

**BAZI MONOTERPEN VE UÇUCU
YAĞLARIN, HÜCRE ÇOĞALMASI
VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİNİN
MEMELİ HÜCRE KÜLTÜRLERİYLE
ARAŞTIRILMASI**

Murat Kaya
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Eylül, 2007

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Murat Kaya'nın " Bazı Monoterpen Ve Uçucu Yağların, Hücre Çoğalması ve Apoptozis Üzerine Etkilerinin Memeli Hücre Kültürleriyle Araştırılması" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 27.07.2007 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yard. Doç. Dr. A. TANSU KOPARAL
Üye	: Yard. Doç. Dr. MELİH ZEYTİNOĞLU
Üye	: Yard. Doç. Dr. MEDİHA CANBEK

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****BAZI MONOTERPEN VE UÇUCU YAĞLARIN HÜCRE ÇOĞALMASI
VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİNİN MEMELİ HÜCRE
KÜLTÜRLERİYLE ARAŞTIRILMASI****Murat KAYA****Anadolu Üniversitesi****Fen Bilimleri Enstitüsü****Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Yard. Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL****2007, 70 sayfa**

Bu tezde bitkilerden elde edilen bazı monoterpen ve uçucu yağların hücre çoğalması ve apoptozis üzerine olan etkileri memeli hücre kültürleri kullanılarak araştırılmıştır.

Timol, *Salvia fructicosa*, *Origanum onites* ve *Laurus nobilis* uçucu yağlarının hücre çoğalması üzerindeki etkileri BrdU (5-bromo-2'-deoksi-uridin) deneyi ile A549 ve V79 379A hücreleri üzerinde araştırılmıştır. *Salvia ructicosa*, *Origanum onites* ve *Laurus nobilis* uçucu yağları ile timol doza ve zamana bağlı olarak hücre çoğalması üzerinde bir azalmaya neden olmuştur.

Bazı monoterpen ve uçucu yağların apoptozis üzerine etkileri DAPI boyama ile floresan mikroskopunda araştırılmıştır. Test maddeleri A549 hücreleri üzerinde apoptotik etkiler göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Uçucu yağ, monoterpen, BrdU, Apoptozis, DAPI

ABSTRACT**Master of Science Thesis****INVESTIGATION OF EFFECTS OF SOME MONOTERPENES AND
SOME ESSENTIAL OILS ON CELL PROLIFERATION AND
APOPTOSIS BY MAMMALIAN CELL CULTURES****Murat KAYA****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Assist.Prof. Dr. A. Tansu KOPARAL****2007, 70 pages**

In this thesis, effects of some monoterpenes and some essential oils obtained from plants on cell proliferation and apoptosis were investigated with mammalian cell cultures.

Effects of thymol and essential oils of *Salvia fructicosa*, *Origanum onites* and *Laurus nobilis* on cell proliferation was investigated with BrdU ((5-bromo-2'-deoxy-uridine) assay on A549 and V79 379A cell lines. Essential oils of *Salvia fructicosa*, *Origanum onites* and *Laurus nobilis* and thymol were caused a decrease of cell proliferation dose and time dependent.

Effects of some monoterpenes and essential oils on apoptosis were investigated with DAPI staining at fluorescence microscopy. Test substances were showed apoptotic effects on A549 cells.

Keywords: Essential oil, monoterpen, BrdU, Apoptosis, DAPI

TEŞEKKÜR

Deneysel çalışmalarım ve lisansüstü eğitimim süresince aldığım her türlü destek ve bilgiden dolayı danışman hocam sayın Yard. Doç. Dr. A. Tansu Koparal'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın devamlılığı için gerekli olanaklardan faydalanmamı sağlayan tüm Biyoloji bölümüne ve Hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuarda ve deneylerimin yapılması aşamalarında göstermiş olduğu yardımlardan dolayı Banu Barutca'ya, bilgi ve tavsiyelerinden yararlandığım değerli hocalarım Melih Zeytinoğlu'na, Muhittin Arslanyolu'na, Emel Ergene'ye, Emel Sözen'e ve Hülya Sivas'a teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim sırasında her zaman yanımda olan tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler

Murat Kaya

Eylül, 2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	2
1.1.1. Karsinojenler	2
1.1.2. Hücre döngüsü	3
1.1.3. Karsinogenez.....	3
1.2. Apoptozis	4
1.2.1. Apoptozis ve nekrozis	7
1.2.2. Apoptozisin modülatör (mediatör) leri	10
1.2.3. Apoptozisin indüklenmesi.....	13
1.2.4. Apoptoziste mitakondrinin rolü	14
1.2.4.1. Bcl-2 ailesi	15
1.2.4.2. Kaspazlar	17
1.2.5. Apoptozisin aşamaları.....	19
1.2.6. Apoptozisin saptanmasında kullanılan yöntemler	19
1.2.6.1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri.....	20
1.2.6.2. Histokimyasal yöntemler	24
1.2.6.3. Biyokimyasal yöntemler	25
1.2.6.4. İmmünojenik yöntemler.....	27
1.2.6.5. Moleküler biyoloji yöntemleri	27
1.3. Çalışmalarda Kullanılan Hücrelerin Özellikleri.....	28
1.3.1. A549 hücreleri.....	28
1.3.2. V79 379A (CHL) hücreleri	28

1.4. Çalışmalarda Kullanılan Test Maddeleri	29
1.4.1. Uçucul yağlar ve monoterpenler	29
1.4.2. Timol	30
1.4.3. Salvia fruticosa (Adaçayı) yağı	31
1.4.4. Laurus nobilis (Defne) yağı	32
1.4.5. Origanum onites (Kekik)	33
1.5. Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler Hakkında Bilgiler	33
1.5.1. BrdU (Hücre çoğalması testi, ELISA)	33
1.5.1.1. BrdU, hücre çoğalması testinin amacı (background).....	33
1.5.1.2. Uygulama	33
1.5.1.3. Testin yapılışı	34
1.5.1.4. Yöntemin avantajları	34
1.5.2. Floresan boyama ile morfolojik inceleme.....	35
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	36
2.1. Kullanılan Bitki Ekstreleri	36
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	36
2.4. Kullanılan Aletler ve Cihazlar	36
2.5. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücreler	37
2.5.1. A549 hücre kültürü	37
2.5.2. V79 379A hücre kültürü.....	37
2.6. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması	37
2.6.1. Timol Dozlarının Hazırlanması.....	37
2.6.2. Adaçayı Dozlarının Hazırlanması	38
2.6.3. Defne Dozlarının Hazırlanması.....	38
2.6.4. Kekik Dozlarının Hazırlanması.....	38
2.7. Test Maddelerinin Analiz Koşulları.....	39
2.7.1. Gaz Kromatografisi (GC) Analiz Koşulları	39
2.8. Test Maddelerinin Ana Bileşenleri	39
2.9. Kullanılan Araç Ve Gereçlerin Hazırlanması	40
2.10. Yöntem.....	41
2.10.1. Hücre kültürü	41

2.10.2. Hücrelerin testler için hazırlanması	41
2.10.3. BrdU (Hücre çoğalması testi, ELISA)	42
2.10.4. Floresan boyama ile morfolojik inceleme.....	42
2.11. Mikroskopi	42
2.12. Fotografi.....	43
2.13. İstatistiksel değerlendirme	43
3. BULGULAR	44
3.1. BrdU sonuçları	44
3.1.1. Kekik'in A549 ve V79 379A hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri.....	44
3.1.2. Adaçayı'nın A549 ve V79 379A hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri.....	44
3.1.3. Defne'nin A549 ve V79 379A hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri.....	45
3.1.4. Timol'ün A549 ve V79 379A hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri.....	45
3.2. Floresan boyama ile morfolojik inceleme sonuçları	46
3.2.1. Kekik'in A549 ve V79 379A hücreleri üzerine morfolojik etkileri	46
3.2.2. Adaçayı'nın A549 ve V79 379A hücreleri üzerine morfolojik etkileri	46
3.2.3. Defne'nin A549 ve V79 379A hücreleri üzerine morfolojik etkileri	47
3.2.4. Timol'ün A549 ve V79 379A hücreleri üzerine morfolojik etkileri	47
4. TARTIŞMA, SONUÇ	61
KAYNAKLAR	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

1.1. <i>Origanum onites</i> (kekik) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi.	49
1.2. <i>Origanum onites</i> (kekik) esansiyel yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi.....	49
1.3. <i>Salvia fruticosa</i> (adaçayı) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi.....	50
1.4. <i>Salvia fruticosa</i> (adaçayı) esansiyel yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi.....	50
1.5. <i>Laurus nobilis</i> (defne) esansiyel yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi.	51
1.6. <i>Laurus nobilis</i> (defne) esansiyel yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi	51
1.7. Timol'ün A549 hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi.....	52
1.8. Timol'ün V79 379A hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi.....	52
2.1. Kekik'in A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi	53
2.2. Defnenin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi	54
2.3. Adaçayının A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi	55
2.4. Timolün A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi	56
2.5. Kekik'in V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi	57
2.6. Timolün V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi	58
2.7. Adaçayının V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi.....	59

2.8. Defnenin V79 379A hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi.....	60
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ÇİZELGELER DİZİNİ**Sayfa**

1. Test maddelerinin gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS) analiz koşulları	39
2. Kekik uçucu yağını ana bileşenleri	39
3. Adaçayı uçucu yağı ana bileşikleri	40
4. Defne uçucu yağı ana bileşikleri	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	: Etilen-diamin tetra asetik asit
FBS/FCS	: Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum
BrdU:	: Bromo-diUridin
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline)

1. GİRİŞ

Kanser, dünyadaki ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Kanser, hücrenin genetik materyali tarafından kontrol edilen hücre döngüsünün normal sürecinde ortaya çıkan bir hastalıktır. Kansere yanlış beslenme, genetik yatkınlık ya da yaşanan çevre neden olabilir (Reddy ve ark., 2003).

Çağımızda halk sağlığı ve tıbbi amaçlar için en önemli konulardan biri kanserden korunmadır. Yaklaşık yirmi yıldan beri doğal ürünlerde bulunan koruyucu maddelerin değerlendirilmesi amacıyla çalışmalar sürdürülmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan bütün suni maddeler toksik olarak bilinmektedir ve sağlam hücrelere ciddi zarar vermektedirler. Bu nedenle kanserden korunmak için yada kemoterapi amacıyla doğal ürünlerin kullanımı kansere yakalanma sıklığını azaltabilir. Tıbbi bitkilerde bulunan, günlük alımla vücudumuza giren antioksidanlar, kimyasal olarak üretilmiş antikanser ajanlara bir alternatif olabilirler.

Son yıllarda malignansinin sadece kontrolsüz hücre çoğalması nedeniyle değil aynı zamanda fizyolojik hücre ölümü apoptosisin azalması nedeniyle ortaya çıktığı anlaşılmıştır (Reed, 1999). Apoptosisin başlatılması ilaç keşif sürecinde yeni bir hedeftir. Bitkilerde bulunan bazı ürünler, malignant hücrelerde apoptosis tetikleyicisi olarak bilinmektedir (Senderowicz, 2004).

Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar günümüzde araştırma çalışmalarının önemli bir yerini tutmaktadır. Çeşitli patolojik durumlarda (örneğin kanser) belli bir maddenin etkilerini, bir hücre ya da dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini (örneğin bir protein) belirlemek amacıyla belli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak canlı ortamında (*in vivo*) elde edilebilecek sonuçlara ulaşılabilir.

1.1. Kanser

Geçtiğimiz yirmi yılda yapılan çalışmalar, moleküler seviyedeki kanser bilgilerimizde büyük ilerleme kaydedilmesine neden olmuştur. Kanser, tıp dilinde, yayılma eğiliminde olan kötü huylu ve çoğunlukla tedaviye dirençli (malignant, habis) tümörler için, hücre kökeni gözetilmeksizin kullanılan genel bir sözcüktür. Virüsler, kimyasal karsinojenler, kromozomal yeniden düzenlenmeler, tümör baskılayıcı genler ya da kendiliğinden meydana gelen transformasyonlar kansere neden olabilir.

Kanser, tek bir hücrenin genomundaki değişimdir. Bu değişim, amino asitlerin değişimlerine neden olan nokta mutasyonlarını; çerçeve kayması mutasyonlarını; protein üretimini sona erdiren ya da protein üretimini ilerleten kodonları durduran mutasyonları; tek bir genin aşırı ifadesi yada uygunsuz ifadesi sonucunda oluşan kromozomal dengesizliği ya da değişikliği; bir genin kaybolmasını ya da “chimeric” proteinle görevinin değişmesi sonucunda kromozomal kırılma ve yeniden düzenleme sonucunda başka bir genle füzyona uğramasını içermektedir (Bertram, 2001).

1.1.1. Karsinojenler

İnsanlarda görülen kanserlerin çoğunluğu çevresel karsinojenlere maruz kalmaları nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bu çevresel karsinojenler; doğal ve insan yapımı kimyasallar, radyasyon ve virüslerdir. Karsinojenler 3 temel grupta sınıflandırılabilir.

1. Genotoksik karsinojenler: nükleik asitlerle reaksiyona giren karsinojenlerdir.
2. Prokarsinojenler: Karsinojenezi başlatmak için metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan karsinojenlerdir.
3. Epigenetik karsinojenler: Genotoksik değildir, metallerden kompleks organik kimyasallara varıncaya kadar olan kanser başlatıcı bileşenlerden meydana gelirler (Reddy ve ark., 2003).

1.1.2. Hücre Döngüsü

Kanser, hücrenin genetik materyali (DNA) tarafından kontrol edilen hücre döngüsünün normal sürecinde ortaya çıkan bir hastalıktır (Reddy ve ark., 2003). Son yıllarda hücre ölümü, hücre canlılığı ve hücre döngüsü arasındaki moleküler bağlantılar yoğun araştırmalara neden olmuştur. Standart ökaryotik hücre döngüsü 4 safhadan oluşmaktadır; DNA sentezi S fazında ve mitoz ise M fazında meydana gelmektedir. Bu safhalar arasında mRNA'ların ve proteinlerin toplandığı G₁ ve G₂ aralık fazları bulunmaktadır. G₁ fazında DNA sentezi için hücre hazırlanır, büyür ve 2n kromozoma sahip diploid hücre oluşur. S fazında DNA iki katına çıkar ve bu fazın sonunda DNA içeriği 4n'e ulaşır. Hücreler M fazına girmeden önce G₂ fazına girerler, hücre büyümeye devam eder ve böylece bölünmeye hazırlanır. Mitoz bölünme ile iki kardeş hücre meydana gelir. Uygun olmayan hücre çoğalmasını önlemek amacıyla kontrol mekanizmaları bulunmaktadır. Hücre siklusunda bir fazdan diğer faza geçişi düzenleyen düzenleyici proteinler vardır, bunlara siklin-bağımlı kinazlar adı verilmiştir (Maddika ve ark., 2007)..

Hücre döngüsünde meydana gelen yanlışlıklar kanser oluşumuna ve gelişim bozukluklarına neden olmaktadır. Hücre döngüsü, döngünün ilerlemesini durduran ve tamir mekanizmalarını aktive eden kontrol noktalarına sahiptir. Hücre bu kontrol noktalarından geçtikten sonra bir sonraki faza geçilebilir. Kritik organellerin ya da yapıların DNA hasarı ya da bozukluğu hücre döngüsünün durmasına ve hatta hücre ölümüne neden olan apoptosize yol açar. Apoptotik mekanizma çok hücreli organizmalarda bütünlüğün sağlanması ve istenmeyen ve hasarlı hücrelerin seçimine izin vermesi bakımından, hücre döngüsü kontrol noktaları için önemli bir elementtir (Maddika ve ark., 2007).

1.1.3. Karsinogenez

Bir hücrenin kanserli hücre haline dönüşümü için yıllar süren birçok safhadan geçmesi gerekmektedir. Karsinogenez, başlama, ilerleme ve gelişme olarak üç evreye sahiptir. İlk aşamada DNA'nın kanseri başlatan madde (karsinogen) ile etkileşimi gerekmektedir. İkinci aşama birkaç aydan birkaç yıla

kadar sürebilen yavaş ilerleyen bir safhadır. Üçüncü aşamada kanser gelişir ve yayılır (Maddika ve ark., 2007)..

1.2. Apoptosis

Apoptozis, hücre içindeki intihar programının aktif hale geçiren ileri derecede düzenlenmiş bir hücre ölümü işlemidir (Huan-Huan ve ark., 2004). Normal dokulardan ve spesifik patolojik olaylardan gereğinden fazla olan hücrelerin çıkartılmasından sorumludur. Bulgular gösteriyor ki, bugünkü birçok anti tümör ilaçlarının olası mekanizmaları, hedef tümör hücrelerdeki apoptozise neden olma yetenekleriyle ilgilidir (Hickmann, 1992). Biyokimyasal ve morfolojik olarak hücre sel nekrozisten farklı olarak apoptozis de kromatin yoğunlaşması, hücre küçülmesi, DNA fragmentasyonu, plazma membran kabarcıklanması ve iyi korunmuş organelleri içeren membranla çevrelenmiş apoptotik badiler vardır. Apoptotik hücreler, yakındaki yerleşik hücreler tarafından bununla ilişkili bir yangıya neden olmadan fagosite edilir ve sindirilirler (Kerr ve ark., 1994). Böylece apoptozisin indüklenmesi son yıllarda anti tümör ilaç araştırmaları için önemli bir strateji haline gelmiştir ve tümör hücreleri için spesifik olan ajanları indükleyen bir apoptozis, ideal bir anti tümör ilacı olabilir (Chen ve ark., 2002).

Yetişkinlerin organlarında ve dokularında, belirli sayıda hücreyi bulundurmak için hücre çoğalması, hücre ölümleriyle özenli bir şekilde dengelenmektedir. Çoğu vakada hücre ölümü, tesadüfi bir travma sonucundan ziyade normal fizyolojik bir olgudur. Bu tür fizyolojik hücre ölümleri (programlanmış hücre ölümü) yalnız hasara uğramış hücrelerin elenmesini ve belirli sayıda hücrenin devamlılığını sağlamakla kalmaz aynı zamanda normal gelişim içinde büyüyen dokularda oluşan istenmeyen hücrelerin de elenmesinin sağlanmasında temel rol oynar. Hücre çoğalımı ve hücre ölümü arasında kurulmuş olan dengeye; hem gelişim için hem de hayvan doku ve organlarının korunması için gereksinim vardır (Cooper, 1997).

Hayvanlarda da diğer bazı hücre tiplerinin hayatta kalması benzer bir şekilde büyüme faktörüne veya komşu hücrelere ya da hücre-dışı matrikse temas

etmelerine bağlıdır bu nedenle programlanmış hücre ölümünün dokulardaki hücrelerin işbirliğini düzenlemede önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. (Cooper, 1997).

Programlanmış hücre ölümü veya apoptosiz, kan hücreleri de dahil olmak üzere bir çok hücre tipinin farklılaşma programının önemli bir parçasıdır. Normal olarak farklılaşamamakla birlikte birçok kanserli hücre apoptosize girmez ve bu nedenle normal kopyalarına kıyasla daha uzun süre yaşarlar. Kanser hücrelerinde programlanmış hücre ölümünün gerçekleşmemesi tümörün büyümesine önemli ölçüde yardımcı olur. Örneğin, normal hücrelerin hayatta kalması büyüme faktörlerinden veya apoptosizi önleyen hücre dışı matriksten gelen sinyallere bağlıdır. Tümör hücreleri ise normal kopyaları için gerekli olan büyüme faktörlerinin yokluğunda da hayatta kalabilmektedirler. Normal çevresel sinyallerden arındırıldığında tümör hücrelerinde apoptosiz gerçekleşmemektedir ve apoptosizin gerçekleşmemesi sadece tümörün büyümesinde etkili olmakla kalmayıp anormal doku bölgelerinde metastaz yapabilen hücrelerin hayatta kalmasında ve gelişmesinde de önemlidir. DNA’da meydana gelen hasarlardan dolayı birçok tümör hücresinde apoptosiz gerçekleşmezken; normal hücrelerde apoptosiz gerçekleşmektedir. Bu durumda, kanser hücrelerinin apoptosize girmemesi DNA’nın hasara uğratılması yoluyla etki eden radyasyon veya kemoterapi tedavisine direnç göstermesine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle hayvanlarda kanser hücrelerinin durmaksızın büyümesinde, hücrelerin anormal bir şekilde hayatta kalması ve hücre çoğalması başlıca rolü oynamaktadır (Cooper, 1997).

Mitokondriler apoptosiz öncesi çeşitli sinyaller için odak noktalarıdır ve apoptosiz programının kontrolünde, yürütülmesinde anahtar role sahiptirler. Proapoptik uyarılar mitokondrial Ca^{2+} aşırı yükü ve oksidatif stress MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore) olarak bilinen ve iç mitokondrial membrandan dış mitokondrial membrana uzanan spesifik olmayan bu gözenegin açılmasına neden olur. MPTP’nin açılmasıyla iç mitokondrial tüm küçük çözümler (<1,5 kDa) denkleşirler ve mitokondrinin şişmesine, dış membranının parçalanmasına, proton motivasyonlu kuvvetin azalmasına, oksidatif fosforilasyon bağının çözülmesine ve glikoliz ile üretilen ATP’nin hidrolizine yol açar.

MPTP'nin geçici olarak açılması, mitokondrinin iç mebran alanından sitokrom C ve apoptosize neden olan faktörün salınımı ile sonuçlanır. Bunu sonucunda kaspaz mekanizması aktif hale gelir. Mitokondrial Ca^{2+} aşırı yükünün hızlı bir şekilde yayılmasında MPTP'nin fizyolojik bir rolü olduğu ileri sürülmüştür.

Canlılığın temel karakterlerinden birisi olan ölüm gerek hücre bazında, gerekse organizma bazında sıkça karşılaşılan bir olaydır. Ökaryotik hücrelerde şimdiye kadar morfolojik ve biyokimyasal analizlerle ayırt edilmiş iki tip hücre ölümü belirtilmiştir, bunlar patolojik hücre ölümleri (nekroz) ve fizyolojik “programlanmış” hücre ölümleridir. İlkinin nedenleri ve mekanizmaları detaylı araştırmalara konu olduğu halde, ikincisi uzun yıllar ihmal edilmiş veya bilim adamlarınca ilgi çekici bir konu olarak görülmemiştir. Bunun bir nedeni belki de hücre ölümlerinin bir şekilde hücrelerin zarar görmesinden kaynaklandığı şeklindeki düşüncedir. Aslında normal embriyo ve bağışıklık sisteminin gelişiminden bazı hücrelerin embriyonun veya organizmanın sağlıklı gelişimi için ortadan kalkması gerektiği biliniyordu fakat bilinmeyen bunun diğer metabolik aktiviteler (büyüme, farklılaşma vb.) gibi “programlanmış” olduğu ve ölen ya da “intihar etmesi söylenen” hücrenin aktif katılımı ile olduğudur. Her ne kadar mekanizması tam olarak bilinmiyorsa da programlanmış hücre ölümlerinin veya apoptozisin, bir hücrenin kendisini intihara götüreceği mekanizmayı devreye sokması sonucu meydana geldiği düşünülmüştür. Bu tip ölümlerin morfolojik ve biyokimyasal açıdan nekrozdan farklı oldukları ve bunların hücrenin kendi iç düzenlemeleri sonucu “intihar” ettikleri belirlenmiştir. Günümüzde apoptozisin fizyolojide ve patolojide önemli bir işleve sahip olduğu ve istenmeyen her türlü hücrenin elimine edildiği fizyolojik bir ölüm olduğu belirtilmiştir.

Programlı hücre ölümünün (apoptozis) birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde ve bazı nörolojik hastalıkların patolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Bruton 1988).

Apoptosis hücrenin kendini yok etmek (intihar) için bir takım metabolik ve fizyolojik işlemleri devreye soktuğu bir olaydır. Yapılan çalışmalarda apoptozis ile sinyal iletim mekanizması arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir. Raff'a göre bütün hücreler ölüme programlanmışlardır ve yaşamlarını devam ettirmek için diğer hücrelerden devamlı olarak sinyal almalıdırlar. Bu sinyal

herhangi bir şekilde kesildiği zaman hücre intihar eder. Sinyal iletim mekanizmasının önemli bir parçası olan Ca^{++} iyonunun bazı hücrelerde apoptozisi aktive ettiği ve ortamdaki Ca^{++} iyonu bloke edildiğinde apoptozis oluşmadığı görülmüştür. Bunun mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber Ca^{++}/Mg^{++} bağlantılı çalışan ve DNA'yı parçalayan endonükleaz enziminin rol aldığı ileri sürülmüştür. Programlanmış hücre ölümlerinde, len hücrenin aktif olarak RNA ve protein sentezi yapması gerektiği ve bu hücrelerdeki RNA ve protein sentezi inhibe edildiği zaman apoptozis oluşmadığı gözlenmiştir. Bu da apoptozisin genlerin kontrolünde olduğunu göstermiştir. Apoptosisin mekanizmasını aydınlatmaya yönelik bir çalışmada ise protein biyosentezinin bazı kimyasallarla (Didemnin B gibi) inhibe edilmesi durumunda, bazı hücrelerin apoptozis mekanizmasını devreye soktuğunu fakat yapılan detaylı çalışmalarda DB'nin sadece protein sentezini inhibe etmesinin apoptozis oluşumu için yeterli olmadığı ve bazı diğer faktörlerin de rol aldığı belirtilmiştir. Bu diğer faktörlerin hormonlar, büyüme faktörleri ve hücreler arası maddeler (Extracellular matrix) olabileceği ileri sürülmüştür. Programlanmış hücre ölüm mekanizmalarının hemen hemen bütün canlılarda bulunduğu saptanmış ve apoptozisi düzenleyen genlerin varlığı ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Programlanmış hücre ölümlerinin organizmalarda pek çok önemli işlevi yerine getirdikleri anlaşılmaya başlanmıştır. Programlanmış hücre ölüm mekanizmalarının moleküler düzeyde daha iyi anlaşılması, organizmada anormal görünen veya istenmeyen hücreleri (kanser hücreleri gibi) ortadan kaldıracak gibi, yakın gelecekte apoptozis immünolojide, onkolojide ve hücre biyolojisinde önemli gelişmelere olanak tanıyabilecektir (Alışkan, 1999)

1.2.1. Apoptosis ve nekrozis

Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Diğer bir ifadeyle apoptozis hem sağlıklı hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır. Tablo 1'de apoptozis ve nekrozis karşılaştırılmıştır. Apoptosis tipik olarak yaşlanan, fonksiyonunu kaybeden ya da bir dış uyaran tarafından hasara uğrayan tek hücreleri etkiler. Nekrozis de ise dış uyaran tarafından travma, iskemi ya da

yüksek dozde radyasyona maruz kalındığında tüm doku ya da hücre grubu etkilenir (Holdenrieder ve Stieber, 2004).

Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken “cell swelling”, apoptotik hücre tam tersine küçülür “cell shrinkage”. Nekrozisde kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır “chromatin aggregation” ve kondanse olur “chromatin condensation”. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler “membrane blebs” oluşur.

Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere “apoptotik bodies” parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nükleus, veya diğer hücre içi yapıları içerirler. Nekrozisde plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama salınması sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa, apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz (Tablo 1.).

Apoptozisin en önemli işareti DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo bazçifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir. DNA'yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase I ve II'de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır “phosphatidylserine translocation”. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (Ulukaya, 2003).

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması “Senescence” HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
Morfolojik özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin “flocculation”u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı fakat membranda “bleb”lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücrenin intact mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 oC’de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 oC’de gerçekleşmez) DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde

	elektroforezinde “smear” görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümün geç safhasında)	kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirteci) Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

Tablo 1. Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması. TNRF-1, tumor nekrozis factor reseptörü-1 (Ulukaya, 2003).

1.2.2. Apoptozisin modülatör (mediatör) leri

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitakondri) bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgündür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli **kalsiyum** girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için esansiyel değildir. **Bcl-2** ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_l) geniş bir ailedir. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu (“survival”) bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu

heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax'ın (ikisinin oranının) bazı hematolojik malignensilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir. Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2 normalden uzun yaşam sürelerine neden olur. Böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler “pore” oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçta sitokrom c ve apoptozis-indükleyici faktör olarak bilinen AIF'ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar. Bcl-2'nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi baskılayabildiği bulunmuştur. **Seramid**, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plasma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünülmektedir. **p53**, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı (“single or double-strand breaks”, nükleotid eksikliği) oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler. p53'ün apoptozisi indüklemesi Bax'ın ekspresyonunu artırması böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Bazı virüsler (insan papillom virüsü, Epstein-Barr virüsü, adenovirüs tip 12) ya p53'ü inaktive ederek ya da Bax'a bağlanarak apoptozisi bloke ederler, böylece bu hücrelerin enfekte ettikleri hücreler doğal hücre ölüm mekanizmasından kurtulduklarından virüsle-indüklenen karsinogenezise bu yolla katkıda bulunurlar. p53 ayrıca bir transkripsiyon faktörü olan Mdm2 (murine double minute 2) tarafından da ya transkripsiyonu “down” regüle edilerek ya da kendisine bağlanılarak hem aktivitesi inhibe edilir hem de yıkımı hızlandırılır. Fakat, DNA'nın hasarlanması halinde p53'ün fosforilasyonu artar ve buna bağlı olarak da Mdm2'den ayrılır, böylece yarılanma ömrü uzadığı için de aktivitesi artar. **Sitokrom c**, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteinidir. Son yıllarda

anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin **mitakondriden** sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom c, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde mitakondriden apoptozis-indükleyici faktör ("AIF, apoptosis-inducing factor") ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom c sitoplazmik protein olan Apaf-1 ("apoptotic protease activating factor-1")'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü ("ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease") inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz ("CAD, caspase-activated deoxyribonuclease") serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Buraya kadarki mekanizma kaspaz-bağımlı apoptozisi gösterir, oysa kaspaz-bağımsız apoptozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptozis yine mitakondriden salıverilen bir faktör olan AIF'ün etkisiyle gerçekleştirilir. Fakat, AIF'ün etkilediği nükleazın ne olduğu henüz bilinmemektedir (Hunot and Flavell, 2001). Kaspaz ("caspase")'lar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)'a neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim ICE (interlökin 1- β dönüştürücü enzim)'dir ve prokaspaz 1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu

yoluyla aktive edildiği gibi, kaspazlar da sitokrom c'nin salıverilmesine neden olabilirler. Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan IAP (“inhibitors of apoptosis”)’leri kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP’leri ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozisi durdurabilirler. Kaspazlardaki defektler otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilir (Kidd ve ark, 2000). Hatta, kaspaz 8’in nöroblastomada tümör süpressörü olarak işlev gördüğü bulunmuştur (Teitz ve ark, 2000). Granzim (“Granzyme”) ler, patojenle enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkin rol alırlar. Perforinler ve granzimler normal olarak sitotoksik lenfositlerin (CTL) ve “natural killer (NK) cell” lerin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar. CTL’lerinin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar meydana getirirler. Perforin porlar sitozolik kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Beraberinde salgılanan ve bir serin proteaz olan granzimin de bu porlar aracılığıyla hücreye girmesiyle hücre içinde prokaspaz 8’in aktivitesi, dolayısıyla kaspaz kaskadı başlatılır. Bu da enfekte hücreyi (veya kanser hücrelerini) apoptozise götürür (Ulukaya, 2003).

1.2.3. Apoptozisin indüklenmesi

Apoptozisi başlatan nedenler çeşitlidir. Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)’in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmalari) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. İlgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve “natural killer” hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein:protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (“death domain”) adı verilen TRADD (“TNFR-1

associated death domain”) ve FADD (“Fas associated death domain”) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8’i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır. Örneğin, kaspaz 8 (FLICE) FLIP (“FLICE-inhibitory protein”)’i inhibe eder.

Apoptozis yukarıda da belirtildiği gibi genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53’ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax’ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. p53 bax’ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilir. Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir.

Apoptozisi büyüme faktörlerinin ortamdan eksilmesiyle de başlatılabilir. Hücre kültür ortamında büyütülen hücreler eğer serum açlığı (“serum starvation”)’na maruz bırakılırlarsa apoptozisle ölürlür. Buradaki mekanizma, apoptozis indükleyici bir nükleer protein olan p53 aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Ayrıca, bir pro-apoptotik (apoptozis uyarıcı) bir bcl-2 ailesi üyesi olan Bad’ın fosforillenememesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c’nin sitoplazmaya salıverilmesi yoluyla da gerçekleşir. Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salıverilen granzim B’lerin hedef hücrede (örn. virüsle enfekte hücre veya kanser hücresi) kaspaz sistemini aktifleştirmesidir (Ulukaya, 2003).

1.2.4. Apoptozisde mitokondrinin rolü

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c’nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi) apoptotik süreçte irreversibl (geri dönülemez) noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c’nin

sitoplazmaya salıverilmesi gerçekleşir (apoptozisin başlaması) veya sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi baskılanır (apoptozisin inhibisyonu) (Ulukaya, 2003).

1.2.4.1. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik, apoptozisi indükleyici, etkiye sahiptir. Diğeri ise anti-apoptotik, apoptozisi baskılayıcı, etkiye sahiptir. 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 a-heliks) bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2, ve BH3 bölgeleri hidrofobik cep'i oluşturur. Amfipatik a-heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğeri bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanırlar. Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt gruplardan 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 "pathway" 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-X1, Mcl-1 iken, pro-apoptotik olanları ise: bax, bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid'dir (Ulukaya, 2003).

Bcl-2 ailesinin mitakondri üzerindeki etkileri

1. Bid'in kırılması: Bid, Bak ve Bax gibi pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyeleri normalde hücrelerde sessiz "latent" halde bulunurlar. Bu proapoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesini sağlarlar. Bid'in kırılmasına, dolayısıyla aktifleşmesine, yol açan etken kaspaz-8'in aktivasyonudur. Aktif kaspaz-8, bid'i kırar; böylece, 15 kDa'luk bir karboksi terminal fragmanı oluşur. Bid ayrıca diğer hücre yüzey ölüm reseptörleri olan TNF ve TRAIL aracılığıyla da aktifleşir.

Bid'i "knock out" yapılmış fare hepatositlerinde TNF veya anti-Fas ile apoptozis indüklenmeye çalışılırsa, bu farelerde apoptozis oluşmaz. Bu deney, bid'in hücre yüzey ölüm reseptörlerinden gelen apoptotik sinyalin mitokondriye iletilmesinde rol aldığını, böylece ölüm reseptörleri ile mitokondrinin bağlantısını sağladığını göstermektedir. Oluşan bid fragmanı BH3 bölgesine sahip olduğundan diğer proapoptotik bcl-2 ailesi üyelerle interaksiyona girerek onların normalde buldukları sitoplazmadan mitokondriye göç etmelerine (aktivasyonlarına) neden olur. Bu aktivasyon sonucu, sitokrom c salıverilir. Bid karboksi terminal fragmanı ayrıca, bak-düzenlemeli sitokrom c salıverilmesini de aktifleştirir (Wei MC et al, 2000. Genes and development. 14:2060).

2. Bad'ın defosforilasyonu: Bad, birçok normal hücrede bulunmaktadır. Bad'ın diğer bcl-2 ailesi üyeleriyle kompleks yapması fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir. Normal koşullarda, bad yaşam ("survival") faktörlerinin etkisiyle, serin-treonin kinaz Akt/PKB yolu aracılığıyla fosforile durumda tutulur. Fosforile durumda iken antiapoptotik üyelerle kompleks oluşturamadığından onları etkisizleştiremez. Yani, sitokrom c tutucu etkilerini antagonize edemez. Eğer defosforile olursa (örn., yaşam faktörlerinin eksikliği gibi bir nedenle) antiapoptotik üyelerle kompleks oluşturarak antiapoptotik (sitokrom c tutucu) etkilerini ortadan kaldırır. Böylece sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir.

3. Bim'in mikrotübüllerden salıverilmesi: Bim, normalde mikrotübüllerle ilişki içinde olan dynein motor kompleksi ile birlikte bulunur. Apoptozis indüksiyonu esnasında mitokondriye göç eder. Pro-apoptotik aktiviteye sahiptir.

Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi kaspazların aktivasyonuna yol açar (Ulukaya, 2003).

1.2.4.2. Kaspazlar

Kaspazlar ("Caspases"), sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler. Apoptozisde hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler "effectors" olarak bilinirler.

Kaspazların sınıflandırılması:

Kaspaz-1 (ICE)

Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2)

Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama)

Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICERen)

Kaspaz-5 (ICERenIII, TY)

Kaspaz-6 (Mch2)

Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)

Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH)

Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)

Kaspaz-10 (Mch4)

Kaspaz-11 (ICH-3)

Kaspaz-12

Kaspaz-13 (ERICE)

Kaspaz-14 (MICE), (Ulukaya, 2003).

- Kaspazların aktivasyonu

İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir.

Apaf-1'in indüksiyonu ise sitokrom c'nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir. Apaf-1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir. Mitokondriden ayrıca AIF (apoptosis indükleyici faktör)'ler salıverilir. Bunlar henüz bilinmeyen bazı nükleazları aktifleştirerek DNA degradasyonuna yol açarlar ama bunların nükleusda yol açtığı morfoloji değişikliği apoptozisde tipik olarak görülen tipde değildir. Daha ziyade, net olarak seçilebilen sınırlardan ziyade düzensiz sınırlı ve periferik yerleşimli dağınık nükleus parçaları şeklindedir.

Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Bu durumda farklı dokular için farklı kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptozisin gerçekleştiği düşünülebilir. Örneğin, periferik T hücreleri ultraviyole ile indüklenmiş apoptozise gitmek için ne kaspaz-3'e ne de kaspaz-9'a gereksinim duyarlar. Oysa, embriyonik stem hücreler bu durumda her iki kaspaza da gereksinim duyarlar. Hatta hücrelerin değişik farklılaşma derecelerinde değişik kaspazların aktivasyonuna gereksinim duyulabilir. Örneğin, periferik T hücreleri Fas'ın aktivasyonuna yanıt olarak gelişen apoptozisde kaspaz-3'e gereksinim duyarlar ama timositler kaspaz-3 eksikliğinde yine Fas'la indüklenen bir apoptozise gidebilirler (Ulukaya, 2003).

- Kaspazların substratları

PARP: Poli (ADP-Riboz) Polimeraz'dır. DNA tamir mekanizmasında rol alan bir enzimdir.

DNA-PK: DNA bağımlı bir protein kinazdır.

PRb: Retinoblastoma geninin ürünüdür. Hücre siklusunun durdurulmasında rol alır.

Lamins: Nükleus membranında yer alan yapısal proteinlerdir.

NuMA: Nükleus mitotik apparatus protein.

Fodrin: Hücre iskeletinde yer alan yapısal bir proteindir.

β -Aktin: Hücre iskeletinde yer alan yapısal bir proteindir.

Mdm2: Tümör süpressör protein olan p53'ün inaktivasyonunu sağlayan bir proteindir.

Cyclin A2: Hücre siklusunda rol alır, ve siklusun ilerlemesini sağlar.

Presenilin: Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda biriktiği görülen bazı bileşiklerdir.

Others: Metabolik aktivitelerden sorumlu bazı kinazlar gibi (Ulukaya, 2003).

1.2.5. Apoptozisin aşamaları

- Apoptozisin indüksiyonu
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması
- Sitokrom c'nin salıverilmesi
- Apoptozom oluşumu (sitokrom c+Apaf-1 +kaspaz-9)
- Mitokondriyal transmembran potansiyel-in değişmesi
- Kaspazların aktivasyonu
- Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması
- DNaz'ın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmentasyonu (internukleozomal DNA fragmentasyonu)
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi (Ulukaya, 2003).

1.2.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa, günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir.

İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen

apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları, 2000'li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etmiştir.

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır:

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. İmmunohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmunolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri

1.2.6.1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

Adi ışık mikroskobu kullanılarak yapılan yöntemler

- Hematoksilen boyama

Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay olanı hematoksilen ile boyamadır. Hematoksilen ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. Hematoksilen boyama (HB) hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metod olarak başlanması uygundur ve çeşitli açılardan (örn. ilk 14 değerlendirme, maliyet) diğer metodlara karşı avantaj sağlar.

Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nukleus morfolojisine göre değerlendirilir. Apoptozise özgü değişiklikler iyi bir boyama yapılmışsa kolayca gözlenebilir. Fakat yine de deneyim gerektirmektedir. Çünkü bazı durumlarda mitotik hücreler ile apoptotik hücreler karıştırılabilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi "cell shrinkage", veya sitoplazmik küçülme "cytoplasmic shrinkage", kromatinin

kondanse olması “nuclear condensation” ve nukleus zarının periferisinde toplanması, nukleusun küçülmesi “pyknosis” veya parçalara bölünmesi “nuclear fragmentation”. Yukarıdaki fotoğrafta hemen hemen merkezi konumdaki iki hücrede nukleus fragmentasyonu görülmektedir (Ulukaya, 2003).

- Giemsa boyama

Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada da olduğu gibi nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (Ulukaya, 2003).

Flouresan mikroskobu / Lazerli Konfokal mikroskobu kullanılarak yapılan yöntemler

Floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI, propidium iyodür) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA’ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelebilir. Floresan sistemler ışık mikroskopuna göre çok daha pahalıdır. Fakat, eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Oysa hematoksilen ya da Giemsa boyamanın kullanıldığı örneklerde hücrelerin tamamı yöntemin prensibi gereği zaten ölmektedirler. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. propidium iyodür) beraber kullanılır. Bu boyama yöntemindeki prensip şudur: Bu yöntemde canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının (hücre zarının) intakt olup olmadığıdır. Membranı intakt olan (canlı) hücreler propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlarlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskopu ile tanınabilirler. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da

canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayrımı hematoksilin boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisine bakılarak yapılır.

Kromatin kondensasyonu veya nukleus fragmentasyonu olan hücreler apoptotik hücreler olduklarını düşündürür.

Hücrelerin detaylı ayrımı aşağıdaki kriterlere göre yapılır:

- Nekrozisle ölen hücreler: Ölü oldukları belirlenen (Hem propidium iyodür hem de Hoechst boyası pozitif) hücrelerin nukleuslarında apoptotik değişiklikler görülmez. Nukleus paterninde büyük değişiklik yoktur. Nukleusun başlangıçta daha küçük olduğu gözlenebilir ama ileri evrelerde normale göre biraz daha büyümüş görülebilir. Boya yoğunluğu başlangıçta daha fazla olabilir ama ileri evrelerde yoğunluk apoptotik hücelere göre daha az bulunabilir.

- Apoptozisle ölen hücreler: Apoptotik hücelerde hücre zarı eğer sekonder nekrozis gelişmemişse intakt olduğundan propidium iyodür ile boyanmaz ama Hoechst boyası pozitifdir. Yani propidium iyodür negatif ve Hoechst boyası pozitif boyanırlar. Fakat apoptozise özgü nukleus morfolojisi bu hücelerde tanı koydurucudur. Tipik nukleus fragmen-tasyonu en önemli bulgudur.

- Normal (canlı) hüceler: Propidium iyodür negatiftir. Hoechst boyası ile boyanırlar ve nukleus normaldir.

Özetle: Nekrotik hüceler: Hoechst boyası (+) ve propidium iyodür (+); Apoptotik hüceler: Hoechst boyası (+), propidium iyodür (-) ve apoptotik morfoloji (+); Normal hüceler: Hoechst boyası (+), propidium iyodür (-) ve apoptotik morfoloji (-) (Ulukaya, 2003).

Elektron Mikroskopu kullanılarak yapılan yöntemler

Elektron mikroskopu ile değerlendirme apoptozisde en değerli yöntem ("gold standard") olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği bir yöntemdir (Huerta ve ark., 2007). Üstelik subsellüler detaylar (örn. mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) da incelenebilir.

Faz kontrast mikroskobu kullanılarak yapılan yöntemler

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, “flask” veya “plate”lerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları “substratum”dan ayrılacakları için besiyer içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskopu ile gözlenebilirler. Mitozise giden hücreler de faz kontrast mikroskopuyla gözlenebilirler fakat bu hücreler aynı zamanda apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntüleri ile karışabilirler. O yüzden ayrımları hemen hemen imkansızdır. Gerek mitozisde gerekse apoptozisin erken evresinde hücreler üzerine yapıştıkları “substratum”a yayılmış halde değil, tam tersine yuvarlaklaşmış ve küçülmüş olarak görülürler. Faz kontrast mikroskopu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler (“blebs”) izlenebilir.

Hücreler henüz “substratum”a yayılmış haldeler ise hücrelerin sitoplazmasında ortaya çıkan vakuoller de gözlenebilir. Ayrıca, bazı hücre tiplerinde “blister” olarak adlandırılan hücrenin sitoplazmasından dışarıya taşar gibi görülen bir veya birkaç tane büyük vakuoller de gözlenebilir. Bu vakuoller hücreden ayrılıp besiyer içinde yüzebilirler. İçleri boş küresel yapılar olarak gözükürler. Bu vakuoller olasılıkla bazı araştırmacıların hayalet hücre (“ghost cell”) olarak adlandırdıkları yapılardır. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin başlangıçta hücre membranları intakt olmasına rağmen ileri dönemlerde sekonder nekrozis gelişir ve böylece membran bütünlükleri bozulur. Sekonder nekrozis aşamasına kadar olan süre içinde non-vital boyalar denen (örn. Propidium iyodür) boyalarla boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen hücreler bu boyalarla boyanmazlar. Çünkü membran bütünlüğü halen tamdır. Sekonder nekrozis geliştikten sonra membran bütünlüğü bozulur ve hücreler non-vital boyalarla boyanma özelliği kazanmaya başlarlar.

“Blister”lerin oluştuğu aşamada membran bütünlüğü halen tamdır ve bu aşamada nukleus morfolojisindeki değişiklikler floresan boyalarla gözlenebilir. Fakat bu dönem uzun sürmez dakikalar içinde membran bütünlüğü bozulur. Faz kontrast mikroskopunda hücreleri gözlemek için normalde boya kullanmaya gerek yoktur ama istenirse yukarıda belirtildiği gibi hem faz kontrast mikroskopisi hem

de floresan mikroskopisi aynı anda kullanılabilir. Böylece, örneğin nukleusu renklendirilmiş ve belirgin bir şekilde ortaya konmuş hücrelerin faz kontrast mikroskopisi fotoğrafları elde edilebilir (Ulukaya, 2003).

1.2.6.2. Histokimyasal yöntemler

Annexin V yöntemi

Annexin V deneyleri apoptozisin başladığı sırada fosfotidilserinlerin (PS) plazma membranının iç yüzünden dış yüzüne çıkışlarının saptanmasında kullanılır. Annexin V, yüksek özgüllük ile PS'lere bağlanan 35kDa'lık bir proteindir. Annexin V, fluorokromlarla konjüge olabilir, bu özelliği nedeniyle ışık ve elektron mikroskoplarında *in vivo* ve *in vitro* deneylerde kullanılabilir (Huerta ve ark., 2007).

TUNEL yöntemi

Terminal deoksinükleotidil transferaz-dUTP uç işaretleme (TUNEL) deneyleri, DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. TUNEL deneyi son yıllarda apoptozisin saptanmasında yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilir (Huerta ve ark., 2007).

MP30 yöntemi

MP30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18'i ekspres eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (Ulukaya, 2003).

Kaspaz-3 yöntemi

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal metod ile belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler (Ulukaya, 2003).

PARP

Kaspaz 3 ve Kaspaz 7'nin aktivasyonu DNA tamir mekanizmasında görevli olan proteinlerin inaktivasyonuna ve kırılmasına yol açar. Bu proteinler; DNA'ya bağlı protein kinaz ve poly(ADP-riboz) polimeraz (PARP) içerir. PARP 113 kDa'luk bir proteindir ve spesifik olarak DNA'ya bağlanır. PARP'ın enzimatik olarak parçalanması 89 kDa ve 24 kDa'luk parçalara ayrılmasına neden olur 89 kDa'luk PARP parçasını tanıyan monoklonal bir antipodi vardır. Bu antipodi immünohistokimyasal boyama metodu ve flow sitometride kullanılmaktadır (Huerta ve ark., 2007).

1.2.6.3. Biyokimyasal yöntemler

Agaroz Jel Elektroforezi - DNA fragmentasyonu

DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptozisde DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internukleozomal bölgeler-den) kırıldığı için merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekrozisde görülmez. O yüzden apoptozisi nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (Ulukaya, 2003).

Western Blotting

- Substrat kırılmaları
- Aktif kaspaz'ın belirlenmesi

- Sitokrom c salıverilmesi

Bu metod yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür.

Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metodla belirlenebilir. Yanlız, sitokrom c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücre-lerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılır (Ulukaya, 2003).

Flow Sitometri

- DNA azalması

- Annexin V

“Flow” sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozisde eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozis deteksiyonu açısından kullanışlıdır. Özellikle iki şekilde apoptozis deteksiyonu yapılır. a) floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak, b) Anneksin V kullanılarak. Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemlerinin kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarının kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptozis lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre populasyonu (sub-G1 piki) tayin edilir. İkincisinde, floresan mikroskopuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınır. “Flow” sitometri grafiklerinde sağ-alt kadrındaki populasyon anneksin V'in pozitif ve propidium iodidin negatif olduğu apoptotik hücrelerin bulunduğu bölgedir (Ulukaya, 2003).

1.2.6.4. İmmunolojik yöntemler

ELISA

- DNA Fragmentasyonu
- M30 Düzeyi

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında gerekse insan plazma-sında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (Ulukaya, 2003).

Fluorimetrik yöntem

- Kaspaz Aktivasyonu (Hücre kültürü)

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu “plate”lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur, ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (Ulukaya, 2003).

1.2.6.5. Moleküler Biyoloji yöntemleri

DNA Microarrays

Gen ekspresyon dereceleri (mRNA)

- Hücre ölüm reseptörleri
- Kaspazlar

DNA “microarray” teknolojisi henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Fakat, yakın bir gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde (önceden aylarca sürerken) yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA’larının) tespiti

mümkün olabilecektir. Böylece, apoptozise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır (Ulukaya, 2003).

1.3. Çalışmalarda kullanılan hücrelerin özellikleri

1.3.1. A549 hücreleri

Akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başlarında ender olmasına karşın günümüzde görülme sıklığı artan, önemli bir sağlık problemidir. Genel ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı alan akciğer kanseri, kanser ölümlerinin %28'ini oluşturmaktadır (Bozkurt ve ark. 2004). Akciğer kanserinin %80'i ise küçük hücreli olmayan akciğer kanserleridir (Chang ve ark. 2004). A549 kanser hücreleri tip 2 alveolar epitel özellikteki bir adenokarsinom insan akciğer cell line'ıdır (Kreja ve Seidel 2002). A549 cell line'ı 1972 yılında D.J: Giant ve ekibi tarafından 58 yaşında bir Caucasian erkekten alınan akciğer tümöründen üretilmiştir ve 1976 yılında, altmış sekizinci pasajı M:Lieber tarafından American Type Culture Collection'da stok edilmiştir. Japanese Cancer Research Resource Cell Bank (JCRB) ve Riken Cell Bank (RCB) ATCC'den hücreyi almış ve stoklamış daha sonrada birçok Japon araştırmacıya dağıtmıştır. A549 hücreleri Institute of Fermentation Osaka (Japonya) dan satın alınmıştır.

1.3.2. V79 379A (CHL) hücreleri

Chinese Hamster Akciğer fibroblast benzeri hücrelerdir. Bu hücreler sitotoksisite, toksisite ve mutajenite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Melo ve ark. 2001; Corr ea ve ark. 2005). Ayrıca bu hücre hattının *in vivo* ortamda alınan cevaplara benzerlik gösterdiği bilinmektedir. (V79 379A hücreleri Institute of Fermentation Osaka (Japonya)'dan satın alınmıştır.

1.4. Çalışmalarda kullanılan test maddeleri

1.4.1. Uçucu yağlar ve monoterpenler

Oda sıcaklığında sıvı halde olan bazen de donabilen, kokulu, uçucu, yağimsı karışımlara eterik yağlar (esans) adı verilir. Uçucu yağlar, yüksek bitkilerde bulunan lipofilik sıvı ve genellikle terpenoid bileşiklerin karışımından oluşmuşlardır. Uçucu yağların içinde günümüze kadar 3000'den fazla bileşik bulunduğu belirlenmiştir. Uçucu yağlar bitkilerden mekanik presleme ya da buhar distilasyonu ile elde edilen ve bitkilerin koku ve diğer karakteristik özelliklerini taşıyan uçucu yağ sınıfındandır (Stammati ve ark. 1999; Gomes-Carneiro ve ark. 1998). Alternatif olarak ekstrakte edilip organik çözücü olarak kullanılabilirler. Eterik yağlar olarak da adlandırılan uçucu yağlar bitkinin çeşitli kısımlarından (çiçek, tomurcuk, tohum, yaprak, sürgün, kabuk, meyve ve kök) elde edilebilmektedir (Burt 2004). Şimdiye kadar 3000 kadar yağ bilinmekte ve bunların yaklaşık 300 tanesi ticari amaçla kullanılmaktadır (Van De Braak ve Leijten 1999). Son zamanlarda uçucu yağlar, bitki ekstraktları ve onların saflaştırılmış ya da sentez edilmiş bileşenleri gıda ve kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Stammati ve ark. 1999; Gomes-Carneiro ve ark. 1998).

Bazı uçucu yağlar, antimikrobiyal özellikleriyle tanınmaktadır (Burt 2004; Guenther 1948). Antibakteriyal özelliklerinin yanı sıra (Mourey ve Canillac 2002; Deans ve Ritchie 1987), uçucu yağlar ve onların bileşikleri; antiviral (Bishop 1995), antimitotik (Jayashree ve Subramanyam 1999; Akgül ve Kıvanç 1988; Azzoua ve Bullermen 1982), antitoksijenik (Akgül ve ark. 1991; Ultee ve Smid 2001; ve antiparazitik (Pessoa ve ark. 2002; Pandey ve ark. 2000), ve inseksidal özellikler içermektedirler (Burt 2004; Guenther 1948; Mahmoud ve Croteau 2002).

Monoterpenler bitkilerden elde edilen kokulu karışımlar olan uçucu yağların başlıca bileşenleridir (Gomes-Carneiro ve ark. 1998). Bitkilerin bileşikleri olan monoterpenlerin birçoğu insanların besinlerinde bulunmakta ya da birçoğu besin olarak kullanılmaktadır (Elegbede ve ark. 2003). Monoterpenler 10-C atomu içeren izoprenoid grubundandır. Uçucu yağlar ve onların monoterpenoid

bileşikleri kozmetikte parfümlerde, yiyecek ve içeceklerde tat verici olarak evde sıkça kullanılan deterjanlarda, sabunlarda, oda spreylerinde ve böcek ilaçlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Uçucu yağlar ve monoterpenler düşük konsantrasyonda kullanıldığında hoş koku ve tat verdiği için çok eskiden beri bitkilerden elde edilir. Hatta bugün bile gıda katkı maddesi olarak ta kullanılmaktadır.

Uçucu yağlar ve monoterpenler lipofilik bileşiklerdir ve kolayca hücre membranından geçebilirler bu sayede akciğer ve deride absorbe edilirler. Bu nedenle monoterpenler ve uçucu yağlar uzun yıllar boyunca tıpta göğüs ışıtmelerinin tedavilerinde, kas ağrılarına karşı merhem ve kremlerde kullanılmaktadır (Mühlbauer ve ark. 2001). Hayvan kanser modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalar; bazı monoterpenlerin farklı hücresel ve moleküler seviyelerde rol alan antikarsinojenik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle monoterpenler, etkili, toksik olmayan, antikarsinojenik ajanlar olarak değerlendirilebilirler, bu ajanlar yeni bir anti kanser ilaç sınıfı olarak ümit vermektedirler (Loza-Tavera, 1999).

1.4.1.1. Timol

Timol (2-isopropyl-5methylphenol), thyme (kekik) bitkisinden elde edilen doğal bir antiseptiktir. Tıpta, tarımda, kozmetikte ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Szentandrassy ve ark. 2003; Manou ve ark. 1998; Sanchez ve ark. 2004).

Timol, monoterpen grubu içerisinde sınıflandırılan bir bileşiktir. Genel olarak bir antimikrobiyal ajan olarak bilinir. Timol'ün ağız bakterilerine karşı bakteriosit aktivitesi bulunması nedeniyle genellikle ağız solüsyonları timol içermektedir. Ayrıca bu terpenin önemli bir fungusit etkisinin bulunduğu bilinmektedir. Bu bileşiğin bakteriosit ve antioksidan (Alam ve ark. 1999) özellikleri nedeniyle dişçilikte ağız enfeksiyonlarını tedavisinde timol kullanımına sıkça başvurulmaktadır. Timol'ün kimyasal yapısına bakılarak bu bileşiğin amfipatik ve/veya hidrofobik davranışa sahip olduğu söylenebilir (Sanchez ve ark.

2004). ATPaz ve membran reseptör gibi ve membran proteinlerinin aktivitesinde, membran geçirgenliğinde, timol etkili bir maddedir.

Timol düşük konsantrasyonlarda insan besin maddelerinde de bulunmaktadır (Stammati ve ark. 1999). Timol antiseptik özelliğe sahip olduklarından tıpta ve dental yöntemlerde, fungusit, bakteriosit ve antioksidan ve anti_inflammatör özelliklerinden dolayı da tarımda kozmetikte ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan monoterpenoid fenol türevleridir (Magyar ve ark. 2004; Perry ve ark. 2003). Ayrıca insektisit ve akarisit etkiye de sahiptirler (Hierro ve ark. 2004).

1.4.1.2. *Salvia fruticosa* (Adaçayı) yağı

Labiatae familyasında sınıflandırılmaktadır. *Salvia fruticosa*, *S. triloba* ve *S. cypria* olarak adlandırılır (Gali-Muhtasib ve ark. 2000). 89 türü Türkiye’de bulunan adaçayının 45 türü endemiktir Birçok adaçayı türü bitkisel çay ve gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Orta doğuda hemen hemen her evde bu bitkinin su ekstraktı, mide ağrılarına karşı, öksürük ve soğuk algınlığının tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (Gali-Muhtasib ve ark. 2000). Ayrıca ağızdaki iltihaplar için anti inflammatör ajan olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bu bitkinin uçucu yağının önemli ölçüde anti bakteriyel etkisinin olduğunu (Hefnawy ve ark. 1993) ve fare derisi üzerinde yapılan çalışmalarda da tümör oluşumunu engelleyici etkisinin olduğunu gösterilmiştir. Bu bitki tıp alanında birçok rahatsızlığın tedavisinde kullanılmasına karşın bitkinin esansiyel yağının toksik etkisiyle ilgili çalışmalara az rastlanmaktadır (Farhat ve ark. 2001). Sivropoulou ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (1997) *Salvia fruticosa*’nın antibakteriyel, sitotoksik ve antiviral etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Sivropoulou ve ark. 1997). Farhat ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2001) adaçayının uçucu yağında α -pinene, Camphene, β - pinene, limonene, sineol, α -thujon, β -thujon, camphor, linalool, linalenasetat ve borneol bileşiklerinin bulunduğu ve mevsime göre miktarlarında değişiklikler meydana geldiği belirlenmiştir.

1.4.1.3. *Laurus nobilis* (Defne) yağı

Laurus nobilis yaprakları ve yapraklarının esansiyel yağı mutfakta ve gıda endüstrisinde baharat ve katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu bitkinin tıpta önemli bir kullanımı olmamasına rağmen son zamanlarda bu bitki bilimsel araştırma konusudur (Simic ve ark. 2003). *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) geleneksel olarak gastrointestinal sorunların tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkinin sıvı ekstratı halk arasında anti-hemoroidal, anti-romatik, diüretik olarak, yılan ısırıklarına karşı antidot ve mide ağrılarının tedavisinde kullanılmaktadır (Kıvçak ve Mert 2002).

Akdeniz ve Avrupa defnesinin (*Laurus nobilis*) yapraklarından elde edilen esansiyel yağın kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi için yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Riaz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada esansiyel yağın başlıca bileşenlerinin sineol (%44,12), eugenol (%15,16), sabinene (%6,20), 4-terpinol (%2,74), metileugenol (%2,48), α -terpinol (%2,19) ve β -pinen (%2,05) olduğu rapor edilmiştir (Sayyah ve ark. 2002).

1.4.1.4. *Origanum onites* (Kekik) yağı

Labiata familyasının bir üyesi olan İzmir kekiği, akkekik, peynir kekiği ve güvey otu olarak bilinen kekik (*Origanum onites* L.) antik çağlardan beri halk tarafından baharat ve ilaç olarak kullanıldığı bilinen bir bitkidir. *Origanum onites* kekik yağı açısından da zengindir. Yapılan bir çalışmada, *O.onites* L. uçucu yağı detaylı olarak araştırılmış ve uçucu yağ içindeki ana bileşenlerin; karvakrol (%65.91), linalool (%14.84), timol (%3.64), p-simen (%3.24) ve g-terpinen (%2.08) olduğu ortaya konulmuştur (Erdemgil 1992; Aydın ve ark. 2005). Karvakrol ve timol gibi monoterpenik fenollerce zengin olan bu yağ çok güçlü mikrop öldürücü özelliğe sahip olduğundan bakteri ve mantar enfeksiyonlarında etkilidir. Bunun yanı sıra karvakrol ve karvakrolce zengin kekik yağlarının gıdaların saklanmasıdaki rolleri çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir (Zeytinoğlu ve ark. 1998).

1.5. Çalışmalarda kullanılan yöntemler hakkında bilgiler

1.5.1. BrdU (Hücre çoğalması testi, ELISA)

DNA sentezi sırasındaki BrdU'nun (5-bromo-2'-deoxy-uridine) DNA'ya bağlanmasının/ DNA ile birleşmesinin belirlenmesi temeline dayalı, hücre çoğalmasının ölçülmesi için yapılan kalorimetrik bir uygulama olan ve [³H]-timidinin DNA ya bağlanması testine alternatif, radyoaktif olmayan bir testtir (Roche Applied Science 2003 Biochemical Catalog).

1.5.1.1. BrdU, hücre çoğalması testinin amacı (background)

Hüresel çoğalma genomik DNA'nın replikasyonuna gerek duyar. Bu yüzden, DNA sentezinin görüntülenmesi, DNA sentezinin kendini düzenlemesinin çalışılmasına da uygun olan hücre çoğalmasının indirekt parametresidir. [³H]-timidin, replike olan hücrelerin DNA'larını belirlemek (etiketlemek) için sıklıkla kullanılmaktadır. [³H]-timidinin kullanım ile ilgili dezavantajları ortadan kaldırmak için, 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) ya dayalı radyoaktif olmayan alternatifler geliştirilmiştir.

Kemiluminescent (1. relating to the phenomenon of chemiluminescence; "fireflies are chemiluminescent". 2. luminescence resulting from a chemical reaction as the oxidation of luciferin in fireflies) teknolojisinin kullanımı, daha fazla duyarlılık ve geniş bir ölçüm alanı sağlar (Roche Applied Science 2003 Biochemical Catalog).

1.5.1.2. Uygulama

The Cell Proliferation ELISA, BrdU (kalorimetrik) DNA sentezini belirlemek için kullanılan testlerin geliştirilmiş olan ikinci jenerasyonuna (nesline) aittir. Replike olan hücrelerdeki DNA sentezi sırasında BrdU'nun DNA ile birleşmesinin ölçülmesi temeline dayalı hücre çoğalmasına alternatif olarak

güvenilir, hızlı ve basit kalorimetrik olarak dizayn edilmiştir. Böylece bu kit bir çok farklı *in vitro* hücre sistemlerinde kullanılabilir; örnek olarak:

Büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin neden olduğu hücre çoğalmasının ölçülmesinin test edilmesinde,

Çevresel ve biyomedikal araştırmalarda ve besin kozmetik ve farmosötik sanayilerinde hücre çoğalması üzerine çeşitli bileşiklerin önleyici veya teşvik edici etkilerinin belirlenmesinde.

Mitojenlerin veya antijenlerin teşvik ettiği/uyardığı lenfositlerin imminoreaktivite ölçümlerinde,

Medikal araştırmalarda tümör hücrelerinin diğer stostatik ilaçlarla olan kemosenesitivitesinin analizlerinde kullanılabilir (Roche Applied Science 2003 Biochemical Catalog).

1.5.1.3. Testin yapılışı

Bu test çoğalan hücrelerin genomik DNA'larına eklenmiş olan BrdU nun bulunması esasına dayalı bir yöntemdir. 96 kuyucuklu doku kültürü plakalarında büyüyen hücreler 2-24 saat süre içinde BrdU nun eklenmesi ile işaretlenirler. Bu işaretleme süresi içinde, BrdU, bölünen hücrelerin DNA'sına timidinin yerine geçerek yerleşir. İşaretleme medyumunu uzaklaştırdıktan sonra, hücreler sabitlenir ve DNA tek adımda FixDenat ilavesi ile denatüre edilir. FixDenatın uzaklaştırılmasından sonra anti BrdU-POD antibodisi eklenir ve bu BrdU yu yeni sentezlenen hücresel DNA ya bağlar. İmmün kompleks substrat reaksiyonu sonucu ile belirlenir. Reaksiyon ürünleri, çok kuyucuk tarayabilen spektrofotometre (ELISA okuyucu) ile absorbansın ölçülmesi ile hesaplanır (Roche Applied Science 2003 Biochemical Catalog).

1.5.1.4.Yöntemin avantajları

- **Güvenli** – radyoaktif izotop kullanılmamıştır.
- **Doğru** – alınan sonuçlar, çoğalan hücrelerin miktarı ile yüksek oranda paralellik gösterir (sapma miktarı düşük)

- **Hassas** – kemilumineskent teknolojisi en az [³H]-timidinin kullanıldığı teste eşit miktarda hassasiyet sağlar.
- **Hızlı** – fiksasyon ve denatürasyon tek bir aşamada gerçekleşir ve bir yıkama aşaması ve iki inkübasyon aşamasından ibarettir; çok kuyucuk okuyan ELISA aletinin kullanımı çok büyük miktarlarda örneğin kullanılmasına olanak sağlar
- **Uygundur** – ürünler sabit ve optimize edilmiş şekillerde sunulmaktadır; tüm test bir mikropalakada gerçekleştirilir; yumuşak fiksasyon ve DNA denatürasyonu hücrel morfolojiyi korur
- **Fonksiyon-test edilmiştir** – her parçanın fonksiyonu, ana bir parçaya göre çoğalan hücreler üzerinde test edilmiştir (Roche Applied Science 2003 Biochemical Catalog).

1.5.2. Floresan boyama ile morfolojik inceleme

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Floresan sistemler ışık mikroskopuna göre çok daha pahalıdır. AT, AU ve IC grupları ile floresan özgülük gösteren, 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) nin, doğal çift iplikcikli DNA ile floresan bir kompleks oluşturduğu bilinmektedir. Bu özelliğinden dolayı DAPI, sitokimyasal araştırmalarda çok kullanışlı bir araç olmuştur. DAPI, DNA ya bağlandığı zaman floresans özelliği daha da güçlenir.

DAPI, tercihli olarak çift iplikcikli DNA'yı boyayarak çekirdeğin mavi görünmesini sağlar. (Wilma ve ark., 2006)

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Bitki Ekstreleri

Kekik, defne, ve adaçayı yağları ile ve kekik esansiyel yağının önemli bir bileşeni olan timol; Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı'ndan elde edilmiş olup, yağların elde edildiği bitkinin kaynağı ve yağların kompozisyonu/bileşenleri tam olarak bilinmektedir.

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

BrdU Proliferasyon Testi Kiti (Cell Proliferation ELISA, BrdU (calorimetric), Roche) Nutrient Mikture F-12 (HAM, Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma), Penicilin-Streptomycin (Sigma), Tripsin-EDTA solution (10X, Sigma), %0.5 lik Triton X-100 (Sigma), Sodyum bikarbonat (Sigma), %3.7 Formaldehit Dimethyl Sulfoxide (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (Ridel de Haen), Etanol (Ridel de Haen), Asetic Asit Glasiyal (Carlo Erba), Formaldehit (Merck), CaCl (Merck), KCl (Sigma), NaCl (Merck), KH₂PO₄ (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), EDTA (Merck), Sıvı Azot.

2.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

25 cm²'lik flasklar, 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP), cam mezürler, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml hacimlerinde), enjektörler (10, 20 ve 50 ml hacimlerinde), 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeleri, 10 ml'lik tek kullanımlık pipetler. Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı.

2.4. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Eppendorf), Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Enzimoloji),

kuru hava sterilizatörü (Nüve), Otoklav, Derin dondurucu (-20, -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO₂ inkübatörü (Heraus), Steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, otomatik pipetler, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza Okuyucu (ELx808-IU, Bio-Tek), Inverted Mikroskop (Olympos), Inverted Mikroskop (1X71 Olympus), 12 ve 6 Kanallı mikropipet (eppendorf), dağıtıcı pipet (eppendorf).

2.5. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücreler

2.5.1. A549 hücre kültürü

A549 hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum, Nutrient Mikture F-12 (HAM), Penicilin-Streptomycin ve %7,5 NaHCO₃ içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklarda %95'lik hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında, 37 °C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.5.2. V79 379A hücre kültürü

V79 379A hücreleri, inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicilin-Streptomycin ve %9,5 NaHCO₃ içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklarda %95'lik hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında, 37 °C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

2.6. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

2.6.1. Timol Dozlarının Hazırlanması

Timol, dimetil sülfoksit (DMSO; Riedel de Haen) içinde çözülerek 50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM ve 800 mM'lık dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilisyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. Timol DMSO içinde

çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. Hazırlanan dozlar +4°C'de saklanmıştır.

2.6.2. Adaçayı Dozlarının Hazırlanması

Salvia fructicosa (adaçayı yağı), uçucu yağ olduğu için %98'lik etanol (Riedel de Haen) içinde çözülerek 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml ve 200 mg/ml'lik dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilisyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. Adaçayı yağı etanol içinde çözüldüğü için (Sivropoulou ve ark. 1997), negatif kontrol olarak, çözücü madde olan etanol kullanılmıştır. Hazırlanan dozlar +4°C'de saklanmıştır.

2.6.3. Defne Dozlarının Hazırlanması

Laurus nobilis (defne yağı), uçucu yağ olduğu için %98'lik etanol (Riedel de Haen) içinde çözülerek 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml, 400 mg/ml ve 800 mg/ml'lik dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilisyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. Defne yağı etanol içinde çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan etanol kullanılmıştır. Hazırlanan dozlar +4°C'de saklanmıştır.

2.6.4. Kekik Dozlarının Hazırlanması

Origanum onites (kekik yağı), uçucu yağ olduğu için %98'lik etanol (Riedel de Haen) içinde çözülerek 0,4 mg/ml, 2 mg/ml, 10 mg/ml, 50 mg/ml ve 100 mg/ml'lik dozlar hazırlanmıştır. Daha sonraki dilisyonlar ise taze kültür vasatları kullanılarak yapılmıştır. Kekik yağı etanol içinde çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan etanol kullanılmıştır. Hazırlanan dozlar +4°C'de saklanmıştır.

2.7. Test maddelerinin analiz koşulları

Çizelge-1. Test maddelerinin gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS) analiz koşulları

Sistem	: Agilent 5975 GC-MSD sistemi
Kolon	: HP-Innowax Silika kapiler (60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)
Sıcaklık Programı	: 60°C de 10 dak // 4°C/dak artışla 220°C ye // 220°C de 10 dak // 1°C/dak artışla 240°C ye
Enjektör	: 250°C
Taşıyıcı Gaz	: Helyum (0.8 ml/dak)
Split oranı	: 40:1
Elektron enerjisi	: 70 eV
Kütle Aralığı	: <i>m/z</i> 35-450
Kütüphane	: BAŞER Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi, Wiley ve Adams-LIBR (TP) Kütüphane tarama Yazılımları

2.7.1. Gaz Kromatografisi (GC) Analiz Koşulları

GC analiz koşulları; eş zamanlı olarak GC/MS sistemindeki madde çıkış zamanları ile aynı olacak şekilde ayarlanmıştır (FID 300°C).

2.8. Test maddelerinin ana bileşenleri

Çizelge-2. Kekik uçucu yağı ana bileşikleri

Ana Bileşikler	E961A %
karvakrol	66.4
linalol	9.3
p-simen	8.3
timol	1.7
mirsen	1.6
γ-terpinen	3.3

α -terpinen	1.4
α -pinen	1.0

Çizelge-3. Adaçayı uçucu yağı ana bileşikleri

Ana Bileşikler	%
1,8-sineol	50.2
β -karyofillen	6.3
kafur	6.1
α -pinen	5.5
β -pinen	5.1

Çizelge-4. Defne uçucu yağı ana bileşikleri

Ana Bileşikler	%
1,8-sineol	51.9
α -pinen	10.5
sabinen	10.1
β -pinen	7.3
limonen	1.7
α -terpinil asetat	5.1
γ -terpinen	1.4
kamfen	1.3
terpinen-4-ol	1.3
p-simen	1.2
linalol	1.1

2.9. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C'de 2 saat, yine bazı cam ve plastik malzemeler ve sıvı solüsyonlar da alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C ,1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 mm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

2.10. Yöntem

2.10.1. Hücre kültürü

A549 ve V79 379A hücreleri uygun besiyerinde ve 25 cm²'lik flasklarda yetiştirilmiş ve %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmişlerdir.

2.10.2. Hücrelerin testler için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Trypsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak BrdU testi için 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda belirlenen sayıda (V79 379A için 1000, A549 için 5000) hücre olacak şekilde % 10 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 0,1 ml hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37°C'de 24 saat inkübe edilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 24, 48, 72 ve 96 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

Timolun belirlenen dozları hazırlanmıştır. Timol için çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı % 0,1'i geçmeyecek şekilde maddeler besiyerinde % 0,1 olacak şekilde 1 ml içinde 1 µl DMSO'da verilmiştir ve final konsantrasyonları: Timol'un 50-100-200-400 µM, 800 µM olması sağlandı. Esansiyel yağların hepsi etanol içinde çözülmüştür. Etanol oranı % 0,05'i geçmeyecek şekilde maddeler besiyerinde % 0,05 olacak şekilde 1 ml içinde 0,5 µl etanol'de verilmiştir ve final konsantrasyonları: Adaçayı'nın 12,5-25-50-100 ve 200 µg ve 200 µg, defne yağı 50-100- 200-400 ve 800 µg ve kekik yağının 0,4-2-10-50-100 µg olması sağlanmıştır. Bu konsantrasyonlarda besiyerinde hazırlanan

test maddelerinin konsantrasyonları, kontrol grubu (sadece besiyeri) ve %0,1 DMSO ya da %0,05 etanol içeren çözücü kontrol grubu da teste eklenmiştir.

2.10.3. BrdU (Hücre çoğalması testi, ELISA)

Bir timidin analogu olan 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)'nun ELISA ile ölçülmesi, memeli hücrelerinde mitoz ölçümleri için kolorimetrik bir method olarak geliştirilmiştir. Çoğalan hücrelerin DNA'larına BrdU yerleştirildiğinde, DNA'lar anti-BrdU antibody ile bulunabilirler.

Daha önceden 96 kuyucuklu plakalar ekilmiş olan ve 24 saat inkübasyon süresinden sonra, test meddeleri ilave edilen plakalar belirlenen süreler sonunda BrdU (Roche) kiti ile muamele edilmişlerdir.

2.10.4. Floresan boyama ile morfolojik inceleme

6'lı plakalara yerleştirilen steril lameller üzerine ekilen A549 ve V79 379A hücreleri 24 saat lamellerin üzerine yapışmaları için 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Monoterpen ve uçucu yağların sitotoksosite testleri sonucunda belirlenen etkili dozları, lameller üzerine yapışan hücrelere 12 saat süresince uygulanmıştır. Bu süre sonunda lameller % 3.7'lik formaldehit ile tespit edilmişlerdir. Daha sonra steril fosfatlanmış tampon çözeltisi (PBS: 137 µM NaCl, 2.7 µM KCl, 15 µM KH₂PO₄, 8 µM NaHPO₄; pH 7.3) ile yıkamaları yapılan lamelle, 1mg/ml DAPI ile 30 dakika boyanmışlardır. Daha sonra PBS ile yıkanan lameller fotoğraflanmıştır.

2.11. Mikroskopi

Hücreler floresan ataçmana sahip Olympus IX71 inverted mikroskobunda incelenmişlerdir.

2.12. Fotoğrafi

Kültür hücrelerinin mikroskop altında saptanan uygun görüntüleri Olympus DP-70 otomatik fotomikrografi aracı kullanılarak fotoğraflanmıştır.

2.13. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. BrdU sonuçları

3.1.1. Kekik'in A549 ve V79 379A hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri

Kekik uçucu yağı uygulanan hücrelerle yapılan BrdU testi sonucunda A549 hücreleri üzerinde zamana ve doza bağımlı olarak ilk üç günde hücre sayısında belirli bir azalma gözlenmiş ve dördüncü günde bu azalma çok fazla miktarda gözlenmemiştir. Kekik uçucu yağının en düşük dozu olan 0,4 µg/ml ve 2 µg/ml lik dozlarda ilk iki gün çok fazla bir etki görülmemiş, üçüncü günde belirli bir azalma gözlenmiştir. Kekik uçucu yağının 10 µg/ml lik dozunda ise ikinci gün belirli bir düşüş gerçekleşmiş ama bu diğer günlerde devam etmemiştir. En etkili dozlar olan 50 µg/ml ve 100 µg/ml lik dozlarda ise ilk günden itibaren hücre sayısında yaklaşık olarak %30 - %40 oranında hücre sayısında bir azalma olmuştur ve bu azalma diğer günlerde de artarak devam etmiştir (Şekil 1.1.)

Kekik uçucu yağı uygulanan hücrelerle yapılan BrdU testi sonucunda V79 379A hücreleri üzerinde zamana ve doza bağımlı olarak dört günde hücre sayısında belirli bir azalma gözlenmiştir. Kekik uçucu yağının en düşük dozu olan 0,4 µg/ml ve 2 µg/ml lik dozlar ile 10 µg/ml lik dozlar ilk günden itibaren hücre sayısında %50 - %55 oranlarında bir azalmaya neden olmuş ve bu azalma son iki dozda çok daha artarak oran %60 - %70 lere kadar çıkmış ve bu azalma diğer günlerde de artarak devam etmiştir. Azalma miktarı 4. günün sonunda %80 - %90 lara kadar çıkmıştır. (Şekil 1.2.)

3.1.2. Adaçayı'nın A549 ve V79 379A hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri

Adaçayı uçucu yağı uygulanan hücrelerle yapılan BrdU testi sonucunda A549 hücreleri üzerinde zamana ve doza bağımlı olarak dört gün boyunca hücre sayısında çok değişken bir etki görülmemiştir. Sadece Adaçayı'nın son dozu olan 200 µg/ml lik dozunda yaklaşık olarak % 40 lık bir azalma görülmüştür (Şekil 1.3.)

Adaçayı uçucu yağı uygulanan hücrelerle yapılan BrdU testi sonucunda V79 379A hücreleri üzerinde zamana ve doza bağımlı olarak ilk günde yaklaşık %20'lik bir azalma gözlenmiş ve bu Adaçayı'nın ilk dört dozu için diğer günler

de hemen hemen aynı kalmıştır fakat Adaçayının son dozu olan 200 µg/ml lik dozunda 2. günden itibaren büyük bir azalma gözlenmiştir. (Şekil 1.4.)

3.1.3. Defne'nin A549 ve V79 379A hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri

Defne uçucu yağı uygulanan hücrelerle yapılan Brdu testi sonucunda A549 hücreleri üzerinde zamana ve doza bağımlı olarak dört gün boyunca olduk düzenli bir azalma görülmüş ve bu azalma birinci günden itibaren doza da bağımlı olarak artarak devam etmiştir. En etkili dozlar ise birinci günden itibaren hücre sayısında %60 - %70 oranlarında azalmayla 400 µg/ml ve 800 µg/ml lik dozlarında görülmüş ve bu oran diğer günlerde artarak devam etmiştir, Dördüncü günün sonunda ise hücrelerin çoğu yaşamını yitirmiştir. (Şekil 1.5.)

Defne uçucu yağı uygulanan hücrelerle yapılan Brdu testi sonucunda V79 379A hücreleri üzerinde zamana ve doza bağımlı olarak ilk günde çok önemli bir azalma olmamakla beraber ikinci gün bu azalmanın oranı oldukça artmıştır. 200 µg/ml, 400 µg/ml ve 800 µg/ml lik dozlarda bu oran doza paralel bağımlı olarak %50 - %80 arasında artmıştır. Diğer günlerde çok fazla bir değişiklik gözlenmemiştir. (Şekil 1.6.)

3.1.4. Timol'ün A549 ve V79 379A hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri

Timol uygulanan hücrelerle yapılan Brdu testi sonucunda A549 hücreleri üzerinde zamana ve doza bağımlı olarak hücre sayısında belirli bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma Timol'ün ilk üç dozu olan 50 µM, 100 µM ve 200 µg/ml için %25 - %45 arasındadır. Timolün son iki dozu olan 400 µM ve 800 µM lik dozlar ilk günden itibaren oldukça sitotoksik bir etki göstererek hücre sayısında %75 - %95 arasında zamana da bağımlı olarak etki göstermiştir (Şekil 1.7.)

Timol uygulanan hücrelerle yapılan Brdu testi sonucunda V79 379A hücreleri üzerinde zamana ve doza bağımlı olarak ilk gün pek bir etki görülmemiştir. İkinci, üçüncü ve dördüncü günlerde %55 - %85 oranlarında doza ve zamana paralel bağlı bir artış gözlemlenmiştir. (Şekil 1.8.)

3.2. Floresan boyama ile morfolojik inceleme sonuçları

Dört adet test maddesinin BrdU deneylerinden elde edilen sonuçlarına göre belirlenen dozlarının, apoptozise neden olup olmadığı, A549 ve V79 379A hücreleri üzerinde DAPI boyaması uygulandıktan sonra Olympus IX71 floresan mikroskobu kullanılarak araştırılmıştır. Saptanan uygun görüntüler Olympus DP-70 otomatik fotomikrografi aracı kullanılarak fotoğraflanmıştır.

3.2.1. Kekik'in A549 ve V79 379A hücreleri üzerine morfolojik etkileri

Kekik uçucu yağının, A549 hücrelerinin ilk dozu olan 0,8 µg/ml den itibaren apoptotik etki göstermiştir. Hücrelerin içindeki DNA fragmanite ve kondanse olmuş, hücre sayısında da bir azalma göze çarpmaktadır (Şekil 2.1.). Şekil 2.1.b., c., ve d. de kondanse olmuş hücreler ve şekil 2.1. e., f., ve g. de ise hem fragmanite hem de kondanse olmuş hücreler görülmektedir.

Kekik uçucu yağının, V79 379A hücreleri üzerine etkileri A549 hücreleri ile çok büyük miktarlarda fark göstermektedir. Hemen hemen ilk dozdan son doza kadar kontrol grubu hücreleri ile aynı morfolojik özellikler göstermekte olup hücre sayısı da son dozda biraz düşmüştür (Şekil 2.5). V79 379A da adaçayı çok fazla bir etkisi gözlenmemiştir. A549 ve V79 379A hücreleri boyutları bakımından ve elde edildikleri kaynak bakımından farklılık göstermektedir. A549 kanserli bir insandan elde edilmiş akciğer kanser hücresi, V79 379A ise sağlıklı bir hamster akciğer kanser hücresidir. Bu yüzden de her bir birim alana düşen hücre sayısı V79 379A larda daha fazladır.

3.2.2. Adaçayı'nın A549 ve V79 379A hücreleri üzerine morfolojik etkileri

Adaçayı uçucu yağının, A549 hücrelerinin ilk dozu olan 12,5 µg/ml den itibaren apoptotik etki göstermiştir. Hücrelerin içindeki DNA fragmanite ve kondanse olmuştur (Şekil 2.2.). Şekil 2.2.c. de kondanse olmuş hücreler ve şekil 2.2. d. de fragmanite ve kondanse olmuş hücreler görülmektedir. Şekil 2.2.e. de de çok fazla sayıda fragmanite olmuş nükleus göze çarpmaktadır. Şekil 2.2.f. de

fragmente olmuş hücreler gözükmemektedir. Şekil 2.2.g. de kondanse olmuş hücrelerin sayısı çok fazla ve fragmente olmuş nükleuslar da gözlenmektedir. Ayrıca doza bağımlı olarak da hücre sayısında belirli bir azalma vardır.

Adaçayı uçucu yağının, V79 379A hücreleri üzerine etkileri A549 hücreleri ile büyük miktarlarda fark göstermektedir. Hemen hemen ilk dozdan son doza kadar kontrol grubu hücreleri ile aynı morfolojik özellikler göstermekte olup hücre sayısı da hemen hemen aynıdır (Şekil 2.6).

3.2.3. Defne'nin A549 ve V79 379A hücreleri üzerine morfolojik etkileri

Defne uçucu yağının, A549 hücrelerinin ilk dozdan itibaren apoptotik etki göstermiştir. Hücrelerin içindeki DNA fragmente olmuş aynı zamanda hücreler kondanse olmuş, hücre sayısında da doza bağımlı olarak bir azalma göze çarpmaktadır (Şekil 2.3.). Şekil 2.3.b. ve c. de fragmente olmuş hücreler ve şekil 2.1. d., e., f., ve g. de ise hem fragmente hem de kondanse olmuş hücreler görülmektedir.

Defne uçucu yağının, V79 379A hücreleri üzerine etkileri A549 hücreleri ile çok büyük miktarlarda fark göstermektedir. Hemen hemen ilk dozdan son doza kadar kontrol grubu hücreleri ile aynı morfolojik özellikler göstermekte olup hücre sayısında da çok fazla bir değişiklik göze çarpmamaktadır (Şekil 2.7).

3.2.4. Timol'ün A549 ve V79 379A hücreleri üzerine morfolojik etkileri

Timol'ün, A549 hücrelerinin ilk dozu olan 50 µM dan itibaren apoptotik etki göstermeye başlamış ve uygulanan doza bağımlı olarak apoptotik etki artmıştır. Hücrelerin içindeki DNA fragmente ve kondanse olmuş, hücre sayısında da bir azalma gözlenmiştir (Şekil 2.4.). Şekil 2.4.c. de kondanse olmuş hücreler ve şekil 2.4. d. ve e. de fragmente ve kondanse olmuş hücreler görülmektedir. Şekil 2.4.f. de de çok fazla sayıda fragmente olmuş nükleus göze çarpmaktadır. Şekil 2.4.g. de fragmente olmuş hücreler gözükmemektedir.

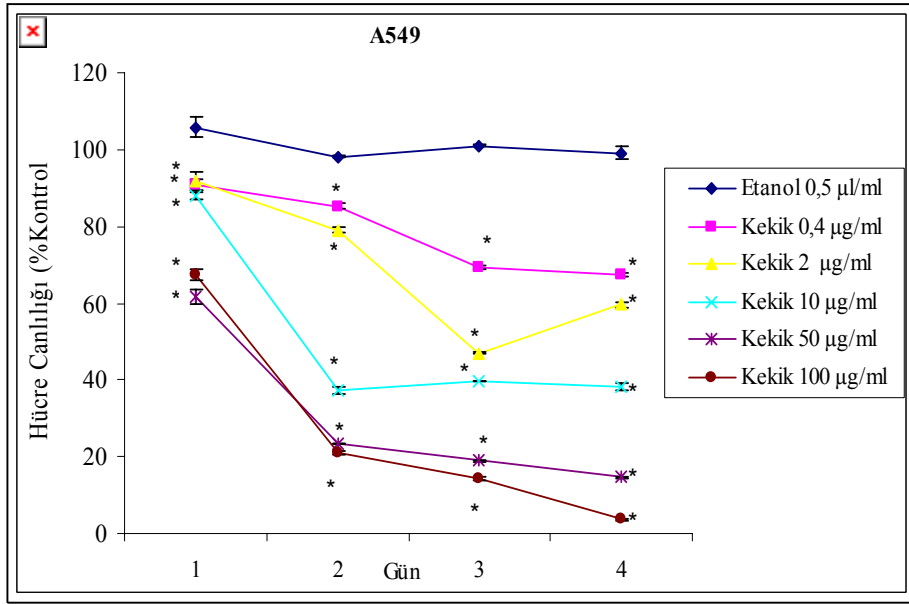
Timol'ün, V79 379A hücreleri üzerine etkileri A549 hücreleri ile çok büyük miktarlarda fark göstermektedir. ilk dozdan itibaren son doza kadar kontrol grubu hücreleri ile aynı morfolojik özellikler göstermekte olup hücre sayısı da son iki dozda biraz düşmüştür. A549 hücrelerindeki gibi kondanse ve fragmente olmuş hücreler göze çarpmamaktadır (Şekil 2.8).

Tüm bu bulgular ışığında Kekik uçucu yağı A549 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre çoğalmasını azaltıcı yönde etki yapmıştır. Kekik uçucu yağı V79 379A hücreleri üzerinde A549 hücreleri üzerine hücre çoğalmasını daha fazla etkilemiştir. Bu sonuç iki hücre ırkının aynı kaynaktan gelmemesinden kaynaklanmış olabilir.

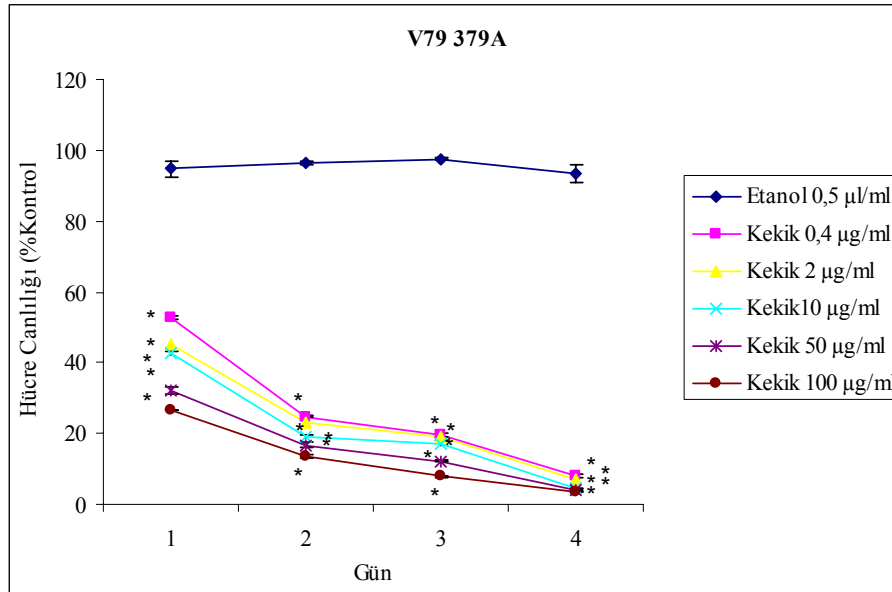
Adaçayının tüm dozları birinci günden başlamak üzere A549 hücreleri üzerinde hücre sayısında azalmaya neden olmuştur. Bu etki diğer üç günde de devam etmiştir.

Defnenin tüm dozları A549 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı sitotoksosite göstermiştir. 800 µg/ml lık doz A549 hücreleri üzerinde ilk gün hücre sayısını %70 oranında azaltırken aynı doz V79 379A hücrelerinde birinci gün %20 azalmaya neden olmuştur. İlk gün göz önüne alındığında Defne'nin A549 hücreleri üzerinde daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.

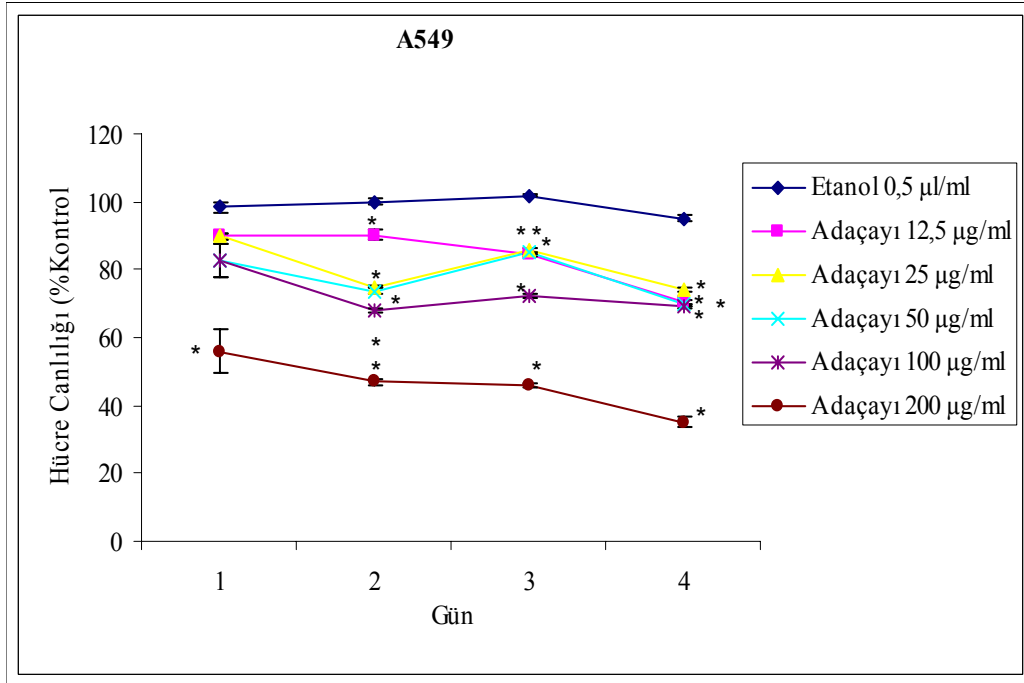
Timol'ün tüm dozları A549 hücreleri üzerinde doza ve zamana dayalı sitotoksositeye neden olmuştur. Timol'ün 200 µM ve 400 µM lık sonuçları birbirine çok yakın sonuçlar vermiştir. En yüksek doz olan 800 µM dozda hemen hemen tüm hücreler 1 günde ölmüşlerdir. V79 379A hücreleri üzerinde Timol'ün en yüksek dozu olan 800 µM, birinci gün %25 oranında hücre çoğalmasını azaltmıştır. Bu oran diğer dozlarda daha azdır. İkinci günden itibaren Timol'ün etkisi artmıştır.



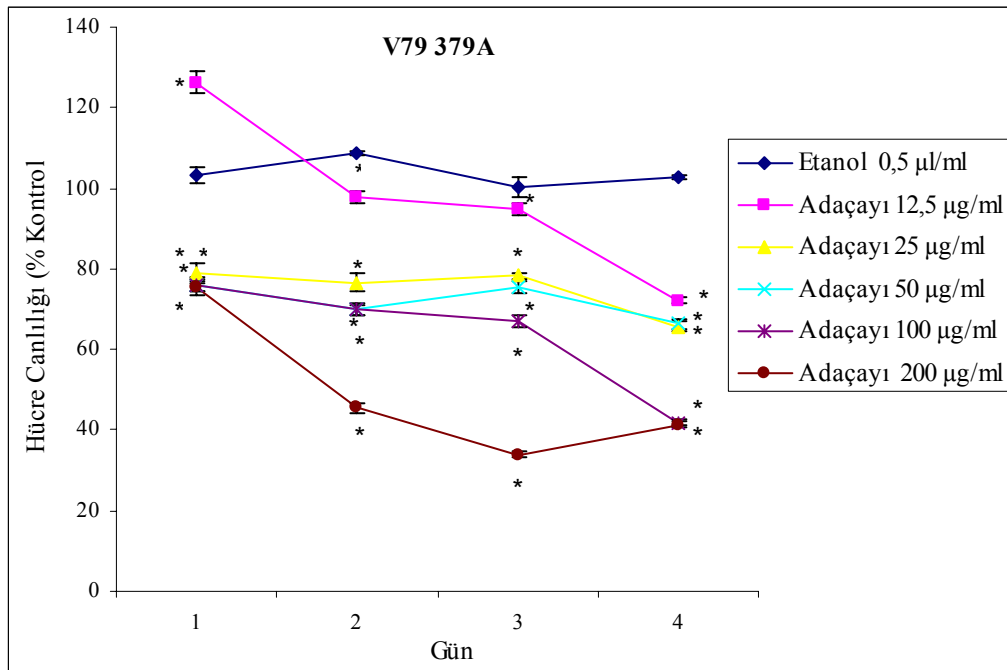
Şekil 1.1. *Origanum onites* (kekik) uçucu yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



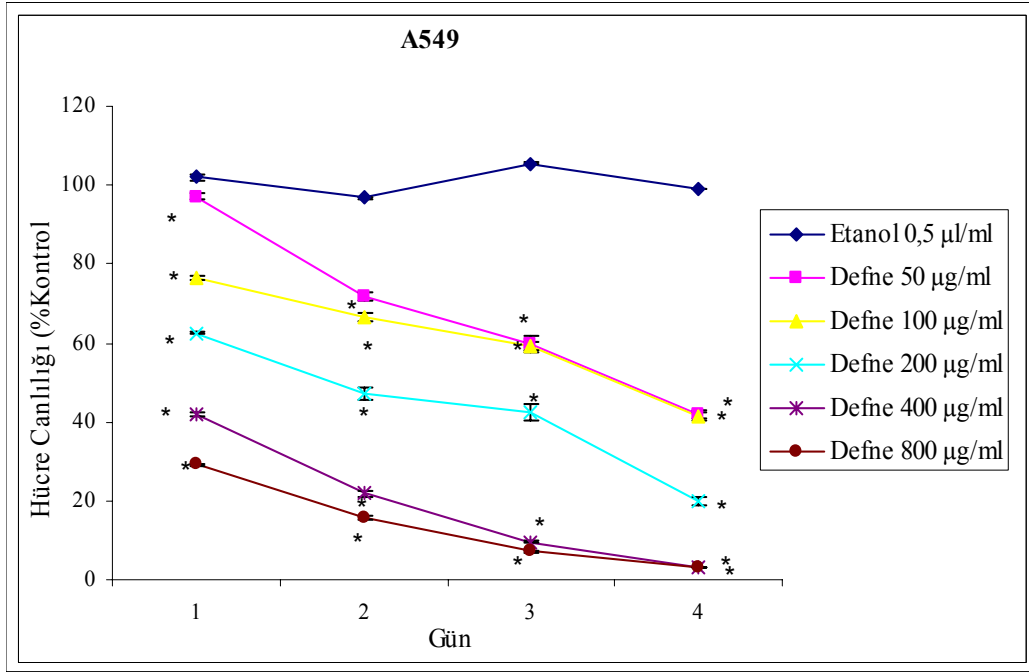
Şekil 1.2. *Origanum onites* (kekik) uçucu yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



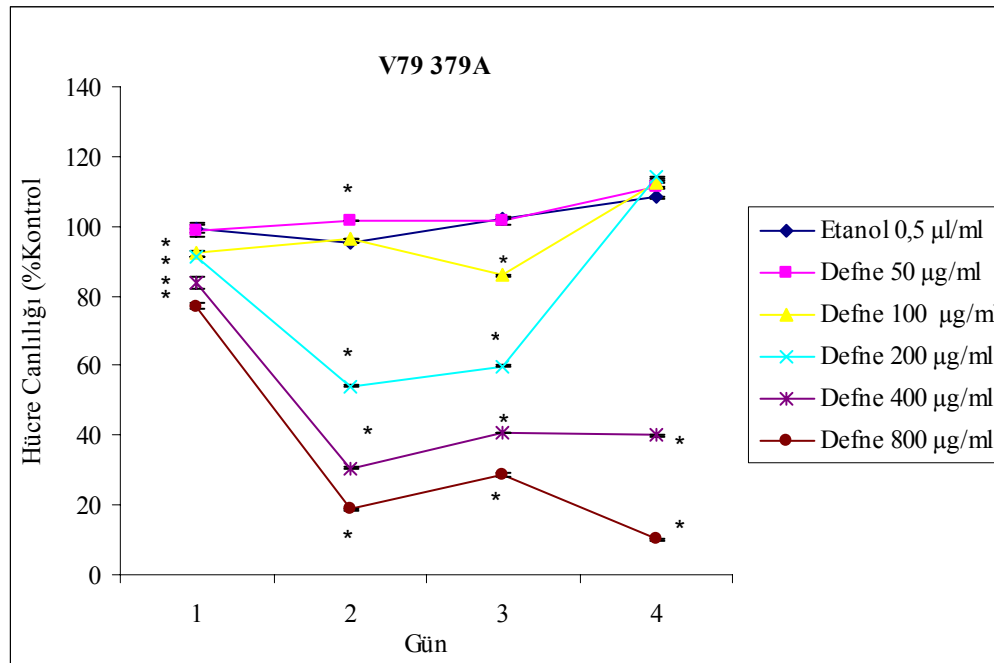
Şekil 1.3. *Salvia fruticosa* (adaçayı) uçucu yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



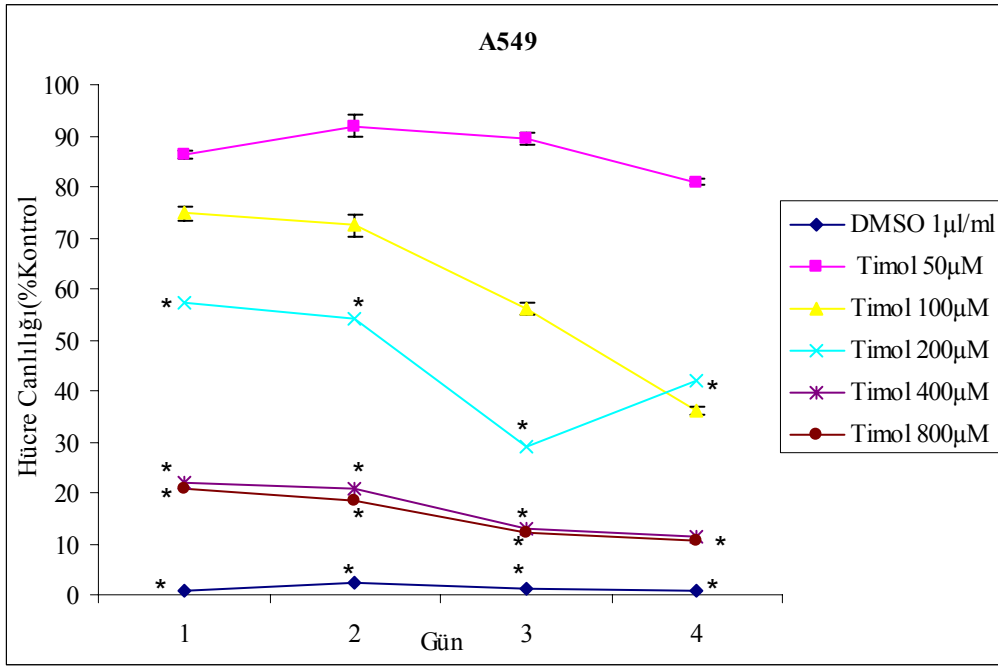
Şekil 1.4. *Salvia fruticosa* (adaçayı) uçucu yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



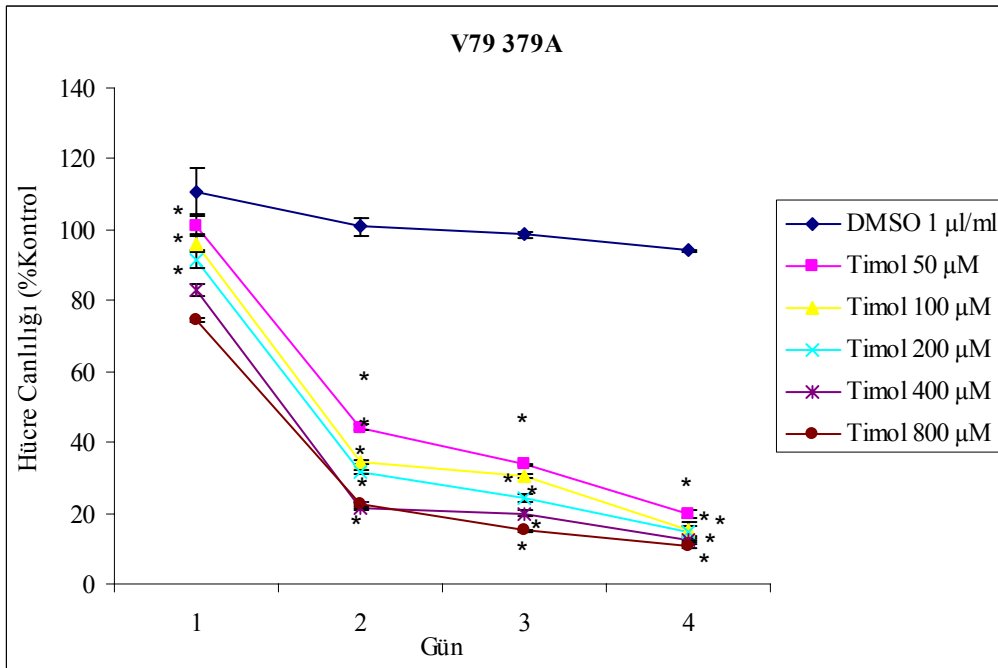
Şekil 1.5. *Laurus nobilis* (defne) uçucu yağının A549 hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



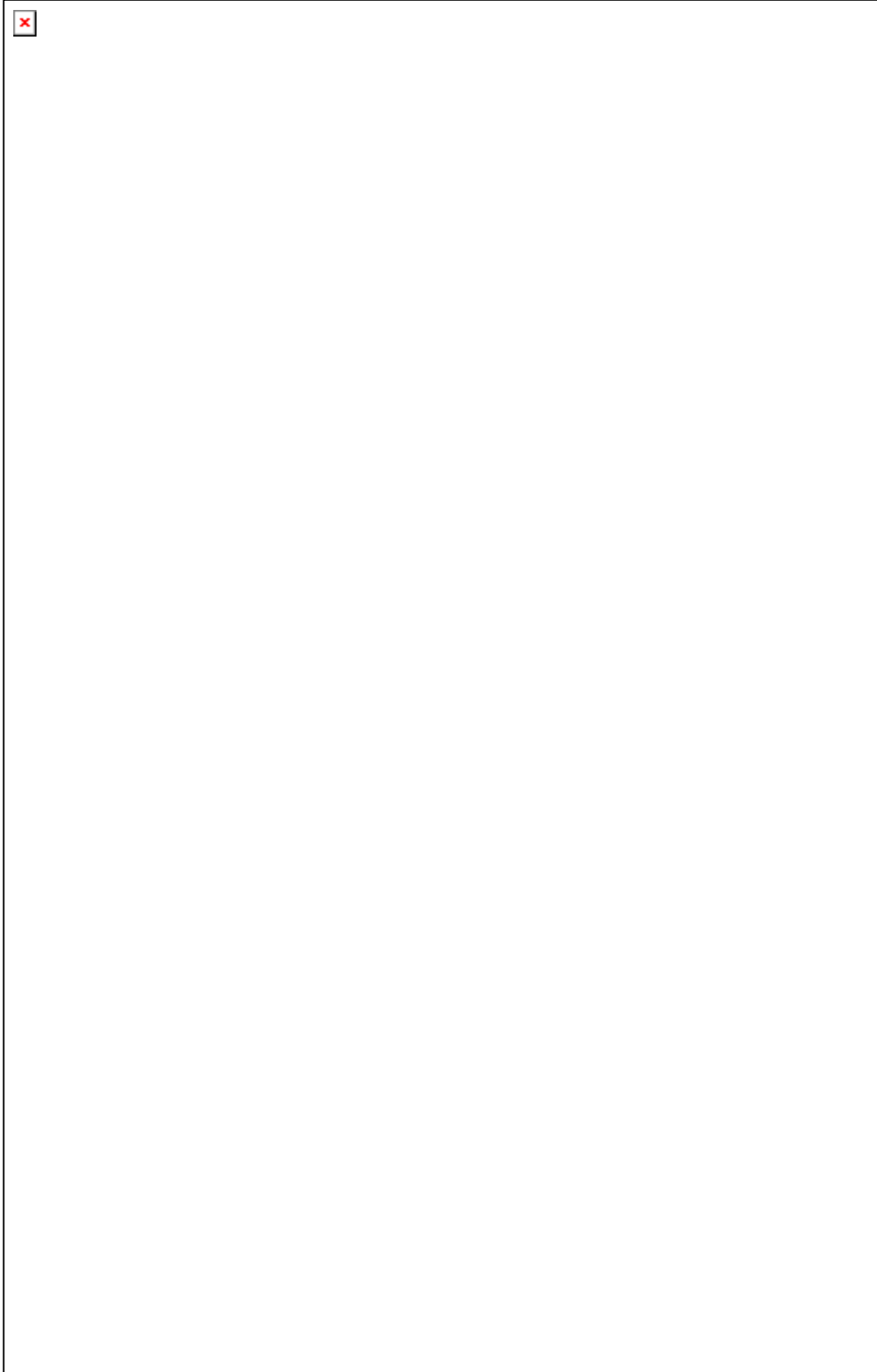
Şekil 1.6. *Laurus nobilis* (defne) uçucu yağının V79 379A hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



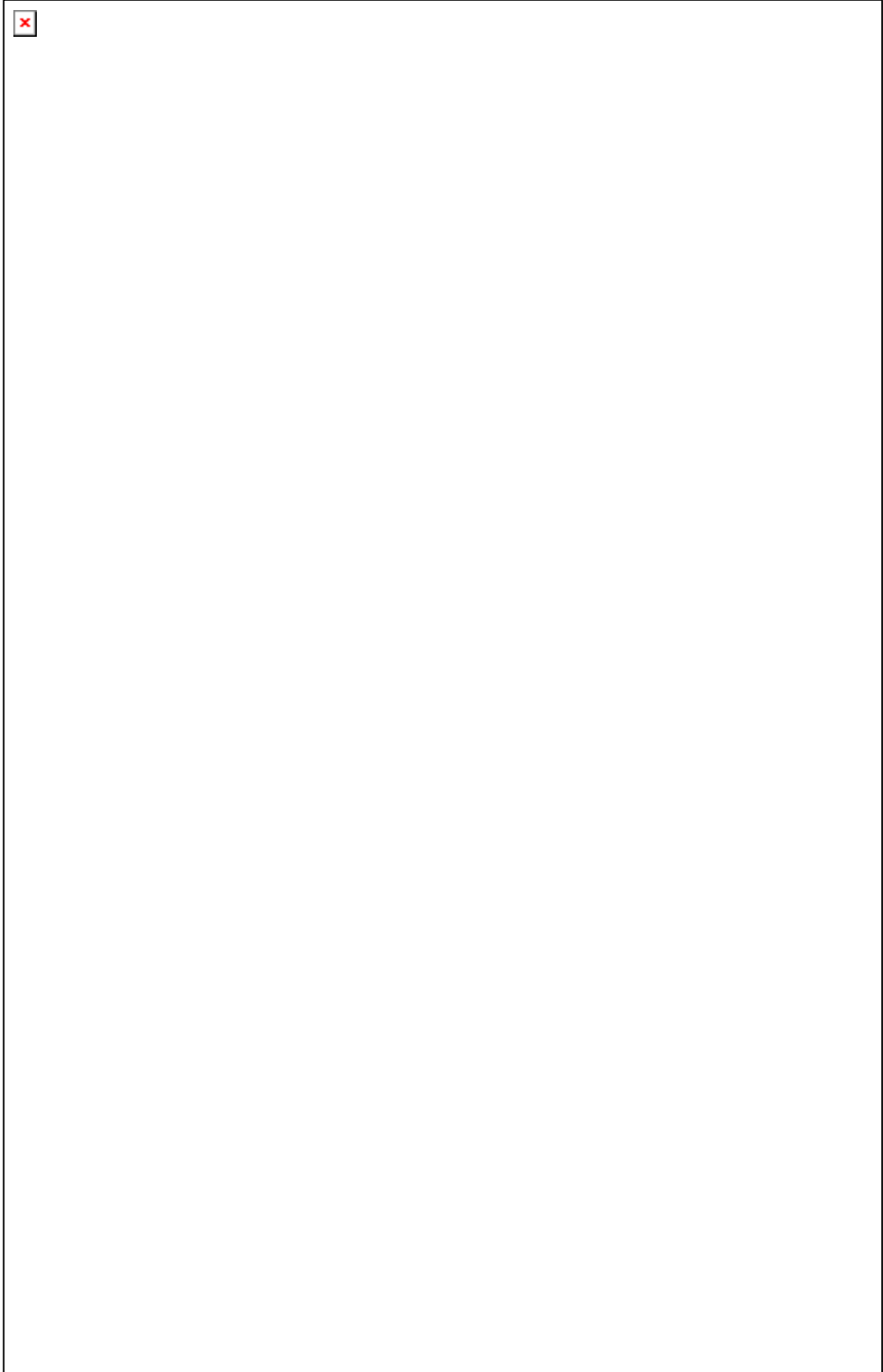
Şekil 1.7. Timol'un A549 hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi
(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



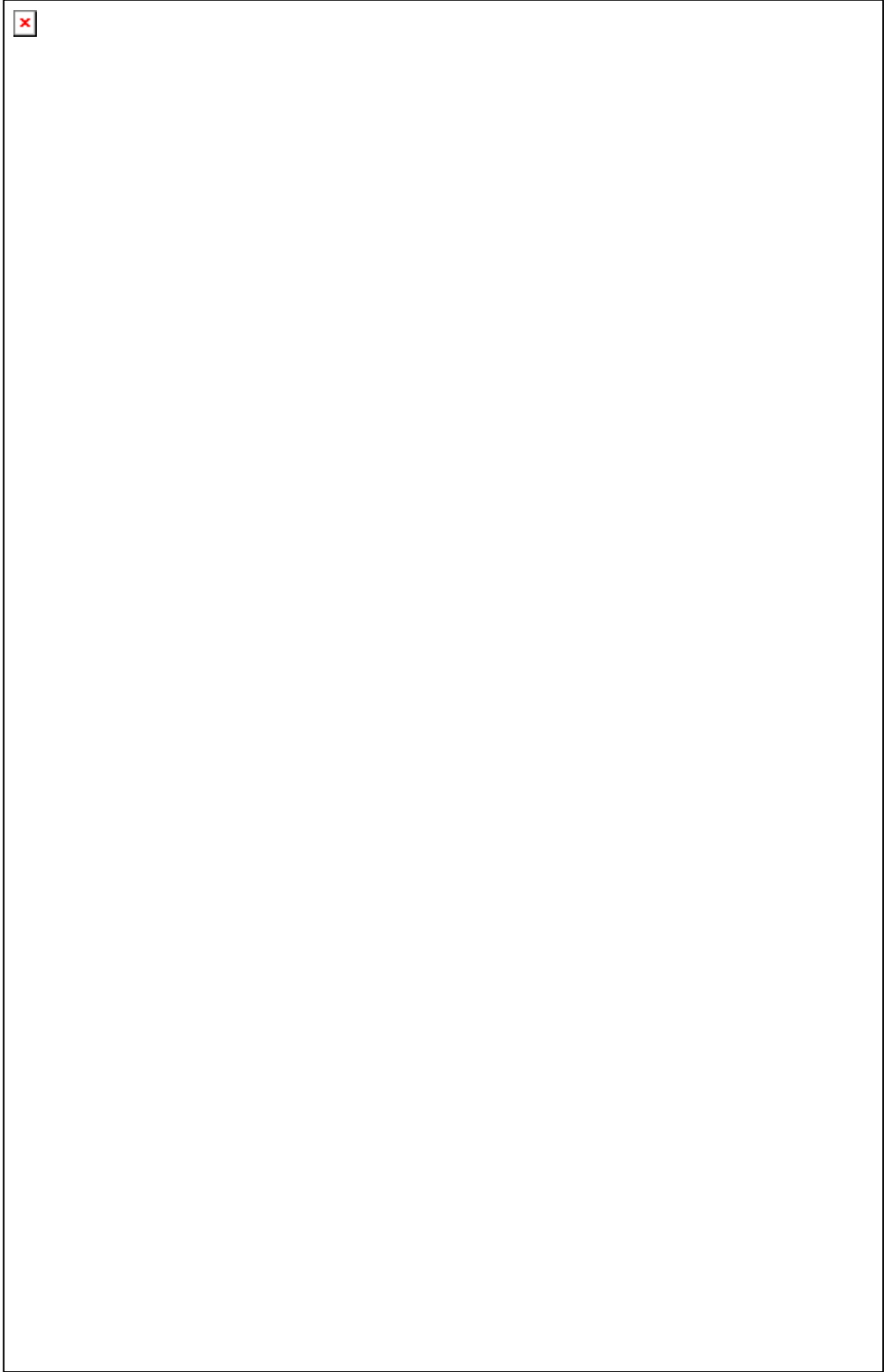
Şekil 1.8. Timol'un V79 379A hücreleri üzerine etkisinin BrdU testi ile değerlendirilmesi
(*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



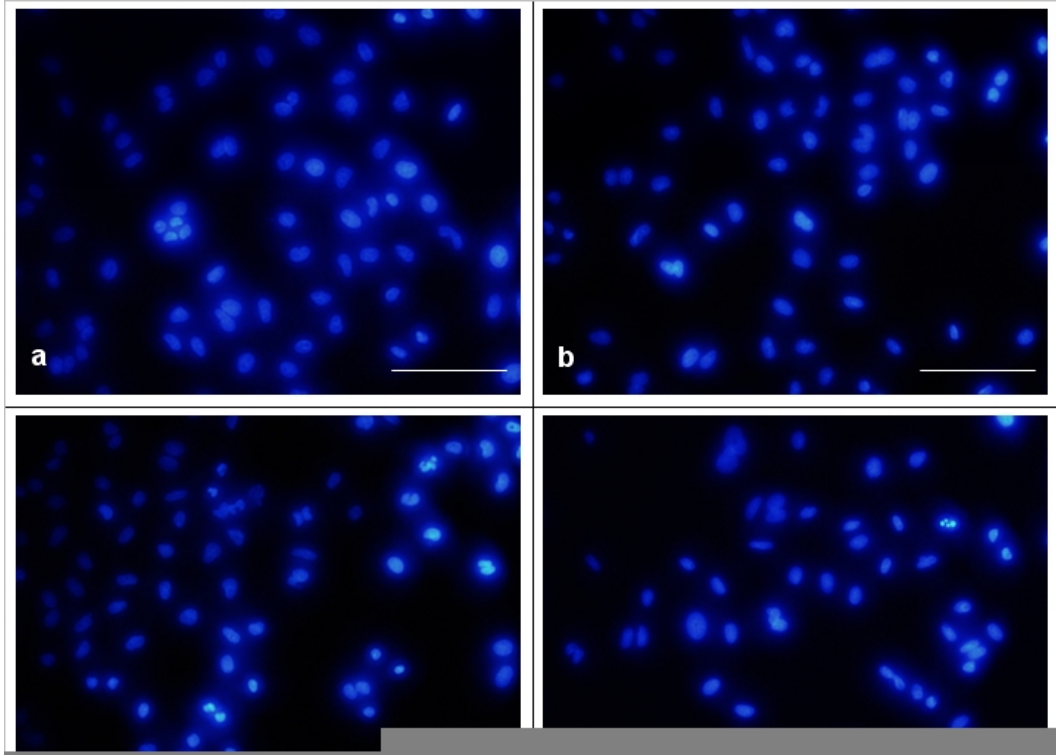
Şekil 2.1. Kekiğin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi. a:Kontrol, b:Etanol, c:0,8 µg/ml, d:2 µg/ml, e: 10 µg/ml, f:50 µg/ml, g:100 µg/ml. Ölçü birimi 125 µm.



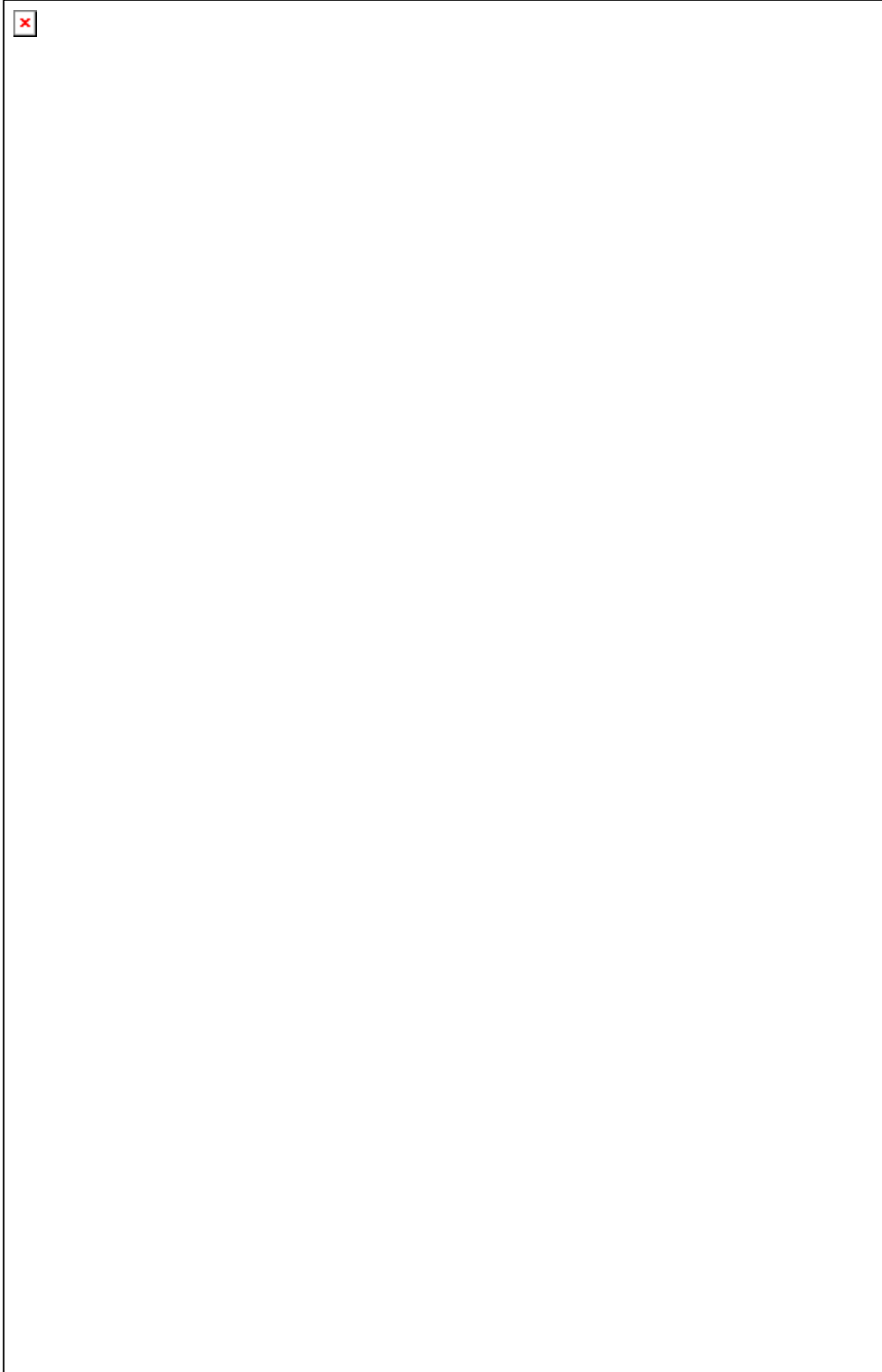
Şekil 2.2. Adaçayının A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi. a:Kontrol, b:Etanol, c:12,5 µg/ml, d:25 µg/ml, e: 50 µg/ml, f:100 µg/ml, g:200 µg/ml. Ölçü birimi 125 µm.



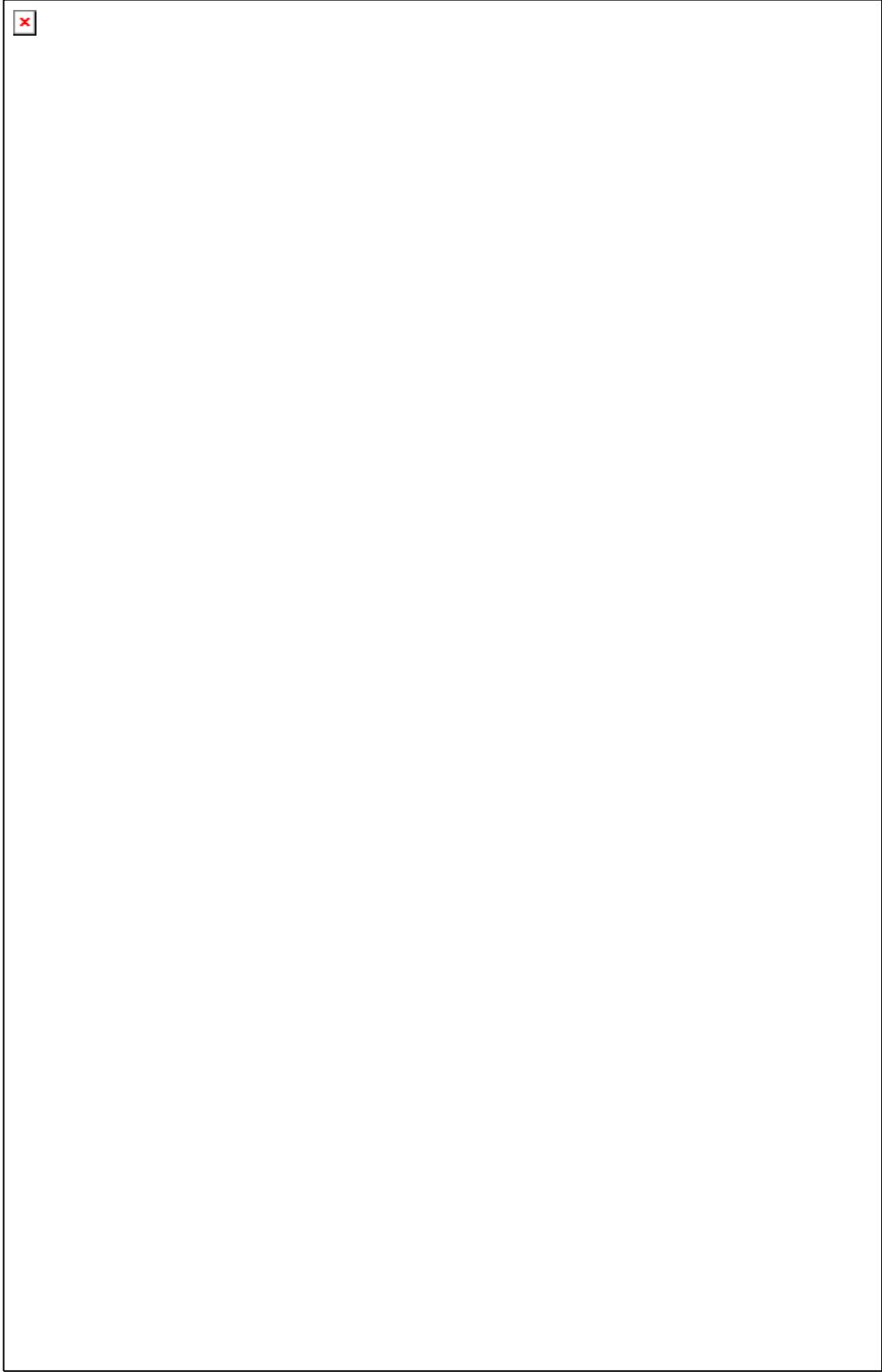
Şekil 2.3. Defnenin A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi. a:Kontrol, b:Etanol, c:100 µg/ml, d:200 µg/ml, e: 400 µg/ml, f:800 µg/ml, g:1000 µg/ml. Ölçü birimi 125 µm.



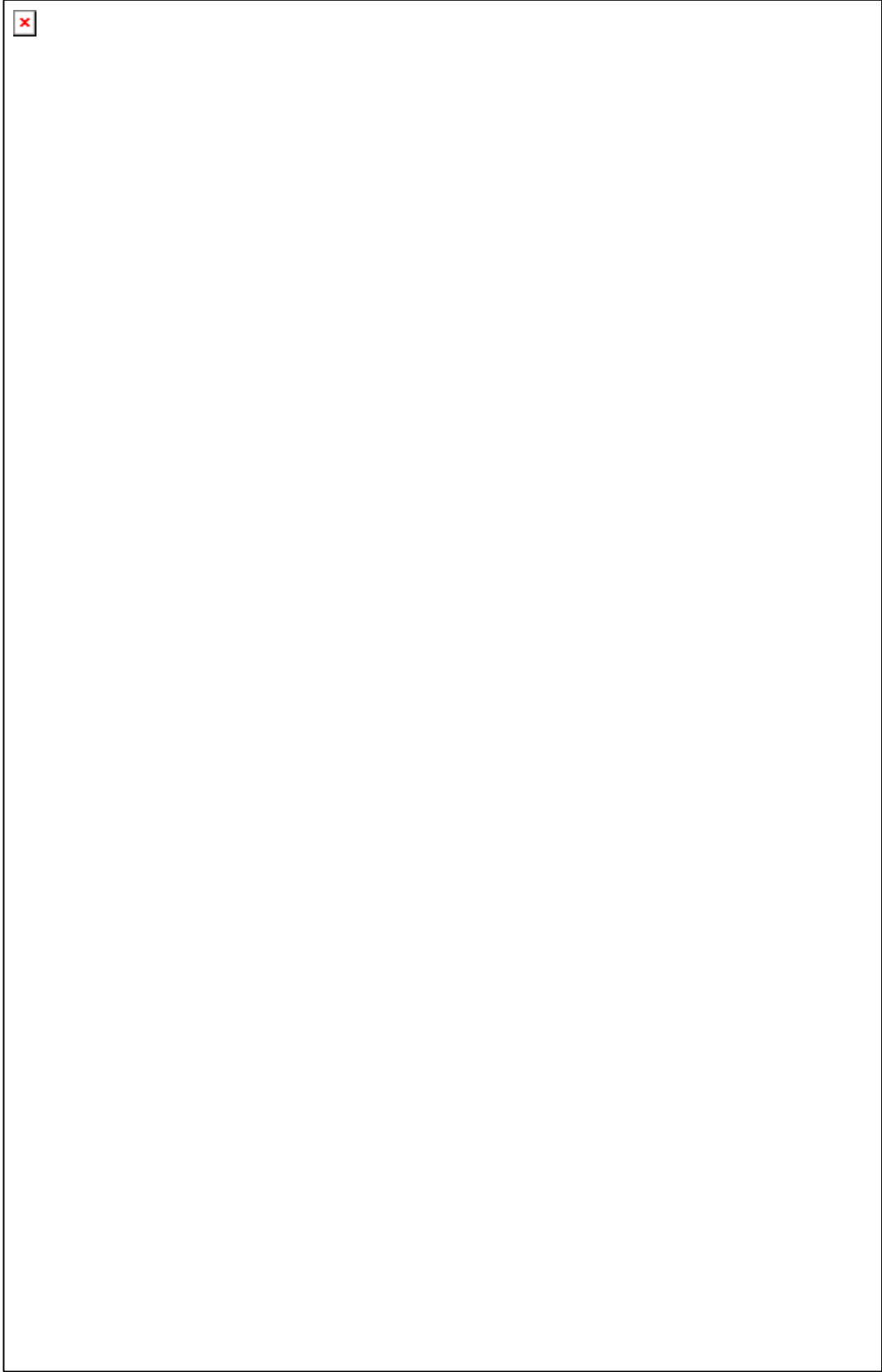
Şekil 2.4. Timolün A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi. a:Kontrol, b:DMSO, c:50 µg/ml, d:100 µg/ml, e: 200 µg/ml, f:400 µg/ml, g:1000 µg/ml. Ölçü birimi 125 µm.



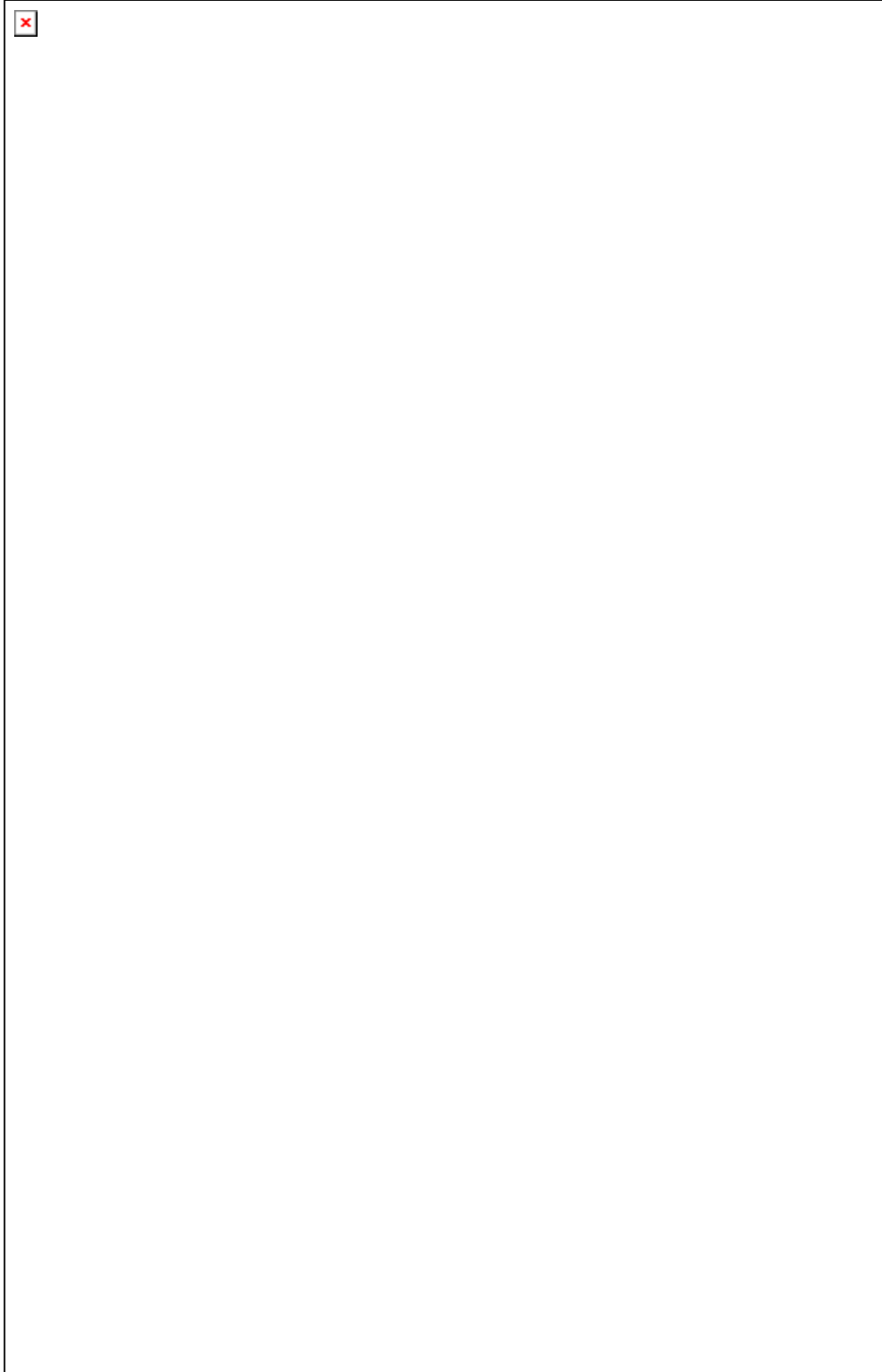
Şekil 2.5. Kekiğin CHL hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi. a:Kontrol, b:Etanol, c:0,4 µg/ml, d:2 µg/ml, e: 10 µg/ml, f:50 µg/ml, g:100 µg/ml. Ölçü birimi 125 µm.



Şekil 2.6. Adaçayının CHL hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi. a:Kontrol, b:Etanol, c:12,5 µg/ml, d:25 µg/ml, e: 50 µg/ml, f:100 µg/ml, g:200 µg/ml. Ölçü birimi 125 µm.



Şekil 2.7. Defnenin CHL hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi. a:Kontrol, b:Etanol, c:5 µg/ml, d:100 µg/ml, e: 200 µg/ml, f:400 µg/ml, g:800 µg/ml. Ölçü birimi 125 µm.



Şekil 2.8. Timolün CHL hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin DAPI boyama ile değerlendirilmesi. a:Kontrol, b:DMSO, c:50 µg/ml, d:100 µg/ml, e: 200 µg/ml, f:400 µg/ml, g:800 µg/ml. Ölçü birimi 125 µm.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Modern çağın insanları artan bir sıklıkta kanserle ve kanser yüzünden ölümlerle karşılaşmaktadır. İstatistikler erkeklerde; akciğer, bağırsak, rektum ve prostat kanserinin, kadınlarda göğüs, bağırsak, rektum ve mide kanserinin sık görüldüğünü rapor etmektedir (Abdulla ve Gruber, 2000). Yapılan çalışmalar birçok doğal ürünün, dünya çapında görülen kanserlere karşı kimyasal koruyucu ajanlar olduğunu göstermiştir. Bu ürünlerin en temel grubu güçlü antioksidanlar, diğerleri doğal olarak bulunan fenolik bileşenler ve kalanları da koruyucu özellikleri olan reaktif gruplardır Bu doğal ürünler; sebzelerde, meyvelerde, bitki ekstralarında ve otlarda bulunmaktadır (Reddy ve ark., 2003).

Son yıllarda, bitkiler ve hayvanlardan elde edilen bileşiklere karşı tıp alanında ilaç olarak kullanılması olasılığı yüzünden artan bir ilgi vardır. Bitki ve hayvanlardan elde edilen doğal ürünlerin avantajları çok fazladır. Farmasötik ve kozmetik açılardan, elde edilen bileşikler büyük bir orana ve biyolojik etkilere sahiptir. Bu özellikler, yeni aktif moleküllerin ortaya çıkarılması ile, yapı-fonksiyon ilişkilerinin çalışılması sonucu yeni biyolojik mekanizmaların keşfedilmesiyle, daha aktif ve istenmeyen yan etkilere sahip olmayan ilaçların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Diğer avantaj ise bu bileşiklerin basit şekilde ekstraksiyonudur. Ayrıca doğal ürünler her yerde ve bol olarak bulunmaktadır. Yüksek kaliteyi düşük fiyata elde etme imkanı bulunmaktadır. Bu yüzden doğal ürünler yeni aktif bileşiklerin elde edilmesi için önemli araştırma kaynaklarıdır (Rancan ve ark., 2002).

Geçtiğimiz on yıl içinde kanser araştırmalarındaki ilerlemeler kanser biyolojisi ve genetiğini anlamamızı kolaylaştırmıştır. Bu çalışmaların içinde en önemlisi, apoptozisi kontrol eden genlerin malignansi üzerinde, apoptotik mekanizmanın bozulması nedeniyle tümör oluşumu, gelişimi ve metastaza yol açmasının saptanmış olmasıdır. Bu nedenle, doğal ürünler kullanılarak tümör baskılanması apoptozisin başlatılması yolu ile olabilir. Bu da doğal ürünlerle kanser tedavisi için genetik bir temel sağlamaktadır (Reddy ve ark., 2003).

Uçucu yağlar ve onların bileşenleri, bitkilerin ikincil metabolizmalarının ürünleridirler (Duşan, 2006).

Günümüzde halk arasında geniş bir kullanıma sahip olan kekiğin (*Origanum onites*) uçucu yağıyla yapılan bilimsel çalışmalar, bu bitkinin antiviral, antiparazitik ve antibakteriyel (Sivropoulou ve ark., 1996) antioksidan, antifungal, inseksidal etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Erdemgil, 1992). Çalışmamızda kekik uygulanan V79 379A ve A549 hücrelerinde kekiğin BrdU testi ile elde edilen sonuçlarında 50-100 µg/ml konsantrasyonlarındaki dozlarının çalıştığımız iki hücre tipinde de toksik etki gösterdiği saptanmıştır. Uygulanan tüm dozlarda sitotoksik etkinin elde edildiği ancak bu etkinin, A549 hücrelerine spesifik olmadığı görülmüştür. *Origanum onites* L. uçucu yağının içeriğinin detaylı olarak araştırıldığı çalışmalarda uçucu yağ içindeki ana bileşenlerin; karvakrol (%65.91), linalool (%14.84), timol (%3.64), olduğu belirlenmiştir (Erdemgil, 1992; Aydın ve ark., 2005; Skoula ve ark., 1999). Karvakrol ve timol gibi monoterpenik fenollerce zengin olan bu yağ çok güçlü mikrop öldürücü özelliğe sahip olduğundan bakteri ve mantar enfeksiyonlarında etkilidir. Doğal bir bileşik olan kekik uçucu yağının sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında, kekik uçucu yağının hücrelerin çoğalımı üzerinde inhibe edici etkisinin çok daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun nedeni kekik uçucu yağının, yüksek oranlarda karvakrol ve timol içermesi olabilir.

Salvia fruticosa (adaçayı) uçucu yağıyla yapılan çalışmalar bu bitkinin antibakteriyel, antifungal, antiviral, ve sitostatik özellik gösterdiğini ortaya koymuştur (Sivropoulou ve ark., 1997). Ayrıca Sivropoulou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Salvia fruticosa* uçucu yağının etanolde içinde çözülmüş çeşitli konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi tripan mavisi yöntemi kullanılarak Vero hücreleri üzerinde araştırılmıştır. *Salvia fruticosa* esansiyel yağının 1/500 oranındaki etanol dilüsyonlarının hücre canlılığını tamamen yok ettiği saptanmıştır (Sivropoulou ve ark., 1997). Bizim çalışmamızda *Salvia fruticosa*'nın etanol içinde çözülmüş belirlenen konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri, BrdU ve fluoresan boyama deneylerinde belirlenmiştir (Şekil 3).

BrdU ve fluoresan boyama deneylerinden elde edilen verilerde, adaçayının A549 hücrelerinde doza bağımlı ve etkili sitotoksik yanıtlar oluşturduğu, düşük konsantrasyonlu dozlarının sağlıklı hücrelerde çok düşük toksisite gösterdiği saptanmıştır. Sonuç olarak, bu bulgulara göre, adaçayının düşük konsantrasyonlu

dozlarının kanser tedavilerinde (A549) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde kullanılabilir olduğu söylenebilir. Elde ettiğimiz sonuçlar adaçayının *in vivo* deneysel modellerde denenebileceğini ve yararlı sonuçlar verebileceğini düşündürmektedir.

Laurus nobilis (defne) uçucu yağının sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan BrdU ve Floresan boyama testlerine göre, defnenin V79 379A hücrelerine daha sitotoksik etkili olduğu görülmüştür ().

Kekik A549 hücrelerinde BrdU Floresan boyama yöntemlerine göre değerlendirildiğinde sitotoksik etki göstermiştir.

Çalışmamızda kullandığımız ve sitotoksik etkisini araştırdığımız timol'un farklı konsantrasyonunda, farklı hücreler ile yapılmış pek çok araştırma bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlarda timol'un uygulanan tüm dozlarında A549 hücrelerinde, sitotoksik etki oluşturduğu saptanmıştır. V79 379A sağlıklı hücrelerine göre insan akciğer karsinomasından türeyen malignant bir hücre ırkı olan A549 hücrelerinde daha anlamlı sitotoksik etkiler elde edilmiştir. Timolun yüksek konsantrasyonlardaki dozları (400 ve 800 μ M) çalışmada kullanılan iki hücrede uygulanan BrdU ve floresan boyama test yöntemleri ile değerlendirildiğinde, popülasyondaki hücre canlılığını %30 ile %3 arasında değişen seviyeye kadar düşürdüğü ve bu dozların toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle hücre kültüründe sitotoksikite çalışmaları için daha düşük konsantrasyonlardaki dozların uygun olduğu belirlenmiştir.

Stammati ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (1999) timol'un toksik etkisi mikrobiyal ve memeli hücre kültürü yöntemleri ile araştırılmıştır. Hep-2 hücreleri kullanılarak timolun toksik etkisi Neutral Red (NR) , koloni formasyonu ve toplam protein içeriği yöntemleri ile değerlendirilmiş ve timolun doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. NR deneyi ile Hep-2 hücrelerinde timol'un IC50 değeri 710 μ M olarak bulunmuştur (Stammati ve ark., 1999). Bu değer bizim verilerimizle uyuşmamaktadır. Bunun nedeni farklı hücre tiplerinde bir maddenin etkisinin farklı olabileceğidir (Zeytinoğlu ve ark., 2003).

Sonuç olarak timol'un BrdU ve Floresan boyama yöntemleri ile elde edilen verileri iki hücre tipinde karşılaştırılmalı olarak değerlendirildiğinde, timol'un zamana ve doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Düşük konsantrasyonlardaki timol dozlarının sağlıklı hücrelerdeki sitotoksik etkisinin A549 hücrelerine göre çok az olduğu saptanmıştır. Bu nedenle timol antikanser ilaç çalışmalarında ümit verici bir madde olabilir.

DAPI kullanılarak yapılan boyamalarda test maddelerinin A549 ve V79 379A hücreleri üzerinde preapoptotik etkiler meydana getirdiği saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdulla, M., Greber, P., (2000), *Role of diet modification in cancer prevention*, Biofactors, **12**, 45-51.
- Akgül, A. and Kıvanç, M., (1988), *Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi*, International Journal of Food Microbiology, **6**, 263-268.
- Akgül, A., Kıvanç, M., Sert, S., (1991), *Effects of carvacrol on growth and toxin production by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus*, Sciences des Aliments, **11**, 361-370.
- Alam, K., Nagi, M.N., Badary, O.A., Al-Shabanah, O.A., Al-Rikabi, AC. and Al-Bekairi A.M., (1999), *The protective action of thymol against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice*, Pharma. Research, **40**, (2)
- Alışkan, Mahmut (2000), *Apoptosis: Programlanmış hücre ölümleri*. Mustafa Kemal üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 31040, Hatay-TÜRKİYE, Turk J Zool 24 Ek Sayı, 31-35 © Tübitak.
- Anonim, (2007) Dapi Staining
<http://www.celldeath.de/apometh/dapi.html> (01-07-2007, 19:15)
- Aydın, S., Basaran, A., Basaran N., (2005), *The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by heterocyclic amine iq and mitomycin c*, Mutation Research, **581**, 43-53.
- Azzoua, M.A., and Bullerman, L.B., (1982), *Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents*, Journal of Food Protection, **45**, 1298-1301.
- Bertram, J.S., (2001), *The molecular biology of cancer*, Molecular Aspects of Medicine, **21**, 167-223.
- Bishop, C.D., (1995), *Antiviral activity of the essential oil of melaleuca +alternifolia (Maiden and Betche) Cheel (Tea Tree) against tobacco mosaic virus*, Journal of Essential Oil Research, **7**, 641-644.
- Bruton C. J., (1988), *The Neuropathology of Temporal Lob Epilepsy*. Oxford University Pres.
- Burt, S., (2004), *Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods- a review.*, Int. J. of Food Microbiol., **94**, 223-253.

- Chen, Q., Peng, W., Xu, A. (2002), *Apoptosis of a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, PLA-801, induced by acutiaporberine, a novel bisalkaloid derived from Thalictrum acutifolium (Hand.-Mazz.) Boivin*, Biochemical Pharmacology, **63**, 1389-1396.
- Cooper, G.M., The Cell A Molecular Approach, (1997), pp:51, 592, 593, 607, Oxford University Pres.
- Deans, S.G., and Ritchie, G., (1987), *Antibacterial properties of plant essential*
- Dušan, F., Marián, S., Katarina, D., Dobroslava, B., (2006), *Essential oils-their antimicrobial activity against Escherichia coli and effect on intestinal cell viability*, Toxicology in Dušan,Vitro, **20**, 1435-1445.
- Elegbede, J. A., Flores, R. and Wang, R.C., (2003), *Perilly alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in Broto and A549 Cells Cultured In Vitro*, Life Sciences, **73**, 2831-2840.
- Erdemgil, Z., (1992), *Origanum onites L. uçucu yağının bileşimi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniv.,Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Farhat, G.N., Affara, N.I. And Gali-Muhtasib, H.U., (2001), *Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of East Mediterranean sage (Salvia libanotica) and its toxicity in mice*, Toxicon, **39**, 1601-1605.
- Gali-Muhtasib, H.U., Hilan, C., Khater, C., (2000), *Traditional uses of Salvia libanotica (East Mediterranean sage) and the effects of its essential oils*, Journal of Enhnopharmacology, **71** (3), 513-520.
- Gomes-Carneiro, M.R., Felzenszwalb, I., Paumgarten, F.J.R., (1998), *Mutagenicity testing of (±)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay*, Mutation Research, **416**, 129-136.
- Guenther, E., (1948), *The Essential oils*, D. Van Nostrand, New York, USA.
- Hefnawy, Y., Moustafa, S., Marth, E., (1993), *Sensitivity of listeria monocytogenes to selected spices*, J. Food Protection, **56** (10), 876-878.
- Hickmann; J.A., (1992), *Apoptosis induced by anticancer drugs*. Cancer Metastasis Rev, **11**, 121-139.

- Hierro, I., Valero, A., Perez, P., Gonzalez, P., Cabo, M.M., Montilla, M.P. and Navarro, M.C., (2004), *Action of different monoterpenic compounds against Anisakis simplex s.l. L3 larvae*, *Phytomedicine*, **11**, 77-82.
- Holdenrieder, S., Stieber, P., (2004), *Apoptotic markers in cancer*, *Clinical Biochemistry*, **37**: 605-617.
- Huan-Huan, C., Li-Li, Y., Shang-Bin, Li, (2004), *Artesunate reduces chicken choriocarcinoma membrane neovascularisation and exhibits antiangiogenic and apoptotic activity on human microvascular dermal endothelial cell*, *Cancer Letters*, **211**, 163-173.
- Huerta, S., Goulet, E.J., Huerta-Yepez, S., Livingston, E.H., (2007), *Screening and detection of apoptosis*, *Journal of Surgical Research*, **139**: 143-156.
- Hücre Kültürü Yöntemleri Ve Çeşitli Hücre Serilerinde Sarımsak Bileşenlerinin Etkileri*
www.medicine.ankara.edu.tr/temel_tip/biyokimya/files/Hucre%20kulturu.doc
 (28-06-2007 08:00)
- Jayashree, T. And Subramanyam, C.,(1999), *Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation*, *Letters in Applied Microbiology*, **28**, 179-183.
- Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, B.V. (1994), *Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy*, *Cancer*, **73**, 2013-2016.
- Kıvçak, B. ve Mert, T., (2002), Short report, *Preliminary evaluation of cytotoxic properties of Laurus nobilis leaf extracts*, *Fitoterapia*, **73**, 242-243.
- Korkmaz, Ceren Gönen Yard.Doç.Dr., (2007) *Kanser Ve Kanser Kemoterapisi* 4.Yıl/2.Dönem. http://pharm.ege.edu.tr/pp/cerenkorkmaz/kanser_1.pdf
 (30-06-2007 22:25)
- Loza-Tavera, H., (1999), *Monoterpenes in essential oils: biosynthesis and properties*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **464**, 49-62.
- Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., Los, M., (2007), *Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy*, *Drug Resistance Updates*, **10**, 13-29.

- Magyar, J. Szentandrassy, N. Bányász, T. Fülöp, L. Varró, A., and Nánási, P.P., (2004), *Effects of terpenoid derivatives on calcium current in canine and human ventricular Cardiomyocytes* European J. of Pharma., **487**, 29-36.
- Mahmoud, S.S. and Croteau, R.B., (2002), *Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants*, Trends in Plant Science, **7**, 366-373.
- Manou, L, Bouillard, L., Devleeschouwer, M.J., Barel, A.O., (1998), *Evaluation of the preservative properties of Thymus vulgaris essential oil in topically applied formulations under a challenge test*, J. Appl. Microbiol., **84**, 368-376.
- Mourey, A. and Canillac, N., (2002), *Anti-Listeria monocytogenesis activity of essential oils components of conifers*, Food Control, **13**, 289-292.
- Mühbauer, R.C., Lozano, A., Palacio, S., Reinli, A., Felix, R., (2003), *Common herbs, essential oils, and monoterpenes potentially modulate bone metabolism.*, Bone **32**, 372-380,
- Öztürk, Prof.Dr. Mehmet, Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü
<http://www.genetikbilimi.com/genbilim/kotuhabergenlerde.htm>
(28-06-2007 08:00)
- Pandey, R., Karla, A., Tandon, S., Mehrota, N., Singh, H.N. and Kumar, S., (2000), *Essential oil compounds as potent of nematicidal compounds*, J. of Phytopathology, **148**, 501-502.
- Perry, N., Bollen, C., Perry, E. and Ballard, C., (2003), *Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial*, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, **75**, 651-659.
- Pessoa, L.M., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L. and Luciano, J.H.S.,(2002), *Anthelmintic activity of essential oil of Ocimum gratissimum Linn. And eugenol against Haemonchus*, Veterinary Parasitology, **109**, 59-63.
- Rancan, F., Rosan, S., Boehm, K., Fernandez, E., Hidalgo, M.E., Quihot, W., Rubio, C., Boehm, F., Piazena, H., Oltmanns, U., (2002), *Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **68**, 133-139.
- Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K.D., (2003), *Natural products for cancer prevention: a global perspective*, Pharmacology & Therapeutics, **99**, 1-13.

- Reed, J.C., (1999), *Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer*, Curr Opin Oncol, **11**: 68-75.
- Roche Applied Science (2003), Biochemical Catalog, 415.
- Sahraei, H., Ghoshooni, H., Salimi, S.H., Astani, A. M., Shafaghi, B., Falahi, M., Kamalnegad, M., (2002), *The effects of fruit essential oil of the Pimpinella anisum on acquisition and expression of morphine induced conditioned place preference in mice*, Journal of Ethnopharmacology, **80**, 43-47.
- Sanchez, M.E., Turina, A.V., Danial, A.G., Nolan, M.V., Perillo, M.A., (2004), *Surface activity of thymol: implication for an eventual pharmacological activity*, Colloids and Surfaces B., **34**, 77-86.
- Sayyah, M., Valizadeh, J. And Kamalinejad, M., (2002), *Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of Laurus nobilis against pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced seizures*, Phytomedicine, **9**, 212-216.
- Senderowicz, A.M., (2004), *Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies*, Curr Opin Cell Biol, **16**, 670-678.
- Simic, M., Kundakovic, T. and Kovacevic, N., (2003), Preliminary assay on the antioxidative activity of Laurus nobilis extracts, short report, Fitoterapia, **74**, 613-616.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M., (1996), Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. J. Agric. Food Chem. **44** (5), 1202-1205.
- Stammati, A., Bonsi P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alokomi, H.-L., Wright, A., (1999), Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assay ., Food and Chemical Toxicology , **37**, 813-8231.
- Szentandrassy, N., Szentesi, P., Magyar, J., Nanasi, P.P and Csernoch, L., (2003), Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle, BMC Pharmacol., **3**, 9.
- Ulukaya, Dr. Engin Apoptozis Ders Notları, (2003). Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa.
http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf (30-06-2007 22:25)
- Ultee, A., Smid, E.J., (2001), Influence of carvacrol on growth and toxin production by Bacillus cereus, Inter. J. of Food Microbiol. **64**, 373-378.

- Van De Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J., (1999), *Essential oils and oleoresins: A survey in the Netherlands and other major markets in the European Union*, CBI, Center for The Promotion of Imports From Developing Countries, Rotterdam, 116.
- Wilma C. Hazeleger, Marinka Dalvoorde, Rijkelt R. Beumer (2006), *Fluorescence microscopy of NaCl-stressed, elongated Salmonella and Listeria cells reveals the presence of septa in filaments*, Laboratory of Food Microbiology, Wageningen University, P.O. Box 8129, 6700 EV Wageningen, The Netherlands, 288
- Zeytinoğlu, M., Aydın, S., Oztürk, Y., Baser, K.H.C., (1998), *Inhibitors effects of carvacrol on DMBA induced pulmononary tumorigenesis in rats*, *Acta Pharmaceutica Turcica*, (2) 93-98.