliğine sahiptir. L-929 fibroblast hücre kültürlerine 1 mM hidrojen peroksit uygulandığında, hidrojen peroksidin serbest radikal etkisinden dolayı lipit peroksidasyonu meydana gelmiş ve MDA seviyelerinin arttığı saptanmıştır. Vit C seviyeleri ise güçlü bir antioksidan olarak lipit peroksidasyonunu önlemeye çalıştığı için düşmüştür. 500 µM Vit C ile 1 mM H₂O₂ birlikte uygulandığında MDA seviyesi artmış, bu da askorbik asidin bir prooksidan olarak lipit peroksidasyonunu arttırdığını göstermiştir. Van der Loo ve ark. (2003) genç ve yaşlı ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada C vitamininin lipit peroksidasyonun artmasına bağlı olarak azaldığını ve MDA miktarının ise arttığını bulmuşlardır (Van Der Loo ve ark., 2003).

1.1.3. Vit C ve Kanser

Vit C'nin bazı kanser türleri üzerinde koruyucu rolü olduğu bildirilmiştir. Askorbik asit ve derivelerinin farelerde spontan olarak oluşan meme tümörü ve ultra-viole ışını ile oluşturulan deri kanserinden korumada veya oluşumunu geciktirmede yararlı etkileri gözlemlenmiştir (Pauling, 1991). Ayrıca Askorbik asit esterlerinin meme, deri ve beyin tümörlerinde hücre çoğalmasını ve DNA sentezini inhibe ettikleri bulunmuştur (Pauling, 1991; Naidu ve ark., 1993). Günlük askorbil palmitat alımının 12-O- tetradekonilforbol-13-asetat (TPA) ile oluşturulan tümör gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Smart ve Crawford, 1991). Vit C ratları kimyasallar tarafından oluşturulan hepatokarsinogenezisten korumaktadır (Inric ve ark., 1991). Padayatty ve ark. (2006) başlıca askorbik asit tedavisi ile kontrol altına alınmış 3 malignant tümör vakası bildirmişlerdir (Padayatty ve ark., 2006).

Benzer şekilde askorbik asit bileşiklerinin in vivo antikanser aktivitesi insandaki lösemide gözlenmiştir (Tsao, 1991). İn vivo ortamda Vit C, alkilleyici

ajanlar tarafından oluşturulan mutajenik etkileri belirgin bir şekilde azaltmıştır (Aidoo ve ark., 1994). Asc-S insan pankreas karsinoma hücrelerinde antiproliferatif ve proapoptotik etkiler göstermiştir (Naidu ve ark., 2003). Sakagami ve Satoh (1997) HL60 hücre hattında apoptozisin askorbik asit ile indüklendiğini bildirmişlerdir (Sakagami ve Satoh, 1997).

Genel olarak sitotoksik bir ajan olarak düşünülmesine de, son yıllarda yapılan çalışmalarda farmakolojik dozlardaki (0,3-20 mM) askorbat, askorbat radikalleri ve H₂O₂ oluşumu ile kanser hücrelerinde seçici olarak toksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2005).

1.2. Selenyum

Selenyum (Se) insan ve hayvan beslenmesinde esansiyel bir mineraldir (Wilber, 1980).

1.2.1. Se'un Kimyasal Yapısı

Se, periyodik tabloda VI A alt grubunda yer alan bir elementtir ve aynı grupta yer alan kükürt ile kimyasal özellikleri büyük benzerlik gösterir. Se havada ve suda erimiş olarak, ayrıca toprak ve kayalarda katı halde bulunur. Böylece buralardan bitkilere, mantarlara, bakterilere ve insanlara geçer, sonra tekrar doğaya döner (Buyukakyuz ve ark., 2000).

Önceleri toksik ve karsinojen özelliğiyle bilinen Se, yapılan son çalışmalar sonucunda biyolojik sistemler için önemli ve faydalı bir element olarak değerlendirilmiştir. 1957 yılında Se'un hayvanlar için önemli bir eser element olduğunun bulunmasının ardından, deneysel olarak oluşturulan karaciğer

tümörlerinin Se verilmesiyle tümör insidansında % 50 oranında bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Foster ve Sumar, 1997).

İnsanlarda görülen ve Se ile ilişkili pek çok hastalık mevcuttur. Bunlar arasında artrit, katarakt, kistik fibrozis, kas distrofisi, fenilketonüri, Down sendromu, bronkopulmoner displazi, hemolitik anemi, multiple skleroz, gece körlüğü, defektif immun cevap, malarya ve çocuklarda ani ölüm sendromu (sudden infant death) sayılabilir (Foster ve Sumar, 1997).

Se bazı metabolik hastalıkların ve kanser türlerinin önlenmesinde rol oynayan antioksidan özellikteki glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin yapısında bulunur. Se'un biyolojik önemi bu enzimin bir ko-faktörü olmasından kaynaklanmaktadır. Her alt ünitesinde selenosistein şeklinde bir adet Se atomu içeren GSH-Px, hücre içinde hidrojen peroksitin (H_2O_2) suya indirgenmesinde rol oynamaktadır. Se, E vitamini ile etkileşerek lipid metabolizması sonucu oluşan peroksitlerin neden olduğu oksidatif hasarlardan hücre membranını korumaktadır (Gebre-Medhin ve ark., 1984).

Önceleri toksik ve karsinojenik olarak bilinen Se günümüzde yapılan çalışmalar sonucunda memeliler için önemli bir esansiyel iz element olduğu antioksidan enzim sistemlerinde yer alarak kanser, kardiyovasküler rahatsızlıklar, nörolojik problemler, yaşlanma, tiroid fonksiyonu gibi önemli dejeneratif durumların oluşumunu engellenmesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Schomburg ve ark., 2004). Se tiroid hormon metabolizması, antioksidan savunma sistemi ve immun fonksiyon gibi bir çok hücrel fonksiyon için gereklidir (Brown ve Arthur, 2001).

1.2.2. Se ve Kanser

Birçok biyolojik fonksiyon için esansiyel bir element olan Se'un epidemiyolojik ve deneysel hayvan çalışmalarında kanserden koruyucu etkisi olduğunu gösterilmektedir. Kanserden koruyucu etkisinin yanında Se prooksidan etkinlik göstererek kanser hücrelerinde oksidatif stres yaratmaktadır (Drake, 2006).

Se biyolojik sistemlerde genellikle organik formda bulunur. Besinlerde selenometiyonin, Se-metil-selenosistein, selenosistein ve Se'un disülfid dimeri selenosistin olmak üzere birçok inorganik Se formu belirlenmiştir (Björnstedt ve ark., 1997). Selenoamino asitler, selenoproteinler ve sentetik organik Se bileşenleri gibi bazı organik Se bileşenlerinin kanserden koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2008; Rayman, 2000). Birçok klinik öncesi araştırmada, epidemiyolojik ve deneysel hayvan modellerindeki çalışmalarda Se bileşenlerinin kanserden koruyucu rol oynadığı desteklenmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar Se bileşenlerinin kanserden koruyucu aktivitesinin belirlenmesinde uygulanan dozun ve kullanılan Se'un kimyasal yapısının önemini göstermektedir (El-Bayoumy ve Sinha, 2004). Günümüzde Se'un antikanser etkinliğinin gösterilmesinde birçok mekanizma olduğu düşünülmektedir (Whanger, 2004). Bunlar hücre apoptozisi, hücre çoğalmasının inhibisyonu, immune sistem uyarılması ve anjiyogenezisin inhibisyonudur. Bu potansiyel mekanizmalar arasında en çok hücre apoptozisi üzerinde durulmaktadır ve Se bileşenlerinin kanserden koruyucu etkinliği açısından önemli olduğu düşünülmektedir (El-Bayoumy ve Sinha, 2004).

1.3. Apoptozis

Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden ölmesidir (Cohen, 1998). Eski Yunanca apo (ayrı) ve ptosis (düşmek)

kelimelerinin birleşmesiyle ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür (Öniz, 2004).

Bütün yüksek canlılarda apoptozis embriyogenez, gelişme, homeostazis, yenilenme ve tamir olaylarında, organların büyüklüklerinin korunmasında ve organların patofizyolojisinde kritik öneme sahiptir (Kinloch ve ark., 1999). Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bir kısmı sadece birkaç saat yaşar. Deri, gastrointestinal sistem ve immun sistem gibi pek çok dokuda devamlılık apoptozis ve hücre yenilenmesine bağlıdır (Cohen, 1998).

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boyama yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. Apoptozis tanımı, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (Kerr ve ark., 1972). Apoptozisin gelişim biyolojisinde, normal doku yıkımlanmalarında ve immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerdeki rolü ortaya çıktıkça önemi hızla artmıştır (Kinloch ve ark., 1999).

Apoptozis, rejenerasyon ve tamir olaylarında, hücresel homeostazın sağlanmasında ve organ büyüklüklerinin korunmasında önemlidir (Sjöström ve Bergh, 2001). Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz apoptozisle vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Bunların yerine yenileri yapılmaktadır. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneziğine katkıda bulunur (Erdoğan ve Uzaslan, 2003). Görüldüğü gibi apoptozis organizmada doğru bir şekilde işlemelidir. Olmaması gerekirken gerçekleşen veya hızlanmış apoptozis ya da tam tersine yavaşlamış apoptozis organizma için tehlikelidir. Apoptozisin gereksiz yere oluşması veya hızlanması

nörodejeneratif hastalıklara, AIDS’de görülen lenfosit yetersizliğine, insüline bağımlı tip diyabete, hepatit C enfeksiyonuna, miyokard infarktüsüne, ateroskleroza; apoptozisin azalması ise malignite ve otoimmün hastalıklara yol açabilir (Sjöström ve Bergh, 2001).

1.3.1. Apoptotik Hücre Ölümü Aşamaları

Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder.

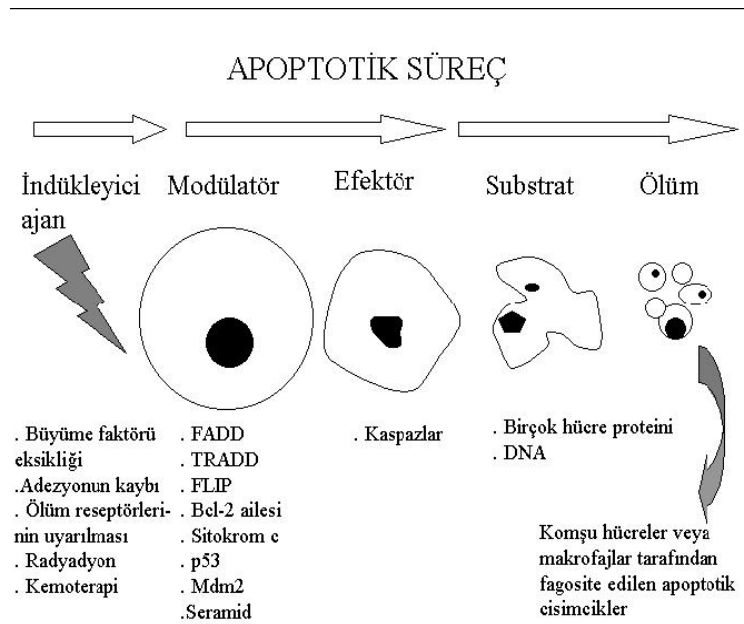
Bu aşamalar;

I) Apoptozun başlatılması,

II) Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu,

III) Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması,

IV) Fagositoz olarak özetlenebilir.



Şekil 1.2: Apoptitik süreç (Anonim, 2012a)

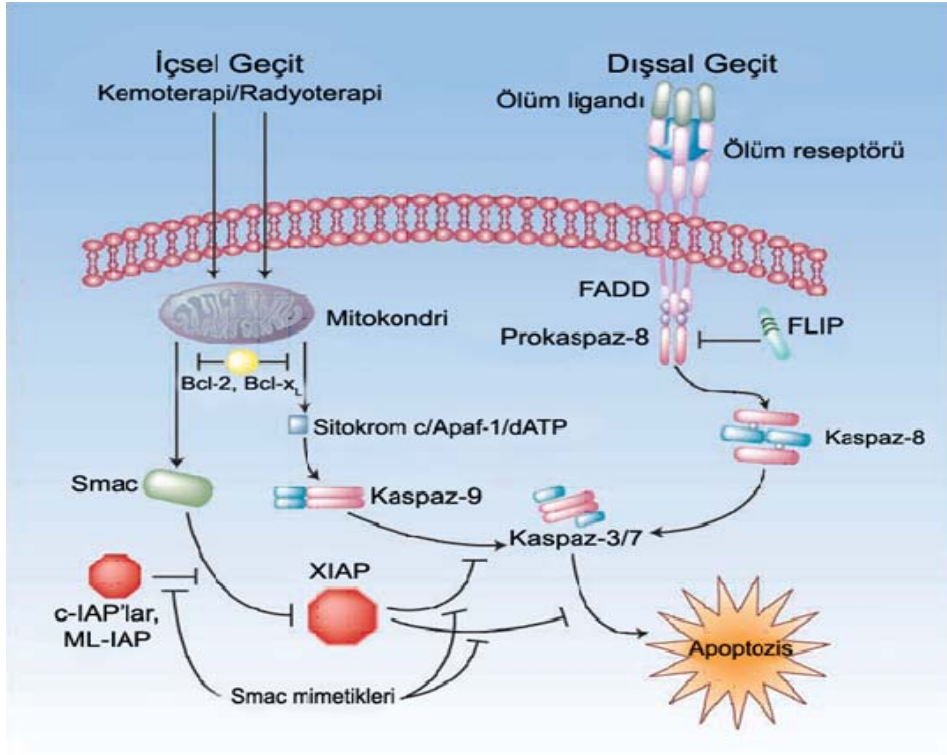
1.3.1.1. Apoptozisin Başlatılması

Hücrenin apoptoza gidebilmesi için ilk önce ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden veya dışından gelebilir (Mountz ve Zhou, 2001; Thompson, 1999). Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde (primer) başlatılabilir ya da bir uyarın sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyarınlar tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi pozitif uyarınlar olabilir. Yapılan çalışmalarda otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirus hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir (Carson ve Ribeiro, 1993).

1.3.1.1.1. Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller, Çevresel Yaşam Sinyallerinin ve Büyüme Faktörlerinin Yetersizliği

Hücreler çevre hücrelerden ve hücre dışı matriksden gelen yaşam sinyallerine ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptoza giderler. Örn; nöronlar “nevre growth factor (NGF)” yetersizliğinde apoptoz gösterebilirler (Hirose ve ark., 1997; Mountz ve Zhou, 2001). Büyüme faktörleri hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanıp sinyal iletimi olaylarını başlatarak hücre bölünmesini pozitif veya negatif yönde etkiler. Bir hücrenin yüzeyinde bulunan reseptörler bu hücrenin hangi faktörlere cevap vereceğini belirler. Böylece pozitif veya negatif uyarınlar, hücre yüzeyindeki reseptörlerin düzenlenmesinde meydana gelen dengesizlikler, hücre siklusunu regülasyonunun kaybına yol açar (Güneş, 1999).

Hücre dışından gelen yaşam sinyalleri düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptozise giderler (Hirose ve ark.,1997).



Şekil 1.3: Apoptozisin başlamasında rol oynayan hücre içi ve dışı yollar
(Vucic ve Fairbrother, 2007)

1.3.1.1.2. Ölüm Reseptörlerinin Aktivasyonu (Reseptör-Ligand etkileşmesi)

Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler (Mountz ve Zhou, 2001).

Apoptozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup TNFR (Tümör Nekroz Faktör Reseptör) ailesidir. Bu reseptör grubunun en az 19 üyesi vardır. Bu reseptörlerin biyolojik etkileri çeşitlidir ve apoptoz ile sınırlı değildir (Thompson, 1999). Bir kısmı apoptoz oluştururken, bir kısmı proliferasyona neden olur. Bir kısmı ise her ikisini de oluşturur. TNRF içinde apoptoz oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNRF1'dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan, "adaptör proteinlere" bağlanır. Adaptör

proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apoptoz için başlatıcı olan kaspazlara (örn: prokaspaz 8) bağlanırlar (Mountz ve Zhou, 2001).

1.3.1.1.2.1. Fas-Fas Ligand Aracılı Apoptozis

Bu tip apoptoz hücre yüzey reseptörü Fas (CD95, APO-1) aracılığı ile oluşur. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, Fas adaptör proteinle (FADD- Ölüm domaini içeren Fas adaptör proteini) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini (Death Inducing Signal Complex - DISC) oluşturur. Bu da prokaspaz 8'in aktifleşmesini sağlar. Fas ligand membrana bağlı veya solubl olabilir. Solubl fas ligand (FasL, CD95L) immun sistem hücreleri tarafından oluşturulur. Bu ligandın T hücreleri membranında bulunan Fas reseptörüne bağlanmasıyla immün reaksiyonla aktive olmuş ve görevlerini tamamlamış olan lenfositler apoptoz ile ortadan kaldırılmış olur (Mountz ve Zhou, 2001).

1.3.1.1.2.2. Tümör Nekroz Faktör (TNF) Aracılı Apoptozis

Bir sitokin olan TNF'nin TNF reseptörleri ile birleşmesi (örn; TNFR1) sonucunda reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TNFR adaptör protein(TRADD - TNFR adaptör protein with a death domain) ile etkileşir. TRADD daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz 8'i aktifleştirerek apoptoza neden olur (Mountz ve Zhou, 2001). Fas reseptörünün aksine, TNFR1'in TRADD'la etkileşmesi her zaman apoptoz ile sonuçlanmaz. TRADD, FADD yerine başka adaptör proteinlere bağlanabilir. Bunun sonucunda önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- κ B (NF- κ B) harekete geçebilir. Bu durumda hücre canlı kalır. Hücrede hangi yolun, nasıl seçildiği açık değildir. Hücrede aktif NF- κ B (bazı tümörlerde bulunur) bulunduğu zaman hücrenin canlı kaldığı düşünülmektedir (Mountz ve Zhou, 2001).

1.3.1.1.3. Sitotoksik T Lenfosit Aracılı Apoptozis

Sitotoksik T lenfositler (CTL) enfekte olmuş olan konakçı hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanırlar. CTL'lerin ana görevi malign ve/veya virus ile enfekte olmuş olan hücrelerin öldürülmesidir (Mountz ve Zhou, 2001). Yabancı antijenleri tanıdıklarında yüzeylerinde Fas ligand oluşur. Hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunurlar. CTL'ler sitoplazmalarında granzyme B (serin proteaz) ve perforin adı verilen, apoptoz oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler (Budd, 2002). Perforin, transmembran por oluşturu bir proteindir. CTL'ler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak, sitoplazmalarına granzyme B salgırlar. Granzim B hedef hücrelere girerek kaspazları aktive eder (Mountz ve Zhou, 2001).

1.3.1.1.4. Hücrelerin Maruz Kaldığı Dış Etkenler

Hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler apoptoza neden olabilirler. Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptoz meydana getirirler (Mountz ve Zhou, 2001).

1.3.1.1.5. Hücre İçinden Kaynaklanan Sinyaller

DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} seviyesindeki artış, hücre içi pH'sında düşme, metabolik ve/veya hücre siklusu bozuklukları gibi hücre içinden gelen sinyaller de hücreyi apoptozise götüren merkezi ölüm sinyallerini oluşturabilir (Turgut ve ark., 2006).

1.3.2. Apoptozisin Modölatörleri

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte modölatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik uyarının çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Bir hücrenin yaşamı, bu hücrenin uygun hücre dışı sinyal almasına bağlıdır. Bu sinyallerin yokluğunda, hücrenin apoptozis ile intihara gittiği düşünülmektedir (Kinloch ve ark., 1999).

Apoptozis sinyalinin iletimini kontrol eden, baskılayan veya aktive eden bir çok modölatör mevcuttur. Bu regölatörlerden bazıları apoptozisin erken evresinde görölmekte ve bunlar hücreyi ölüme hazırlamakta, ölüm efektörlerini aktive etmektedir. Bunlar patojenler tarafından eksprese edilen proteinler (örn; Bcl- 2 ve ilgili proteinler) ve kinazlardır (stres ile aktive edilmiş protein kinazlar) (Kinloch ve ark., 1999).

Bcl-2, 26kDa büyüklüğünde, mitokontriyal, endoplazmik redikulum ve çekirdek çevresi membranlarda yerleşmiş proteinlerdir. ilk kez *Caenorhabditis elegans* (*C. Elegans*) üzerinde yapılmış genetik çalışmalarda Ced-9 adı verilen bir molekülün programlanmış hücre ölümünü engellediği bulunmuştur. Ced-9'un memelilerdeki karşılığı Bcl-2 olarak adlandırılmıştır (Thompson,1995; Cooper, 1994). Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının pro-apoptotik olduğu yani apoptozisi uyardığı (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s); bir kısmının ise anti-apoptotik olduğu yani apoptozisi inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_l) geniş bir ailedir. Bcl-2 ailesinde pro-apoptotik olanlar sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salıverilmesini baskırlar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks) bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2, ve BH3 bölgeleri hidrofobik cebi oluşturur. Amfipatik α -heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğerk bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanırlar. Pro-apoptotik üyeler

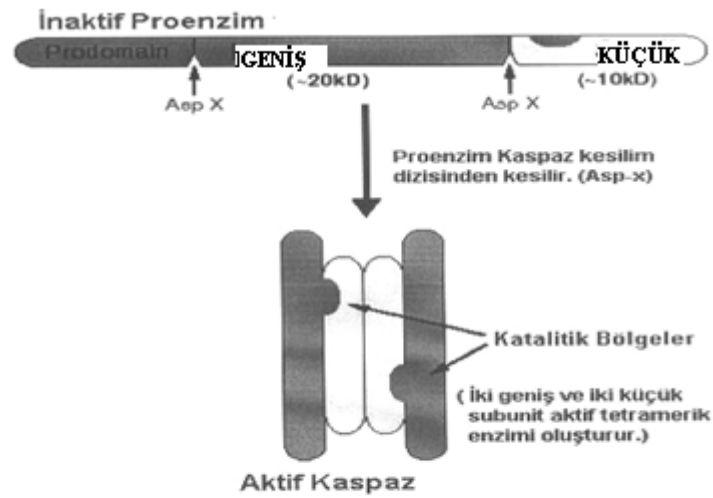
kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt grublardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn; Bax, Bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Bu bölgenin, apoptozisin diğeri hücrel yollarla ilişkisini kurduğu düşünülmektedir. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak "intrinsic" sitokrom c'nin salıverilmesini baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir. Anti-apoptotik bcl-2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri: Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1, pro-apoptotik olanları ise; Bax, Bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid'dir (Petros ve ark., 2004).

1.3.2.1. Hücre içi Proteazların Aktivasyonu

Kaspazlar apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kelime olarak "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs- CASPASE" olarak türetilmiştir. Öncelikle inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilmelerinin ardından hücrel hedeflerdeki tetrapeptit motifleri tanıyarak ve substratı bir aspartat rezidüsünün karboksil tarafından ayırır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok sellüler ve morfolojik değişimler bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gelişir (Nicholson, 1999).

Kaspazlar ilk olarak CED-3 yoluyla keşfedilmiştir. CED-3 bir nematod olan *C. elegans*'ın hücre ölümü için gerek duyduğu genin ürünüdür ve memelilerdeki karşılığı interleukin-1 beta converting enzim (ICE) veya kaspaz 1 bu geniş ailenin ilk tanımlanan üyesidir (Yılmaz ve Pençe, 2002).

Kaspazlar benzer amino asit dizilimine sahip olduklarından, yapısal ve substrat spesifikliği de benzer özellikleri paylaşır. Tüm kaspazlar proenzimler şeklinde üretilirler (30-50 kD), bu durumda kaspazlar 3 kısımdan meydana gelirler ki bunlar NH - terminal kısım, geniş alt ünite (20kD civarı) ve küçük alt ünite (10kD civarı). Proteolitik süreç içerisinde aktivasyona uğrayan kısımlar arasında yani geniş ve küçük alt üniteler arasında heterodimer oluşturacak şekilde birleşmeler açığa çıkar (Thornberry ve Lazebnik, 1998).



Şekil 1. 4. Kaspaz aktivasyonu (Yılmaz ve Pençe, 2002)

Proenzim yapısında ve aktif kaspaz enzim yapısında iki önemli özellik aktivasyonda rol oynar. Birincisi NH- terminal kısım ki burası yüksek değişim gösteren bir dizilime sahiptir ve uzundur, aktivasyonun düzenlenmesini içerir. İkincisi, proenzimden elde edilen tüm kısımlar yani kaspaz konsensüs bölgesidir. Kaspazaların hepsinde benzer özgünlük söz konusudur. Kaspazlar en yüksek özgünlüğe sahip proteazlar arasındadır fakat alışılmadık ve kesin bir şekilde kesme işlemini aspartik asit üzerinden yaparlar. Kaspazların spesiflikleri her ne kadar yüksek düzeyde olsa da, substrat tanımlanmasında her optimal tetrapeptid dizilime sahip proteaz kesilmez. Nedeni üçüncül protein yapısının da substrat tanımlaması üzerine olan etkisidir. Böylece proteinlerin kaspaz yolu ile kesilmesi yalnız spesiflik değil aynı zamanda da yüksek etkinlik gösterir (Thornberry ve Lazebnik, 1998; Wellington, 2000).

Günümüzde memelilerde tespit edilmiş 14 tane kaspaz vardır ve bunlardan 12 tanesi insanda da tespit edilebilmiştir. Fakat bütün hücreler bu enzimlerin hepsini içermemektedir (Coultas ve Strasser, 2000).

Sağlıklı bir hücrelerde kaspazlar inaktif zimojenler şeklinde bulunurlar ve bunların çok az enzimatik aktivitesi vardır. Aktive olabilmeleri için yaklaşık olarak 20kD ve 10kD uzunluğundaki iki parçaya ayrılmalarını sağlayacak spesifik aspartik asit kalıntılarından kesilerek tamamen aktif tetramerik enzim kompleksi şekline gelmeleri gereklidir. Zimojen şeklinde bulunan kaspazların aktivasyonu 2 farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlar otokatalitik proses ve aktif kaspazlar tarafından gerçekleştirilen proteolizisdir (Thornberry ve Lazebnik, 1998; Salvesen ve Dixit, 1999).

Uzun N- terminal bölgeye sahip zimojen kaspazlar CARD (caspase recruitment domain örn; kaspaz 2, 9) ya da DED (death effector domain örn; kaspaz 8, 10) ile etkileşerek adaptörleri ile agraşe olabilirler (örn; CARD'ın Apaf-1, DED'in FADD/MORT1 olduğu gibi). Bu indüklenmiş yakınlık, düşük intrinsik proteolitik aktivite ile birleştiği zaman bu kaspazların otolitik aktivasyonunu teşvik eder (Salvesen ve Dixit, 1999). Bu belirtilen kaspazlar apoptoziste ilk aktive edilen kaspazlardır ve bu sebeple başlatıcı (initiator) kaspazlar olarak adlandırılır (Thornberry ve Lazebnik, 1998; Salvesen ve Dixit, 1999). Kısa pro-domain içeren kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) genellikle başlatıcı kaspazlar tarafından meydan getirilen proteolizis sonucunda aktive edilirler ve hücreler için hayati öneme sahip proteinlerin parçalanmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Cryns ve Yuan, 1998; Thornberry ve Lazebnik, 1998). Bu sebeple bunlar sonlandırıcı (efektör) kaspazlar olarak adlandırılırlar. Farklı kinetiklere sahip olsa da apoptozis süresince birçok kaspaz aktive olur. Bu sebeple önemli olan apoptozisi başlatacak ölüm sinyalinin verilmesi için hangi kaspazın aktive olmak zorunda olduğudur (Coultas ve Strasser, 2000).

Memeli kaspazları 3 kritere göre sınıflandırılabilir;

1. Kaspaz Kesme Spesifikliği:

Büyük ölçüde tetra peptid tanıma alanı yoluyla olmaktadır. Burada C-uçta yer alan aspartat atığı üzerinde kesme gerçekleşir. Kaspazlar tipik olarak tetra peptitleri bu bölgede tanır, bölgeler C'den N'ya doğru numaralandırılır (P4-P3-P2-P1). P1 bölgesinde kesin olarak aspartata gereksinim duyarlar. Ayrıca P4 pozisyonu da substrat spesifikliği için gereklidir. P4 pozisyonunda; Grup 1 de yer alan insan kaspaz 1,4,5 enzimleri çok fazla hidrofobik ve aromatik aminoasit atıklarını yapısında içerir, bu aminoasitler Tyr, Trp veya Leu dir. Grup 2 yi oluşturan kaspazlar 2,3,7 P4 pozisyonunda Asp ve P3 pozisyonunda Glu artıklarını tercih ederken, grup III enzimleri 6, 8, 9, 10 P4 pozisyonunda artıkları olan Ile, Leu veya Val 'i tercih ederler (Thornberry ve Lazebnik, 1998; Marek ve ark., 2001).

2. Pro-domain uzunluğu:

Grup 1 enzimler enflamasyonda rol oynayan bir alt grubun üyesidir. Halbuki Grup II ve III kaspazları apoptozda rol alırlar ve CED-3 homoloğu olan bir ailedir. Grup III kaspazların çok önemli bir kısmı (kaspaz 8,9,10) uzun pro-domaine sahip enzimlerdir ve apoptozda başlatıcı fonksiyon gösterirler. Buna karşın kaspaz 3 ve 7 (Grup II) sonlandırıcı kaspazlar olup kısa prodomaine sahiptirler. Diğerlerinden farklı olarak Grup III üyesi kaspaz 6 kısa prodomaine sahiptir ve çekirdek laminlerini kestiğine dair kanıtlar vardır, bu görüşle sonlandırıcı kaspaz fonksiyonunu görüyor diyebiliriz. Benzer şekilde kaspaz 2 her ne kadar Grup II üyesi olsa da uzun N-terminal prodomaine sahiptir. Buna ek olarak grup III insan kaspaz 9 ve 8 enzimlerinde CARD (Caspase Recruitment Domain) kısımları vardır. Bu sayede adaptör proteinleri ile etkileşerek ölüm-reseptör kompleksine bağlanabilir (Barinaga, 1998).

3. Fonksiyonuna göre:

Yeni Kaspazları: ICE (IL-1 β -Converting Enzyme) ailesi memeli kaspazları: Kaspaz 1 (ICE), 4, 5, 11, 12, 13 ve bazı dizi analizleri ile kaspaz 14 olmak üzere geniş bir kaspaz grubunu kapsamaktadır. ICE ailesinin üyeleri esas olarak inflamasyonda rol oynamaktadırlar ve bazı spesifik hastalıklarda (İnme ve Alzheimer gibi) önemli modölatör olmaktadır (Salvesen ve Dixit, 1999).

ICE, kaspaz-1 ilk tarif edilen kaspazdır. Sonradan, CED-3 homoloğu olduğu bulunmuştur. Bu kaspaz *C. elegans*'da programlı hücre ölümünün (Apoptoz) temelini oluşturmaktadır. Diğer çeşitli memeli kaspazlarının apoptozda esansiyel bir rol oynadığı şimdilerde bilinmekte iken; ICE'nin primer olarak inflamasyonu düzenlediği bulunmuştur (Kim ve ark., 2001; Meller ve ark., 2002).

ICE'nin inflamasyondaki rolü geniş bir şekilde aydınlatılırken bir taraftan da hücre ölümünden sorumlu genetik yoldaki rolü ortaya konmuştur (Ellis ve ark., 1991). Bir nematod olan *C. elegans*'in üzerinde yapılan bu çalışmada, hücre ölümü sırasında görev alan genetik yolda *ced-3* isimli bir genin kodladığı proteinin hermafroditin gelişimi esnasındaki tüm programlı hücre ölümlerinden sorumlu olduğu görülmüştür. Daha sonraları ise *ced-3*'ün memelilerdeki ICE'nin bir homoloğu olduğu gözlenmiştir (Xue ve ark., 1996; Yuan ve ark., 1993). Tüm bu bilgilerin ışığında apoptotik hücre ölümleri esnasında meydana gelen özellikle proteolizler ve bu yıkımlar sonucu oluşan biyokimyasal olaylar aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Spesifik olarak kaspaz 1; pro-IL-1 ve pro-IL-18'in (IFN- γ Inducing Faktör) proteolitik sürecine katılmaktadır. Bu süreç sonucunda olgun sitokinler meydana gelmektedir. Prokaspaz-1'in N-terminal öncül kısmında CARD (Caspase-Recruiting Domain) yani kaspaz toplayıcı kısım bulunmaktadır, bu kısım CARD ile CARDIAK arasındaki etkileşimleri düzenler ki bu kinaz

etkileşimi TNF indüklenmesine bağlı NF- λ B aktivasyonunu sağlar (Lacasse ve ark., 1998).

Olgun kaspaz 4 ve 5'in dizilimleri %50'den fazla bir oranda kaspaz-1 ile benzeşmektedir. Buna ek olarak, kaspaz 1 gibi onların da N-terminal öncül kısımlarında CARD'lar vardır. Kaspaz 4 ve 5'in apoptozda rol aldığı bilinse de, kesin rolleri henüz tam açıklığa kavuşturulamamıştır. Farelerdeki kaspaz 11 ve 12'nin homoloğu insanda kaspaz 4 ve 5'dir. Prokaspaz 11 prokaspaz 1 ile iç iletişimler içindedir. Kaspaz 11'den yoksun farelerde proinflamatuvar sitokinlerin üretimleri yoktur ve beyin iskemisi ile apoptoz indüklemeli strok modeli bu farelerde çalışmaz. Kaspaz 12 ise apoptotik yolda bir modülatör görevi görmektedir. Endoplazmik retikulumdaki kalsiyum homeostazını m-Kalpain yolu ile bozmaktadır. m-Kalpain prokaspaz 12 tarafından bölünmektedir (Thornberry ve Lazebnik, 1998; Yang ve Liu, 2002).

Kaspaz 14 kaspaz 1 ailesinin kısa N-terminal bölümüne sahip tek üyesidir. Farede, kaspaz 14 embriyoda yüksek oranda sentezlenmektedir (postkoitusun 15-17. günleri) ve yetişkin fare derisinde bulunur. Fakat diğer yetişkin dokularında varlığı tespit edilememiştir. Kaspaz 14 üretimi ve sentezi proenzim olarak kısıtlanmıştır. Kısıtlamayı keratanositler yetişkin ve embriyo derisinde göstermektedir. Bölünmüş, muhtemelen aktif, kaspaz 14 derinin kornifiye tabakasında yer alır, bu durum programlı hücre ölümünün deriye spesifik tipini bize göstermektedir (Yılmaz ve Pençe, 2002).

Başlatıcı Kaspazlar: Kaspaz 8 bir çok ölüm ligand reseptöre sinyal komplekslerinin bağlanması yolu ile aktive olmaktadır. Bu reseptörler, sinir büyüme faktörü (NGF) ve TNF ailesindedir. TNF α , FasL ve TRAIL içerirler. Prokaspaz 8'in N-terminal prodomain kısmında iki DED homoloğu bulunmaktadır. Prokaspaz 8 reseptöre bağlı adaptöre (Mort 1) bağlanır. Bu yolla DED kısımlarının homofilik etkileşimlerine neden olur. Proenzimin bağlanması kendisinde de proteolitik sürece ve aktivasyona yol açar, böylece otokataliz veya

ilgili kaspazlar ile etkileşim açığa çıkmaktadır (örneğin: kaspaz 10). Aktivasyondan sonra, kaspaz 8 apoptotik sinyali artırmaktadır, artan sinyal sonucunda da kaspaz 3 aktivasyonu proteolitik yolla sağlanır ya da indirekt olarak kesme/aktivasyon yoluyla Bid üzerinden sağlanmaktadır. Bid mitokondriyal Sitokrom c salınımına ve kaspaz 9 aktivasyonuna yol açar (Kim ve ark., 2001; Meller ve ark., 2002).

Kaspaz 10, kaspaz 8'in iyi bir homologudur, ilişkileri proformlarının DED'ler ile olan ilişkilerine kadar uzanır. Kaspaz 10 için yapılan negatif dominant ve genetik kanıtlara dayanan çalışmalar sonucu kaspaz 10'un TRIAL-indüklenen apoptoziste esansiyel bir rol oynadığını düşündürmektedir (Kim ve ark., 2001).

Kaspaz 2 apoptozis esnasında çeşitli sistemler ile aktive edilmektedir. Kaspaz 8 gibi kaspaz 2 de ölüm-reseptör kompleksi yolu ile adaptör proteine bağlanmaktadır. Adaptör proteini RAIDO'dur. Bu adaptör CARD bağlar, bu CARD yapısı da kaspaz 2 prodomainde yer alır. RAIDO RIP kinaza bağlanır, burada adaptör TRADD'dır, TNF-1 ile ilişkili bir proteindir. Prokaspaz 8, 9 ve 10'da olduğu gibi, prokaspaz 2'de de uyarılmış öncelik vardır ve otoproses ile aktivasyon sağlanır. Aktivasyon prosesindeki benzerliklere rağmen kaspaz 2'nin diğer başlatıcı kaspazlarla aynı gene sahip olup olmadığı açık değildir. Doku orijinine bağlı olarak kaspaz 2 eksik parakrin dokunun az veya çok apoptozis indüklenmesine direnç göstermektedir. Bu durum kaspaz 2'nin başlatıcı olmaktan çok düzenleyici olduğunu düşündürmektedir (Salvesen ve Dixit, 1999).

U.V ışığı, kimyasal maddeler, DNA bozulmasına yol açan ajanlar ve çeşitli kemoterapetikler apoptozu başlatmaktadır. Burada mitokondriyal hasara bağlı sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı yoluyla kaspaz 9 aktivasyonu sağlanır. Memelilerde CED-4 homologu olan Apaf-1 sitokrom c bağlar, bu da dATP (veya ATP) bağlanmasını uyarmaktadır. Apaf-1/Sitokrom c/dATP kompleksi "*Apoptozom*" adını almaktadır. Prokaspaz 9 bu kompleksi CARD ile Apaf-1

arasındaki homofilik iç etkileşimler yolu ile bağlar. Otoproses sonucu olgun kaspaz 9, 35kD geniş alt ünite ve buna N-terminal prodomain kısmına 12kD küçük alt ünite eklenmesi ile meydana gelir ve aktif enzim oluşur. Bu apoptozom ile bağlı kaspaz 9, prokaspaz 3 gibi kaspaz zimojenlerinin aktivasyon sürecini başlatır (Salsaven ve Dixit, 1999).

Sonlandırıcı (Effektör) Kaspazlar: Kaspaz 3, 6 ve 7 efektör grubu oluşturup başlatıcı kaspazlardan 8 veya 9 tarafından “downstream” yolu ile aktive olmaktadır ve fonksiyonları hücrelerdeki hedef proteinleri (non-kaspaz) özel yerlerinden kesmektedir. Bu hedefler arasında klasik bir örnek poly (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1) enziminin kaspaz 3 veya 7 tarafından kesilmesidir ya da Lamin-A'nın kaspaz 6 tarafından koparılmasıdır. Bugün itibariyle 17 kaspaz hedefi bilinmektedir. Kaspazların kesme işlemi tek bir noktada hedefe çeşitli yollarla direk veya indirek etki ederek olmaktadır. Örneğin endonükleaz CAD inhibitörü olan ICAD kesildiği zaman aktive olmaktadır ve kesilen aktif fragment şeklinde ortama salmaktadır. Öte yandan PARP'ın elimine edilmesi DNA tamirinde bozukluğa yol açmaktadır. Tüm bu kesilme işlemleri sonuç olarak fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler yaparak apoptotik hücrelerin oluşumuna yol açar (Kim ve ark., 2001; Yang ve Liu, 2002).

Başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazlar arasındaki farklılıklar oldukça karışıktır. Kaspaz 8 ölüm-reseptör komplekse (DRC) bağlanması yoluyla ve sonra prokaspaz 3'ü keserek sistemi aktive ettiği için başlatıcı kaspaz olarak sınıflandırılır. Fakat kaspaz 8 aynı zamanda BID, Bcl-2/Bax ailesi üyelerini keserek de apoptotik aktivitede belirgin artışa neden olmaktadır. Tersine Apaf/Kaspaz 9 arasındaki çapraz ilişki ağları sonucu ve hücre yüzey ölüm reseptörlerinin normal işleyişleri kaspaz 3 ve kaspaz 6'nın aktivatör gibi etki ederek başlatıcı kaspazların, kaspaz 2, 8 ve 10'un uzun prodomain kısımlarını aktive etmektedir. Bu kompleks görünüme rağmen kaspaz 3, 6 ve 7 efektör yapı bakımından eşsiz görünmektedir (Kim ve ark., 2001; Yang ve Liu, 2002).

Çizelge 1. 1: Memeli Kaspazların Fonksiyonuna Göre Sınıflandırılması

Yangı Kaspazları	Kapsaz 1, Kaspaz 4, Kaspaz 5, Kaspaz 11, Kaspaz 12, Kaspaz 13, Kaspaz 14
Başlatıcı Kaspazlar	Kaspaz 2, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Kaspaz 10
Sonlandırıcı Kaspazlar	Kaspaz 3, Kaspaz 6, Kaspaz 7

1.3.3. Hücrede Oluşan Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler

1.3.3.1. Biyokimyasal Değişiklikler

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkarlar.

1- DNA kırıklarının oluşması: Hedef proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkararak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren Ca^{++} - Mg^{++} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180-200 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur (Mountz ve Zhou, 2001, Sheikh ve Fornace, 2000).

2- Hücre iskeletinin yıkılması: Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan bir proteindir. Aktin filamanlarının yıkılması ile hücre normal şeklini kaybeder (Sheikh ve Fornace, 2000).

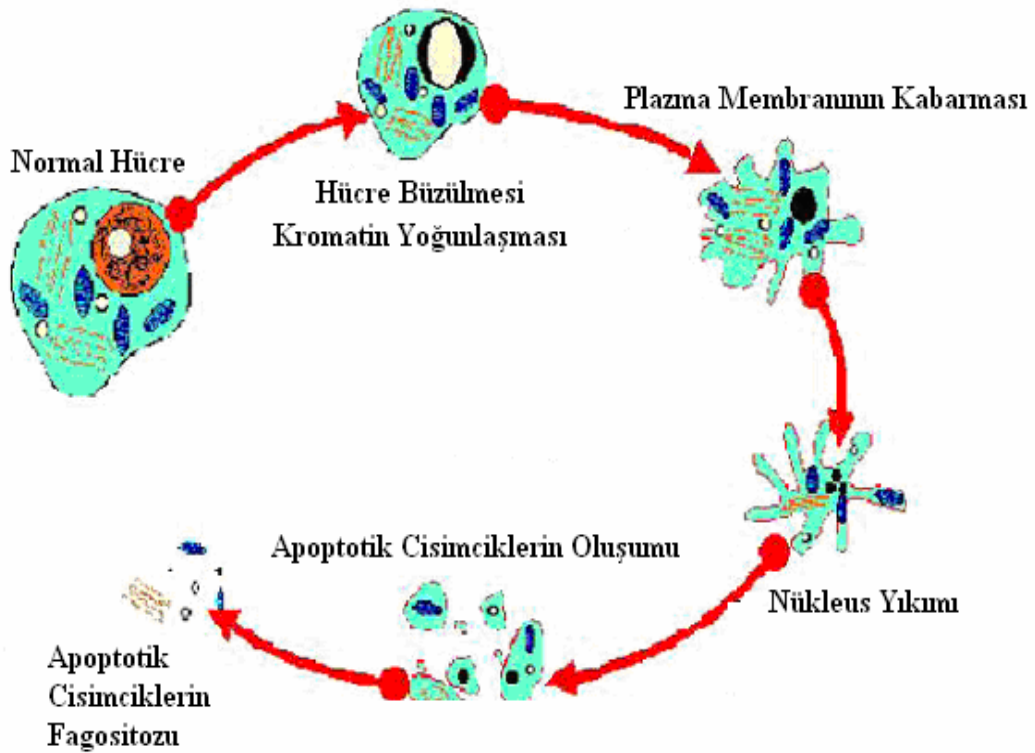
3- Hücre membran değişiklikleri: Kaspazların etkisiyle hücre membranının asimetrisi bozulur. Plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin yer değiştirilerek membranın dış yüzüne yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre membranlarında thrombospondin denilen adeziv bir glikoprotein ve bazı hücre adezyon kuvvet molekülleri (örn: ICAM 3) içerirler. Bütün bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilmelerini ve fagositozlarını sağlamaktadır. Transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerde oluşan çapraz bağlanmalar ile apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlar (Mountz ve Zhou, 2001).

1.3.3.2. Morfolojik Değişiklikler

Hücreler özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülürler, büzüşürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı, organellerin birbirlerine yaklaştığı izlenir. Membranlar bütünlüklerini korurlar. Organeller genel olarak sağlamdır. Bazen ribozomlarda çökme izlenebilir. Sitoplazmada yüzeye paralel yerleşmiş mikrofilaman kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Bu genişlemelerin sitoplazmadaki suyun endoplazmik retikuluma geçmesi ile oluştuğu sanılmaktadır. Dilatasyona uğrayan sisternalar hücrenin yüzeyi ile birleşerek yüzeyde krater manzarası oluşturur. Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar (Mountz ve Zhou, 2001).

En önemli değişiklikler çekirdekte izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, değişik şekil ve büyüklüklerde çöker. Elektron mikroskop ile bakıldığında kromatinin yoğun granüler yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği izlenir. Çekirdek de hücre gibi büzüşür. Bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nükleer porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar (Mountz ve Zhou, 2001). Apoptoz hematoksilen eozinle boyanmış kesitlerde ışık mikroskopik seviyede de izlenebilir. Hücreler koyu eozinofilik

sitoplazmalı, bir veya birkaç parçalı piknotik çekirdekli olarak görülür. Çekirdek, kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle hilal veya yarımay şeklinde izlenebilir. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara ‘apoptotik cisim’ adı verilir. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında çekirdek parçaları da mevcuttur (Mountz ve Zhou, 2001).



Şekil 1. 5: Apoptoziste meydana gelen morfolojik değişiklikler, (Anonim 2012b)

1.3.4. Fagositoz

Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosit edilerek dokudan temizlenirler (Mountz ve Zhou, 2001). Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin,

lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (Cohen, 1998).

1.4. Kanser ve Apoptozis

Malign hastalıklar kontrolsüz aşırı hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının olduğu hastalıklar olarak tanımlanır. Ancak aşırı çoğalmanın yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişiminde rol oynadığı görülmüştür. Fizyolojik ömrünü tamamladığı halde çeşitli nedenlerle apoptozise gidemeyen hücreler malign hücrelere dönüşme potansiyeline sahiptir (Stratton ve ark., 2009).

Kansere neden olan bazı virüsler enfekte ettikleri hücrelerde fizyolojik apoptozisi engellerler. Bu şekilde davranan iki tip Human papilloma virüsü (HPV)'nun serviks kanseri oluşturdukları saptanmıştır. HPV virüslerinden biri E6 adında protein üreterek apoptozisi başlatan p53'e bağlanır ve apoptozisi inaktive eder (Lowe ve Lin, 2000).

Burkitt lenfoma ve mononükleozise neden olan Epstein-Barr Virüsü de Bcl-2'ye benzer bir protein salgılar veya salgıladığı bir diğer proteinle hücrenin Bcl-2 protein üretimini arttırmasını indükler. İki olay da hücreyi apoptozise karşı daha dirençli kılar. Bu şekilde çoğalmaya devam eden hücre kanser hücresi haline gelir (Lowe ve Lin, 2000).

Kanser hücreleri virüsler olmadan da apoptozisi engelleyebilirler. B-hücre lösemilerinin ve lenfomaların bazı tiplerinde Bcl-2 proteini yüksek seviyede eksprese edilir. Bu apoptozis uyarılarını bloke eder (Lowe ve Lin, 2000).

Malign melanom, apoptozise karşı Apaf-1'i kodlayan genin ekspresyonunu engelleyerek direnç gösterir. Bazı kanser hücreleri sitotoksik T-

hücrelerinin FasLigand kısımlarını bağlayan bir molekül salgılayarak T-hücrelerinin apoptozis mekanizmalarını başlatmalarına izin vermezler. Dolayısıyla bozulan bu mekanizma kanser hücrelerinin fizyolojik apoptozisini engeller (Lowe ve Lin, 2000).

Bu çalışmada güçlü birer antioksidan olan C vitamini ile antioksidan sistemde önemli bir yer tutan Se'un hepatoselüler karsinom hücrelerine etkileri araştırılması amaçlanmıştır. Vit C'nin 3 farklı dozu ile Se'un organik ve inorganik formlarının Hepatoselüler karsinom hücrelerindeki hücre canlılığına ve apoptotik hücre ölümüne etkileri incelenmiştir. Hepatoselüler karsinom hücrelerindeki hücre canlılığına etkileri hücre çoğalma testi ile, apoptotik hücre ölümüne etkileri ise sitokrom c, kaspaz 1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivite analizleri ile belirlenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde Adı,(Üretici Firma, Katalog Numarası)

Phosphate Buffered Saline (PBS) Hücre kültürü için hazırlanmış, steril, Ca ve Mg tuzları içermeyen, 10X (Irvine Scientific, 9242), 2-Propanol (Reidel-de Haen, 24137), Ethanol (absolut), (Reidel-de Haen, 32221), Dimetil sülfoksit (DMSO), freeze medium,steril, (Bioveris, 210002), Tris-Borik asit-EDTA tamponu (Invitrogen, 15581-028), Ultrapure, 10X yoğun), Fetal dana serumu (FBS) (Irvine Scientific, 3000A), Hücre kültürü saflıkta, steril, Gentamisin sülfat solüsyonu 50 mg/ml, hücre kültürü kullanımı için (Irvine Scientific, 9355), Trypan Blue (Fluka, 93595), Tripsin EDTA 1X, Hank's balanced salt sol., 1 l solüsyon içinde 0,5 g Tripsin ve 0,2 g EDTA Fenol red içeren, Ca ve Mg tuzları içermeyen, (Irvine Scientific, 9341), RPMI medium 1640, 300 mg/l L-Glutamin'li (Irvine Scientific, 9161), Akrilamid (ICN Biomedicals, 150256), Bisakrilamid (Serva, 29195), Tris (Sigma, T 6066), HCl (Merck, K40740917/005), SDS(Amresco, 0227), Amonyum Persülfat (Sigma, A-3678), TEMED (Merck, K-34460932-517), n-Butanol (Carlo Erba, 414-131), Glisin (Amresco, 0167), Metanol (Merck, 1534808-017), PBS (Amresco, E404), Tween-20 (Amresco,0777), Gliserol (Amresco, 0854), Bromophenol Blue (ICN Biomedicals, 193980), 2-Mercaptoethanol (S4136340-445), Ponceu S (Sigma, P-7170), Primer Antikor (Santa Cruz Biotechnology, Cytochrome c-SC8385 goat polyclonal, IgG), Sekonder Antikor (Santa Cruz Biotechnology, Cytochrome c (SC2020 donkey anti-goat IgG-HRP), NaHCO₃ Merck 6323 (619K2256123), NaCO₃ (Merck 6398), Luminol Reagent (Santa Cruz Biothechnology SC2048)

2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Sarf Malzeme Adı, (Üretici Firma, Katalog Numarası)

Hücre kültürü flasksı, 25 cm² (BD Falcon, 353108), Cryo.S cryovial, Dnase-Rnase free, 2ml, (CellStar/GBO), Steril, polipropilen konik santrifuj tüpü, 15 ml (TPP, 91015), Steril, polipropilen konik santrifuj tüpü, 50ml (CellStar/GBO, 227261), Pipet uçları, DNase-RNase free, steril, filtreli 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Neptune, BT10E,BT100,BT1000), Steril serolojik pipet, tekli paketli, 1 ml, 5 ml, 25 ml (CellStar/GBO, 7760180), Lam, 76 x 26 mm (Isolab, 7522), Lamel, 20 x 20 mm (Isolab, 7512), Neubauer hemositometri lamı (Isolab), 96 kuyucuklu, düz tabanlı, steril plaka (BD Falcon, 3530), Nitroselüloz membran (Sigma N8017-5EA 0.2 mikron 20x20cm electrophoresis tested, lot no: 8016643),

2.1.3. Kullanılan Kitler

Kitin Adı, Üretici Firma, Katalog Numarası

Kaspaz 1kolorimetrik testi, BioVision, katalog no: K111

Kaspaz 3 kolorimetrik testi, BioVision, katalog no: K106

Kaspaz 9 Kolorimetrik testi, BioVision, katalog no: K119

Quick Cell Proliferasyon testi, BioVision, katalog no: K301

Sitokrom c Releasing Apoptozis testi, Bio Vision, katalog no: K257

2.1.4. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı, Üretici Firma, Katalog Numarası

Su banyosu, ısıtmalı (Nüve, BM402), Saf su cihazı (Millipore Synergy, 185), Spin santrifuj, (Continental Lab Products), Derin dondurucu (-20 °C) (Arçelik, Derin), Otomatik pipetler, 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Gilson, Pipetman), Transluminatör (Herolab, UVT-20M), Kırık buz makinesi (Fiocchetti, AF-100), Santrifuj, Yüksek hızlı, soğutmalı, masa üstü, MPW, MPW350R, Sıvı azot tankı, 40 l (Arpage, A40), Buharlı sterilizatör (otoklav, Erna), Santrifuj, masa üstü, Yüksek hızlı, soğutmalı (Sigma, 3K30), Mikroskop, invert, trinoküler (Olympus, CKX41), Mikroskop, klasik ışık mikroskobu (Leica, CME), CO₂'li inkubatör (Sanyo, MCO-18AIC), Steril güvenlik kabini (Laminar Flow) (Holten, Laminair 1,8), Vorteks (Biosan, BiovortexV1), Hassas Terazi (Shimadzu, AUW320), ELISA okuyucu (Tecan, Sunrise), Elektroforez Tankı (Amhersham Biosciences, SE260 Electrophoresis Tank), Güç kaynağı, (Amhersham Pharmacia Biotech Electrophoresis power supply EPS 301), Hoefer Semiphor, TE70, Bio-Rad, GS-800 Calibrated Dansitometer

2.2. Yöntem

2.2.1. HepG2 Hücre Kültürünün Hazırlanması

Çalışmada hepatosellüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücreleri kullanılmıştır (ATCC Cat No. HB-8065).

Hücreler % 10 Fetal Dana Serum (FBS), 50 mg/l Gentamisin sülfat ve 300 mg/l L-glutamin içeren RPMI 1640 Medium besi ortamı içerisinde, 37 °C'de % 5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkubatöründe üretildi. Üretim sırasında

kontaminasyonu önlemek amacıyla filtre kapaklı hücre kültürü flaskları kullanıldı. Hücrelerin besiyeri iki günde bir değiştirildi ve canlılıkları, çoğalma hızları ve morfolojik yapıları invert mikroskop ile takip edildi.

Yeterli hücre yoğunluğuna sahip flaskların besiyerleri vakumlanarak boşaltıldı. Hücreler bir kez Ca ve Mg tuzları içermeyen steril PBS ile yıkandı. Daha sonra 1 : 250 Tripsin–EDTA çözeltisi ile 8–10 dakika 37 °C’de inkubasyona bırakıldı. Yüzeiden ayrılan hücreler trypan mavisi ile boyanıp Neubauer Hemositometri Lamı ile sayıldıktan sonra 1/3 oranında pasajlandı. Bu işlemlerin tamamı hücre kültürü laboratuvarında ve steril güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi.

2.2.2. Quick Cell Hücre Canlılık Testi

Quick Cell hücre proliferasyon ve canlılık testi, hücre çoğalması ve canlılığını in vitro ortamda hızlı ve hassas bir şekilde belirleme testidir. Test, WST-1 tetrazolyum tuzunun hücresel mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından formazana dönüştürülmesi esasına dayanır. Canlı hücre sayısının artması mitokondriyal dehidrogenazların aktivitesinin artması anlamına gelmektedir. Bu da oluşan formazan boyasının miktarında artışa neden olur. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazanın absorbanısı 440 nm’de okunarak belirlenir. Quick Cell hücre proliferasyon testi MTT, XTT ve MTS bazlı testlere göre daha hızlı ve daha duyarlı bir testtir.

WST-1 tetrazolyum tuzu hücresel mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından formazana indirgenir. Bu indirgenme yalnızca mitokondriyal redüktaz enzimi varlığında gerçekleştiği için formazanın oluşum miktarı ile canlı hücre sayısı doğru orantılıdır.

Her hücre hattının çoğalma hızı ve hücre büyüklüğü farklıdır. Bu nedenle Quick Cell testine başlamadan önce kullanılan hücreye göre standardizasyon çalışması yapılmalıdır. HepG2 hücrelerinin optimum kaplama yoğunluğunu belirlemek amacıyla flasklarda üretilen hücreler tripsin ile muamele edilerek toplandı. Toplanan hücreler 2-8 °C'de 500 x g'de santrifuj edildi. Üstte kalan süpernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 5 ml taze besiyeri hücrelerin üzerine eklendi ve hemositometri lamı ile sayıldı.

2.2.3. Hücrelerin Sayımı ve Kaplama Yoğunluğunun Belirlenmesi

Hücrelerin 5 ml besi yeri içerisinde homojen şekilde dağılması için, steril konik tüp içerisinde altüst edildi. Bu hücre süspansiyonundan Neubauer Hemositemetri Lamı'nda sayılmak üzere 100 µl örnek alındı. Hemositometri lamında dört karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındı. Elde edilen sayı dilüsyon etkeni (10^4) ile çarpılıp 1 ml'deki hücre sayısı (hücre/ml) bulundu. Bu işlem üç kez tekrarlanıp ortalaması alınarak değerlendirildi. Bu işlem hücre sayımının gerekli olduğu tüm aşamalarda uygulandı.

Hücre kültürü plakları (96 kuyucuklu) 5×10^6 hücre/ml'den $0,0244 \times 10^6$ hücre/ml'ye kadar 12 farklı seri dilüsyonda kaplandı. Her bir kuyucuğa 10 ml/kuyucuk WST-1/ECS solusyonu olacak şekilde eklendi. Hücreler 2 saat süreyle 37 °C'de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda invert mikroskop ile mor formazan kristallerinin oluşumu kontrol edildi. Sonuçlar spektrofotometrik olarak 420 nm'de okunarak değerlendirildi ve hücrelerin logaritmik fazda ürettiği en uygun kaplama yoğunluğu elde edildi. Bu deneme beş kez tekrarlandı ve ortalamaları alındı.

Sonuç olarak 100 000 hücre / kuyucuk ve 24 saat inkubasyon süresi HepG2 hücreleri için optimum üreme şartları olarak belirlendi ve diğer analizler bu şartlarda gerçekleştirildi.

HepG2 hücrelerinin Quick Cell hücre canlılık testi için uygun kaplama konsantrasyonu ve inkubasyon süreleri belirlendikten sonra Vit C ile Se'un SeO_2 , Na_2SeO_3 ve L-selenometiyonin formlarının HepG2 hücrelerindeki canlılık testi uygulamasına geçildi. Bu amaçla daha önceden belirlenen kaplama yoğunluğu olan 100 000 hücre / kuyucuk ile hücreler 96 kuyucuklu, düz tabanlı, steril hücre kültürü plaklarına kaplandı. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat 37°C 'de %5 CO_2 'li inkubatörde bekletildi.

96 kuyucuklu plakaya kaplanan hücrelerin üzerindeki besiyeri boşaltıldı ve hücreler bir kez steril PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 0,000313 mM - 625 mM aralığında bir seri farklı konsantrasyonlarda 100 μl Vit C içeren besi yeri ilave edildi. Aynı şekilde selenometiyoninin 8 μM - 935 μM arasındaki bir seri farklı konsantrasyonu, SeO_2 ve Na_2SeO_3 'in 0,001 μM - 10 000 μM arasındaki bir seri farklı konsantrasyonlarından içeren 100 μM besiyeri ilave edildi. 37°C 'de % 5 CO_2 'li ortamda 24 saat inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda her kuyucuğa 10 μl WST-1/ECS solusyonu olacak şekilde eklendi ve iki saat daha 37°C 'de inkübe edildi. Sonuçlar 420 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Bu analizler Quickcell Proliferasyon Assay ticari kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kaspaz enzim aktivitesi ve sitokrom c analizleri için uygulanacak dozlar 5 farklı ölçümün ortalaması alınarak bu sonuçlara göre belirlendi.

2.2.4. Kaspaz 1 Kolorimetrik Analizi

Kaspaz 1 analizleri "BioVision Caspase-1 colorimetric assay" kiti ile gerçekleştirildi.

Kit İÇeriği:	
YVAD-pNA Substrat	500 µl, p-nitroanilin ile konjuge edilmiş
YVAD substrat peptid	4 Mm
DTT (1M)	400 ml
Lizis Tamponu	100 ml lizis tamponu
Reaksiyon Tamponu	4x2 ml konsantre
Dilüsyon tamponu	100 ml

Kaspaz 1 Testinin Prensibi ve Uygulanması:

Hücre lizatındaki proteaz aktivasyonu p-nitroanilin (pNA) ile konjuge edilmiş kaspaz 1 spesifik peptid YVAD-pNA ile belirlenir. Peptidin kaspaz 1 tarafından parçalanması sonucu kromofor madde olan pNA serbest kalır. pNA'nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm'de spektrofotometrik olarak okunup kantitatif sonuç elde edilir. Oluşan rengin şiddeti hücre lizatındaki kaspaz 1 enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Kaspaz 1 kolorimetrik analizi için her bir uygulama grubu ve kontrol grubu için 3'er flaskta hücreler üretildi. Hücre kültürü şartlarında (37 °C'de %5 CO₂'li ortamda), 25 cm²'lik filtre kapaklı hücre kültürü flasklarında üretilen hücrelerin medyumları aspire edildi ve bir kez PBS ile yıkanarak teste hazır hale getirildi. Hücreler Vit C (0,13 mM, 3,13 mM ve 31,3 mM konsantrasyonları) ile selenometiyonin (234 µM), SeO₂ (100 µM) ve Na₂SeO₃ (1 µM)'in RPMI 1640 + %10 FBS ve gentamisin içeren besiyerinde çözülmesi ile hazırlanan test ortamlarında 24 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Kontrol grubunu Se ve Vit C içermeyen besiyerinde test grubu ile aynı fiziki şartlarda inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. İnkubasyon sonrası hücreler tripsin ile muamele edilerek toplandı. Bu toplama sırasında ölen ve yüzeyden ayrılan hücreleri de elde edebilmek için inkubasyon sırasında kullanılan besiyeri de 250 x g'de santrifuj edildi. Elde edilen hücre peletinin üzerine 50 µl soğuk lizis tamponu eklendi ve 10 dakika süreyle buz üzerinde inkubasyona bırakıldı. Daha sonra 10 000 x g'de 1

dakika süreyle 2–8 °C’de santrifuj edildi. Üstte kalan süpernatant daha önceden soğutulmuş başka bir santrifuj tüpüne aktarıldı.

Hücrelerden elde edilen lizatlarda protein tayini yapılarak her enzim için protein konsantrasyonları ayarlandı. Kaspaz 1 için 100 µg protein / 50 µl lizis bufferda olacak şekilde sulandırma yapıldı. Lizis bufferları 100 µg protein / 50 µl’de olacak şekilde ayarlanan hücre lizatı örneklerinden 96 kuyucuklu plaka içerisine 50 µl pipetlendi. Her bir örnek içine 10 mM DTT (dithiothreitol) içeren 50 µM reaksiyon tamponu eklendi. 4mM YVAD-pNA 5 µl (kaspaz 1 kolorimetrik substratı) eklenip 37 °C’de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda mikropilaya okuyucuda 405 nm dalgaboyunda optik dansiteler okundu. Bu test üç kez tekrarlanıp kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

2.2.5. Kaspaz 3 Kolorimetrik Analizi

ICE-ailesi proteazların/ kaspazların aktivasyonu memeli hücrelerinde apoptozisi başlatır. Kaspaz 3, aynı zamanda CPP-32 olarak da bilinen hücre içi sistein proteazıdır. Proenzim olarak sentezlenir ve apoptozis sırasında kaspaz kaskadının uyarılması ile aktif hale geçer. Kaspaz 3 enzimi, DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) aminoasit motifi içeren PARP (poli ADP-riboz polimeraz) ve 70 kD büyüklüğündeki U1-ribonükleoprotein gibi molekülleri parçalar.

Kaspaz 3 analizleri “BioVision, Caspase-3 colorimetric assay” kiti ile gerçekleştirildi.

Kit İçeriği :	
DEVD-pNA-Substrat	500 µl, p-nitroanilin ile konjuge edilmiş
DEVD substrat peptid	4 mM
DTT (1M)	0,4 ml
Lizis Tamponu	100 ml lizis tamponu
Reaksiyon Tamponu	4x2 ml konsantre
Dilüsyon tamponu	100 ml

Kaspaz 3 Testinin Prensipli ve Uygulama Yöntemi:

Hücre lizatındaki proteaz aktivasyonu pNA ile konjuge edilmiş kaspaz 3 spesifik peptid olan DEVD ile belirlenir. Peptidin kaspaz 3 tarafından parçalanması sonucu kromofor madde olan pNA serbest kalır. pNA'nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm de spektrofotometrik olarak okunup kantitatif sonuç elde edilir. Oluşan rengin şiddeti hücre lizatındaki kaspaz 3 enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Kaspaz 3 kolorimetrik analizi için her bir uygulama grubu ve kontrol grubu için 3'er flaskta hücreler üretildi. Hücre kültürü şartlarında (37 °C'de % 5 CO₂'li ortamda) 25 cm²'lik filtre kapaklı hücre kültürü flasklarında üretilen hücrelerin mediumları aspire edildi ve bir kez PBS ile yıkanarak teste hazır hale getirildi. Hücreler Vit C (0,13 mM, 3,13 mM ve 31,3 mM konsantrasyonları) ile selenometiyonin (234 µM), SeO₂ (100 µM) ve Na₂SeO₃ (1 µM)'in RPMI 1640 + %10 FBS ve gentamisin içeren besiyerinde çözülmesi ile hazırlanan test ortamlarında 24 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Kontrol grubunu Se ve Vit C içermeyen besiyerinde test grubu ile aynı fiziki şartlarda inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. İnkubasyon sonrası hücreler tripsin ile muamele edilerek toplandı. Bu toplama sırasında ölen ve yüzeyden ayrılan hücreleri de elde edebilmek için inkubasyon sırasında kullanılan besiyeri de 250 x g'de santrifuj edildi. Elde edilen hücre peletinin üzerine 50 µl soğuk lizis tamponu eklendi ve 10 dakika süreyle buz üzerinde inkubasyona bırakıldı. Daha sonra 10000 x g'de 1 dakika süreyle 2-8 °C'de santrifuj edildi. Üstte kalan süpernatant daha önceden soğutulmuş başka bir santrifuj tüpüne aktarıldı.

Hücrelerden elde edilen lizatlarda protein tayini yapılarak her enzim için protein konsantrasyonları ayarlandı. Kaspaz 3 için 200 µg protein / 50 µl lizis bufferda olacak şekilde sulandırma yapıldı. Lizis bufferları 200 µg protein / 50 µl'de olacak şekilde ayarlanan hücre lizatı örneklerinden 96 kuyucuklu plaka içerisine 50 µl pipetlendi. Her bir örnek içine 10 mM DTT (dithiothreitol) içeren 50 µM reaksiyon tamponu eklendi. 4 mM DEVD-pNA 5 µl (kaspaz 3

kolorimetrik substratı) eklenip 37 °C'de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda mikropkaya okuyucuda 405 nm dalgaboyunda optik dansiteler okundu. Bu test üç kez tekrarlanıp kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

2.2.6. Kaspaz 9 Kolorimetrik Analizi

Kaspaz 9 aynı zamanda ICE-LAP6 ve Mch6 olarak da adlandırılan ve kaspaz kaskatında apoptozise gitmesi için uyarılmış hücrelerde zimojen prokaspaz 9 olarak sentezlenip daha sonra aktive olan bir enzimdir. Mitokondriden sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasından sonra kaspaz 9 aktive olur ve Sitokrom c, kaspaz 9 ve Apaf-1 birleşerek kompleks oluşturur. Kaspaz 9 enziminin hücre içerisinde en iyi tanıyıp parçalayabildiği sekans LEDH'dir. Kaspaz 9 aktivasyonu pek çok pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler tarafından düzenlenir ve embriyonik dönemde meydana gelen apoptoziste önemi büyüktür (Thornberry ve Lazebnik, 1998).

Kaspaz 9 analizleri de ticari test kiti (BioVision, Caspase-9 colorimetric assay) ile gerçekleştirildi.

Kit İçeriği:	
LEHD-pNA Substrat	500 µl, p-nitroanilin ile konjuge edilmiş
LEHD substrat peptid	4 Mm
DTT (1M)	400 ml
Lizis Tamponu	100 ml lizis tamponu
Reaksiyon Tamponu 3	4x2 ml konsantre
Dilüsyon tamponu	100 ml

Kaspaz 9 Testinin Prensipleri ve Uygulanması:

Hücre lizatındaki proteaz aktivasyonu pNA ile konjuge edilmiş kaspaz 9 spesifik peptid ile belirlenir. Peptidin kaspaz 9 tarafından parçalanması sonucu kromofor madde olan pNA sertbest kalır. pNA'nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm de spektrofotometrik olarak okunup kantitatif sonuç elde edilir. Oluşan rengin şiddeti hücre lizatındaki kaspaz 9 enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır. Kaspaz 9 kolorimetrik analizi için her bir uygulama grubu ve kontrol grubu için 3'er flaskta hücreler üretildi. Hücre kültürü şartlarında (37 °C'de % 5 CO₂), 25 cm²'lik filtre kapaklı hücre kültürü flasklarında üretilen hücrelerin mediumları aspire edildi ve bir kez PBS ile yıkanarak teste hazır hale getirildi. Hücreler Vit C (0,13 mM, 3,13 mM ve 31,3 mM konsantrasyonları) ile L-selenometiyonin (234 µM), SeO₂ (100 µM) ve Na₂SeO₃ (1 µM)'in RPMI 1640 + %10 FBS ve gentamisin içeren besiyerinde çözülmesi ile hazırlanan test ortamlarında 24 saat süreyle inkubasyona bırakıldı. Kontrol grubunu Se ve Vit C içermeyen besiyerinde test grubu ile aynı fiziki şartlarda inkubasyona bırakılan hücreler oluşturdu. İnkubasyon sonrası hücreler tripsin ile muamele edilerek toplandı. Bu toplama sırasında ölen ve yüzeyden ayrılan hücreleri de elde edebilmek için inkubasyon sırasında kullanılan besiyeri de 250 x g'de santrifüj edildi. Elde edilen hücre peletinin üzerine 50 µl soğuk lizis tamponu eklendi ve 10 dakika süreyle buz üzerinde inkubasyona bırakıldı. Daha sonra 10000 x g'de 1 dakika süreyle 2–8 °C'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant daha önceden soğutulmuş başka bir santrifüj tüpüne aktarıldı.

Hücrelerden elde edilen lizatlarda protein tayini yapılarak her enzim için protein konsantrasyonları ayarlandı. Kaspaz 9 için 100 µg protein / 50 µl lizis bufferda olacak şekilde sulandırma yapıldı. Lizis bufferları 100 µg protein / 50 µl'de olacak şekilde ayarlanan hücre lizatı örneklerinden 96 kuyucuklu plaka içerisine 50 µl pipetlendi. Her bir örnek içine 10 mM DTT (dithiothreitol) içeren 50 µM reaksiyon tamponu eklendi. 4 mM LEHD-pNA 5 µl (kaspaz 9 kolorimetrik substratı) eklenip 37 °C'de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda

mikroplaka okuyucuda 405 nm dalga boyunda optik dansiteler okundu. Bu test üç kez tekrarlanıp kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

2.2.7. Bradford Protein Tayin Yöntemi

Hücrelerden elde edilen lizatlarda protein konsantrasyonu ayarlaması için protein miktar tayini Bradford yöntemi ile tespit edildi (Bradford, 1976).

Bradford boya çözeltisi: 100 mg Coommasie Brilland Blue G-250, 50 ml % 95'lik etil alkolde çözüldü. Üzerine 100 ml konsantre fosforik asit ilave edildi. Son hacim 200 ml'ye distile su ile tamamlandı. Bu şekilde hazırlanan çözelti +4°'de 6 ay dayanıklıdır.

Test prensibi: Reaktif içindeki Coommasie G250'nin asidik ortamda proteinlere bağlanarak, çözelti renginin kahverenginden maviye dönüşmesi ile oluşan rengin maksimum absorpsiyonunun 595 nm'de ölçülmesidir.

Testin yapılışı: 5 µl örnek mikroplate kuyucuklarına pipetlendi. Üzerine otomatik pipet ile 250 µl Bradford çözeltisi eklenip, karıştırıldı. En az 5 dakika beklendikten sonra en geç 30 dakika içinde 595 nm'de okundu.

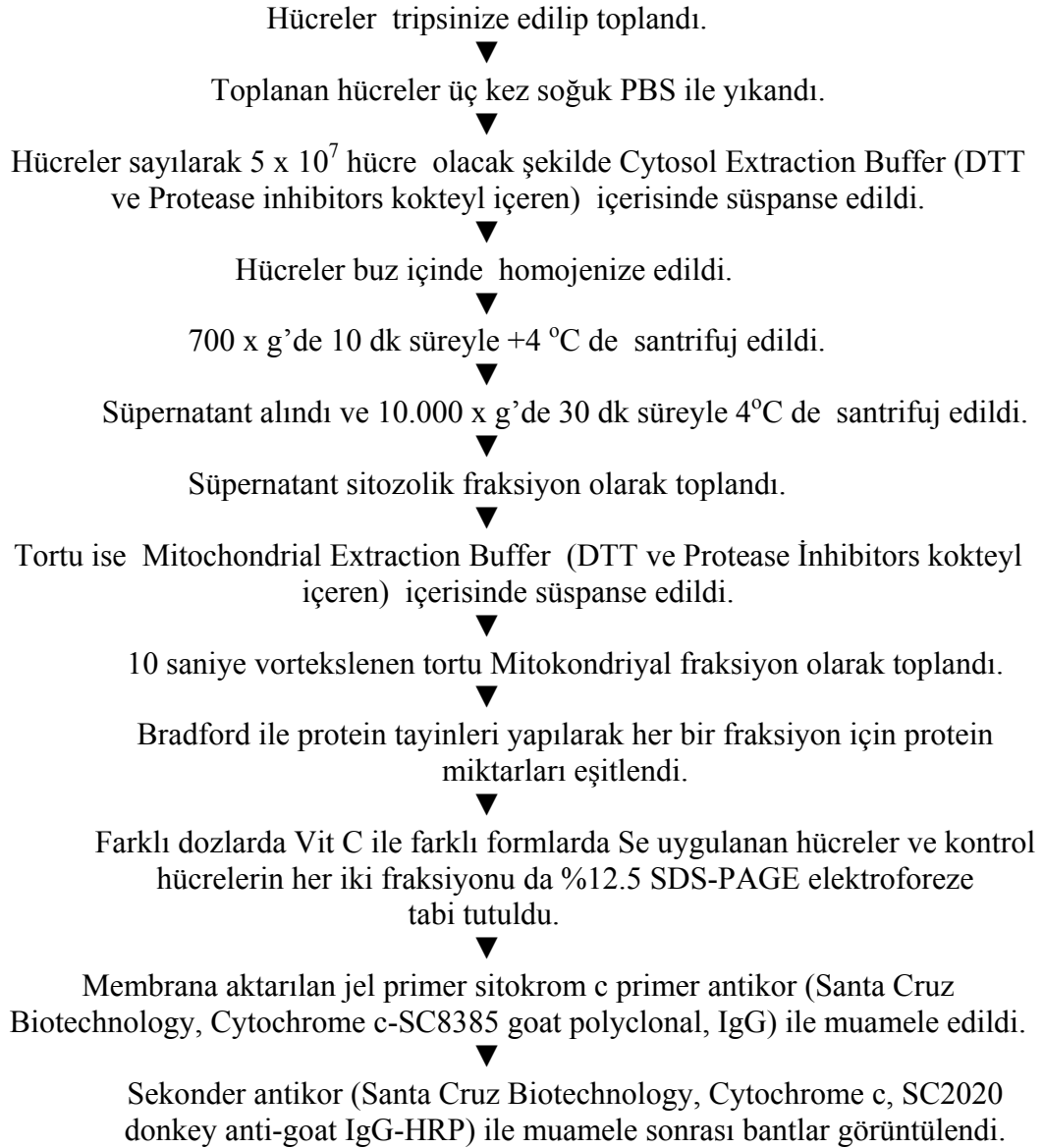
2.2.8. Sitokrom c Tayin Yöntemi

Sitokrom c hücre lizatının sitoplazmik ve mitokondriyal fraksiyonları "BioVision kiti" ile hazırlanarak, Western Blot analizi uygulandı.

Sitokrom c apoptoziste önemli bir role sahiptir. Bu protein iç ve dış mitokondriyal zarlar arasında yerleşmiştir. Apoptotik uyarana sitokrom c'nin mitokondriyadan sitozole geçişini tetikler. Burada sitokrom c Apaf-1 ile

bağlanır. Sitokrom c-Apaf 1 kompleksi kaspaz 9'u aktive eder. Bu da kaspaz 3'ü aktive ederek kaspaz kaskadını başlatır.

Hücre lizatının hazırlanması:



2.2.8.1. SDS-PAGE ve Western Blot

Monomer Solüsyonu (%30.8 T, %2.7 Cbis)

60g Akrilamid (FW 71.08), 1.6g Bisakrilamid (FW 154.2), ddH₂O ile 200ml'ye tamamlanır (+4 °C de, karanlık ortamda 3 aya kadar saklanabilir).

Running Jel Buffer (1.5M Tris,pH 8.8)

36.3g Tris (FW 121.1), 150ml ddH₂O eklendi, HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. 200ml'ye ddH₂O ile tamamlandı (+4 de, karanlık ortamda 3 aya kadar saklanabilir).

Running Jel Solusyonu %12.5 (2 jel için)

12.5 ml Monomer Solüsyon, 7.5 ml 4x Running Jel Buffer, 0.3 ml %10 SDS, 9.6 ml dd H₂O, 300 µl %10 Amonyum persulfat, 20 µl TEMED

Stacking Jel Solusyonu (2 jel için)

0.88ml Monomer Solüsyonu, 1.66ml 4X stacking jel Buffer, 66 µl %10 SDS, 4.06ml ddH₂O, 33.4 µl %10 Amontum persulfat

Transfer Buffer (Dune Carbonate Buffer)

0,84g 1mM NaHCO₃, 0,318g 3mM NaCO₃, %20 Metanol (pH 9.9)

Tween PBS; 100 ml PBS, 50µl Tween-20

Blocking Buffer; 5g süt tozu, 50µl Tween-20, PBS ile 100 ml'ye tamamlandı.

SDS-PAGE metodu, Reynolds ve Tanford'un (1970) bildirdikleri şekilde uygulanmıştır. Cam plakalar etanolla temizlenmiş, jel dökülmeden önce cam plakalar aralarda spacer olacak şekilde birleştirilip, yanlardan sıkıştırılmış ve yerine oturtulmuştur. Sonra %12.5'lik resolving jel hazırlanmış ve dökülmüştür. Üzerine n-Butanol konularak jel düzeltilmiştir. Donunca jel alkol kalıntısı kalmasın diye suyla yıkanıp üzerine stacking jel dökülmüş ve tarak yerleştirilmiştir. Jelin donması beklendikten sonra tarak çıkartılıp, numuneler jele yüklenmiştir. Markerdan 10 µl yüklenmiştir. Elektroforez için vertikal mini jel elektroforezi kullanılmıştır. Numuneler stacking jeli geçene kadar her bir jel için 10 mA, geçtikten sonra 20 mA akım uygulanmış ve jelde yürütme işlemi numunelerin jelin sonuna ulaşmasına kadar devam ettirilmiştir.

SDS-PAGE'de 4 kDa ile 250 kD arasındaki molekül ağırlıklı protein standardı (Invitrogen, Cat no: LC5925) kullanılmıştır. SDS-PAGE sonucu elde edilen jel boyunda nitroselüloz membran kesilmiş 1-2 saniye distile suya batırılıp aktive edilmiş ardından hemen transfer buffera konup blotlamaya başlayana kadar

içerisinde bekletilmiştir. Bir kap içerisine blot materyali transfer bufferla ıslatılmıştır. Üzerine ilk olarak blotlama kağıdı, sonra membran, jel ve tekrar blotlama kağıdı konup kapatılıp tanka yerleştirilmiştir. 100 mA'de 2 saat blotlanmış ve membran ilk olarak belirteci göstermek için Ponceu S ile boyanmıştır. Blocing buffer ile membran bir gece soğuk odada (+4) bloklanmıştır. Membran tween PBS ile bir kere yıkanıp paketlenmiş ve % 5'lik süt içerisine primer antikor (Cytochrome c- goat polyclonal, IgG), konmuş ve oda sıcaklığında 2 saat çalkalayıcıda inkube edilmiştir (1/200 antikor). Sonra 15 d × 3 tween PBS'le çalkalayıcıda yıkanmıştır. 1/5000 sekonder antikorla (Cytochrome c, donkey anti-goat IgG-HRP) tekrar muamele edilmiş ve 2 saat çalkalayıcıda inkube edilmiştir. 15dk X 3 defa tween PBS'le yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra üzerindeki tween PBS dökülerek protokole göre hazırlanan luminol reagent solüsyonu membran üzerine döküldü (Proteinli kısım üstte kalacak şekilde yerleştirildi). Oda ısısında 1 dakika beklendi. Bekleme işleminden sonra luminolün fazlası döküldü. Protein kısmı üstte kalacak şekilde ve plastikle membran arasında hava kabarcığı kalmayacak ve kırıksıklık oluşmayacak şekilde plastik dosya içine yerleştirildi. Plastik içinde hazırlanan membran, protein kısmı üstte kalacak şekilde röntgen kasetinin içine yerleştirildi. Karanlık odada kaset içine film yerleştirildikten sonra 1 dakika beklendi. Daha sonra röntgen filmi prosedüre uygun olarak görüntülendi.

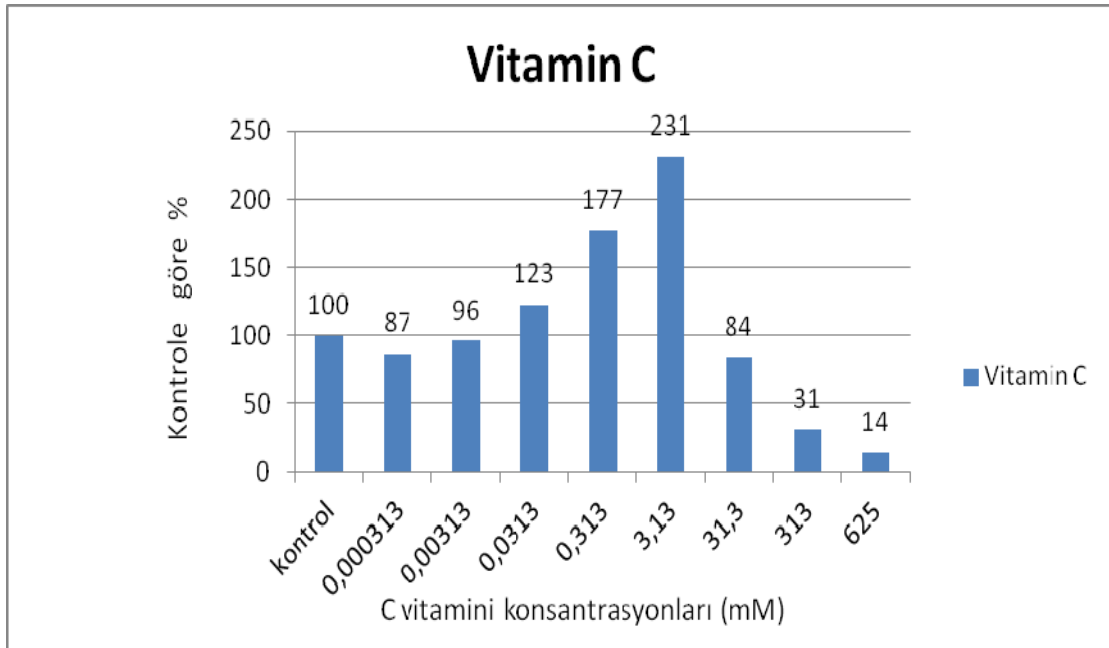
2.2.9. İstatistik Analiz:

Ölçüm değerleri bakımından gruplar arası farklılığın önemliliğini incelemek için non parametrik Kruskal Wallis testi uygulandı. Farklılığın hangi gruplar arasında kaynaklandığını bulmak için çoklu karşılaştırma testi olarak birden fazla Mann-Whitney Testi uygulandı ve Bonferonni düzeltmesi yapıldı. (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu, 2000).

3. BULGULAR

3.1. Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde Hücre Canlılık Testi Sonuçları

Vit C'nin 0,000313 mM ile 625 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerine uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık testi sonuçları ile kontrol grubuna göre hesaplanan hücre canlılığı % değerleri Şekil 3.1'de verilmiştir.



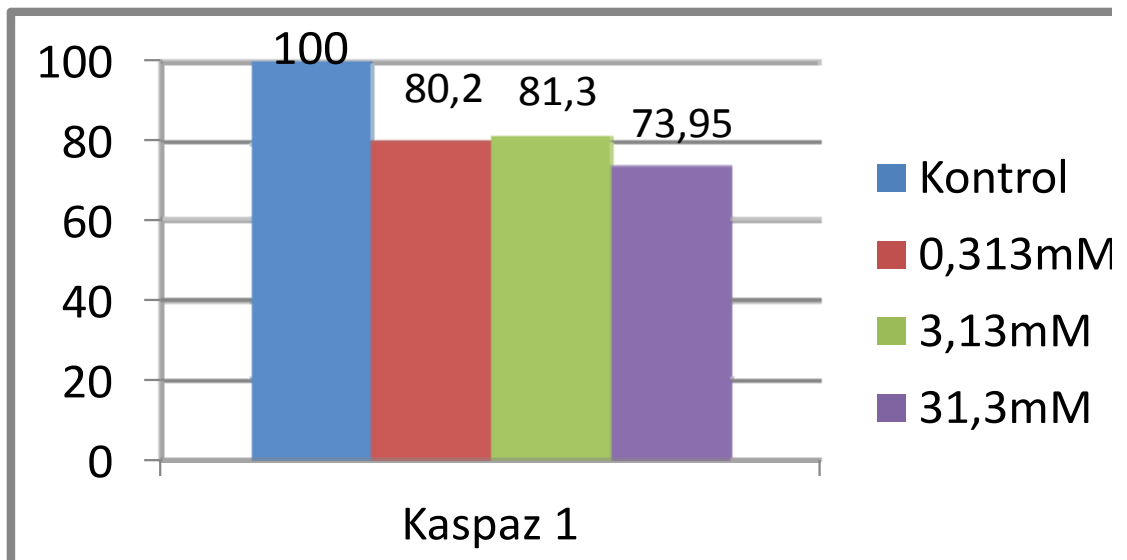
Şekil 3.1 Vitamin C'nin HepG2 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları

En yüksek konsantrasyon olan 625 mM Vit C uygulanan hücrelerdeki hücre canlılığı % 14 olarak bulunmuştur. 0,000313 mM, 0,00313 mM ve 0,0313 mM Vit C uygulanan hücrelerdeki canlılık oranı sırasıyla % 87, % 96 ve % 123 olarak bulunmuştur. Şekil 3.1'de de görüldüğü gibi 0,0313 mM Vit C konsantrasyonundan itibaren kontrole göre hücre canlılığında bir artış gözlenmiştir. Bu artış 0,313 mM ile 3,13 mM Vit C konsantrasyonlarında sırasıyla % 177 ve % 231 değerlerine ulaşmıştır.

HepG2 hücrelerinde kontrole göre hücre canlılığında görülen yaklaşık 2 kat artış, Vit C'nin artan konsantrasyonları ile düşmeye başlamıştır. 31,3 mM Vit C konsantrasyonunda kontrol grubuna göre hücre canlılığı % 84 bulunmuştur. Hücre canlılığında kontrole göre azalmanın görüldüğü 31,3 mM Vit C konsantrasyonu HepG2 hücrelerinde sitokrom c ve kaspaz enzim aktivite analizleri için uygulanacak doz olarak belirlenmiştir. Ayrıca kontrole göre % 177 ve % 231 düzeylerinde hücre canlılığında artış gözlenen 0,313 mM ve 3,13 mM Vit C konsantrasyonlarındaki kaspaz enzim aktivitelerine ve sitokrom c düzeylerine de bakılmıştır.

3.2. Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde Kaspaz 1 aktivitesi

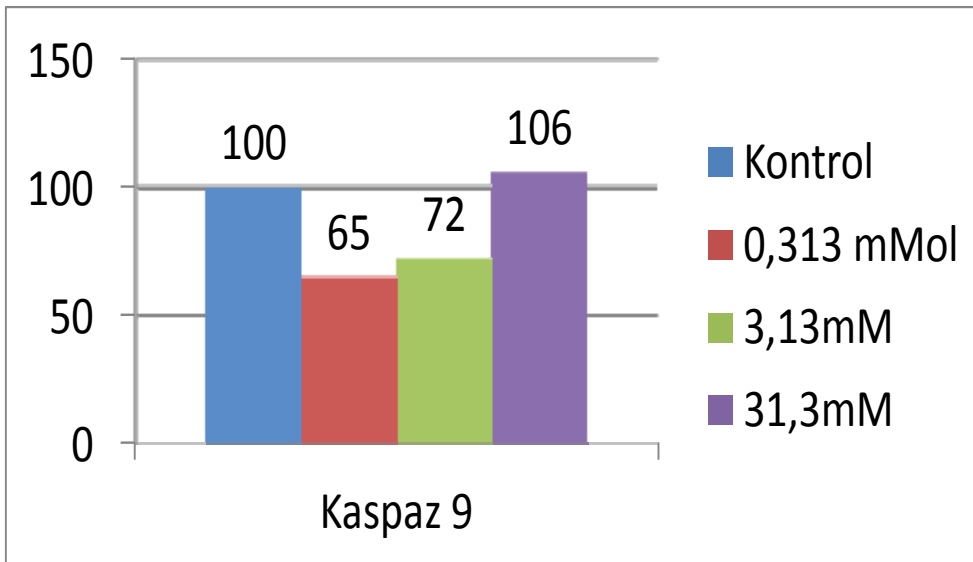
Farklı dozlarda Vit C uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 1 enzim aktiviteleri Şekil 3.2'de verilmiştir. 0,313 mM, 3,13 mM ve 31,3 mM dozlarda Vit C uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz 1 aktivitesi kontrole göre sırasıyla % 19,8, % 18,7 ve % 26,05 azalmıştır. Kaspaz aktivitesindeki bu azalış istatistik olarak anlamlı değildir.



Şekil 3.2: Vitamin C'nin farklı dozlarının HepG2 hücrelerinde kaspaz 1 aktivitesi üzerine etkisi

3.3. Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde Kaspaz 9 aktivitesi

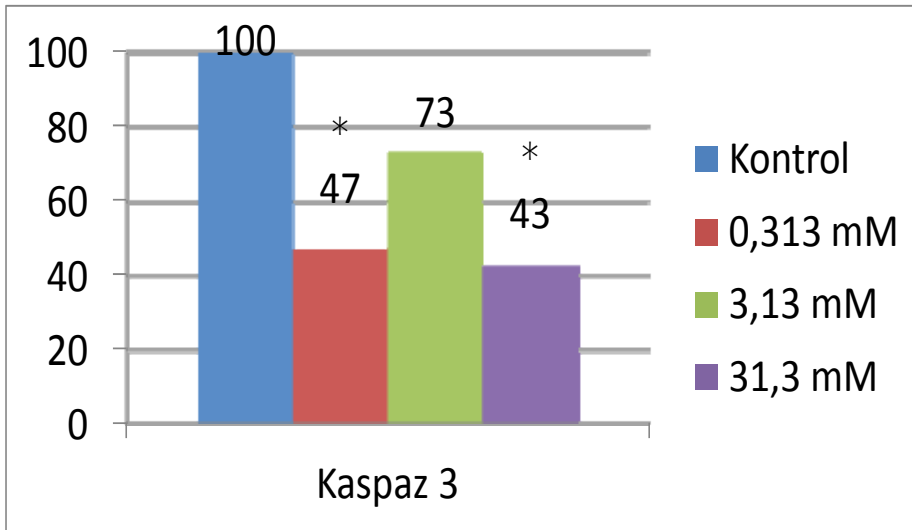
Farklı dozlarda Vit C uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 9 enzim aktiviteleri Şekil 3.3’de verilmiştir. Kaspaz 9’un aktivitesi 0,313 mM ve 3,13 mM Vit C uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre sırasıyla % 35, % 28 azalmış, 31,3 mM uygulanan hücrelerde ise % 6 artmıştır. Kaspaz 9 aktivitesindeki değişiklikler istatistik olarak anlamlı değildir.



Şekil 3.3 Vitamin C'nin farklı dozlarının HepG2 hücrelerinde kaspaz 9 aktivitesi üzerine etkisi

3.4. Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde Kaspaz 3 aktivitesi

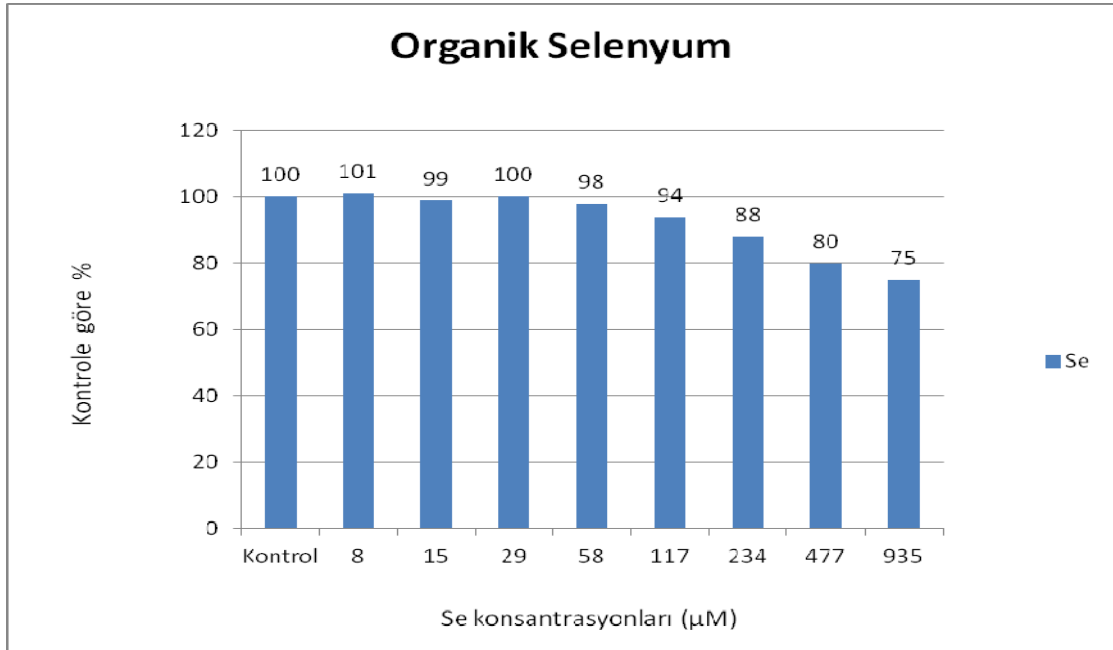
Farklı dozlarda Vit C uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 3 enzim aktiviteyi Şekil 3.4’de verilmiştir. Kaspaz 3’ün aktivasyonu 0,313 mM, 3,13 mM ve 31,3 mM Vit C uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre sırası ile % 43, % 27 ve % 47 azalmıştır. 0,313 mM, ve 31,3 mM Vit C uygulanan hücrelerde Kaspaz 3 aktivitesindeki azalış istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,005$).



Şekil 3.4 Vitamin C'nin farklı dozlarının HepG2 hücrelerinde kaspaz 3 aktivitesi üzerine etkisi

3.5. Organik Selenyumun HepG2 hücrelerinde Hücre Canlılık Testi sonuçları

Organik Se olarak L-Selenometiyonin 8 μ M - 935 μ M arasındaki farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerine uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık testi sonuçları ile kontrol grubuna göre hesaplanan hücre canlılığı % değerleri Şekil 3.5’de verilmiştir.



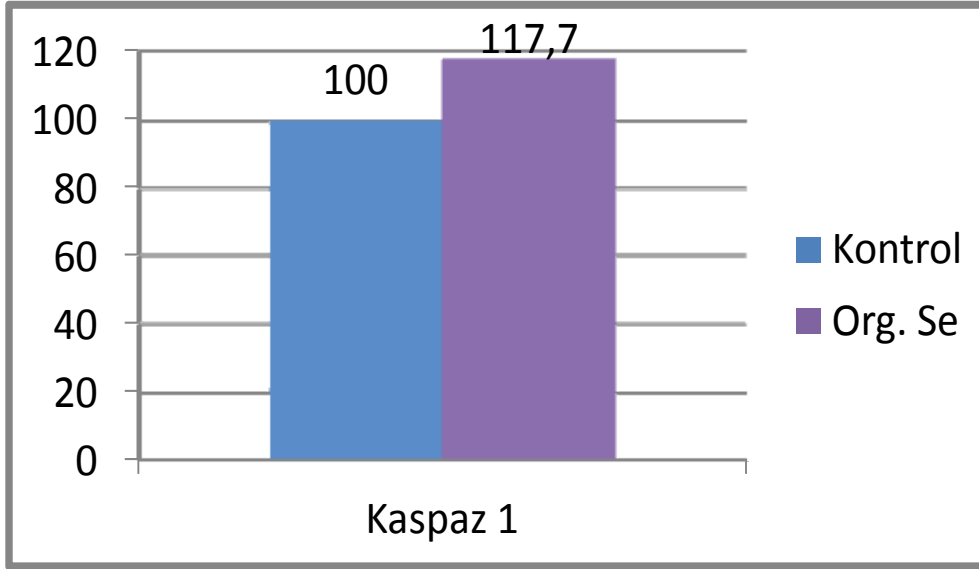
Şekil 3.5. Organik Selenyumun HepG2 hücrelerinde Hücre Canlılık Testi sonuçları

Organik Se'un 8 µM, 15 µM, 29 µM ve 58 µM aralığındaki farklı konsantrasyonlarının uygulandığı HepG2 hücrelerindeki hücre canlılığı kontrol grubuna göre sırasıyla % 102, % 99, % 100 ve % 98 olarak bulunmuştur. HepG2 hücrelerine uygulanan 117 µM organik Se konsantrasyonunda hücre canlılığında kontrole göre bir azalma görülmüştür. Hücre canlılığında görülen bu azalma, organik Se'un artan konsantrasyonlarına bağlı olarak azalmaya devam etmiştir. L-Selenometiyonin'in 234 µM konsantrasyonundaki hücre canlılığı kontrole göre % 88 bulunmuştur. Kontrole göre hücre canlılığında görülen belirgin azalmanın olduğu bu doz sitokrom c ve kaspaz enzim aktivite analizleri için uygulanacak doz olarak belirlenmiştir.

3.6. Organik Selenyumun HepG2 hücrelerinde Kaspaz 1 aktivitesi

HepG2 hücrelerine 234 µM konsantrasyonunda uygulanan organik Se'un Kaspaz 1 enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.6'de verilmiştir. Kaspaz 1 aktivitesi Selenometiyonin

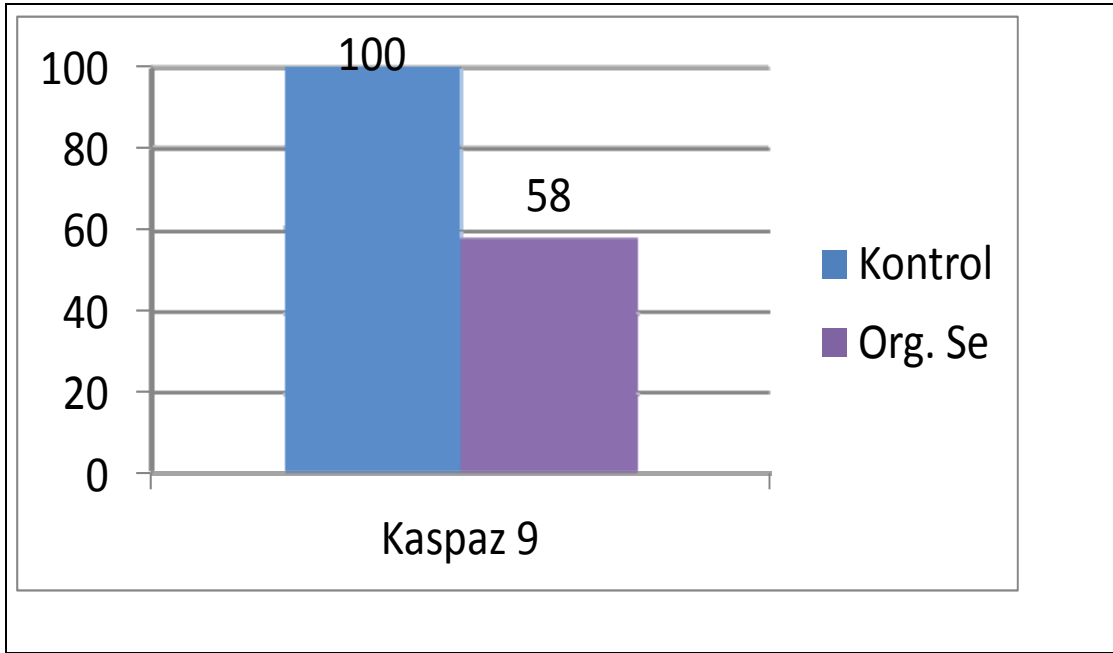
uygulanan HepG2 hücrelerinde % 17,7 artış göstermiştir. Kaspaz 1 aktivitesinde görülen bu artış istatistik olarak anlamlı değildir.



Şekil 3.6. Organik Selenyumunun HepG2 hücrelerinde Kaspaz 1 aktivitesine etkisi

3.7. Organik Selenyumun HepG2 hücrelerinde Kaspaz 9 aktivitesi

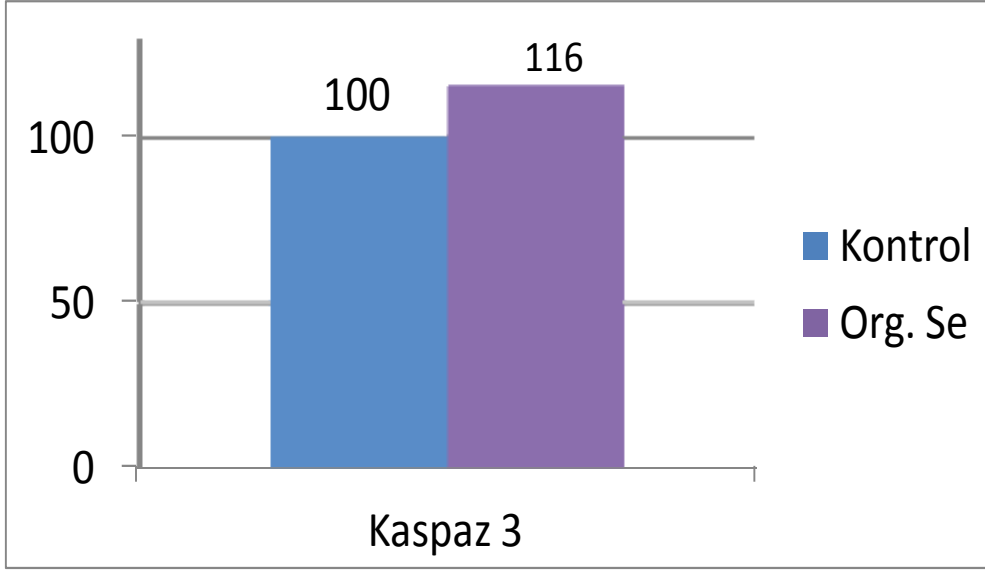
HepG2 hücrelerine 234 μ M konsantrasyonunda uygulanan organik Se'un Kaspaz 9 enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.7'de verilmiştir. Kaspaz 9 aktivitesi Selenometiyonin uygulanan HepG2 hücrelerinde % 42 azalma göstermiştir. Kaspaz 9 aktivitesinde görülen bu azalma istatistik olarak anlamlı değildir.



Şekil 3.7. Organik Selenyumunun HepG2 hücrelerinde Kaspaz 9 aktivitesine etkisi

3.8. Organik Selenyumun HepG2 hücrelerinde Kaspaz 3 aktivitesi

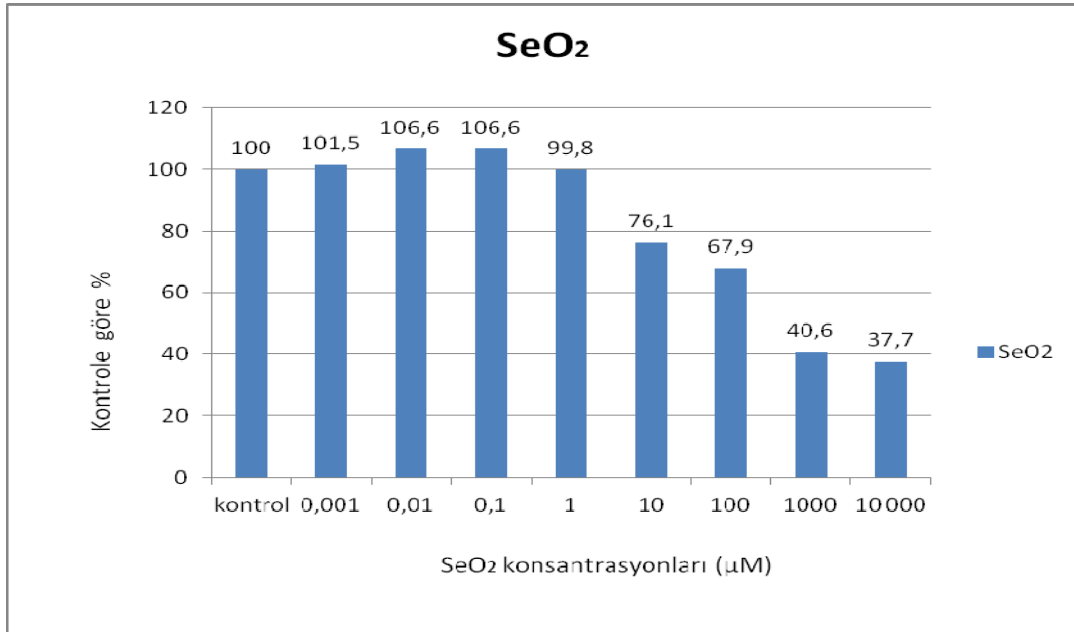
HepG2 hücrelerine 234 μM konsantrasyonunda uygulanan organik Se'un Kaspaz 3 enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.8'de verilmiştir. Kaspaz 3 aktivitesi Selenometiyonin uygulanan HepG2 hücrelerinde % 16 artış göstermiştir. Kaspaz 3 aktivitesinde görülen bu artış istatistik olarak anlamlı değildir.



Şekil 3.8. Organik Selenyumunun HepG2 hücrelerinde Kaspaz 3 aktivitesine etkisi

3.9. SeO₂'nin HepG2 hücrelerinde Hücre Canlılık Testi Sonuçları

SeO₂ farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerine uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık testi sonuçları ile kontrol grubuna göre hesaplanan hücre canlılığı % değerleri Şekil 3.9'da verilmiştir.



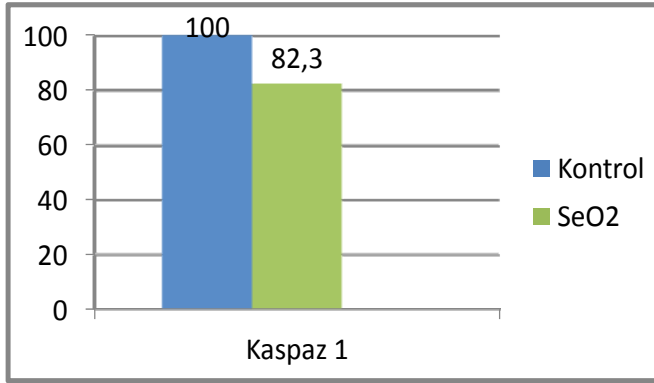
Şekil 3.9: SeO₂'nin HepG2 hücrelerinde Hücre Canlılık Testi Sonuçları

SeO₂'nin 0,001 µM - 1 µM aralığındaki farklı konsantrasyonlarının uygulandığı HepG2 hücrelerindeki hücre canlılığı kontrol grubuna göre sırasıyla % 102, % 107, % 107 ve % 100 olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyonlardaki hücre canlılığı oranları kontrol grubuna yakın değerlerde bulunmuştur. HepG2 hücrelerine uygulanan 10 µM SeO₂ konsantrasyonunda hücre canlılığında kontrole göre bir azalma görülmüştür. Hücre canlılığında görülen bu azalma, SeO₂'in artan konsantrasyonlarına bağlı olarak azalmaya devam etmiştir. SeO₂'nin 100 µM konsantrasyonundaki hücre canlılığı kontrole göre % 68 bulunmuştur. Kontrole göre hücre canlılığında görülen belirgin azalmanın olduğu bu doz kaspaz enzim aktivitesi ve sitokrom c analizleri için uygulanacak doz olarak belirlenmiştir.

3.10. SeO₂'in HepG2 hücrelerinde Kaspaz 1 Aktivitesi

HepG2 hücrelerine 100 µM konsantrasyonunda uygulanan SeO₂'nin Kaspaz 1 enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.10'da verilmiştir. Kaspaz 1 aktivitesi SeO₂ uygulanan HepG2

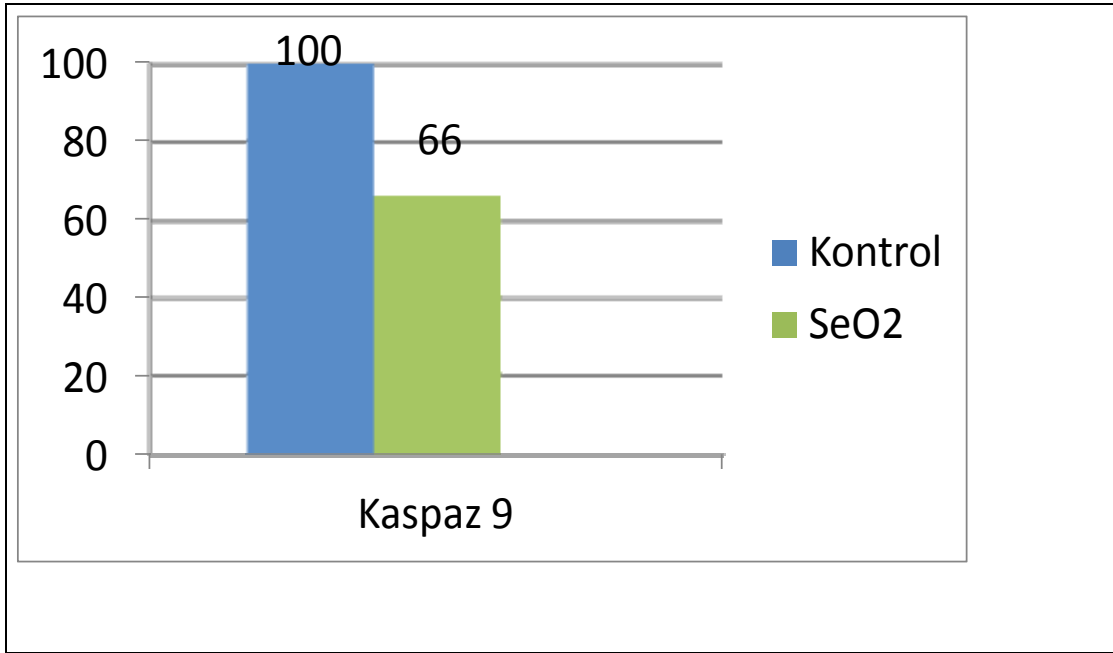
hücrelerinde % 17,7 azalma göstermiştir. Kaspaz 1 aktivitesinde görülen bu azalma istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.10: SeO₂'nin HepG2 hücrelerinde Kaspaz 1 aktivitesine etkisi

3.11. SeO₂'in HepG2 hücrelerinde Kaspaz 9 aktivitesi

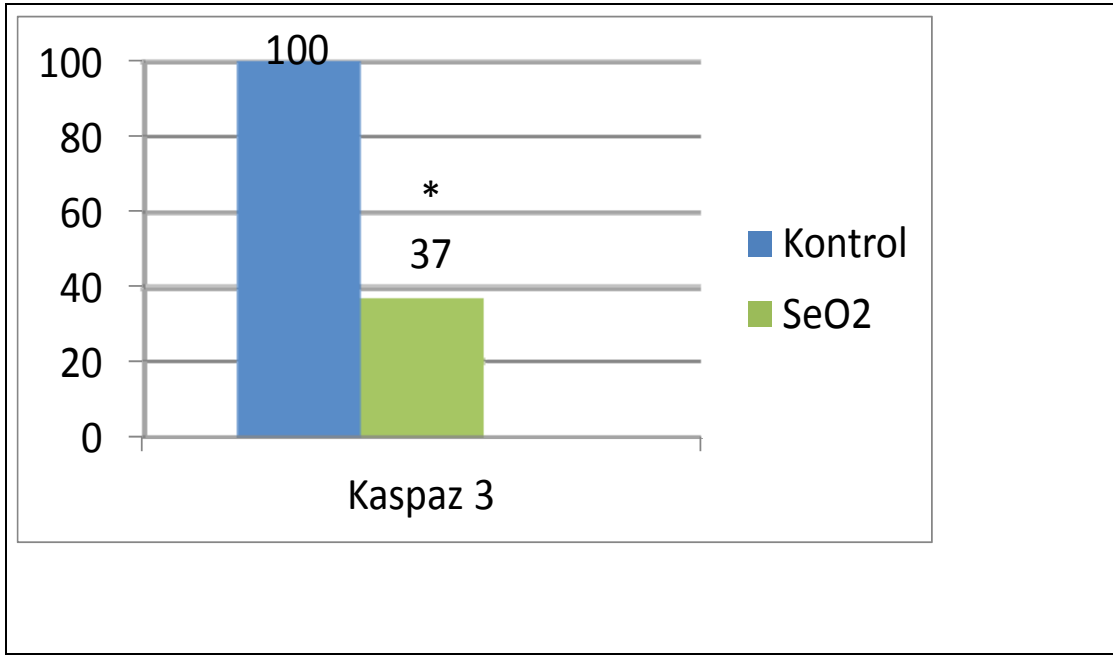
HepG2 hücrelerine 100 μ M konsantrasyonunda uygulanan SeO₂'nin Kaspaz 9 enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.11'de verilmiştir. Kaspaz 9 aktivitesi SeO₂ uygulanan HepG2 hücrelerinde % 36 azalma göstermiştir. Kaspaz 9 aktivitesinde görülen bu azalma istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.11: SeO₂'nin HepG2 hücrelerinde Kaspaz 9 aktivitesine etkisi

3.12. SeO₂'nin HepG2 hücrelerinde Kaspaz 3 aktivitesi

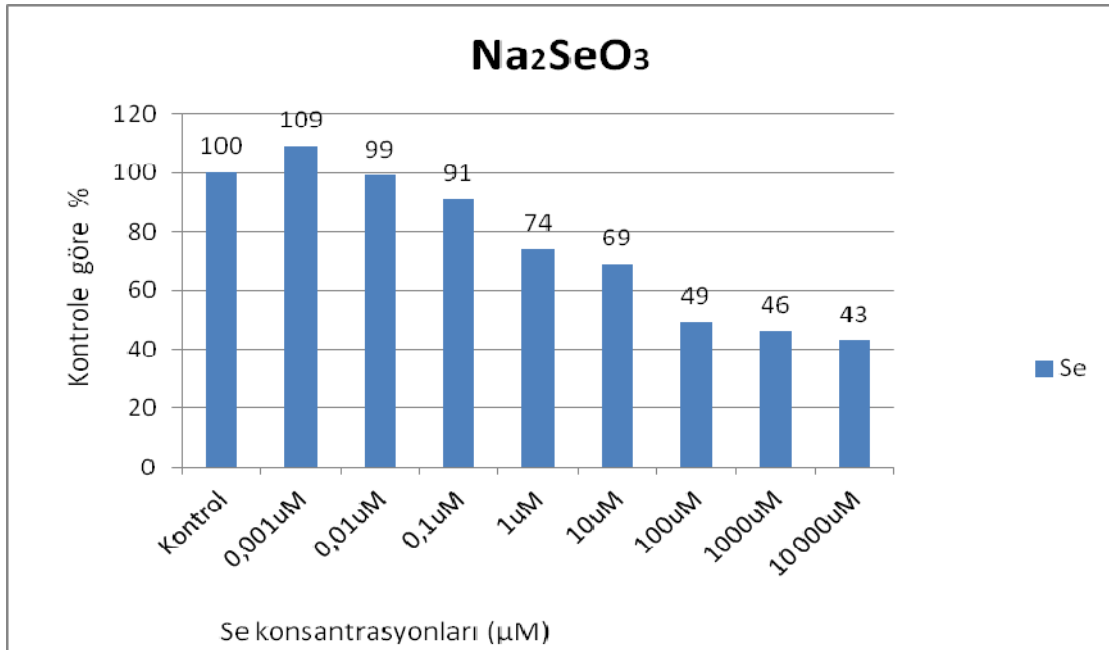
HepG2 hücrelerine 100 µM konsantrasyonda uygulanan SeO₂'nin Kaspaz 3 enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.12'de verilmiştir. Kaspaz 3 aktivitesi SeO₂ uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre % 63 azalma göstermiştir. Kaspaz 3 aktivitesinde görülen bu azalma istatistik olarak anlamlı bulunmuştur (p< 0,05).



Şekil 3.12: SeO₂'nin HepG2 hücrelerinde Kaspaz 3 aktivitesine etkisi

3.13. Na₂SeO₃'ün HepG2 hücrelerinde Hücre Canlılık Testi sonuçları

Na₂SeO₃'ün 0,001 μ M - 10 000 μ M arasındaki farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerine uygulanması sonucunda elde edilen hücre canlılık testi sonuçları ile kontrol grubuna göre hesaplanan hücre canlılığı % değerleri Şekil 3.13'de verilmiştir.

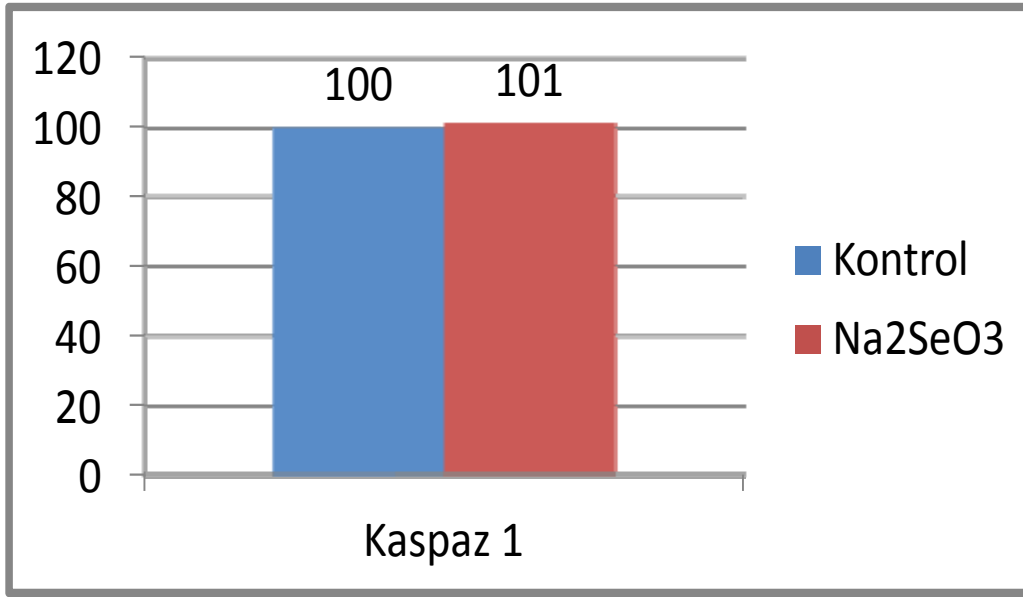


Şekil 3.13: Na₂SeO₃'ün HepG2 hücrelerinde Hücre Canlılık Testi sonuçları

Na₂SeO₃'ün 0,001 µM - 1 µM aralığındaki farklı konsantrasyonlarının uygulandığı HepG2 hücrelerindeki hücre canlılığı kontrol grubuna göre sırasıyla % 109, % 99 ve % 91 olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyonlardaki hücre canlılığı oranları kontrol grubuna yakın değerlerde bulunmuştur. HepG2 hücrelerine uygulanan 1 µM Na₂SeO₃ konsantrasyonunda hücre canlılığında kontrole göre bir azalma görülmüştür. Hücre canlılığında görülen bu azalma, Na₂SeO₃'in artan konsantrasyonlarına bağlı olarak azalmaya devam etmiştir. Na₂SeO₃'nin 1 µM konsantrasyonundaki hücre canlılığı kontrole göre % 74 bulunmuştur. Kontrole göre hücre canlılığında görülen belirgin azalmanın olduğu bu doz sitokrom c ve kaspaz enzim aktivite analizleri için uygulanacak doz olarak belirlenmiştir.

3.14. Na₂SeO₃'ün HepG2 hücrelerinde Kaspaz 1 aktivitesi

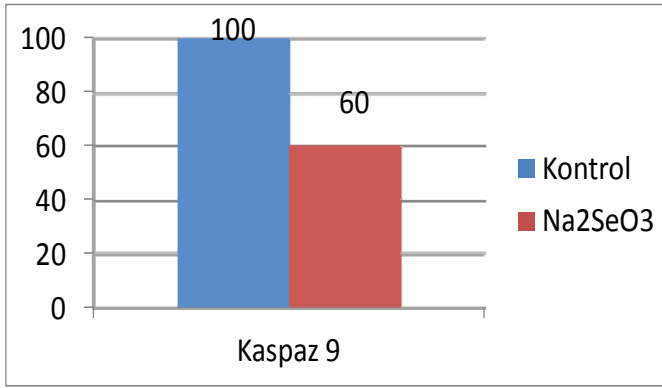
HepG2 hücrelerine 1 µM konsantrasyonunda uygulanan Na₂SeO₃ Kaspaz 1 enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.14'de verilmiştir. Kaspaz 1 aktivitesi Na₂SeO₃ uygulanan HepG2 hücrelerinde % 1 artış göstermiştir. Kaspaz 1 aktivitesinde görülen bu artış istatistik olarak anlamlı değildir.



Şekil 3.14: Na₂SeO₃ ün HepG2 hücrelerinde Kaspaz 1 aktivitesine etkisi

3.15. Na₂SeO₃'ün HepG2 hücrelerinde Kaspaz 9 aktivitesi

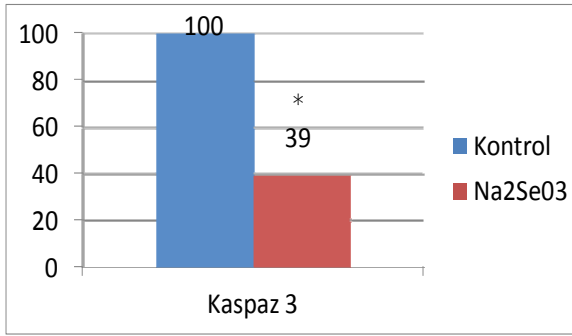
HepG2 hücrelerine 1 µM konsantrasyonunda uygulanan Na₂SeO₃ Kaspaz 9 enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.15'de verilmiştir. Kaspaz 9 aktivitesi Na₂SeO₃ uygulanan HepG2 hücrelerinde % 40 azalma göstermiştir. Kaspaz 9 aktivitesinde görülen bu azalış istatistik olarak anlamlı değildir.



Şekil 3.15: Na₂SeO₃'ün HepG2 hücrelerinde Kaspaz 9 aktivitesine etkisi

3.16. Na₂SeO₃'ün HepG2 hücrelerinde Kaspaz 3 aktivitesi

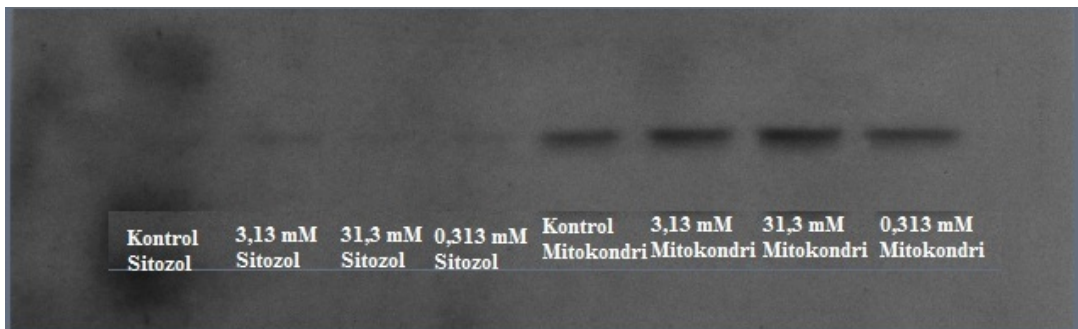
HepG2 hücrelerine 1 µM konsantrasyonunda uygulanan Na₂SeO₃ Kaspaz 3 enzim aktivitesine etkisi Şekil 3.16'de verilmiştir. Kaspaz 3 aktivitesi Na₂SeO₃ uygulanan HepG2 hücrelerinde % 61 azalma göstermiştir. Kaspaz 3 aktivitesinde görülen bu azalma istatistik olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05).



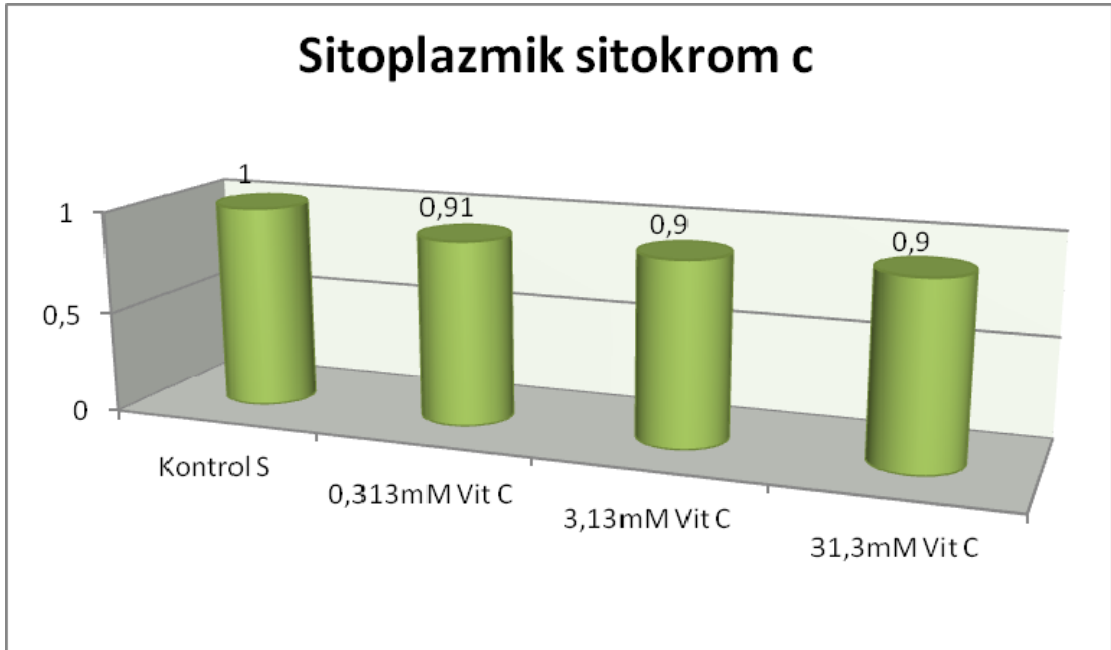
Şekil 3.16: Na₂SeO₃'ün HepG2 hücrelerinde Kaspaz 3 aktivitesine etkisi

3.17. Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 Hücrelerinde Sitokrom c sonuçları

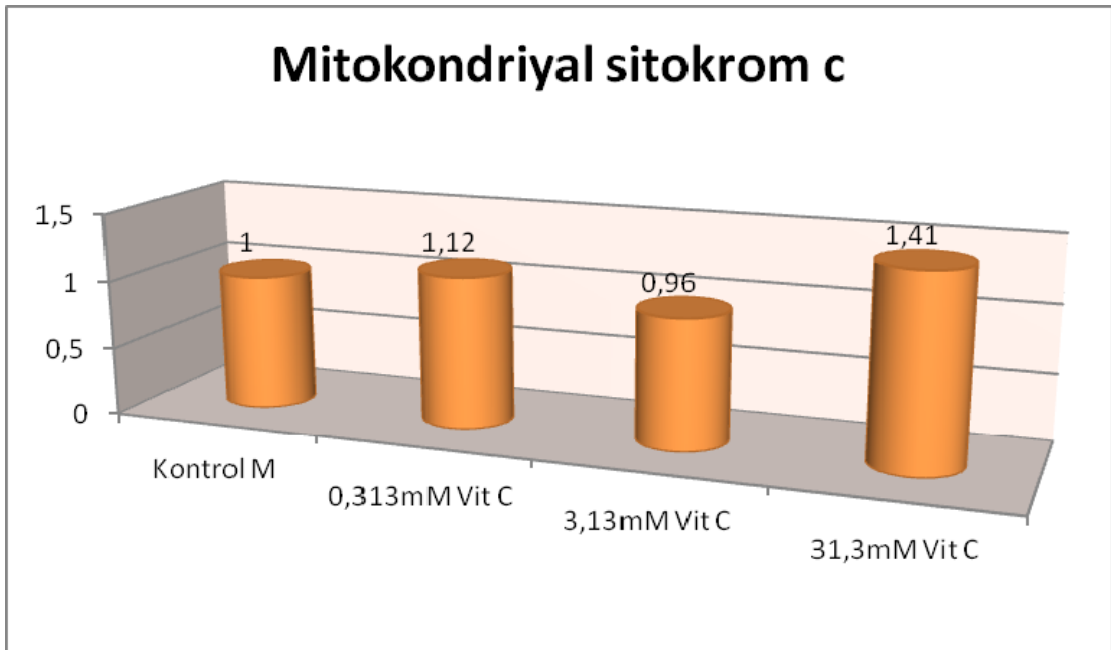
Hücrelerde mitokondrilerde lokalize olan sitokrom c'nin farklı dozlarda Vit C uygulanan HepG2 hücrelerinde mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonlarının western blot analiz sonuçlarına ait bant görüntüleri Şekil 3.17'de verilmiştir. Bu verilere göre oransal değişimler (Şekil 3.18; Şekil 3.19) incelendiğinde istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.17. Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde Sitokrom c sonuçları



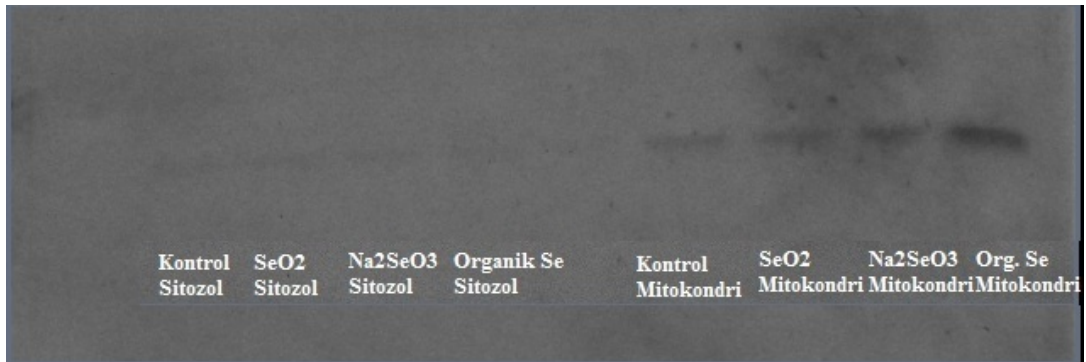
Şekil 3.18 : Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinin sitoplazmik fraksiyonuna ait Western blot verilerinin oransal değişimleri (Veriler en az 3 ayrı analizin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. $P > 0,05$)



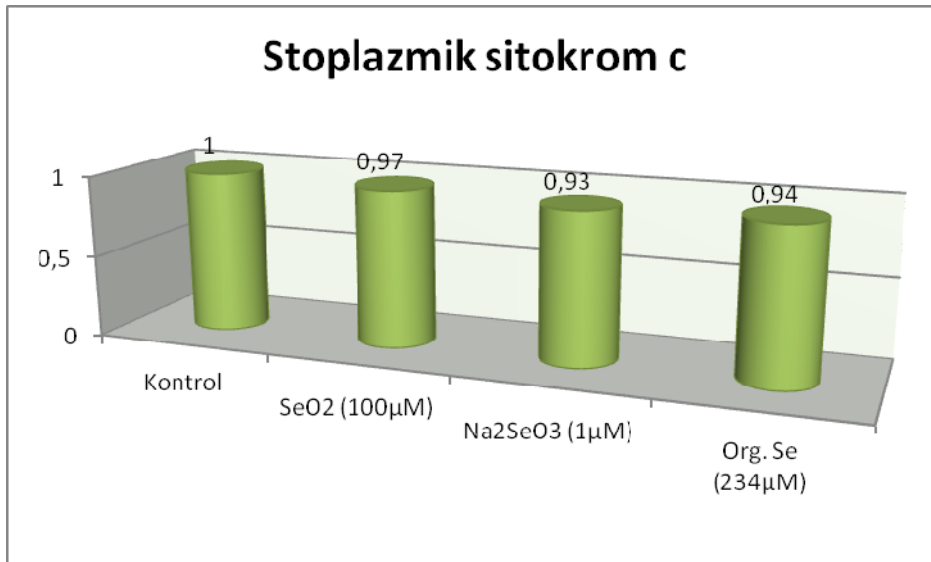
Şekil 3.19 : Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinin Mitokondriyal fraksiyonuna ait Western blot verilerinin oransal değişimleri (Veriler en az 3 ayrı analizin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. $P > 0,05$)

3.18. Farklı Formlarda Selenyum Uygulanan HepG2 Hücrelerinde Sitokrom c Sonuçları

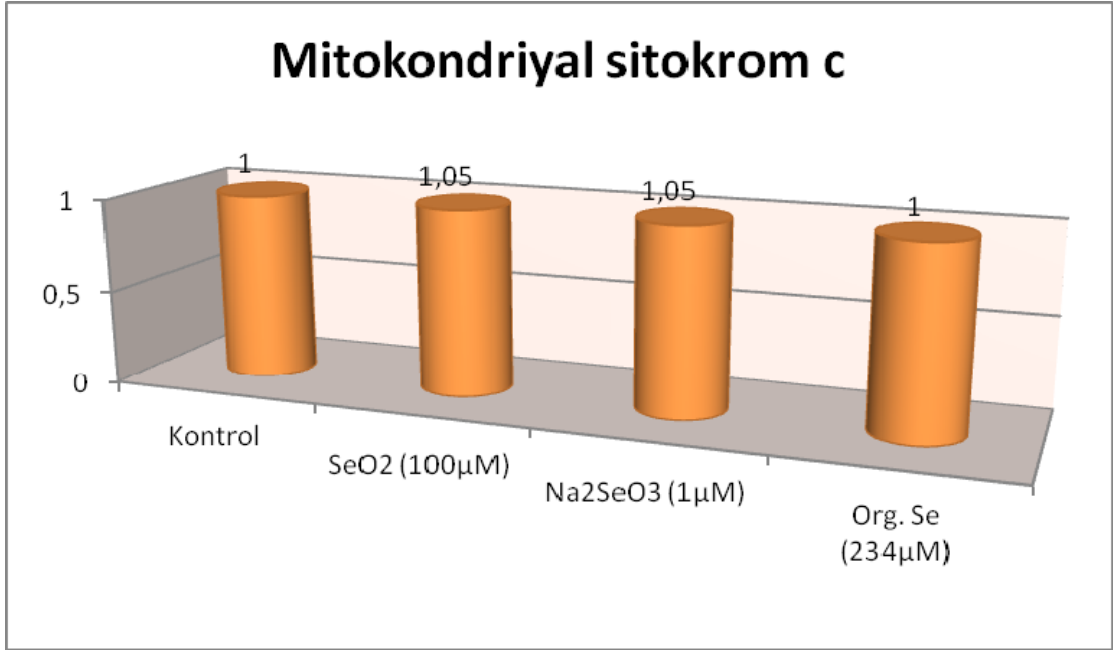
Hücrelerde mitokondrilerde lokalize olan Sitokrom c'nin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonlarının western blot analiz sonuçlarına ait bant görüntüleri Şekil 3.20'de verilmiştir. Bu verilere göre oransal değişimler (Şekil 3.21, Şekil 3.22) incelendiğinde istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.20. Farklı formlarda Selenyum uygulanan HepG2 hücrelerinde Sitokrom c sonuçları



Şekil 3.21. SeO₂, Na₂SeO₃ ve Org. Se uygulanan HepG2 hücrelerinde sitoplazmik fraksiyonlara ait Western Blot Analiz verileri (Veriler en az 3 ayrı analizin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. P> 0,05)



Şekil 3.22 : SeO₂, Na₂SeO₃ ve Org. Se uygulanan HepG2 hücrelerinde Mitokondriyal fraksiyonlara ait Western Blot Analiz verileri (Veriler en az 3 ayrı analizden ortalaması alınarak hesaplanmıştır. P> 0,05)

4.TARTIŞMA

Çalışmada, antioksidan sistemde önemli bir yer tutan Selenyum (Se) ile güçlü bir antioksidan olan C vitamininin hepatoselüler karsinom hücrelerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, vitamin C ile Se'un organik ve inorganik formlarının Hepatoselüler karsinom hücrelerindeki hücre canlılığına etkileri belirlenmiştir. Hücre canlılığı sonuçlarına göre tespit edilen dozlarda Se'un organik ve inorganik formları ile Vit C'nin 3 farklı dozunun apoptotik hücre ölümüne etkileri kaspaz 1, 3, 9 enzim aktiviteleri ve sitokrom c düzeyleri ile incelenmiştir. Kontrol grubu HepG2 hücrelerine göre hücre canlılıkları ve kaspaz 1, 3, 9 enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak, sitokrom c düzeyleri ise hem mitokondriyal hem de sitoplazmik fraksiyonlarda western blot yöntemleriyle ölçülmüştür.

Vitamin C ve Selenyumun HepG2 hücre hattında uygulama dozunu belirlemek amacıyla hücre çoğalması ve canlılığının in vitro ortamda belirlenmesinde bir kriter olan Quick Cell hücre proliferasyon testi uygulanmıştır.

HepG2 hücrelerinde selenyumun farklı formlarının 24 saat inkubasyonu sonunda hücre canlılığında belirgin azalmanın gözleendiği, SeO₂ için 100 µM, Na₂SeO₃ için 1 µM ve L-selenometiyonin için 234 µM konsantrasyonları çalışmada uygulanacak dozlar olarak belirlenmiştir. Se'un hücrelerdeki etkisi Se'un formuna ve dozuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Şekil 3.5, Şekil 3.9, Şekil 3.13). Organik Se'un, inorganik Se formlarına göre HepG2 hücrelerinde daha yüksek konsantrasyonlarında hücre ölümü gözlenmiştir. İnorganik Se formlarının hücre ölümü üzerine etkileri de farklılık göstermektedir. Na₂SeO₃ HepG2 hücrelerinde SeO₂ 'e göre daha düşük konsantrasyonlarda toksik etkili olmuştur. İnorganik Se formlarının düşük konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu gözlenmiştir.

Se'un kanser hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkilerini araştıran çalışmalarda, Se'un konsantrasyonu, kimyasal formu ve uygulanan hücre tipine göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Chen ve Wong, 2009; Susin ve ark., 1999; Uguz ve ark., 2009; Zou ve ark., 2008). Se'un yüksek dozlarda hücre sayısı ve canlılığını azalttığı ve lipit peroksidasyonuna bağlı olarak apoptozisi teşvik ederek kanserli hücrelerin çoğalmasını önlediğini bildirilen çalışma sonuçları (Susin ve ark., 2000; Uguz ve ark., 2009; Zou ve ark., 2008.) organik ve inorganik Se'un hücre canlılık testi bulguları ile uyumlu bulunmuştur. Düşük dozlarda ise tersi etki göstererek lipit peroksidasyonunu önleyerek antioksidan aktivitesi ile hücre proliferasyonunda artışa neden olduğunu bildirilen çalışma sonuçları (Gopee ve ark., 2004; Susin ve ark., 2000; Uguz ve ark., 2009; Zou ve ark., 2008) inorganik Se formlarının bulguları ile uyumlu görülmektedir. Organik Se formunun uygulanan tüm konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu tespit edilmemiştir.

Se'un antioksidan aktivitesi GPx enzim aktivitesi ile ilişkilidir (Gebre-Medhin ve ark., 1984). Se'un kanser hücrelerini apoptozise götürmesi tiyol içeren enzimleri inaktive etmesi sonucu, ROS üretimini ve oksidasyonu arttırmasına bağlı olduğu bildirilmektedir (Susin ve ark., 2000; Uguz ve ark., 2009).

Zou ve ark.'nın (2008) sodyum selenit ile yaptıkları çalışmada 10 µM Se 24 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin yaklaşık % 70'i canlı kalmıştır. Na-selenitin farklı konsantrasyonlarının HL 60 hücrelerinde hücre canlılığına etkilerine bakılan çalışmada ise (Uguz ve ark., 2009), 10 µM Se'un 24 saat inkübasyonunda hücre canlılığında % 75 oranında düşüş tespit edilmiştir. Çalışmada da sodyum selenitin HepG2 hücrelerinde 10 µM Se konsantrasyonunun 24 saat inkübasyonunda kontrol hücrelerine göre % 69 'u canlı kalmıştır. Çalışma sonuçları, HepG2 hücreleri ile çalışan Zou ve ark.'nın (2008) sonuçları ile birebir örtüşürken HL 60 hücreleri ile yapılan çalışma (Uguz ve ark., 2009) sonuçları ile farklılık göstermektedir. Sodyum selenitin aynı konsantrasyonu HL 60 hücreleri üzerinde daha toksik etki göstermiştir. Toksikitedeki bu farklılık Se'un kanser hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkilerinin uygulanan hücre tipine göre değişiklik göstermesiyle ilgilidir.

Genel olarak sitotoksik bir ajan olarak düşünülmesine de, son yıllarda yapılan çalışmalarda Vit C'nin, askorbat radikalleri ve H₂O₂ oluşumu ile kanser hücrelerinde seçici olarak prooksidan etkileri ile hücrelerde oksidatif stres oluşturduğu gösterilmiştir. Vit C'nin in vitro hücreler üzerindeki paradoksal etkileri konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Düşük konsantrasyonlarda antioksidan etki (fizyolojik etki) , yüksek konsantrasyonlarda ise prooksidan etki (farmakolojik etki) göstermektedir (Chen ve ark., 2005; Duarte ve ark., 2007; Pevec ve ark., 2012). HL 60 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda askorbik asitin canlı hücre sayısındaki etkilerinin incelendiği çalışmada da konsantrasyona bağlı antioksidan ve prooksidan etkiler gözlenmiştir. Nitekim 0,1 mM askorbik asit konsantrasyonunda canlı hücre sayısının kontrolle aynı olduğu gözlenirken, 0,5 mM askorbik asit uygulamasından itibaren doz bağımlı olarak hücre sayısı azalmıştır. Çalışmada 24 saatlik inkübasyon yapılmış ve 1 mM askorbik asit konsantrasyonundan sonraki azalma istatistik olarak anlamlı bulunmuştur (Shinozaki ve ark., 2011) Bu çalışmada ise, 0.313 mM ile 3,13 mM Vit C konsantrasyonlarında kontrol hücrelere göre canlı hücre sayısında sırasıyla % 177 ve %231 artış ile hücre proliferasyonu gözlenmiştir. HepG2 hücrelerinde proliferatif etki gösteren konsantrasyon, HL 60 hücrelerinde hücre ölümüne neden olmuştur. HepG2 hücrelerinde canlı hücre sayısında belirgin azalma 31.3 mM Vit C konsantrasyonlarında tesbit edilmiştir. HL60 hücrelerinde daha düşük Vit C konsantrasyonlarında canlı hücre sayısında büyük oranda azalma gözlenmiştir. Hücre canlılığında görülen bu farklılıklar çalışmada kullanılan hücre tipine bağlı olarak şekillenmiş olabilir. Nitekim pankreas kanseri hücrelerinde 50 µM -200 µM konsantrasyonlardaki Asc-S'in 24 saat uygulanması bu hücrelerde doz bağımlı olarak hücre çoğalmasını kontrol grubu hücrelerine göre belirgin bir şekilde inhibe etmiştir. (Naidu ve ark., 2003). Başka bir çalışmada ise (Hsieh ve ark., 2010), 24 saat boyunca 0,854 mM askorbik asit uygulan HA22T/VGH hücrelerinde hücre canlılığında kontrol grubu hücrelerine göre % 28'lik bir azalma bulunmuştur.

Arranz ve ark.'nın (2008) HepG2 ve HL60 hücrelerinde nitrozamin ile oluşturdukları apoptozisin önlenmesinde Vit C'nin etkilerini incelemişler ve farklı inkübasyon sürelerinde 1-100 µM Vit C konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerinde

sitotoksik etki tesbit etmemişlerdir. HL60 hücrelerinde ise, 50 µM ve üzeri Vit C konsantrasyonlarında hücre canlılığında doz bağımlı bir azalma gözlemlenmiştir. Bunun yanında, 5-50 µM Vit C uygulanan hücrelerde NPYR ile indüklenen apoptoziste azalma gözlenmiştir (Arranz ve ark., 2008). Çalışmalar aynı hücre hattında yapılmakla birlikte, uygulanan Vit C konsantrasyonları farklılık göstermektedir. Buna bağlı olarak, Arranz ve ark.'nın Vit C uygulanan HepG2 hücrelerinde gözlemledikleri bulgular çalışma sonuçları ile uyumlu değildir.

Normal gelişim ve doku homeostazisi için kritik öneme sahip olan apoptozis, hücre ölümünün genlerle düzenlenmiş formudur. Şimdiye kadar ölüm reseptörü aracılı dış yolak, mitokondri aracılı iç yolak ve endoplazmik redikulum aracılı oksidatif stres yolağı gibi bir çok apoptotik yolak ortaya konulmuştur (Kinloch ve ark., 1999). Apoptotik hücre ölümü ekstraselüler ve intraselüler sinyallerin, mitokondriyal değişimlerin, proapoptotik proteazların, spesifik endonükleazların aktivasyonu ile DNA fragmantasyonunun dahil olduğu kompleks bir mekanizmayla başlatılabilmektedir (Susin ve ark., 2000; Uguz ve ark., 2009).

Proapoptotik sinyal, başlatıcı (initiatör) ilk kaspazı aktive etmektedir. Bu da diğer efektör kaspazları aktive ederek hücre sel bozulma açığa çıkarmaktadır. Sinyalleri ayırt edip düzenleyen bir çok çeşit başlatıcı kaspaz söz konusudur. Örneğin, Kaspaz 8 ölüm reseptörlerini (DISC) içeren bir apoptoz ile ilişkilidir. Kaspaz 9 ise sitotoksik ajanların uyarısı sonucu hücre ölümünü gerçekleştirmektedir. UV ışığı, kimyasallar, DNA bozulmasına yol açan ajanlar ve çeşitli kemoterapötikler apoptozisi başlatan sitotoksik ajanlardır. Bunlar, mitokondriyal hasara bağlı sitokrom c'nin salınımı yoluyla kaspaz 9 aktivasyonunu sağlarlar. Aktif enzim (Kaspaz 9) prokaspaz 3 gibi kaspaz zimojenlerinin aktivasyon işlemini başlatır (Salsaven ve Dixit, 1997).

Farklı kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda (Drake, 2006; Zou ve ark., 2004) Se, kaspaz aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümünde rol oynamaktadır. Bunun yanında Se kaspaz bağımsız apoptotik hücre ölümünde de yer almaktadır. Kaspaz

bağımsız hücre ölümü, mitokondriden apoptozisi indükleyen faktörlerin nükleer translokasyonu ile olmaktadır (Susin ve ark., 2000).

FDA tarafından antikarsinojen kabul edilen Se formu +4 oksitleyici haldeki selenittir. Selenit formundaki Se protein kinaz C gibi enzimlerin sülfidril gruplarını oksitleyerek disülfid bağlantısı oluşturarak inaktif enzim oluşumuna neden olmaktadır. Protein kinaz C inaktivasyonu kanser hücrelerinde apoptozisi indüklemektedir. Selenitin sülfidril gruplarını oksitlemesi sonucu süperoksit ve peroksit üretimi artmaktadır. Apoptozisin başlatılmasında enzim inaktivasyonu ve/veya ROS üretimi etkilidir (Drake, 2006).

Shilo ve Tirosh'un (2003) yapmış oldukları çalışmada selenit, Jurkat T hücreleri ve J774.2 makrofaj hücrelerinde mitokondriyal oksidan oluşumu ile kaspaz bağımsız nekrotik hücre ölümünü aktive ettiğini göstermişlerdir. 5 μ M ve üzeri selenit dozlarının hem Jurkat T hücrelerinde hem de makrofajlarda hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır (Shilo ve Tirosh, 2003).

Zou ve ark.'nın (2004) yaptığı çalışmada ise 5-20 μ M Na-selenit NB4 hücrelerinin çoğalmasını doz ve zaman bağımlı olarak azaltmıştır. Ayrıca Na₂SeO₃ uygulanan NB4 hücrelerinde 10 μ M Na₂SeO₃ uygulamasının ardından kaspaz 3 aktivitesi hızlı bir şekilde artış göstermiştir.

Oksisterol olan 7B OH-kolesterol bir çok hücre hattında oksidatif strese bağlı sitotoksik etki oluşturmaktadır. 7B OH-kolesterolün insan monosit kan hücre hattı (U937) ile HepG2 hücrelerine etkilerine bakıldığı çalışmada her iki hücre hattında da hücre canlılığında azalma görülmekle birlikte apoptozis belirteçlerinden kaspaz 3 aktivitesi U937 hücrelerinde istatistik önemde artarken, HepG2 hücrelerinde ise azalmıştır (O'Callaghan, 2002).

H₂O₂ ile muamele edilen primer domuz tiroid hücrelerinde GPx aktivitesi azalma gösterirken kaspaz aktivitesi artmaktadır. Bu hücrelerin 10-100 nM Selenit ile inkübasyonunda GPx aktivitesi normale dönerken kaspaz 3 aktivitesinde azalma görülmüştür. H₂O₂'in oluşturduğu oksidatif strese etkisi ile apoptozise giden primer hücrelerde, Se'un antioksidan etkisi ile oksidatif stresin azalmasına bağlı kaspaz aktivasyonunda düşüş görülmüştür (Demelash ve ark., 2004).

Servikal kanser hücreleri ile yapılan çalışmada (Rudolf ve ark., 2008), Na-selenit zamana ve doza bağlı oluşturduğu oksidatif stres sonucunda kaspaz bağımsız apoptozisi indüklemektedir. Servikal kanser hücrelerinde selenit uygulamasının p53 bağımlı proapoptotik yolun aktivasyonu sonucu proapoptotik Bax proteininin toplam birikimindeki artışa bağlı hücre ölümü şekillenmektedir. p38 ve JNK (Jun N- terminal Kinaz) gibi stres ileten kinazların Se uygulamasına bağlı spesifik aktivasyonları da kaspaz bağımsız apoptozisin oluşumunda rol aldığı bildirilmektedir (Ghose ve ark., 2001; Jiang ve ark., 2004; Rudolf ve ark., 2008). Rudolf ve ark.'nın (2008) yapmış oldukları çalışmada selenitin p38 aktivasyonu doza bağımlı farklılıklar göstermektedir. Düşük selenit dozlarında p38'in fosforilasyonu oluşmakta ve p38'in aktivasyonu saatlerce devam etmektedir. Yüksek selenit dozlarında da p38 forforilasyonu şekillenmekte fakat kısa sürmektedir, bu da p38 yolağında paradoksal baskılamaya neden olmaktadır (Rudolf ve ark., 2008).

Na-selenit uygulanan birçok tip hücrede kaspazların dahil olduğu mitokondriyal yolağa bağlı direkt ya da indirekt etkilerle hücre ölümü olduğu bildirilmiştir (Shilo ve Tirosh, 2003; Li ve ark., 2007).

Se uygulamalarına bağlı kaspaz aktivasyonunda artış görülmediği bulgular ile uyumlu çalışmalar olduğu gibi (O'Callaghan, 2002; Ghose ve ark., 2001; Rudolf ve ark., 2008), Se uygulaması sonucu kaspaz aktivasyonunun arttığını bildiren araştırmalar da vardır (Zou ve ark., 2004; Shilo ve Tirosh, 2003; Li ve ark., 2007).

Bunun yanında selenit uygulanan hücrelerdeki apoptotik hücre ölümlerinde sitokrom c'nin yer almadığı, kaspaz 8 ve 9'un etki etmediği, çok az kaspaz 3 aktivitesinin arttığını bildiren çalışmalar da vardır (Rudolf ve ark., 2008). Organik Se sonuçları bu çalışma sonuçları ile uyumlu görülmektedir.

Se'un farklı formlarının in vitro hücre kültüründeki etkileri ile ilgili çalışmalar yanında (Chen ve Wong, 2008; O'Callaghan ve ark., 2002; Rudolf ve ark., 2008) in vivo deney hayvanları ile yapılmış çalışmalar da (Hirose ve ark., 1997; Li ve ark., 2008) bulunmaktadır. İnsan prostat kanser ksenografları uygulanan farelerde farklı organik Se formları ile inorganik Na-selenitin hücre proliferasyonu ve canlılığı ile ilgili yapılan çalışmalarda sadece Na-selenitin in vitro olduğu gibi in vivo olarak da genotoksik etkileri olduğu, metilselenik asit ve metilselenosisteinin, selenometiyonin ile Na-selenite göre doza bağlı olarak ksenograft büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2008).

Bu çalışmada ise, inorganik Se bileşiklerinden Na_2SeO_3 ve SeO_2 ile Organik Se l-selenometiyonin'in artan konsantrasyonlarının canlı hücre sayısında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.5, Şekil 3.9 ve Şekil 3. 13) . Se uygulaması yapılmayan kontrol grubu hücrelere göre belirgin hücre ölümünün başladığı Se konsantrasyonları, SeO_2 için 100 μM , Na_2SeO_3 için 1 μM ve organik Se için 234 μM olarak belirlenmiştir. Kaspaz aktiviteleri ve sitokrom c analizleri bu Se konsantrasyonlarında yapılmıştır. İnorganik Se uygulanan hücrelerde kaspaz 1, 3 ve 9 enzim aktivasyonu gözlenmemiştir. Aksine kontrol grubuna göre daha düşük kaspaz 3 enzim aktivitesi ölçülmüştür. Kontrol grubu hücrelere göre Se uygulanan hücrelerdeki kaspaz inaktivasyonu Se'un kaspaz aktivasyonunda yer alan enzimleri inhibe etmesi (Drake, 2006) sonucu olabilir.

Se uygulamalarına bağlı görülen hücre ölümüne ROS üretimi ile ilişkilendirilmiş (Drake, 2006; Gopee ve ark., 2004; Shilo ve Tirosh, 2003; Uguz ve ark., 2009), ve artan ROS üretimi sonucu görülen apoptotik hücre ölümünün kaspaz bağımsız apoptotik yolak üzerinden gerçekleştiği bildirilmiştir (Rudolf ve ark., 2008).

Çalışmada bu literatürlerle uyumlu olarak kaspaz enzim aktivasyonunun görülmemesi, kanımızca apoptotik hücre ölümünün kaspaz bağımsız yolak üzerinden gerçekleşmesine bağlanabilir.

Uğuz ve ark.'nın (2009), HL60 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, Se'a bağlı kaspaz aktivasyonu sonucu apoptozis gözlenmiştir. Bu çalışmada ise, Se uygulamasına bağlı HepG2 hücrelerinde şekillenen kaspaz bağımsız hücre ölümü görülmesi, Se'un kimyasal formu ve uygulandığı hücre tipi ile ilişkili olabilir.

Se konsantrasyonu da apoptozisin indüklenmesinde etkilidir. Yapılan çalışmalarda, düşük ya da orta konsantrasyonlarda Se, ROS ile indüklenen apoptozisi önlerken, yüksek konsantrasyonda ROS üretimini arttırarak apoptozise neden olmaktadır (Gopee ve ark., 2004)

Birçok kaspaz apoptozisin indüklenmesiyle ilgili olsa da, Kaspaz 1 diğer adıyla IL-1 dönüştürücü enzim (IL-1B converting enzyme-ICE) IL1B ve IL-18 gibi inflamatuvar sitokinlerin proteolitik işlenmesinden ve aktivasyonundan sorumludur. Kaspaz 1 (ICE) memeli hücrelerinde bulunan ilk kaspaz olmasının yanı sıra inflamasyonda rol oynayan önemli bir sitokin olan pro IL-1B'nin 31 kDa'luk inaktif formunu, 17 kDa'luk aktif forma dönüştürmesiyle de iyi bilinmektedir (Kostura ve ark., 1989).

Kaspaz 1 apoptotik sürecin temel komponentlerinden biri olmasa bile, birçok sistemde apoptozise sebep olduğu bildirilmiştir. Örneğin, kaspaz 1'in ekspresyonu fibroblastlarda apoptozise sebep olur ve bakteri ile enfekte makrofajların apoptozisi için kaspaz 1 gereklidir (Miura ve ark., 1993, Hersh ve ark., 1999). HepG2 hücrelerinin organik Se ile 24 saat inkübasyonu sonunda istatistik olarak önemli olmasa da kaspaz 1 aktivasyonunda artış bulunmuştur (Şekil 3.6).

Organik Se uygulamasında kaspaz 1 ve 3 aktivitesinde istatistik olarak anlamlı olmayan bir artış görülmüştür (Şekil 3.6 ve Şekil 3.8). Rudolf ve ark.'nın (2008) servikal kanser hücreleri ile yapmış oldukları çalışmada da Na-selenit uygulanan hücrelerdeki apoptotik hücre ölümlerinde kaspaz 8 ve 9'un yer almadığı, çok az kaspaz 3 aktivitesinin arttığı bildirilmektedir. Kaspaz inhibitörlerinin Se ile birlikte uygulanması yapılan hücrelerin sadece Se uygulaması yapılan hücrelerle karşılaştırıldığında hücre ölümlerinde bir düşmenin tespit edilmemesi, Se'un apoptotik hücre ölümüne etkilerini kaspaz bağımsız olarak gerçekleştirdiğini göstermektedir. Çalışmadaki organik Se uygulamasında görülen kaspaz 1 ve 3 aktivasyonu Rudolf ve ark.'nın (2008) yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir. Fakat Rudolf ve ark. (2008) servikal kanser hücrelerinde Na-selenit uygulamasında tespit ettikleri durum, çalışmada HepG2 hücrelerinde organik Se'da gözlenmiştir (Şekil 3.6 ve Şekil 3.8). Kaspaz bağımlı ya da bağımsız apoptotik ölüm yolunun indüksiyonu kanımızca Se'un kimyasal formu ve hücre tipine bağlı değişiklik göstermesi sonucu olabilir.

Askorbik asitin, farelerde spontan olarak oluşan meme tümörü ve ultra-viole ışını ile oluşturulan deri kanserinde (Pauling, 1991), yine ratlarda kimyasallar tarafından oluşturulan hepatokarsinogeneziste (Inric ve ark., 1991) kanser oluşumunu geciktirdiği ve oluşumunu önlediği gözlemlenmiştir.

Asc-S ve arjinin (24 saat) kombinasyonu uygulanan HA22T/VGH hepatoma hücrelerinde prokaspaz 3 ve prokaspaz 9 aktivasyonunun düştüğü yani kaspaz 3 ve kaspaz 9'un aktive olduğu görülmüştür (Hsieh ve ark., 2010). Shinozaki ve ark.'nın (2011) HL60 hücrelerinde yaptıkları çalışmada da kaspaz 3, 8 ve 9 enzim aktivitesinde artış görülmüştür. Bu çalışmada ise, Vit C uygulanan HepG2 hücrelerinde, Hsieh ve ark (2010) ile Shinozaki ve ark.'nın (2011) bulgularından farklı olarak kaspaz aktivasyonunda artış görülmemesi, kanımızca Vit C'nin hücre tipine bağlı farklı etki oluşturması sonucu olabilir.

Padayatty ve ark (2006), 1 mM ve üzeri kan Asc-A konsantrasyonunun, intravenöz olarak uygulanmasının kanser tedavisi için gerekli olduğunu ve optimal Asc-A konsantrasyonun ise 5 mM olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda Asc-A ve X-Ray kombinasyonunun HL60 hücrelerinde apoptozisi arttırdığını gözlemlemişlerdir (Padayatty ve ark., 2006).

Apoptotik hücre ölümünde mitokondri içinde elektron transport zincirinin bir proteini olan sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınımı da etkili olmakla birlikte, Se'un indüklediği apoptotik hücre ölümünde sitokrom c'nin yer almadığı, AIF, SMAC-DIABLO proapoptotik proteinlerin mitokondriden salınımı ile şekillendiği bildirilmektedir (Rudolf ve ark., 2008). Çalışmada sitoplazmik ve mitokondriyal sitokrom c düzeylerinin kontrol hücrelere göre Se uygulanan hücrelerde bir farklılık göstermemesi, kanatımızca sitokrom c'nin Se'a bağlı apoptotik hücre ölümünde yer almamasından (Rudolf ve ark., 2008) dolayı olabilir. Vit C uygulanan HepG2 hücrelerindeki sitokrom c'nin sitoplazmik ve mitokondriyal düzeylerinin de kontrol hücrelere göre değişiklik göstermemesi, Se uygulamalarında olduğu gibi sitokrom c'nin apoptotik hücre ölümünde yer almamasından dolayı olabilir.

Kemoterapi ya da radyasyon ile kanser tedavisinde en önemli noktalardan biri de uygulanan tedavinin kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelere de zarar vermesidir. Bununla birlikte bu tedavi yönteminde hastalar çok ciddi yan etkilere maruz kalmaktadırlar. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar kemoterapi sırasında antioksidanların kullanılmasının yararlı olabileceğini gösterse de, kanser kemoterapisi sırasında antioksidanların verilmesi konusunda çalışmalar devam etmektedir. Burada en önemli nokta kullanılan kemoterapötik ajanın oksidatif stres oluşturarak apoptozis yoluyla öldürmeye çalıştığı kanser hücrelerini, dışardan verilen antioksidanlarla apoptozise gitmesini engellemektir. Vit C ve Se gibi antioksidanlar uygun konsantrasyonlarda verildiğinde kanser hücrelerinde apoptozisi arttırdığı, bunun yanında sağlıklı hücrelerde ise zararlı etkileri bulunmadığı gösterilmiştir. Antioksidanların kullanılması uygulanan kemoterapötik ajanın dozunun azaltılması bakımından da önemlidir. Antioksidanların hem bu yararlı etkilerini gösterecek hem

de insan ve hayvanlarda doz aşımına bağlı yan etkiler göstermeyecek uygulama dozunun ve plazma konsantrasyonlarının belirlenmesi için çalışmalara yer verilmesi, ileri dönemlerde uygulanacak yeni tedavi stratejileri bakımından da önemlidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Vit C'nin 0,000313 mM ile 625 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerine uygulanması ile Vit C konsantrasyonuna bağlı hücre canlılığında gözlenen artış 3,13 mM Vit C konsantrasyonundan sonra azalma göstermiştir. En yüksek Vit C konsantrasyonunda (625 mM) hücrelerdeki ölüm oranı % 86 bulunmuştur. Vit C'nin 0,313 mM ile 3,13 mM konsantrasyonlarında hücre canlılığında 2 ve 2.5 kat artış gözlenmiştir.

Hücre canlılığında kontrole göre azalmanın görüldüğü 31,3 mM Vit C konsantrasyonu HepG2 hücrelerinde sitokrom c ve kaspaz enzim aktivite analizleri için uygulanacak doz olarak belirlenmiştir. Bunun yanında kontrole göre 2 ve 2.5 kat hücre canlılığında artışa neden olan 0,313 mM ve 3,13 mM Vit C konsantrasyonlarındaki sitokrom c ve kaspaz enzim aktivitelerine de bakılmıştır.

Vit C (0,313 mM, 3,13 mM ve 31,3 mM) uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre kaspaz 1 ve kaspaz 3 enzim aktivitelerinde azalma tespit edilmiştir. Kaspaz 9 enzim aktivitesinde ise 31,3 mM Vit C konsantrasyonunda hafif bir artış bulunurken, diğer Vit C konsantrasyonlarında azalma görülmüştür. Kaspaz 1 ve 3 enzim aktivitesinde görülen bu azalma, 0,313 mM, 3,13 mM Vit C uygulanan hücrelerde kaspaz inhibisyonuna bağlı apoptozisin baskılanmış olabileceğini ve hücre proliferasyonda artış meydana geldiğini göstermektedir.

Organik Se olarak L-selenometiyonin 8 µM ile 935 µM arasındaki farklı konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerine uygulanması ile artan Se konsantrasyonuna bağlı hücre canlılığında azalma görülmüştür. HepG2 hücrelerinde kontrole göre hücre canlılığında belirgin azalmanın olduğu L-selenometiyoninin 234 µM konsantrasyonu sitokrom c ve kaspaz enzim aktivite analizleri için uygulanacak doz olarak belirlenmiştir.

Selenometiyonin uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre kaspaz 1 ve kaspaz 3 enzim aktivitelerinde artış, kaspaz 9 enzim aktivitesinde ise azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar istatistik olarak anlamlı olmamakla birlikte, Selenometiyoninin indüklediği apoptoziste kaspaz 1 ve 3'ün rol oynadığının bir göstergesi olabilir.

SeO₂'nin 0,001 µM ile 10 000 µM aralığındaki farklı konsantrasyonlarının uygulandığı HepG2 hücrelerindeki hücre canlılığı kontrol grubuna göre 1 µM SeO₂ konsantrasyonuna kadar hafif bir artış göstermiştir. 1 µM SeO₂ konsantrasyonundan sonra ise artan doza bağlı hücre canlılığında azalma görülmüştür. Kontrole göre hücre canlılığında belirgin azalmanın olduğu 100 µM SeO₂ konsantrasyonu sitokrom c ve kaspaz enzim aktivite analizleri için uygulanacak doz olarak belirlenmiştir.

SeO₂ uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre kaspaz 1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. Hücre canlılığında görülen azalmanın yanında kaspaz aktivitesinin olmaması SeO₂'in HepG2 hücrelerinde kaspaz bağımsız hücre ölümüne neden olduğunun göstergesi olabilir.

Na₂SeO₃'ün 0,001 µM ile 10 000 µM aralığındaki farklı konsantrasyonlarının uygulandığı HepG2 hücrelerindeki hücre canlılığı kontrol grubuna göre 0.001 µM Na₂SeO₃ konsantrasyonunda artış göstermiştir. Na₂SeO₃'in artan konsantrasyonunda kontrol grubuna göre hücre canlılığı azalmıştır. HepG2 hücrelerinde kontrole göre hücre canlılığında belirgin bir azalma görülen Na₂SeO₃'nin 1 µM konsantrasyonu sitokrom c ve kaspaz enzim aktivite analizleri için uygulanacak doz olarak belirlenmiştir.

Na₂SeO₃ uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrol grubuna göre kaspaz 1 enzim aktivitesinde bir değişiklik görülmezken kaspaz 9 ve kaspaz 3 enzim aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. Kaspaz 3 ve 9 enzim aktivitelerinde görülen bu azalma

Na_2SeO_3 'in HepG2 hücrelerinde kaspaz bağımsız hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir.

Hücrelerde esas olarak mitokondrilerde lokalize olan sitokrom c'nin farklı dozlarda Vit C uygulanan HepG2 hücrelerinde özellikle yüksek hücre proliferasyonunun görüldüğü 3.13 mM Vit C konsantrasyonlarında sitozolik sitokrom c bantları belirgin gözlenmiştir.

Se ve Vit C uygulanan HepG2 hücrelerinde mitokondriyal sitokrom c bantları sitokrom c bantlarından daha yoğun olarak tespit edilmiştir. Sitoplazmik fraksiyonlarında da sitokrom c bantlarının varlığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak Se'un antikanser etkinliğinin belirlenmesinde Se'un kimyasal formu ve uygulama dozu etkili olmaktadır. Bu çalışmada kullanılan organik Se formu olan L-selenometiyonin ve inorganik Se formları olan Na_2SeO_3 ile SeO_2 yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalmaya neden olmaktadır. Bunun yanında inorganik Se formlarının düşük konsantrasyonları hücre canlılığında hafif bir artışa neden olmaktadır.

Vitamin C uygulanan hücrelerde ise çok düşük dozlarda ve yüksek dozlarda hücre canlılığında azalma görülürken, 0,0313Mm,0,313Mm ve 3,13Mm konsantrasyonlarda kontrol hücrelere göre belirgin bir şekilde hücre canlılığı artmıştır. Bu değişimler kanser tedavisinde antioksidanların kullanımında uygulanacak dozun önemini göstermektedir. Kanser tedavisinde amaç kanserli hücrelerin öldürülmesidir. Bu noktada uygulanan antioksidanın kanser hücrelerin çoğalmasını indüklemesi istenmeyen bir sonuçtur ve tedavi stratejisi üzerinde olumsuz etkilere neden olabilecektir.

Kanser tedavisinde antioksidanların verilmesi üzerinde durulması gereken ve etkilerinin aydınlatılması gereken bir konudur. Antioksidanların tek başına ya da kemotröpatik ajanlarla kullanımı üzerinde çalışmalar yapılmaya devam etmektedir. Bu şekilde antioksidanların kanser tedavisinde apoptozis üzerine etkilerinin ve uygulama dozlarının belirlenmesi ileride yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önemli katkıda bulunacaktır.

Apoptozis hücre ölüm şekli olup özel hücresel mekanizmalar ile birlikte dir. Bu mekanizmalar hücre ölümü sırasında (fizyolojik veya orta şiddette zedelenme sonrası) yüksek oranda korunmakta, zarar görmemektedir ve mevcudiyetini devam ettirmektedir. Bu işlemler esnasında kompleks biyokimyasal olaylar açığa çıkmaktadır. Apoptotik hücre ölüm mekanizmalarının düzenlenmesinin anlaşılması rasyonel olarak apoptozisin manipülasyonuna ve terapötik amaçlarla kullanımı yolunu açacaktır.

ÖZET

HepG2 Hücrelerinde Selenyum ve Vitamin C'nin Apoptozis Üzerine Etkileri

Kanser araştırmalarında yapılan çalışmalar apoptozisin kanser gelişiminde ve tedaviye cevapta önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Uygulanan tedavi yönteminin apoptozisi başlatma mekanizması uyarana göre farklılık göstermektedir. Ancak bu mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır.

Güçlü bir antioksidan olan Vit C ve antioksidan sistemde önemli bir yer tutan Se'un HepG2 hücrelerinde apoptozis üzerine etkilerinin incelenmesinin amaçlandığı bu çalışmada, hücre canlılık testi, sitokrom c, kaspaz 1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivite analizleri yapılmıştır. Hücre oğalama Testinde canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle değerlendirildi. Kaspaz 1, 3 ve 9 analizleti işaretlenmiş substrat ile kolorimetrik olarak ölçülmüş, sitokrom c düzeyleri Western Blot analizi ile belirlenmiştir.

Hücre canlılığında kontrol grubu hücrelerine göre azalmanın olduğu 31,3 mM Vit C, 234 µM L-selenometiyonin, 100 µM SeO₂ ve 1 µM Na₂SeO₃ yoğunluğu sitokrom c ve kaspaz enzim aktivite analizleri için uygulanacak doz olarak belirlenmiştir. Bunun yanında kontrol hücrelerine göre hücre çoğalmasında belirgin artışın gözlendiği 0,313 mM ve 3,13 mM Vit C yoğunlukları da sitokrom c, kaspaz 1, 3 ve 9 enzim analizler için uygulanacak dozlara dahil edilmiştir.

HepG2 hücrelerinin 24 saat inkübasyonu sonucunda 31,3 mM Vitamin C, 234 µM L-selenomethionin, 100 µM SeO₂ ve 1 µM Na₂SeO₃ dozlarında hücre canlılığında belirgin bir azalma görülmüştür (sirasıyla, %16, %12, %32 ve %26).

Farklı dozlarda Vitamin C ve farklı formlarda Se uygulanan HepG2 hücrelerinde Kaspaz 1, 3 ve 9 enzim aktivitelerinde istatistik olarak önemli bir artış gözlenmemiştir. Ancak 0,313 mM and 31,3 mM Vit C (%53 ve %57) and 100 µM SeO₂ (%63) uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz 3 enzim aktivitesinde istatistik olarak önemli azalma meydana gelmiştir.

Hücrelerde mitokondri iç ve dış zarları arasında lokalize olan sitokrom c, apoptotik uyarı ile sitoplazmaya salınmaktadır. 0,313 mM, 3,13 mM, 31,3 mM konsantrasyonlarda Vitamin C, 234 µM L-selenometiyonin, 100 µM SeO₂ and 1 µM Na₂SeO₃ uygulanan HepG2 hücrelerinin sitoplazmik ve mitokondriyal sitokrom c düzeylerinde istatistik anlamda bir değişim gözlemlenmemiştir.

Sonuç olarak, farklı dozlarda Vitamin C ve farklı formlarda Selenyum uygulanan HepG2 hücrelerinde şekillenen hücre ölümlü kaspaz bağımsız olarak şekillenmektedir. Meydana gelen hücre ölümlünün mitokondriden bazı apoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınımı ile şekillenen diğer hücre ölümleri ile ilişkilendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, HepG2, Selenyum, Vitamin C

SUMMARY

The Effects of Selenium and Vitamin C on Apoptosis in HepG2 Cells

Studies in cancer research show that apoptosis plays a major role in both tumor formation and treatment response. The mechanisms for triggering apoptosis upon therapy may differ for individual stimuli and are only partially understood.

In this study proliferation assay, cytochrome c, caspases 1, 3, and 9 enzyme activity analyses were performed to investigate the effects of Vitamin C and Selenium on apoptosis in HepG2 cells. Cell proliferation assay was evaluated by spectrophotometric measurement of formazan dye produced by viable cells. Caspases 1, 3, and 9 calorimetric assays were performed adding labeled substrate and cytochrome c determined by Western blotting.

According to the results of cell proliferation assay, 31,3 mM Vitamin C, 234 μ M L-selenomethionine, 100 μ M SeO₂ and 1 μ M Na₂SeO₃ concentration which reduced the cell viability significantly. 3,13 mM and 0,313 mM Vitamin C concentrations which show significant increase of cell viability were determined as applied dose for measuring the caspases 1, 3 and 9 enzyme activity and cytochrome c analyses.

There were significant loses of HepG2 cells viability, measured by Quick cell proliferation assay, 24 h after treatment with 31,3 mM Vitamin C, 234 μ M L-selenomethionine, 100 μ M SeO₂ and 1 μ M Na₂SeO₃ (16%, 12%, 32% and 26% respectively).

There were no significant increase in caspases 1, 3 and 9 activity in Vitamin C and Se treated HepG2 cells. However the caspases 3 activity decreased in HepG2 cells treated with 0,313mM and 31,3 mM Vit C (53% and 57%) and 100 μ M SeO₂ (63%) significantly.

Cytochrome c located between inner and outer membrane of mitochondria and releases from mitochondria to cytosol with apoptotic stimuli. No statistic changes was observed in cytoplasmic and mitochondrial cytocrome c levels in HepG2 cells treated with 0,313 mM, 3,13 mM, 31,3 mM Vitamin C, 234 μ M L-selenomethionine, 100 μ M SeO₂ and 1 μ M Na₂SeO₃ for 24 h.

In conclusion, our results suggest that Vitamin C and Selenium can induce caspases-independent cell death in HepG2 cells. It may be related to release of some apoptotic protein from mitochondria to cytosol.

Key words: Apoptosis, HepG2, Selenium, Vitamin C

KAYNAKLAR

- ANONİM (2012a): Erişim: <http://www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/1260110414.pdf>, Erişim Tarihi: 24.02.2012
- ANONİM (2012b): Erişim: <http://www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/1260110414.pdf> Erişim Tarihi 30.01.2012
- AIDOO A, LYN-COOK LE, LENSING S, WAMER W. (1994) Ascorbic Acid (Vitamin C) Modulates The Mutagenic Effects Produced By Alkylating Agent In Vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* **24**: 220-228.
- AKSOY, N., VURAL, H., SABUNCU, T., ARSLAN, O., AKSOY, S., (2005). Benefical effect of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats, *Nutr. Res.*, **25**: 625-630
- ARAS, K., ERSE, G., KARALAN, S., (1976). Vitaminler, *Ankara Üniversitesi Basımevi*, Ankara, s.: 96-100
- ASARD, H., MAY, J.M., SMIRNOFF, N., (2004). Vitamin C Function and Biochemistry in animals and plants, *Free Radical Bio. Med.*, 173-220
- ARRANZ, N., HAZA, I.A., GARCIA, A., DELGADO, M.E., RAFTTER, J., MORALES, P. (2008). Inhibition by vitamin C of apoptosis induced by N-nitrosamines in HepG2 and HL-60 cells, *J. Appl. Toxicol.*; **28**: 788-796
- BARINAGA, M. (1998). Death By Dozens Of Cuts. *Science*; **280**: 5360, 32-37
- BEKERECIOGLU, M., UGRAS, S., DİLEK, O.N., (1998). Serbest Radikaller. *Sendrom* **10**(3): 85-94
- BJÖRNSTEDT, M., KUMAR, S., BJÖRNSTEDT, L., SPYROU, G., HOLMGREN, A. (1997). Selenium and Thioredoxin and Glutaredoxin System. *Biomed Environ Sci.*, **10**:271-9
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254. 1976.
- BROWN, K.M., ARTHUR, J.R., (2001). Selenium, Selenoproteins And Human Health: A Review. *Public Health Nutr*: **4**:593-9
- BUDD, R.C. (2002). Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* ;**109**:437-42
- BUYUKAKYUZ, N., ALTUĞ, T., YALTIRIK, M. (2000). Kanser proflaksisinde antioksidan maddelerden E vitamini ve Seun önemi. *Dişhekimliğinde Klinik Derg.* **12**: 136-139

- CARSON, D.A., RIBEIRO, J.M. (1993). Apoptosis and disease. *The Lancet* **341**: 1251–4.
- CHAN, A.C. (1993). Partners in Defense, Vitamin E and Vit C. *Can. J. Physiol. Pharmac.* **71**: 725–731
- CHEN, T., WONG, Y.S., (2009) Selenosystine induces reactive oxygen species- mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **63**:105-113
- CHEN, T., ZHENG, W., WONG, Y.S., YANG, F. (2008). Mitochondria-Mediated Apoptosis in Human Breast Carcinoma MCF7 Cells Induced By A Novel Selenadiazole Derivative. *Biomed Pharmacoter* **62**:77-84
- CHEN, Q., ESOEY, M.G., KRISHNA, M.C., MITCHELL, J.B., CORPE, C.P., BUETTNER, G.R. (2005). Pharmacologic Ascorbic Acid Concentrations Selectively Kill Cancer Cells: Actin As A Pro-Drug To Deliver Hydrogen Peroxide To Tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 13604-9
- COHEN, J.J. (1998). Apoptosis. To Be Or Not To Be. *Postgraduate Syllabus (AA-AA-I)* **1**: 1–19
- COMBS, G.F. (2004). Status of selenium in prostate cancer prevention. *Br J Cancer* **91**:195-199
- COMBS, G.F. (1998). Vit C: Fundamental aspects in nutrition and health, *Academic Press*, New York, 245-275
- COOPER, G.M. (1994). Programmed cell death. The cell. In: Cooper GM (ed) Chapter 14. Washington: ASM Pres: 592-596
- CRYNS, V., YUAN, J. (1998). Proteases To Die For. *Genes and Development* **12**: 1551-1570
- CUOLTAS, L., STRASSER, A. (2000). The Molecular Control Of DNA Damage-Induced Cell Death, *Apoptosis*; **5**: 491-507
- DECKER, E.A., CLARKSON, P.M., (1999). Dietary sources and bioavailability of essential and antioxidants, *Amsterdam*, 334-337
- DEMELASH, A., KARLSSON, J.O., NILSSON, M., BJÖRKMAN, U., (2004). Selenium has a protective role in caspase-3-dependent apoptosis induced by H₂O₂ in primary cultured pig thyrocytes. *European Journal of Endocrinology* **150**: 841-849
- DRAKE, E.N. (2006). Cancer Chemoprevention: Selenium As A Prooxidant, Not An Antioxidant. *Medical Hypotheses* **67**,318-322
- DUARTE, T.L.,ALMEIDA, G.M., JONES, G.D.D. (2007). Investigation of thr role of extracellular H₂O₂ and transition metal ion in the genotoxic action of ascorbic acid in cell culture models. *Toxicology letter*. **170**: 67
- EL-BAYOUMY, K., SINHA, R. (2004). Mechanisms of Mammary Cancer Chemoprevention By Organoselenium Compounds. *Mutat Res* **551**:181-97
- ELLIS, R.E., YUAN, J.Y., HORVITZ, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**: 663-698)

- EMADI-KONJIN, P., VERJEE, Z., LEVIN, A.V., ADELI, K., (2005). Measurement of intracellular Vit C levels in human lymphocytes by reverse phase high performance liquid chromatography, *Clin. Biochem.*, **38**(5): 450-456
- ERDOĞAN, B., B., UZASLAN, E., K. (2003). Apoptozis Mekanizmları: Tümör Gelişiminde Faz-Fasl Bağımlı Apoptozis, *Akciğer Arşiv* **4**: 165-174
- FOSTER, L.H., SUMAR, S. (1997). Selenium in health and disease: a review. *Crit Rev Food Sci.*, **37**: 211-228
- GEBRE-MEDHIN, M., EWALD, U., PLATIN, L. (1984). Elevated serum selenium in diabetic children. *Acta Pediatr Scand.*, **73**: 109-114
- GHOSE, A., FLEMING, J., EL-BAYOUMY, K., HARRISON, P.R. (2001). Enhanced Sensitivity of Human Oral Carcinomas to Induction of Apoptosis by Selenium Compounds: Involvement of Mitogen-activated Protein Kinase and Fas Pathways. *Cancer Research*, **61**, 7479–7487
- GOPEE, N.V., JOHNSON, V.J., SHARMA, R.P. (2004). Selenite-induced apoptosis in murine B-sslymphoma cells is associated with inhibition of protein kinase C, nuclear factor Kb, and inhibitor of apoptosis protein. *Toxicol Sci* **78**:204-214
- GÜNEŞ, H. (1999). Sitokinlerin hücre döngüsü üzerinde etkileri. *Tr J of Biology* **23**: 283-292.
- HEAD, K.A. (1998). Ascorbic Acid in the Prevention and Treatment of Cancer. *Altern. Med. Rev.* **3**: 174–186
- HERSH, D., MONACK, D.M., SMITH, M.R., GHORI, N., FALKOW, S., ZYCHLINSKY, A. (1999). The Salmonella invasion Sip B induces macrophage apoptosis by binding to caspas-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2396-401
- HIROSE, Y., YOSHIMI, N., SUZUI, M., KAWABATA, K., TANAKA, T., MORI, H. (1997). Expression of bcl-2 ,bax, and bcl-XL proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas. *Mol Carcinog* **19**(1) :25-30.
- HU, Y.M., BENEDICT, M.A., DING, L.Y.(1999) Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis, *EMBO J.* **18**: 3586-3595
- HSIEH, B.S., HUANG, L.W., SU, S.J., CHENG, H.L., HU, Y.C., HUNG T.C., CHANG, K.L. (2010). Combined arginin and ascorbic acid treatment induced apoptosis in the hepatoma cell line HA22T/VGH and changes in redox status involving the pentose phosphate pathway and reactive oxygen and nitrogen species. *J Nutr Biochem* **22**(3):234-41
- INRIC, L.L., PETERSON, A.R., SEVANIAN, A. (1991). Mechanisms of Ascorbic Acid-Induced Inhibition of Chemical Transformation in C3H/ 10T1/2 Cells. *Am J Clin Nutr* **54**:1236S
- IQBAL, K., KHAN, A., (2004). Biological significance of ascorbic acid in human health, *Pakistan J. Nutr.*, **3**: 5-13

- JIANG, C., KIM, K.H., WANG, Z., LÜ, J. (2004). Methyl Selenium-Induced Vascular Endothelial Apoptosis Is Executed by Caspases and Principally Mediated by P38 MAPK Pathway. *Nutrition and Cancer*, **49**(2), 174–183
- KERR, J.F., WILLIE, A.H., CURRIE, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*; **26**: 239–257
- KIM, P.K., MAHIDARA, R., SEOLO, W. (2001). The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat*. **5**: 293-6
- KINLOCH, R.A., TREHERNE, J.M., FURNESS, L.M., HAJIMOHAMADREZA, I., (1999). The Pharmacology of Apoptosis, *Trends in Pharmacological Sciences*; **20**: 35-42
- KINEKT, P., MARNIEMI, J., TEPPU, L. (1998). Is low selenium status a risk factor for lung cancer? *Am J Epidemiol* **148**; 975-982
- KOSTURA, M.J., TOCCI, M.J., LIMJUCO, G., CHIN J, CAMERON, P., HILLMAN, A.G., CHARTRAIN, N.A., SCHMIDT, J.A.(1989). Identification of a monocyte specific preinterleukin 1 p convertase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:5227-5231
- KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., ELLERBY, L.M., WELSH, K., XIE, Z., DEVERAUX, Q.L., SALVESEN, G.S., BREDESEN, D.E., ROSENTHAL, R.E., FISKUM, G., REED, J.C. (1999). Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci, USA* **96**: 5752-5757
- LACASSE, E.C., BAIRD, S., KORNELUK, R.B. (1998) The Inhibitors of Apoptosis. (Iaps) and Their Emerging Role in Cancer. *Oncogene*; **17**: 3247-3259
- LEUNG, P.Y. (1993). Cytotoxic Effect of Ascorbate and its Derivatives on Cultured Malignant and Nonmalignant Cell Lines. *Anticancer Res* **13**: 475–480
- LI, G.X., LEE, J.H., WANG, Z., HU, H., LIAO, D.J., WATTS, C.J., COMBS, F.G., LÜ, J. (2008). Superior in vivo inhibitory efficacy of methylseleninic acid against human prostate cancer over selenomethionine or selenite. *Carcinogenesis* **29**(5): 1005-1012
- LI, G.X., HU, H., JIANG, C., SCHUSTER, T., LU, J. (2007). Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer cells. *Int J Cancer* **120**:2034-2043
- LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIHardjo, I., SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., ALNEMRI, E.S. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*; **91**: 479 – 489
- LOWE, S.W., LIN, A.W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, **21**, 485-495.
- MAREK, L., CHRISTOPHER, S., DEINER, J. (2001). Caspases; More Than Just Killers? *Trends in Immun.* **22**: 1, 31-4
- MELLER, R., SKRADSKI, S., L., SIMON, R., P. (2002). Expression Proteolysis and Activation of Caspases 6 and 7 During Rat C6 Glioma Cell Apoptosis. *Neurosci Lett.* **10**: 324, 33-36

- MICHELS, A.J., JOISER, N., HAGEN, M.T. (2003). Age-related decline of sodiumdependent ascorbic acid transport in isolated rat hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **410**: 112-120
- MIURA, M., ZHU, H., ROTELLO, R., HARTWEIG, E.A., YUANS, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* **75**:653-60
- MOUNTZ, J.D., ZHOU, T. (2001). Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. A, Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions. Lippincott Williams & Wilkins
- NAIDU, K.A., KARL, R.C., NAIDU, K.A., COPPOLA, D. (2003). Antiproliferative and Proapoptotic Effect of Ascorbyl Stearate in Human Pancreatic Cancer Cells. *Digestive Disease And Science* **48**(1): 230-237
- NAIDU, K.A., WIRANOWSKA, M., KORI, S.H., PROCKOP, L.D., KULKAMI, A.P. (1993). Inhibition of Human Glioma Cell Proliferation and Dlutathione S-Transferase by Ascorbyl Esters on Interferon. *Anticancer Res.* **13**: 1469
- NICHOLSON, D.W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*; **6**: 1028-1042
- O'CALLAGHAN, Y.C., WOODS, J.A., O'BRIEN, N.M. (2002). Characteristic of 7B hydroxycholesterol-induced cell death in human monocytic blood cell line, U937, and a human hepatoma cell line, HepG2. *Toxicology in Vitro* **16**: 245-251
- ÖNİZ, H. (2004). Apoptosis: The Death Decision. *SSK Tepecik Hast Derg.* **14**(1): 1-20
- PADAYATTY, S.J., RIORDAN, H.D., HEWITT, S.M. (2006). Intraavenously Administered Vitamin C as Cancer Therapy: Three Cases. *CMAJ*: **174**:937-942
- PAOLINI, M., POZETTI, L., PEDULLI, G.F., MARCHESI, E., (1999) The nature of prooxidant activity of Vitamin C, *Life Sci.*, **64**(23): 273-278
- PAULING, L. (1991). Effect of Ascorbic Acid on Incidence of Spontaneous Mammary Tumors and UV Light Induced Skin Tumors in Mice. *Am J Clin Nutr.* **54**: 1252S
- PETROS, A.M., OLEJNICZAK, E.T., FESIK, S.W. (2004) Structural biology of the bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1644**(2-3): 83-94
- PEVEK, A.Z., SLEJKOVEK, Z., VON ELTEREN, J.T., FALNOGA, I. (2012). As₂O₃ oxidation by vitamin C; Cell culture studies. *Biomaterials.* **25**: 103-113
- RAYMAN, M.P. (2000). The Importance of Se to Human Health. *Lancet*; **356**:233-41
- REYNOLDS, J.A., TANFORD, C. (1970). The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.*, **245**: 5161-5165.
- RUDOLF, E., RUDOLF, K., CERVINKA, M. (2008). Selenium activates p53 and p38 pathway and induces caspases-independent cell death in cervical cancer cells. *Cell Biol Toxicol* **24**:123-141

- SAKAGAMI, H., SATOH, K. (1997). Effect Of Ascorbate Oxidase On Radical Intensity And Cytotoxic Activity Of Ascorbate. *Anticancer Res* **17**: 1163–1166
- SALVESEN, G.S., DIXIT, V.M. (1999). Caspase Activation: The Induced-Proximity Model. *Proceeding of The National Academy of Sciences of The USA*; **96**: 217-245
- SCHOMBURG, L., SCHWEIZER, U., KÖHRLE, J. (2004). Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cell Mol Life Sci.* **61**(16):1988-95.
- SHEIKH, M.S., FORNACE, A.J. (2000). Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol*; **182**:171–81
- SHILO, S., TIROSH, O. (2003). Selenite Activates Caspase-Independent Necrotic Cell Death in Jurkat T Cells and J774.2 Macrophages by Affecting Mitochondrial Oxidant Generation. *Antioxidant and Redox Signaling*, **5**(3): 273-279
- SHINOZAKI, K., HOSOKAWA, Y., HAZAWA, M., KASHIWAKURA, I., OKUMURA, K., KAKU, T., NAKAYAMA, E. (2011). Ascorbic Acid Enhances Radiation-induced Apoptosis in an HL60 Human Leukemia Cell Line, *J. Radiat. Res.*, **52**, 229–237
- SINCLAIR, A.J., BARNET, A.H., LUNEC, J. (1990). Free Radicals and Antioxidant Systems in Health and Disease. *Br J Hosp Med* **43**: 334-344
- SJÖSTRÖM, J., BERGH, J. (2001). How Apoptosis Regulated, and What Goes Wrong in Cancer? *BMJ*; **322**: 1538–1539
- SMART, R.C., CRAWFORD, C.L. (1991). Effect of Ascorbic Acid and its Synthetic Lipophilic Derivative Ascorbyl Palmitate on Phorbol Ester-Induced Skin Tumor Promotion in Mice. *Am J Clin Nutr.* **54**:1266S
- SONG, H.J., SHIN, S.H., ROSS, G.M. (2001). Oxidative Stress Induced by Ascorbate Causes Neuronal Damage in an in Vivo System. *Brain Res*; **895**: 66-72
- SÜMBÜLOĞLU, K., SÜMBÜLOĞLU, V. (2000). Biyoistatistik. Hatipoğlu yayınları No.53. 9.Baskı.
- STRATTON, M., CAMPBELL, P., FUTREAL, A. (2009). The cancer genome. *Nature* **458**: 719–724.
- SUSIN, S.A., DAUGAS, E., RAVAGNAN, L., SAMEJIMA, K., ZAMZAMI, N., LOEFFLER, M., CASTANTINI, P., FERRI, K.F., IRINOPOULOU, T., PREVOST, M.C., BROTHERS, G., MAK, T.W., PENNINGER, J., EARNSHAW, W.C., KROMER, G. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 571-580.
- THOMPSON, C.B. (1999). Apoptosis. In: Paul WE, Ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers
- THOMPSON, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*; **267**: 1456-1462
- THORBERRY, N.A., LAZEBNIK, Y. (1998). Caspases: Enemies Within. *Science*; **281**: 5381, 1312-17

- TSAO, C.S. (1991). Inhibiting Effect Of Ascorbic Acid On Growth Of Human Mammary Tumor Xenografts. *Am J Clin Nutr* **54**: 1274S-1280S
- TURGUT, B., DEMİR, T., ÇELİKLER, Ü. (2006). Oftalmolojide Apoptozis. *Firat Tıp Derg* **11**(1): 6-11
- UGUZ, C.A., NAZIROGLU, M., ESPINO, J., BEJARANO, I., GONZALEZ, D., RODRIGUEZ, B.A., PARIENTE, A.J. (2009). Selenium Modulates Oxidative Stress-Induced Cell Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells Through Regulation of Calcium Release and Caspase-3 and -9 Activities. *J Membran Biol* **232** :15-23
- VAN DER LOO, B., BACHSCHMID, M., SPITZER, V., BREY, L., ULLRICH, V., LÜSCHER, T.F. (2003). Decreased plasma and tissue levels of Vit C in rat model of aging: implications for antioxidative defense, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**(2): 483-487
- VUCIC, D., FAIRBROTHER, W. (2007). The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* **13**:(20)
- WELLINGTON, C.L. (2000). Inhibiting Caspase Cleavage of Huntington Reduces Toxicity and Aggregate Formation in Neuronal and Non Neuronal Cells. *J Biol Chem.*; **275**: 19831-19838
- WHANGER, P.D. (2004). Selenium and Its Relationship to Cancer: An Update. *Br J Nutr*; **91**: 11-28
- WILBER, C.G. (1980). Toxicology Of Se: A Review. *Clin. Toxicol.* **17**:171-230
- XUE, D., SHAHAM, S., HORVITZ, H.R. (1996). The Caenorhabditis elegans celldeath protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the humanCPP32protease. *Genes. Dev.***10**: 1073-1083
- YANG JN, LIU CX. (2002). Caspases promoted DADA6 induced apoptosis in human Leukemia HL-60 cells. *Acta Pharmacol Sin.* **23**(5): 461-6
- YILMAZ, N., PENÇE., S. (2002). Kaspazlar. *İbni Sina Tıp Derg*; 127-146
- YUAN, J., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H.M., HORVITZ, H.R. (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*; **75**: 641 – 652
- ZOU L., LI J., YANG Y., WANG X., SHEN T., XU C.,ZHANG Z. (2004). Sodium Selenite induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia-derived NB4 cells by a caspase-3-dependent mechanism and a redox pathway different from that of arsenic trioxide. *Ann Hematol* **83**: 751-758
- ZOU, Y., NIU P., YANG J., YUAN J., WU T., CHEN X. (2008). The JNK signaling pathway is involved in sodium-selenite-induced apoptosis mediated by reactive oxygen in HepG2 cells. *Cancer Biology and Therapy* **7**: 5,691-698)

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Burcu Menekşe
Soyadı: ALPASLAN BALKAN
Doğum yeri ve tarihi: Kırşehir, 17.11.1979
Uyruğu: T.C.
Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu:

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı, Burdur
bmabalkan@mehmetakif.edu.tr
0 507 472 18 21

II- Eğitimi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi,
2006-

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1998-2003 , Veteriner Hekim, (79.66-100)
Kuşadası Kaya Aldoğan Lisesi, Fen Bilimleri Bölümü (Yabancı Dil Ağırlıklı)
(4.55/5.00)

Yabancı dili

İngilizce(İleri)

Almanca (Başlangıç)

III- Ünvanları

Araştırma Görevlisi, **Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya A.D.**, Eylül 2011-

IV- Mesleki Deneyimi

Gıda,Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Çankırı İl Müdürlüğü, Veteriner Hekim, Haziran 2011-Ağustos 2011

Servier Ilac ve Araştırma AŞ., Medikal Delege, Şubat 2008-Ocak2011

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Proje Asistanı, *Ağustos 2006-Ocak 2008*

Başkent Hayvan Hastanesi, Veteriner Hekim, *Eylül 2005-Ağustos 2006*

Harrod's Ltd. (Pet Shop), Veteriner Hekim, *Eylül 2004 – Haziran 2005*, Londra/İngiltere

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Hücre Ölümü Araştırma Derneği
European Association for Cancer Research

VI- Bilimsel İlgili Alanları

BİLİMSEL MAKALELER

Kısmalı G., Ozgur E., Sayiner S., **Alpaslan B.M.**, Guler G., Seyhan N., Sel T. (2009). The Effects of Epigallocatechin Gallate and N-Acetylcysteine on Mobile Phone-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig, *Journal of Animal and Veterinary Advances*. **8**(5): 959-961

Kısmalı G., Ozgur E., Sayiner S., **Alpaslan B.M.**, Guler G., Seyhan N., Sel T. (2009). The effects of Epigallocatechin gallate and N-Acetylcysteine on serum testosterone levels in mobile phone-exposed Guinea pigs, *Journal of Animal and Veterinary Advances* **8**(6): 1149-1151.

Zonturlu, A.K., Üren, N., Özyurtlu, N., B.Ozkurt G., **Alpaslan B.M.** (2008). Retensiyo Sekundinarumlu İneklerde Yaş, Süt Verimi, Vücut Kondisyon Skoru Ve Kan Serumu Se Düzeylerinin Karşılaştırılması. *F.Ü. Sağ. Bil. Derg.*, **22** (3): 127-130.

ULUSAL VE ULUSLAR ARASI KONGRE SUNUMLARI

Farklı Dozda Uygulanan Vit C'nin Hepg2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkileri, **B.M. Alpaslan**, T. Sel (sözlü sunum) 5. Ulusal Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 6-8 Eylül 2011, AYDIN

Doğal Enfekte Nematodiazisli Kilis Keçilerinde Rikabendazol Uygulamasının Eritrosit Sod, Cat, Gpx Enzim Aktiviteleri Ve MDA Düzeyine Etkileri, Güzin Özkurt - Borazan¹, İlker Çamkerten², Tekin Şahin², Ahmet Gökçen³, **Burcu Menekşe Alpaslan**⁴, Metin Boz (Poster Sunum) 5. Ulusal Biyokimya Ve Klinik Biyokimya Kongresi, 6-8 Eylül 2011, Aydın

Enzootik Pnömonili Kuzularda Eritrosit Antioksidan Enzim Aktiviteleri. Borazan G., Çamkerten, İ., Sahin, T., Daş, A., **Alpaslan, B.M.** (sözlü bildiri) VI. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi (Uluslar arası katılımı), 2-4 Temmuz 2009, İstanbul

Serum Seleniun Levels In Thoroughbred Race Horses In Turkey, **B. M. Alpaslan**, İ. Altıntaş, N. Üren, G. Yıldız, T. Sel, International Symposium on Selenium in health and disease, *12-13 Ekim 2006*, TÜBİTAK, ANKARA

Serum Concentration Of Selenium In Cows With Retained Fetal Membranes, N. Üren, G. Özkurt Borazan, A. Zonturlu, **B. M. Alpaslan**, International Symposium on Selenium in health and disease, *12-13 Ekim 2006*, TÜBİTAK, ANKARA

Kidney Tissue Selenium Levels Of Toxocara Canis Infected Mice Given N.Sativa, G. Özkurt Borazan, N. Üren, **B. M. Alpaslan**, S. Sayiner, International Symposium on Selenium in health and disease, *12-13 Ekim 2006*, TÜBİTAK, ANKARA

The Effects of Epigallocatechin Gallate and N-Acetylcysteine on Mobile Phone-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig, Gorkem Kismali , Elcin Ozgur , Serkan Sayiner , **Burcu Alpaslan** , Goknur Guler , Nesrin Seyhan 32nd FEBS Congress, 7-12 Temmuz 2007, 'Molecular Machines', Vienna, Austria

The effects of Epigallocatechin gallate and N-Acetylcysteine on serum testosterone levels in mobile phone-exposed Guinea pigs, S. Sayiner, E. Ozgur, **B. Alpaslan**, G. Kismali, G. Guler, N. Seyhan, T. Sel, 32nd FEBS Congress, 7-12 Temmuz 2007, 'Molecular Machines', Vienna, Austria

Subklinik Mastitisli Süt İneklerinde Süt Serum ve Kan Se Seviyelerinin Ölçülmesi, **Alpaslan B.M.**, Sel T., Karagül H., Istanbul University 5th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, 8-10 May 2003, Istanbul, Turkey

İmmünesupresif dozda Pednisolon Uygulanan Köpeklerde SDS-PAGE ve Nişasta Jel Elektroforez ile C-Reaktif proteinin Değerlendirilmesi **Üçüncülük Ödülü** İstanbul Üniversitesi 4. Ulusal Veteriner Hekimliği Öğrencileri Kongresi, 2002

İmmünesupresif Dozda Prednizolon Uygulanan Köpeklede Kan Serum Kalsiyum ve Potasyum Seviyesinin Ölçülmesi. İstanbul Üniversitesi 4. Ulusal Veteriner Hekimliği Öğrencileri Kongresi, 2002

KATILDIĞI BİLİMSEL TOPLANTILAR VE KURSLAR

- **Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu, 24-25 Kasım 2011, İZMİR**
- **5. Ulusal Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 6-8 Eylül 2011, AYDIN**
- **Moleküler Biyoloji'de ve Biyokimya'da kullanılan Temel Teknikler**, Dokuz Eylül Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, *17-27 Haziran 2007, Didim*
- **Uygulamalı Moleküler Teknikler ve Gamet Biyolojisi Kursu, İmmunohistokimya ve TUNEL Uygulamaları:** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, *14-27 Mayıs 2007, Antalya*
- **Apoptozis, Hastalıklarla ilişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri** (Teaching Workshop On Apoptosis); Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, *7-8 Aralık 2006, İzmir*
- **International Symposium on Selenium in health and disease, 12-13 Ekim 2006, TÜBİTAK, ANKARA**
- **Proteomics Workshop on Two Dimensional Electrophoresis**
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, (Eğitmen, Dr Carsten Lück ,Münih Teknik Üniversitesi) , *11-15 Eylül 2006*
- **31st Febs Congress, 24-29 Haziran 2006, İstanbul "Molecules in Health and Disease"**
- **12 th Congress of the International Society of Animal Clinical Biochemistry**

Veterinary Comparative Hematology and Cytoloji Course, *21 May 2006, İstanbul*

Veterinary Clinical Biochemistry Course, 22 May 2006, İstanbul

- **Royal Society of Medicine: 17 Mart 2004, Londra/İNGİLTERE**
 “Medical and Veterinary Education and Professional Development in 2011 and beyond”
 “2010 yılı ve sonrasında Tıp ve Veterinerlik Eğitimi ve Profesyonel Gelişimi
- **Istanbul University 5th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, 8-10 May 2003, Istanbul, Turkey**
- **İstanbul Üniversitesi 4. Ulusal Veteriner Hekimliği Öğrencileri Kongresi, 2002**
- **Yaban Hayatı Rehabilitasyon Sempozyumu, Mayıs 2002, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara/TÜRKİYE (Organizasyonda görev aldı)**

VII- Diğer Bilgiler

I. Ludwig Maximilian Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Münih/ALMANYA

Küçük Hayvan Cerrahi Kliniği : Eylül 2003

Çeşitli operasyonlara asistan olarak katıldı. Hayvanların operasyon sonrası bakım ve tedavisinden sorumlu oldu ve ayrıca klinikte tedavileri sürdürülen hayvanların rutin kontrollerinde görev aldı.

Jinekoloji Kliniği : Eylül 2003

Çeşitli operasyonlara asistan olarak katıldı. İnek, kısırak, kedi ve köpek gibi hayvanların jinekolojik muayenesini yaparak bu konuda çeşitli bilgiler edindi. Aygırlarda sperm alınması konusunda uygulamalara katıldı.

İç Hastalıkları Kliniği : Eylül 2003

Kliniğe gelen hastaların muayenesinde ve klinikte tedavileri devam eden hastaların bakımına yardımcı oldu.

II. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara, TÜRKİYE

Jinekoloji Kliniği

: 11 Haziran-20 Temmuz 2003

Kliniğe gelen hastaların muayeneleri, hastalıkların teşhis ve tedavisinde görev aldı. Düzenlenen seminerlere katıldı.

III. Ludwig Maximilian Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Münih/ALMANYA

Küçük Hayvan Cerrahi Kliniği (Yaz Stajı)

: Haziran-Eylül 2002

Çeşitli operasyonlara asistan olarak katıldı. Hayvanların operasyon sonrası bakım, tedavi ve ayrıca klinikte tedavileri sürdürülen hayvanların rutin kontrollerinde görev aldı.

IV. Kuşadası Veteriner Kliniği, Kuşadası, Aydın, TÜRKİYE
