

**GÜMÜŞ NİTRAT, TİTANYUM OKSİT VE
DEMİRLİ BİLEŞİKLER İLE NANOPARTİKÜL
FORMLARININ KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
APOPTOTİK, NEKROTİK VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

Ayşe KAPLAN
Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Şubat, 2015

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1305F088**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayşe Kaplan'ın "Gümüş Nitrat, Titanyum Oksit ve Demirli Bileşikler ile Nanopartikül Formlarının Kansere Hücreleri Üzerindeki Apoptotik, Nekrotik ve Biyokimyasal Etkileri" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 15.01.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. H. MEHTAP KUTLU
Üye	: Doç. Dr. ADNAN AYHANCI
Üye	: Doç. Dr. HARUN BÖCÜK
Üye	: Doç. Dr. İLHAMİ ÇELİK
Üye	: Yard. Doç. Dr. HALİL BERBER

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

GÜMÜŞ NİTRAT, TİTANYUM OKSİT VE DEMİRLİ BİLEŞİKLER İLE NANOPARTİKÜL FORMLARININ KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK, NEKROTİK VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ

Ayşe KAPLAN

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

2015, 151 sayfa

Metal bileşikler ve metal nanopartiküller kanser tedavisinde büyük öneme sahiptir. Sisplatin en başarılı antikanser metal bileşiklerinden birisidir. Ancak onun yan etkilerinden dolayı farklı metal bileşiklere yönelme olmuştur. Bu tezde gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir oksit nanotozlarının A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik, antiproliferatif etkileri ve bunlardan sorumlu genlerle hücre ölümü mekanizmalarının (apoptoz, nekroz, otofaji gibi) aydınlatılması hedeflendi.

Sitotoksisite, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) analizi ile belirlendi. Flow analizlerinden Anneksin V-FITC /PI (Propidyum iyodid) boyama ile erken/geç apoptotik-nekrotik hücre sayısı belirlendi. Kaspaz-3 ve mitokondriyal membran potansiyeli (JC-1) analizi ile apoptotik etki saptandı. Hematoksilen/eozin, TUNEL (Terminal deoksinukleotidil transferaz deoksiüridin trifosfatbiyotin işaretleme), BrdU (Bromodeoksiüridin), Bcl-2 ve Bax boyama ile hücrelerdeki apoptotik miktar skorlandı. Hücre ölüm yolları, geçirimli elektron ve konfokal mikroskobu ile morfolojik olarak gösterildi. Mikroarray analizi ile hücre ölüm yollarında (apoptoz vb) görevli genlerin aktivite miktarı, ekspresyon artış ve azalışları belirlendi.

AgNO₃, TiO₂ ve Fe₃O₄ nanotozları, potansiyel sitotoksik ve apoptotik ajanlardır ve alternatif kanser kemoterapötikleri olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: A549, AgNO₃, TiO₂, Magnetik Fe₃O₄ nanotozu, Apoptoz, Mikroarray.

ABSTRACT

PhD Dissertation

BIOCHEMICAL, APOPTOTIC, NECROTIC EFFECTS OF NANOPARTICLES FORMS WITH FERROUS COMPOUNDS, SILVER NITRATE AND TITANIUM DIOXIDE ON CANCER CELLS

Ayşe KAPLAN

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Biology Program

Supervisor: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

2015, 151 pages

Metal compounds and metal nanoparticles has great importance at cancer treatment. Cisplatin is one of the most successful anticancer metal compounds. But researchers have focused on different metal compounds because of side effects. In this thesis, it was aimed to clarify cytotoxic, antiproliferative effects of silver nitrate, titanium dioxide and iron oxide nanopowders and the genes responsible for cell death mechanisms (such as apoptosis, necrosis, autophagy) on A549 cell lines.

Cytotoxicity was determined by MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay. Early/late apoptotic-necrotic cell numbers were detected with Annexin V-FITC/PI (Propidium iodid) staining by flow cytometry. Apoptotic effects were determined together with caspase-3 and mitochondrial membrane potential (JC-1) assay. The amount of apoptotic cells were scored by hematoxylin/eosine, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), BrdU (Bromodeoxyuridine), Bcl-2 and Bax staining. Cell death pathways were morphologically shown by transmission electron and confocal microscopy. The genes responsible for cell death pathways (apoptosis etc.) were detected by determining amount of activity and increased-reduced expression with microarray assay.

AgNO₃, TiO₂ and Fe₃O₄ nanopowders are potent cytotoxic and apoptotic agents and may be used as alternative cancer chemotherapeutics.

Keywords: A549, AgNO₃, TiO₂, Magnetic Fe₃O₄ nanopowder, Apoptosis, Microarray.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma, Anadolu Üniversitesi Fen Fakóltesi oğretim üyesi Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU danışmanlığında yürütölmüş ve sonuçlanmıştır. Başta danışman hocam Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU'ya ve ortak danışman hocam Yard. Doç. Dr. Gülřen AKALIN ÇİFTÇİ'ye çok teşekkür ederim.

Çalışmamın hücre költürü deneysel aşamalarını, Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AÜBİBAM) bünyesinde gerçekleştirmemi sağlayan müdürümüz hocam Prof. Dr. Lütfi GENÇ'e ve Biyolog şennur GÖRGÜLÜ KAHYAOğLU'na ve TEM'de yardımcı olan Biyolog Arzu FERAHBOD İşCAN'a ve tüm AÜBİBAM çalışanlarına teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, bütün eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, bütün sıkıntılı anlarımda yalnız bırakmayan ve beni ayakta tutan sevgili annem Aysel KAPLAN'a, babam Veli KAPLAN'a ve abim Avni Murat KAPLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayşe KAPLAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser gelişimi.....	2
1.1.1. Akciğer kanseri	3
1.2. Kanser tedavisinde ölüm mekanizmaları.....	4
1.3. Apoptoz.....	4
1.3.1. Apoptoz ve nekroz morfolojisi.....	6
1.3.2. Apoptozda biyokimyasal değişiklikler.....	7
1.3.3. Apoptozun moleküler mekanizması.....	8
1.3.3.1. Dış ölüm reseptörü yolu	8
1.3.3.2. İç mitokondriyal yolu.....	9
1.3.3.3. İç endoplazmik retikulum yolu	11
1.3.4. Apoptoz ve kanser.....	11
1.3.4.1. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması	12
1.3.4.2. Azalan kaspaz aktivitesi.....	15
1.3.4.3. Bozulmuş ölüm reseptörü sinyali.....	16
1.3.5. Kanser kemoterapisinde apoptoz hedeflenmesi.....	17
1.4. Kanserde mikroarray sistemler.....	18
1.5. Kanser kemoterapi stratejileri	19
1.6. Antikanser metal bileşikler.....	21
1.6.1. Platin temelli antikanser metal bileşikler.....	22

1.6.1.1. Sisplatin	22
1.6.2. Platin olmayan antikanser metal bileşikler	23
1.6.2.1. Gümüş nitrat	23
1.6.2.2. Titanyum dioksit	24
1.7. Kanser hedefli nanoboyutlu dağıtıcı sistemler	24
1.7.1. Antikanser metal nanopartiküller	25
1.7.1.1. Magnetit demir (II, III) oksit nanotozu	25
1.8. Sitotoksosite analizleri.....	26
1.8.1. MTT analizi.....	26
1.9. Apoptotik analizler	27
1.9.1. Flow sitometrik (Akış Sitometrik) analizler.....	27
1.9.1.1. Anneksin V-FITC/PI analizi	27
1.9.1.2. Kaspaz analizi	27
1.9.1.3. Mitokondriyal membran potansiyeli analizi.....	28
1.9.2. İmmünohistokimyasal analizler	28
1.9.2.1. Hematoksilen/Eozin parafin gömme ile boyama	29
1.9.2.2. TUNEL parafin gömme ile boyama	29
1.9.2.3. BrdU parafin gömme ile boyama	29
1.9.2.4. Bcl-2 parafin gömme ile boyama	30
1.9.2.5. Bax parafin gömme ile boyama	30
1.9.3. Mikroskopik analizler.....	30
1.9.3.1. Konfokal mikroskopu.....	30
1.9.3.2. Geçirimli elektron mikroskopu (TEM).....	31
1.9.4. Gen profileme analizleri.....	31
1.9.4.1. Mikroarray analizi	32

2. MATERYAL VE YÖNTEM	34
2.1. Kimyasallar	34
2.2. Kullanılan araç ve gereçler	36
2.3. Hücre kültür modeli	37
2.4. MTT canlılık belirleme	37
2.5. Anneksin V-FITC/ PI işaretleme.....	38
2.6. Kaspaz- 3 işaretleme	38
2.7. Mitokondriyal membran potansiyeli (JC-1 boyama)	39
2.8. İmmünohistokimyasal işlemler	39
2.8.1. Doku tespiti	39
2.8.2. Doku gömme (Bloklaşma)	39
2.8.3. Doku kesimi (mikrotom cihazı)	40
2.8.4. Doku takibi (yarı kapalı – tam kapalı doku takip cihazı).....	40
2.9. Hematoksilin/Eozin işaretleme	40
2.9.1. Deparaffinize işlem	40
2.9.2. Hidratasyon.....	40
2.9.3. Boyama tekniği (Biopsi).....	40
2.9.4. Dehidratasyon	41
2.9.5. Monte etme (kapama işlemi)	41
2.10. TUNEL parafin gömme	41
2.10.1. Deparaffinize işlem	41
2.10.2. Hidratasyon	41
2.10.3. Boyama tekniği (Biopsi)	41
2.11. BrdU işaretleme	42
2.11.1. Deparaffinize işlem	42
2.11.2. Hidratasyon	42
2.11.3. Boyama tekniği (Biopsi)	42
2.11.4. Dehidratasyon	43
2.11.5. Monte etme (kapama işlemi)	43
2.12. Bcl-2 işaretleme	43
2.12.1. Deparaffinize işlem	43

2.12.2. Hidratasyon	43
2.12.3. Boyama tekniği (Biopsi)	43
2.13. Bax işaretleme.....	44
2.13.1. Deparaffinize işlem.....	44
2.13.2. Hidratasyon	44
2.13.3. Boyama tekniği (Biopsi)	44
2.14. Konfokal mikroskobi analizi.....	45
2.15. Geçirimli elektron mikroskobi analizi	45
2.16. Gen ekspresyonu analizi (cDNA mikroarray)	46
2.16.1. RNA izolasyonu	46
2.15.1.1.Yüksek saflıkta	
RNA izolasyon kiti	46
2.15.1.2. Prosedür	46
2.16.2. cDNA sentezi	47
2.16.3. Saflaştırma (cRNA elde edilmesi)	48
2.16.4. Array alışması (Hibridizasyon)	48
2.16.5. Bloklama (Boyama ve yıkama).....	51
2.17. İstatistiksel analiz.....	52
3. BULGULAR	53
3.1. MTT sonuçları	53
3.1.1. Pozitif kontrol sisplatinin sitotoksik etkisi.....	53
3.1.2. Gümüş nitratın (AgNO ₃) sitotoksik etkisi	56
3.1.3. Titanyum dioksitin (TiO ₂) sitotoksik etkisi.....	59
3.1.4. Demir (II, III) oksit (Fe ₃ O ₄) nanotozunun	
sitotoksik etkisi	62
3.2. Erken/geç apoptotik ve nekrotik etki	66
3.3. Kaspaz-3 aktivitesi	68
3.4. Mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi.....	69
3.5. Hematoksilen/Eozin işaretleme ve apoptotik etki	71
3.6. TUNEL parafin gömme ve apoptotik etki.....	74
3.7. BrdU işaretleme ve apoptotik etki.....	77

3.8. Bcl-2 işaretleme ve apoptotik etki.....	80
3.9. Bax işaretleme ve apoptotik etki	83
3.10. Konfokal mikroskobu ile morfoloji	86
3.11. Geçirimli elektron mikroskobu ile morfoloji.....	89
3.12. Tüm genom gen ekspresyonunun doğrudan analizi	
(Mikroarray analizi)	90
3.12.1. Örnek kodlaması	90
3.12.2. Verilerin kalite kontrolü.....	90
3.12.3. Cluster (Kümeleme) analizleri	92
3.12.4. İstatistiksel analizler.....	94
3.12.5. Sisplatinin kontrole göre değerlendirilmesi	95
3.12.6. Gümüş nitratin ($AgNO_3$) kontrole göre değerlendirilmesi.....	99
3.12.7. Titanyum dioksitin (TiO_2) kontrole göre değerlendirilmesi.....	103
3.12.8. Demir (II, III) oksit nanotozunun kontrole göre değerlendirilmesi.....	106
3.12.9. Gümüş nitratin ($AgNO_3$) sisplatine göre değerlendirilmesi.....	111
3.12.10. Titanyum dioksitin (TiO_2) sisplatine göre değerlendirilmesi	112
3.12.11. Demir (II, III) oksit nanotozunun sisplatine göre değerlendirilmesi	114
3.12.12. Titanyum dioksitin (TiO_2) gümüş nitrata ($AgNO_3$) göre değerlendirilmesi.....	115
3.12.13. Demir (II, III) oksit nanotozunun gümüş nitrata ($AgNO_3$) göre değerlendirilmesi	117

3.12.14. Demir (II, III) oksit nanotozunun titanyum dioksite (TiO ₂) göre değerlendirilmesi	118
4.TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	120
KAYNAKLAR	133

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Kanser gelişim şeması.....	3
1.2. Hücre ölümü mekanizmaları.....	5
1.3. Apoptoz ve nekroz morfolojisi.....	7
1.4. Apoptotik dış ölüm reseptör yolunda protein ve ligandların etki mekanizmaları.....	9
1.5. Apoptotik dış ve iç mitokondriyal yolda etkili mekanizmalar.....	10
1.6. Apoptozun düzenlenmesinde JNK ve ROS faktörü.....	11
1.7. Apoptoza ve kanser oluşumuna etkili mekanizmalar.....	12
1.8. Apoptozun düzenlenmesinde ölüm kaspazlarının (kaspaz 8 gibi) ve IAP'ların etkileri.....	13
1.9. Apoptoz mekanizmasında p53, NFkB ve PI3K yollarının ubikitin/proteozom sistem ile düzenlenmesi.....	15
1.10. Apoptoz mekanizmasında kaspazların etki mekanizmaları.....	16
2.1. DNA ve RNA saflık konsantrasyonunu ölçen nanodrop cihazı.....	47
2.2. Array için çipe aktarılacak örnek sayısı.....	49
2.3. Çip platformu.....	49
2.4. Array çipi.....	50
2.5. Yıkama küveti.....	50
2.6. Su banyosu.....	50
2.7. Shaker (karıştırıcı).....	51
2.8. iScan (Görüntüleme) cihazı.....	51

2.9. Illumina Scan Control Software programı kullanılarak eksprese genlerin belirlenmesi	52
3.1. Pozitif kontrol sisplatinin 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	53
3.2. Pozitif kontrol sisplatinin 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	54
3.3. Pozitif kontrol sisplatinin 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	54
3.4. Pozitif kontrol sisplatinin 24, 48 ve 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	55
3.5. Gümüş nitratın (AgNO_3) 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	56
3.6. Gümüş nitratın (AgNO_3) 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	57
3.7. Gümüş nitratın (AgNO_3) 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	57
3.8. Gümüş nitratın (AgNO_3) 24, 48 ve 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	58
3.9. Titanyum dioksitin (TiO_2) 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	59

3.10. Titanyum dioksitin (TiO_2) 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	60
3.11. Titanyum dioksitin (TiO_2) 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	60
3.12. Titanyum dioksitin (TiO_2) 24, 48 ve 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	61
3.13. Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	62
3.14. Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	63
3.15. Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	63
3.16. Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları 24, 48 ve 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	64
3.17. Erken/geç apoptotik ve nekrotik etki için A549 hücrelerinin 72 saat sonunda Anneksin V- FITC ve PI (Propidyum iyodid) boyaması	66

3.18. Kaspaz-3 aktivitesi için A549 hücrelerinin 72 saat sonunda işaretlenmesi.....	68
3.19. Mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi için A549 hücrelerinin 72 saat sonunda JC-1 boyaması	69
3.20. Hematoksilen/Eozin işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi	71
3.21. TUNEL parafin gömme boyama ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi	74
3.22. BrdU işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi	77
3.23. Bcl-2 işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi	80
3.24. Bax işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi	83
3.25. A549 hücrelerinin tedavi edilmesi sonucu Anneksin FITC (kırmızı boya) ve akridin oranj (yeşil boya) kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi	86
3.26. A549 hücrelerinin tedavi edilmesi sonucu geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi	89
3.27. Profil plot (Tek tek problu gösterim) gösterimi	91
3.28. Box plot (Kutu grafiği) gösterimi	92
3.29. Gruplar baz alınarak yapılan cluster analizi	93

3.30. Örnekler baz alınarak yapılan cluster analizi (probu gösterim).....	94
3.31. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla sisplatinin etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası.....	95
3.32. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla sisplatinin etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası.....	98
3.33. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla gümüş nitratın (AgNO_3) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası.....	100
3.34. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla gümüş nitratın (AgNO_3) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası.....	102
3.35. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla titanyum dioksitin(TiO_2) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası	104
3.36. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla titanyum dioksitin (TiO_2) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası	105
3.37. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun (Fe_3O_4) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası	107
3.38. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun (Fe_3O_4) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası.....	108

3.39. A549 hücrelerinde sisplatinin etkisine kıyasla gümüş nitratın (AgNO_3) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası	111
3.40. A549 hücrelerinde sisplatinin etkisine kıyasla gümüş nitratın (AgNO_3) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası	112
3.41. A549 hücrelerinde sisplatinin etkisine kıyasla titanyum dioksitin (TiO_2) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası	113
3.42. A549 hücrelerinde sisplatinin etkisine kıyasla titanyum dioksitin (TiO_2) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası	113
3.43. A549 hücrelerinde sisplatinin etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası	114
3.44. A549 hücrelerinde sisplatinin etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası	115
3.45. A549 hücrelerinde gümüş nitratın (AgNO_3) etkisine kıyasla titanyum dioksitin (TiO_2) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası	116
3.46. A549 hücrelerinde gümüş nitratın (AgNO_3) etkisine kıyasla titanyum dioksitin (TiO_2) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası	116

3.47. A549 hücrelerinde gümüş nitratın (AgNO_3) etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası.....	117
3.48. A549 hücrelerinde gümüş nitratın (AgNO_3) etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası.....	118
3.49. A549 hücrelerinde titanyum dioksitin (TiO_2) etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası.....	119
3.50. A549 hücrelerinde titanyum dioksitin (TiO_2) etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası.....	119

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Kullanılan kimyasallar listesi	34
2.2. Kullanılan teçhizat listesi	36
3.1. Pozitif kontrol sisplatinin MTT analizi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonundaki canlılık yüzdeleri	55
3.2. Gümüş nitratın MTT analizi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonundaki canlılık yüzdeleri	58
3.3. Titanyum dioksitin, MTT analizi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonundaki canlılık yüzdeleri	61
3.4. Demir (II, III) oksit nanotozunun, MTT analizi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonundaki canlılık yüzdeleri	64
3.5. MTT analizleri sonucu 24, 48 ve 72 saat sonundaki IC ₅₀ ve IC ₃₀ değerleri	65
3.6. Anneksin V-FITC ve PI boyaması sonucu A549 hücrelerinde % canlılık	67
3.7. Kaspaz-3 aktivitesi sonucu A549 hücrelerinde % canlılık	69
3.8. JC-1 boyaması sonucu A549 hücrelerinde % canlılık	70
3.9. Hematoksilen/Eozin işaretleme sonucu apoptotik değerlendirme	73
3.10. TUNEL parafin gömme sonucu apoptotik değerlendirme	76
3.11. BrdU İşaretleme sonucu apoptotik değerlendirme	79
3.12. Bcl-2 işaretleme sonucu apoptotik değerlendirme	82

3.13. Bax işaretleme sonucu apoptotik değerlendirme	85
3.14. Kontrole göre sispaltinin etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemler	96
3.15. Kontrole göre sispaltinin etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler	98
3.16. Kontrole göre gümüş nitratın etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemler	100
3.17. Kontrole göre gümüş nitratın etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler	102
3.18. Kontrole göre titanyum dioksitin etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemler	104
3.19. Kontrole göre titanyum dioksitin etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler	105
3.20. Kontrole göre demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemler	107
3.21. Kontrole göre demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler	108

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A549	: Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
FBS	: Fetal bovin serum
PBS	: Fosfat buffer solüsyon
MTT	: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
IC₅₀	: %50 inhibe eden konsantrasyon
IC₃₀	: %30 inhibe eden konsantrasyon
TUNEL	: (dUTP)-biotin nick end-labeling
BrdU	: Bromodeoksiüridin (5-bromo-2'-deoksiüridin)
SPSS	: Statistics Program for Social and Science

1. GİRİŞ

Kanser teşhis ve tedavisinde günümüze kadar önemli gelişmeler olmasına rağmen, kanser en yaygın ölüm nedenlerinin ikinci sırasında yer almaktadır (Laine ve Passirani, 2012). Kanser tedavisinde çeşitli stratejiler geliştirilmiş olmasına rağmen, hala cevaplanacak sorular bulunmaktadır (Zhang ve ark., 2009). Kanser, Amerika'da ve dünyada da en büyük sağlık problemlerinden biridir. Avrupa da dört insandan biri kanserden ölmektedir ve 1.529.560 yeni kanser vakasının 569.490'ı ölüm ile sonuçlandığı 2010 verilerinde belirlenmiştir (Xu ve ark., 2011).

Kanser tedavisinde ameliyat, radyasyon ve kemoterapi en çok kullanılan yöntemlerdir. Bu tedavilerin farklı kombinasyonları da kullanılmaktadır (Indran ve ark., 2011). Kemoterapi, apoptoz gibi hücre ölüm yollarını hedef alan temel kanser tedavi yollarından biridir (Tang ve ark., 2009). Programlı hücre ölümü apoptoz sayesinde, yetişkinde ortalama her gün yaklaşık olarak 50-70 milyar hücre ölmektedir. Hücre ölümü apoptoz, insanda deri, bağırsak ve kemik iliği gibi dokuların kendini yenilemesi için gerekli yeni hücrelerin üretimine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu doku homeostazisinin bozulması kansere neden olabilmektedir ve buna bağlı olarak apoptoz düzenlenmesinde rol oynayan genlerin mekanizması, kanser biliminin araştırma konusu olmuştur (Reed, 1999; Ghobrial ve ark., 2005). Çoğu kanser doku ve hücrelerinde apoptotik sinyal yollarında bozulmalar belirlenmiştir (Yang, 2005). Apoptozu anlamak, kanser hücrelerini öldürmede kullanılacak yeni kanser terapötiklerini belirleyebilmek için bilgi sağlamaktadır (Ghobrial ve ark., 2005).

Metal bileşiklerin özellikle geçiş metal bileşiklerin kanser tedavisinde büyük başarı gösterdiği önceki yıllara ve günümüze dayanan birçok çalışmada gösterilmiştir. Kanser ve lösemide metal ve metal içeren bileşiklerin terapötik (tedavi edici) kullanımı üzerine en erken veriler 16. yüzyıla dayanmaktadır (Desoize, 2004; Warra, 2011). Geçiş metallerin (Ti, V, Cr, Mo, Mn, Fe, Cu ve diğerleri) antitümör etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Warra, 2011).

Metal bileşik cisplatinin [cis-diamminedichloroplatinum(II)] 1965 yılında Rosenberg tarafından antiproliferatif etkisinin keşfi ve 1978 yılında FDA (U.S. Food and Drug Administration = Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu) tarafından

onaylanması ile kemoterapötik bir madde olarak çeşitli kanser türlerine (ovaryum, baş ve boyun, mesane, testiküler ve akciğer kanserleri) karşı yüksek etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Sisplatinin büyük başarısına rağmen, tıbbi kullanımında nörotoksisite, hepatotoksisite ve nefrotoksisite gibi toksik yan etkiler görülmüştür. Tüm bunların sonucu olarak sisplatin kadar etkili ancak yan etkisi az veya olmadığı düşünülen metal içerikli güçlü kemoterapötiklere ilgi artmıştır. Metal bileşiklerinin öneminin artması ile titanyum, gümüş gibi şimdiye kadar göz ardı edilmiş metal temelli ilaçların gelişimi önem kazanmıştır (Laine and Passirani, 2012).

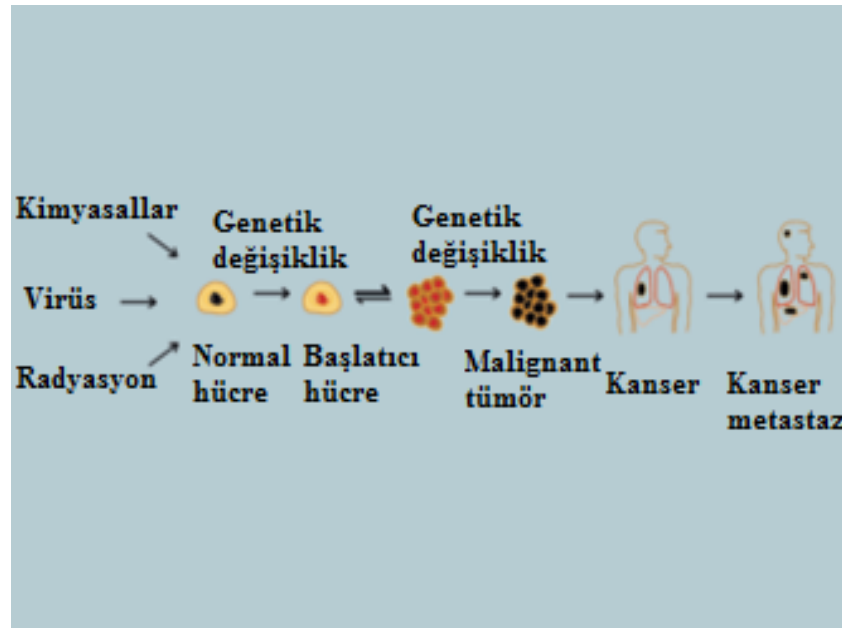
Kanser kemoterapisinde tedavinin etkisi sadece antikanser ilacın kendisine değil aynı zamanda ilacın hedeflenen bölgeye nasıl dağıtıldığına da bağlıdır. Nanopartiküller, kanser hücrelerinde ilaç dağıtım verimliliğini arttırmak için ilaç taşıma sistemleri olarak araştırılmıştır. Nanomateryallerin, antitümör ilaçlar ile kombinasyonu, normal dokulara karşı ilacın toksisitesini azaltırken, kanser hücrelerine karşı ilaç seçiciliğini arttırabilir ve ilaç direnç mekanizmasının üstesinden gelebilir (Zhang ve ark., 2011).

1.1. Kanser gelişimi

İnsan ve çok hücreli organizmalarda canlı dokular ve organların hacimleri vücudun boyutuna göre sabit ve orantılıdır. Organlarda dokuların organizasyonu ve dokulardaki hücrelerin farklılaşma karakteri de sabittir. Bu hacim, farklılaşma ve organizasyonların dengesi, normal fonksiyonların korunması için çok önemlidir. Ancak çok hücreli organizmada kontrollü hücre bölünmesinin mekanizması bazen düzenlenirken hata yapabilir. Bu durumda, doku ve organların organizasyon dengesi bozulmaktadır. Sonuç olarak çeşitli hastalıklar meydana gelmektedir. Örneğin kontrol edilemeyen hücre çoğalmaları sonucu tümör meydana gelmektedir (Blake ve ark., 1999).

Kanser, anormal gen ifadesinden kaynaklanan bir hastalıktır ve kanser hücreleri kalıcı, kalıtsal bir dizi değişiklik geçirmiş, tek bir ata hücreden gelişir (Şekil 1.1). Neoplastik dönüşüm olarak adlandırılan bu süreç bir dizi mekanizmanın (örneğin gen mutasyonları, translokasyonlar veya amplifikasyonlar ve delesyonlar gibi) DNA'ya doğrudan hasar vermesi ve anormal gen

transkripsiyonunu veya translasyonunu içermektedir (Blake ve ark., 1999) ve mutasyon aralığı bile histopatolojik olarak özdeş tümörler arasında farklılık gösterebilir (Cairns ve ark., 2011). Tümörler, iyi huylu veya yayılma eğilimine (metastaz) bağlı olarak kötü huylu olarak sınıflandırılabilir. Epitel yapılardan kaynaklanan kanserler karsinom olarak adlandırılır; bağ dokuları, kas, kıkırdak, yağ veya kemik kaynaklı olanlara sarkomlar denir; ve bağışıklık sistemi de dahil olmak üzere hemopoietik yapıları etkileyen habis tümörler, lösemiler ve lenfomalar olarak adlandırılmaktadır (Blake ve ark., 1999).



Şekil 1.1 Kanser gelişim şeması (Stewart ve Kleihues, 2003)

1.1.1. Akciğer kanseri

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarına kadar ender görülen bir hastalığı (Stewart ve Kleihues, 2003; Beadsmoore ve Screatton, 2003). Ancak şu anda akciğer kanseri dünya’da en yaygın olarak görülen ve ölüme neden olan kanserlerden biridir (Stewart ve Kleihues, 2003; Hou ve ark., 2014; Sihoe ve Yim, 2004; Beadsmoore ve Screatton, 2003) ve bu kanserden en fazla ölüm erkeklerde görülmektedir. Akciğer kanserinin gelişiminde en önemli faktör sigara kullanımınıdır. Hastaların asbest, arsenik, nikel, radyasyon ve artmış pulmoner fibrozise maruz kalması da riski arttırmaktadır.

Marchesani (1924) akciğer kanserini sınıflandıran ilk insanlardan biridir. Histolojik olarak alt sınıflara ayırmıştır (Beadsmoore ve Screaton, 2003). Birkaç tane histolojik şekli vardır. En yaygın olan pullu (squamous) hücre karsinoma, adenokarsinoma ve küçük hücreli karsinomadır. Akciğer kanseri neredeyse sadece karsinomları içerir. Bu tümörler trake, bronşlar veya akciğerlerin epitellerinden köken almaktadırlar. (Stewart ve Kleihues, 2003).

Adenokarsinomlar tüm akciğer kanseri hastalıklarının yaklaşık olarak % 31'ini içermektedir. Tüm akciğer kanserlerinin % 30 pullu hücre grubuna girmektedir. Küçük hücreli akciğer kanserleri de tüm akciğer kanserlerinin % 18'ini içermektedir. Büyük hücreli akciğer kanseri, tüm akciğer kanserlerinin % 9'unu kapsamaktadır (Beadsmoore ve Screaton, 2003).

1.2. Kanser tedavisinde ölüm mekanizmaları

Kanser tedavisinde, kanserli hücre ölümü mekanizmaları yapılan çalışmalarda yoğun ilgi görmektedir. Apoptoz en çok araştırılan hücre ölüm yollarından biridir. Mitotik katastrof, otofaji ve nekroz diğer ölüm tipleridir. Bu alternatif hücre ölüm tipleri apoptoza direnç gösteren hücrelerde alternatif mekanizmalar olabilir. Bu hücre ölüm yollarının mekanizmalarını anlamak tümör gelişim ve tedavisinde daha iyi değerlendirmeler yapmak açısından önemlidir (Bruin ve Medema, 2008).

1.3. Apoptoz

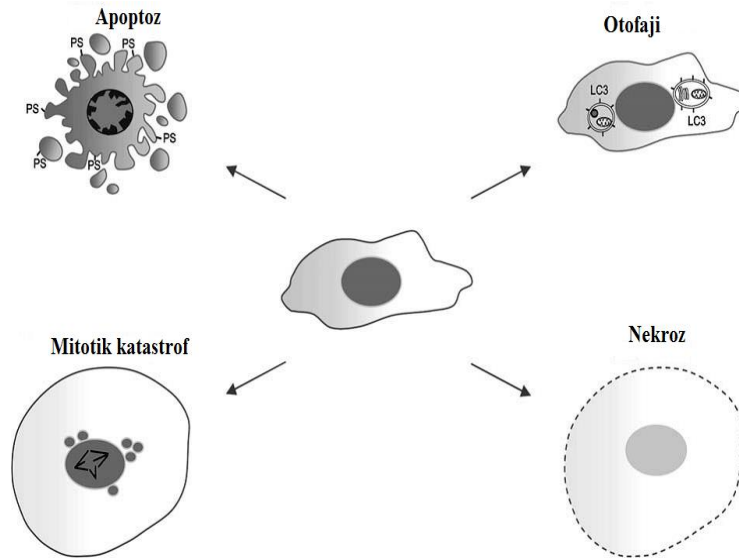
Apoptoz, çok hücreli organizmalarda hücre ölümlerinden biridir (Cotter, 2009). Apoptoz, normal dokularda anormal hücreleri eleyerek homeostatik dengeyi kurar. Normal hücrelerde apoptoz, fetüste doku ve organ gelişiminde, menstrual döngüde ve doğumdan sonra meme kanallarındaki gibi bazı fizyolojik koşullar altında tetiklenmektedir. Apoptotik hücre ölümü aynı zamanda viral enfeksiyon, DNA hasarı veya diğer genomik değişimler ve hücre immün cevaplarının düzenlenmesi ile de tetiklenmektedir (Yang, 2005).

Hücreler nekroz adı verilen hücre ölümü gibi alternatif mekanizmalar ile de yok edilebilir. Nekroz, hücreler ve dokular etrafında inflamatuvar hasarlara bağlı olarak plazma membranının bozulması sonucu meydana gelen hücre ölümüdür.

Buna karşın apoptoz, bir seri programlı işlevler geçirerek hücrenin dış yüzeyindeki sinyaller (fosfatidilserin) sayesinde fagositik hücreler tarafından yok edilebilmesine dayanan programlı hücre ölümüdür (Kasibhatla ve Tseng, 2003).

Otofaji hücre ölümü düzenlenmesi lizozomal proteazların bozulmasına bağlı olarak meydana gelmektedir. Hücre membran yapısında görülen kesecikler otofajinin tipik morfolojisini göstermektedir (Şekil 1.2). Otofaji tümör gelişiminin erken safhalarında bir tümör baskılayıcı rol göstermektedir. Otofaji, bozulmuş organeller tarafından ve hücresel stresi azaltarak normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesini engelleyebilmektedir (Bruin ve Medema, 2008).

Mitotik katastrof, anormal mitozun neden olduğu hücre ölümü olarak gösterilmektedir. Mitotik katastrof, kanser hücrelerinde hücre döngüsü kontrol noktalarında eksiklikler olması ile bağlantılı olarak belirlenmiştir. Mitotik katastrofun morfolojik özellikleri, genişlemiş ve çok çekirdekli hücrelerdir (Şekil 1.2). Mitotik defektler varlığında eksik nükleer yoğunlaşma, kromozom hizalama hataları, eşit olmayan DNA bölünmesi veya DNA hasarı varlığında mitoz oluşumu görülebilir (Bruin ve Medema, 2008).



Şekil 1.2. Hücre ölümü mekanizmaları (Bruin ve Medema, 2008)

Apoptoz, gelişim biyolojisinde ve doku homeostazisinde görevini, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol ederek sağlamaktadır. Apoptoz, “genetiksel olan programlı hücre ölümü” istenmeyen ya da hasarlı hücreleri gelişim sürecinde, DNA veya enfeksiyon hasarına bağlı olarak yok eder

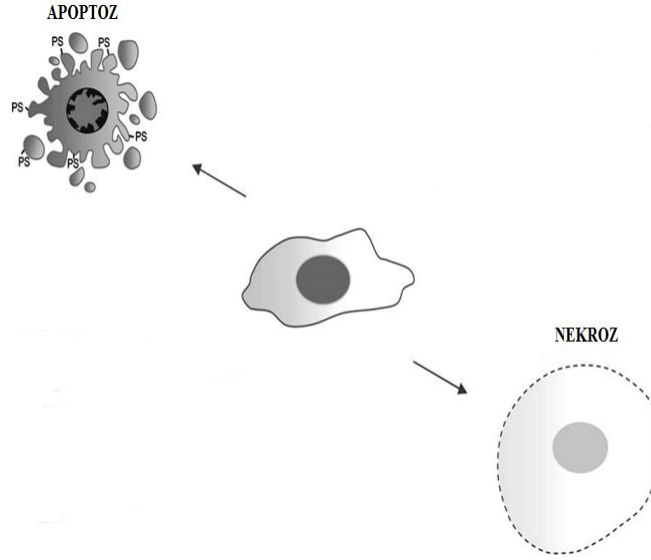
(Gopinath ve ark., 2010). Apoptotik yollardaki defektler ve bu yollarda meydana gelen mutasyonlar çok sayıda insan hastalığına neden olmaktadır (Lowe ve Lin, 2000). Apoptozun artması AIDS, diabet hastalıkları ve parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olurken, apoptozun azalması sonucu tümör gelişimi yani kanser meydana gelmektedir (Indran ve ark., 2011). Azalan apoptoz ya da apoptoza direnç kanser gelişiminde (karsinogenezis) önemli bir rol oynamaktadır (Wong, 2011).

Kanser, normal bir hücrede gerekli fonksiyonların yapıldığı sırada hücre ölümünden kaçınarak malignan bir hale dönüşen hücrede meydana gelen genetik değişikliklerin bir sonucu olarak görülebilmektedir. Hücre ölümlerinden özellikle apoptoz hücre biyologlarının en yaygın şekilde çalıştığı konulardan birisidir. Kerr ve arkadaşları (1970) potansiyel habis hücrelerinde hiperplazi görülmesinin ve tümör progresyonunun ortadan kaldırılmasının apoptoz ile bağlantılı olduğunu belirlemişlerdir. Kanserde hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki denge kaybolmaktadır. Hastalık durumunda apoptozu anlamak, patogenez esnasında belirlenen ipuçları açısından hastalığın nasıl tedavi edileceği konusunda bilgi vereceğinden önem kazanmaktadır (Wong, 2011). Bu nedenle, apoptozun moleküler mekanizmasının anlaşılması yeni ilaçlar ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için şarttır (Gopinath ve ark., 2010). Bu seçici özellik, normal hücrelere zarar vermeden kanserli hücreyi öldürmeyi hedeflemektedir (Kasibhatla ve Tseng, 2003).

1.3.1. Apoptoz ve nekroz morfolojisi

Apoptozun morfolojik görünümü, hücre haciminde azalma, membran bütünlüğünün korunması, pseudopodların geri çekilmesi ile çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve nükleer fragmentasyondur (Indran ve ark., 2011). Kromatin yoğunlaşması, nükleer membranın periferinde başlar ve hilale benzeyen halka şeklinde bir yapı oluşur. Kromatin, karyoheksis olarak görülen bir özellik olan bozulmamış membranlı bir hücrenin içerisinde dağılıncaya kadar yoğunlaşır. Plazma membranı tüm süreç boyunca bozulmaz. Apoptozun en son safhasında morfolojik özelliklerden bazıları, membran cepçığı, fosfatidilserinin (PS) hücre yüzeyine çıkması, sitoplazmik organellerin ultrastruktural değişimleri ve membran bütünlüğünün kaybıdır (Şekil 1.3) (Wong, 2011). Fosfatidilserin,

makrofajlara ‘beni ye’ sinyali vermektedir (Bruin ve Medema, 2008). Fagositik hücreler genelde apoptotik yapılar meydana gelmeden önce apoptotik hücreleri yutar (Wong, 2011).



Şekil 1.3. Apoptoz ve nekroz morfolojisi (Bruin ve Medema, 2008)

Nekrozun morfolojik görünümü hücre ve organelde şişme, bozulan plazma membranı, kromatin sindirimi, DNA hidrolizi ve son olarak hücre lizisi olarak bilinmektedir (Şekil 1.3). Hem nekroz hem de apoptoz dış uyaranların (Sitokinez, iskemi/reperfüzyon, ısı, radyasyon, patojenler gibi) yanı sıra iç uyaranlar tarafından da tetiklenebilmektedir. Her iki ölüm şekli de benzer sinyal yollarını (ölüm reseptörleri, kinaz kaskadlar ve mitokondriyal ve lizozomal geçirgenlik ve bu yolların düzenlenmesi gibi) aktive edebilirler (Gogvadze ve ark., 2009).

1.3.2. Apoptozda biyokimyasal değişiklikler

Apoptoz da üç tip biyokimyasal değişiklik görülür: 1) kaspaz aktivasyonu, 2) DNA ve protein kırılması ve 3) membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından düzenlenmesi. Erken apoptoz da hücre membranının dış katmanında fosfatidilserin ekspres edilir. Bu durum fagositozis sonucunda makrofajlar tarafından hücre ölümünün düzenlenmesine izin verir. Bunu takiben 50-300 kilobaz büyüklükte kırılmış DNA parçaları oluşur. Sonrasında endonükleazlar tarafından 180-200 baz çifti oligonükleozomlar içinde DNA internükleozomal

kırılmaları görülür. Apoptozun başka spesifik özelliği kaspaz olarak adlandırılan sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktive edilmesidir (Wong, 2011).

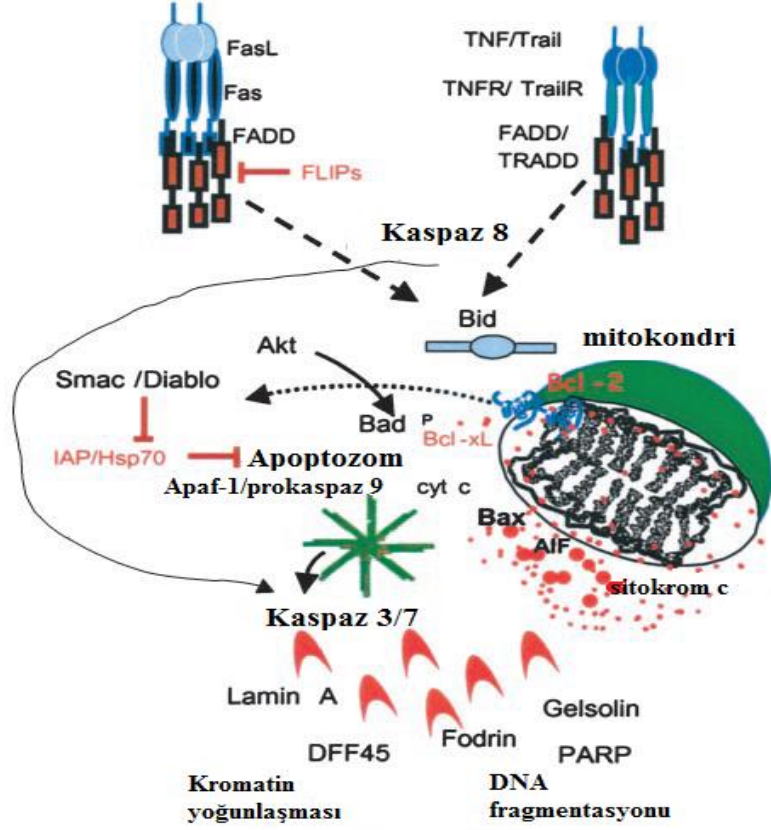
1.3.3. Apoptozun moleküler mekanizması

Kaspazlar, apoptoz mekanizmasının başlatıcı ve bitirici merkezleridir. Aktive edilebilen kaspazların üç yolu vardır. En yaygın bilinen iki başlatıcı yol iç mitokondriyal ve dış hücre ölüm reseptör yollarıdır (Fulda, 2009; Wong, 2011). Üçüncü en az bilinen başlangıç yolu iç endoplazmik retikulum yoludur (Wong, 2011).

1.3.3.1. Dış ölüm reseptörü yolu

Ölüm reseptörleri, hücre membranlarının yüzeyinde bulunur (Indran ve ark., 2011). Kaspaz aktivasyonunu sağlayan dış ölüm reseptörü, ligandına bağlanır ve bunu birkaç ölüm reseptörü ile gerçekleştirmektedir (Kasibhatla ve Tseng, 2003). Ölüm ligandları ölüm reseptörüne bağlanır. En iyi bilinen ölüm reseptörleri, TNF (Tümör nekrozu faktör) reseptörü (TNFR1) ve Fas (CD95) proteini ve onların ligandları TNF ve Fas ligand (FasL) dır. Ölüm reseptörleri, kaspaz 8 gibi sistein proteazların yanısıra TNF (TRADD: TNFR Adaptor Protein with Death Domain) iç hücresele ölüm domaini ve Fas (FADD: FAS Adaptor Protein with Death Domain) ölüm domainine sahiptir (Şekil 1.4).

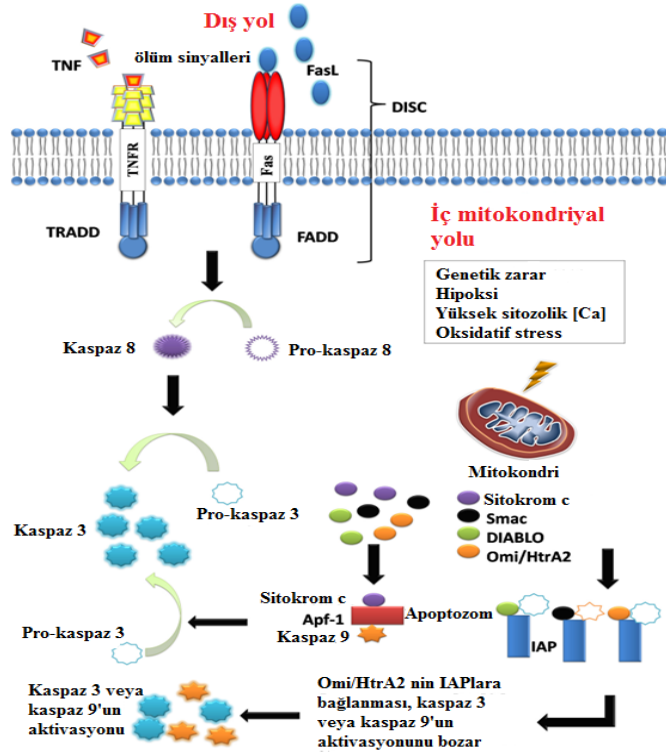
Ölüm ligandı ölüm reseptörüne adaptör protein içinde bağlanır. Bu üçlü komplekse ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (DISC) denir. DISC, pro-kaspaz 8'i aktive eder. Aktif kaspaz 8, diğer kaspazları kırarak apoptozu başlatır (Wong, 2011; Kasibhatla ve Tseng, 2003). Bu aktivasyon c-FLIP (hücresele FLICE inhibitör proteinler) tarafından kontrol edilir. Kısa ve uzun c-FLIP kaspaz aktivasyonunu engellemektedir. Aktif kaspaz 8, Bid proteinini aktif tBid formuna dönüştürür. Aktif tBid, Bax/Bak bağımlı geçirgenlik dış mitokondriyal membranı ve sitokrom c salınmasını tetikler (Burin ve Medema, 2008). Effektör kaspaz 3 aktive edilir (Şekil 1.4). Aktive edilen kaspazlar, mitokondriyal hasarı tetiklemektedir (Indran ve ark., 2011).



Şekil 1.4. Apoptotik dış ölüm reseptör yolunda protein ve ligandların etki mekanizmaları
(Kasibhatla ve Tseng, 2003)

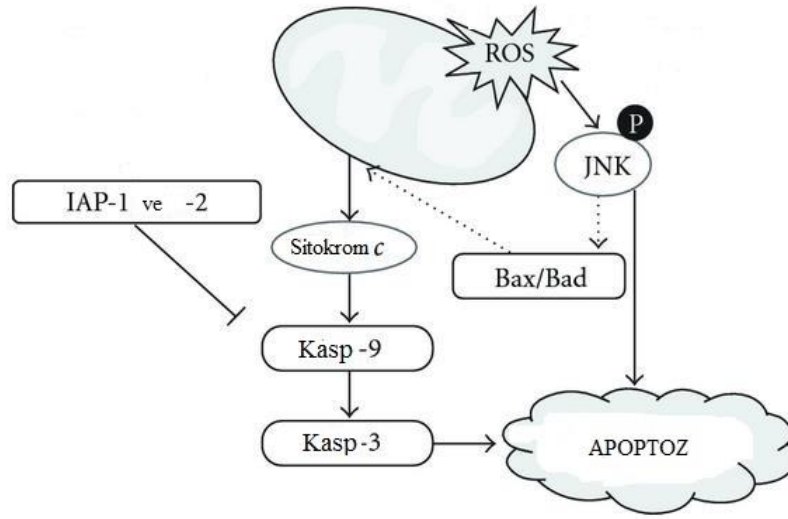
1.3.3.2. İç mitokondriyal yolu

Hücrenin içinde gerçekleşir. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, Ca^{+2} sitosolik aşırı yüksek konsantrasyonları ve birkaç oksidatif stres iç mitokondriyal yolun başlaması için bazı tetikleyicilerdir (Wong, 2011). Serbest radikaller, radyasyon ve viral enfeksiyonlar gibi reseptör bağımlı uyarılar, mitokondriyal yolu aktive edebilir (Indran ve ark., 2011). Bu yol mitokondri membran geçirgenliğinin artması ve sitokrom-c pro-apoptotik molekülünün sitoplazmaya salınması ile sonuçlanır. İç mitokondriyal yol Bcl-2 ailesine ait bir grup protein ile düzenlenmektedir. Bu proteinler, pro-apoptotik proteinler (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk gibi) ve anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1 gibi) olarak iki ana gruba ayrılır. Anti-apoptotik proteinler, sitokrom-c'yi bloke ederek apoptozu düzenlemektedir.



Şekil 1.5. Apoptotik dış ve iç mitokondriyal yolda etkili mekanizmalar (Wong, 2011)

Mitokondriyal iç membranından salınan diğer apoptotik faktörler apoptoz tetikleyici faktör (AIF), ikinci mitokondri kökenli kaspaz aktivatörü (Smac), doğrudan apoptoz inhibitör protein (IAP), bağlanma proteini (DIABLO) ve Omi/yüksek sıcaklık proteini A (HtrA2) dir. Apoptozom (sitokrom c + Apaf-1 + kaspaz 9) yapıdaki sitokrom c, kaspaz 3'ü aktive eder (Şekil 1.5). Diğer taraftan Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2, apoptoz protein inhibitörüne (IAPs) bağlanarak kaspaz aktivasyonunu düzenlemektedir (Şekil 1.5) (Bruin ve Medema, 2008; Wong, 2011). Sitokrom-c salınmasını düzenleyen proteinlerin her biri hücre içi sinyal yollarından JNK sinyal yolunu fosforile ederek apoptozu tetikler (Şekil 1.6). Bunun dışında Akt sinyal yolu fosforilasyonu da apoptozun transkripsiyonel düzenlenmesinde etkili olabilir (Kasibhatla ve Tseng, 2003) (Şekil 1.4). İç mitokondriyal yolda ROS (reaktif oksijen türleri) faktörü de çok önemlidir. ROS üretimi mitokondriyal apoptozu tetiklemektedir (Şekil 1.6). ROS, mitokondriyal elektron transport zincirinde yer alan protein komplekslerini düzenler, kaspazları aktive eder ve hücre ölümünü tetikler (Indran ve ark., 2011).



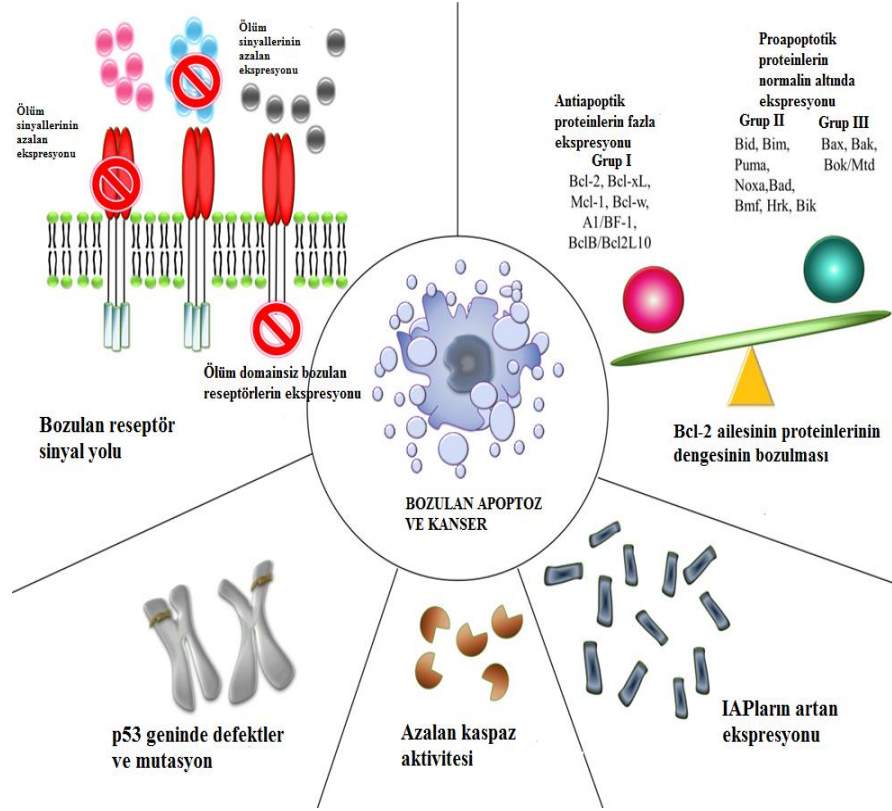
Şekil 1.6. Apoptozun düzenlenmesinde JNK ve ROS faktörü (Kim ve ark., 2011)

1.3.3.3. İç endoplazmik retikulum yolu

İç endoplazmik yol, mitokondriden bağımsızdır. Bu yol kaspaz 12 ile etkindir. Endoplazmik retikulum hipoksi, serbest radikaller veya glukoz açlığı gibi hücrel strese maruz kaldığında, hücrede protein sentezi azalır ve merdiven aktivasyonu sonucunda TNF (tümör nekroz faktör) reseptör faktörü 2 (TRAF2) pro-kaspaz 12'den ayırır (Wong, 2011).

1.3.4. Apoptoz ve kanser

Kanser hücresi, apoptoz azalması veya apoptoza direnç ile meydana gelebilmektedir. Tümör hücresinde apoptozda azalma veya apoptoza direnç geliştiren çok fazla yol vardır. Genelde apoptozdan kaçınma meydana getiren mekanizmalar: 1) pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması, 2) azalan kaspaz fonksiyonu ve 3) bozulmuş ölüm reseptörü sinyali (Şekil 1.7) (Wong, 2011).

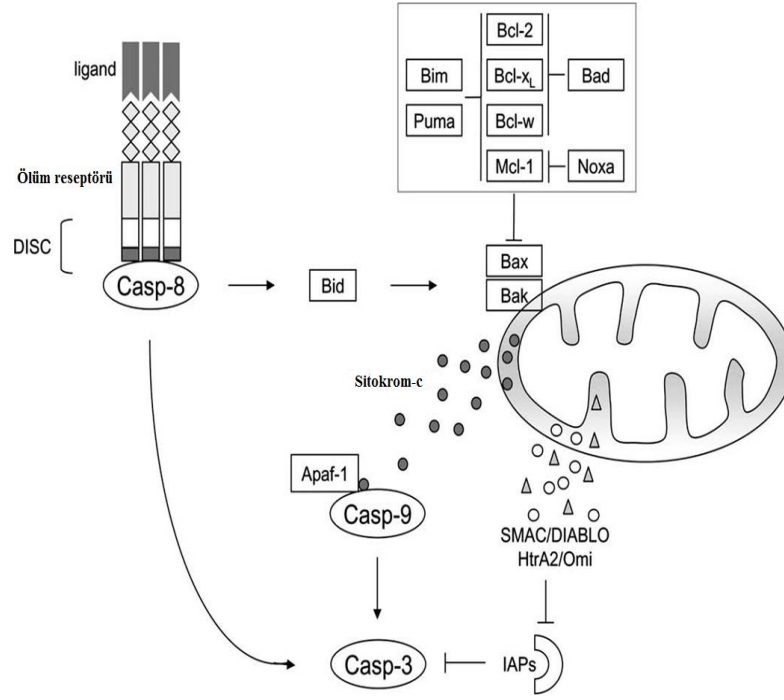


Şekil 1.7. Apoptoza ve kanser oluşumuna etkili mekanizmalar (Wong, 2011)

1.3.4.1. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması

Hücre içinde çok fazla proteinin pro- veya anti- apoptotik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu proteinler, hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bazı genlerin artan ve azalan ekspresyonu ile kanser hücrelerinde apoptozun azalarak karsinogenezise neden olduğu bulunmuştur. Bcl-2 ailesi, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinleri olarak apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu proteinler geri dönüşümsüz hücre hasarına neden olur ve mitokondri seviyesinde rol oynar. Bcl-2, 20 yıl önce belirlenmiş bu ailenin ilk proteinidir ve BCL2 geni tarafından kodlanır. İnsan B hücre lenfoma 2 den adını alır. Tüm Bcl-2 üyeleri dış mitokondri membranında yerleşir. Bunlar membran geçirgenliğinden sorumlu iyon kanallarının şekillenmesinden ya da porların oluşumundan sorumludur. Bcl-2 ailesi üyeleri üç gruba ayrılır. İlk grup anti-apoptotik proteinlerdir. Bunlar apoptotik uyarandan hücreyi korur. Bu proteinlere Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1 ve Bcl-B/Bcl2L10 örnek verilebilir. İkinci

grup sadece BH-3 proteinlerinden yapılır. Bu proteinlere Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk ve Bik örnek verilebilir (Şekil 1.8). DNA hasarı, büyüme faktörü eksikliği, endoplazmik retikulum stresi gibi hücresel stresler BH-3 proteinlerini aktive eder. Üçüncü grup dört BH domaini içerir. Bunlara Bax, Bak ve Bok/Mtd örnek verilebilir (Wong, 2011).



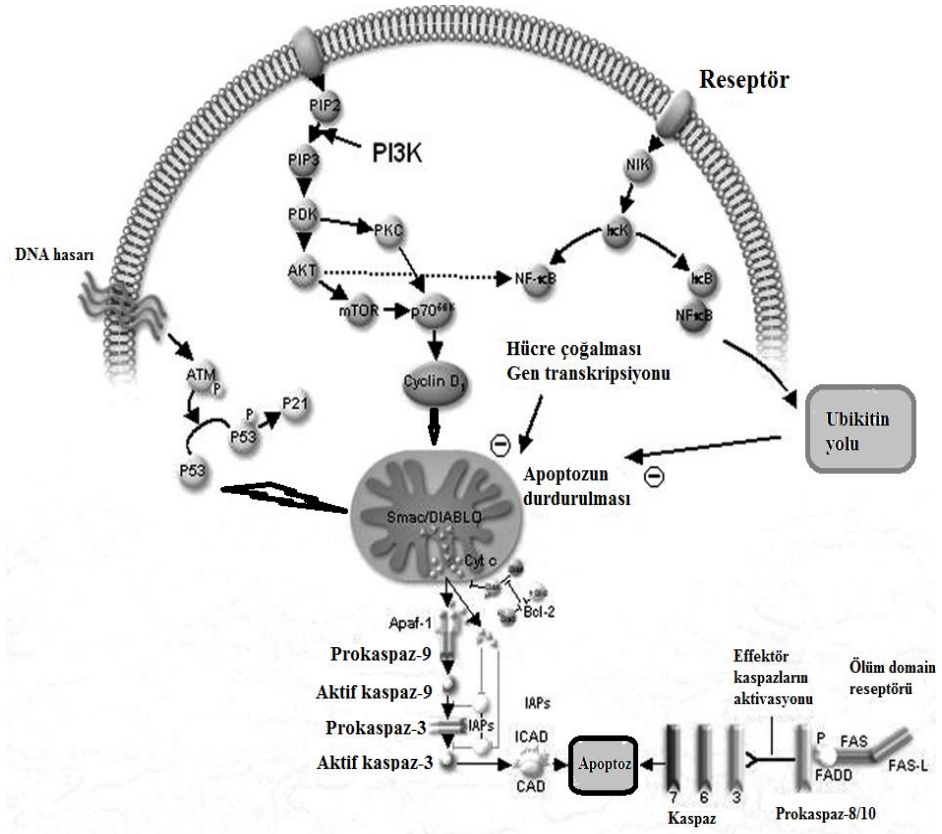
Şekil 1.8. Apoptozun düzenlenmesinde ölüm kaspazlarının (kaspaz 8 gibi) antiapoptotik ve proapoptotik proteinler ile etkileşime geçerek efektör kaspazları (kaspaz 3 gibi) aktive edebilmesi ve bu etkileşim esnasında mitokondriden salınan sitokrom c'nin, SMAC/DIABLO, HtrA2/Omi proteinlerinin ve bunların antagonisti IAP'ların etkileri (Bruin ve Medema, 2008)

Pro-apoptotik Bax ve Bak proteinlerinin fonksiyonunun azalması sonucu tümör oluşumu gözlenmiştir (Bruin ve Medema, 2008). Çoğu tümör türlerinde anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aşırı eksprese edildiği gözlenmiştir ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aktivitesini yok eden ilaç sistemleri geliştirilmiştir (Kasibhatla ve Tseng, 2003). Diğer en iyi bilinen protein tümör baskılayıcı p53, kromozom 17'nin kısa kolunda yerleşmiş TP53 geninden kodlanır. Bu protein ilk kez 1979'da keşfedilmiştir (Wong, 2011). Apoptoz ile bağlantılı ilk tümör baskılayıcı gen p53'dür (Lowe ve Lin, 2000). Bu genin ürünü protein sadece apoptoz da değil aynı zamanda hücre döngüsünün düzenlenmesinde, gelişimde,

farklılaşmada, gen amplifikasyonunda, DNA rekombinasyonunda, kromozomal segregasyonda ve hücre yaşlanmasında önemli rol oynar. Tümör baskılayıcı gen p53'ün defekti insan kanserlerinin % 50'sinden fazlasında görülmektedir (Wong, 2011).

Apoptoz inhibitör proteinler (IAPs)'de apoptozun düzenlenmesinde önemlidir. Bunlara NAIP (BIRC1), c-IAP1 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC3), XIAP, BIRC4, BIRC5 (Survivin), BIRC6, BRUCE, BIRC7 (Livin/ML-IAP) ve BIRC8 örnek verilebilir. İnhibitör apoptoz proteinler, kaspazların inhibitörleridir. Kaspazların aktif bölgelerine bağlanarak kaspaz aktivitesini engellerler (Wong, 2011).

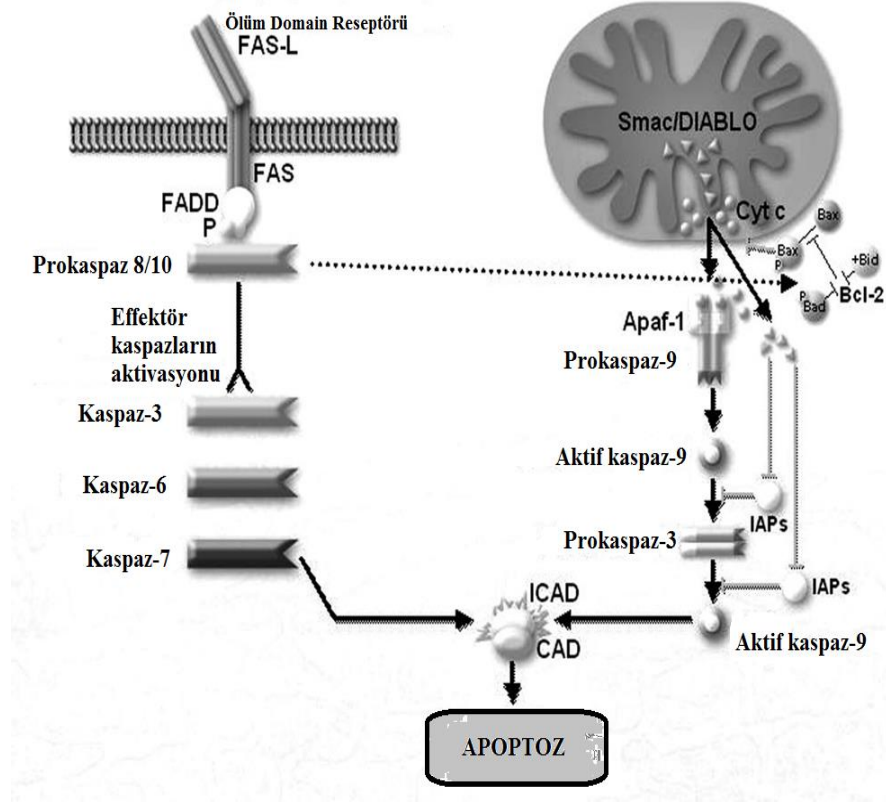
NF κ B, apoptotik genler dahil çok sayıda genin düzenlenmesinde görevli nükleer transkripsiyon faktördür. NF κ B, büyüme faktörleri, sitokinler, limfokinler, radyasyon, farmakolojik ajanlar gibi çok uyaran tarafından aktive edilmektedir. NF κ B, hem anti hem de pro-apoptotik fonksiyonlar göstermektedir. Hücre siklus düzenleyicilerinden ve transkripsiyon faktörlerinden NF κ B, p53, siklin ve siklin bağımlı kinaz inhibitörler, ubiquitin/proteozom sistem tarafından düzenlenmektedir. Ubikitin proteozom sistem, hücre çoğalması ve apoptozu düzenleyen büyük bir proteinaz komplekstir (Şekil 1.9). Bu proteozomlar aynı zamanda Bcl-2 ailesinin substratlarıdır. PI3K, hücre çoğalması ve canlılığı için görevli sinyal yollarında önemli bir kinazdır. PI3K, çoğu kanser türünde artış göstermektedir (Ghobrial ve ark., 2005).



Şekil 1.9. Apoptoz mekanizmasında p53, NFκB ve PI3K yollarının ubikitin/proteozom sistem ile düzenlenmesi (Ghobrial ve ark., 2005)

1.3.4.2. Azalan kaspaz aktivitesi

Kaspazlar iki gruba sınıflandırılır. İlk gruba kaspaz-1, -4, -5, -13 ve -14 örnek verilebilir. Apoptoz da asıl rol oynayan kaspaz-2, -3, -6, -7, -8, -9 ve -10 ikinci gruba örnek verilebilir. İkinci grup başlatıcı kaspazlardır (kaspaz-2, -8, -9 ve -10). Kaspaz-3, -6 ve -7 apoptoz süresince hücresel bileşenlerin bölünmesinden sorumlu efektör kaspazlardır (Şekil 1.10). Kaspaz seviyesinde azalma veya kaspaz fonksiyonunda bozulma apoptoz azalmasına ve karsinogenezise neden olur (Wong, 2011).



Şekil 1.10. Apoptoz mekanizmasında kaspazların etki mekanizmaları (Ghobrial ve ark., 2005)

1.3.4.3. Bozulmuş ölüm reseptörü sinyali

Ölüm reseptörleri ve ölüm reseptör ligandları apoptoz dış yolunda önemli rol oynar. Ölüm reseptörlerine TNFR1 (DR1), Fas (DR2, CD95 veya APO-1), DR3 (APO-3), DR4 (TRAIL-1 veya APO-2), DR5 (TRAIL-2), DR6 (Lowe ve Lin, 2000), ektodisplasin A reseptör (EDAR) ve sinir büyüme faktör reseptörü (NGFR) örnek verilebilir (Wong, 2011).

Ölüm sinyal yolundaki anormallikler, reseptörün ölüm sinyallerinde azalan seviye veya onarılamaz reseptör fonksiyonu mekanizması ve apoptozda azalma ile görülebilir (Wong, 2011). Fas reseptörü ekspresyonu bazı hücrelerde artış gösterirken, ekspresyonunun azalması kanser oluşumuna yol açabilmektedir (Bruin ve Medema, 2008).

1.3.5. Kanser kemoterapisinde apoptoz hedeflenmesi

Kanser araştırmalarında, son yıllarda kanser biyolojisi ve kanser genetiğini anlamamız açısından önemli gelişmeler bilinmektedir. Bu gelişmeler arasında en önemlileri malignant fenotipte büyük etkisi olan genler ve apoptozdur. Bazı onkogenik mutasyonlar apoptozu engelleyerek tümör gelişimi, ilerlemesi ve metastazına önderlik ederler. Bunun aksine bazı onkogenik değişiklikler ise apoptozu tetikler. Çok sayıda sitotoksik antikanser ajanlar apoptozu tetiklemektedir (Lowe ve Lin, 2000). Bu nedenle apoptotik yollar kanser tedavisinde ilgili hedefler olabilir (Wong, 2011). Kemoterapötik ajan etoposid başta olmak üzere, VM26, m-AMSA, deksametazon, vinkristin, sisplatin, siklofosamid, paklitaksel, 5'-fluro-deoksiuridin, 5'- flurourasil ve adriyamisin gibi ajanlar apoptotik indükleyiciler olarak belirlenmiştir. Retinoik asitin in vivo ortamda apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Hannun, 1997).

İlaçlar ve tedavi stratejileri apoptotik sinyal yollarını onarabilmektedir. Apoptotik bozulmaları hedefleyen antikanser ilaçlara yönelik çok sayıda önemli gelişmeler bulunmaktadır. Anti-apoptotik proteinlerden Bcl-2 ailesini inhibe ederek apoptoz hedefli terapötik ajanlar kullanılmıştır (Wong, 2011). Bax veya Bak genlerinin ekspresyonu antitümör yani apoptotik etkiler göstermektedir. Potansiyel antikanser ilaçlar kullanılarak, fazla eksprese olan Bcl-2 ve Bcl-XL aktivitesi inhibe edilerek apoptoz tetiklenmiştir (Yang, 2005). Tümör baskılayıcı p53 proteinine yönelik ilaç terapisi araştırılmaktadır. Bu terapi p53 mutasyonunu onarmaya yönelik olabilir. Bunun dışında p53 gen terapi ve immünoterapi yöntemleri de uygulanmıştır. İnhibitör apoptoz proteinlerine hedefli terapötik uygulamalar da denenmiştir. Kaspaz hedefli ilaçlar da dizayn edilmiştir (Wong, 2011).

Tümör hücrelerinde apoptotik tetiklenme, normal hücrelere kıyasla daha azdır. Çeşitli tümör hücreleri kullanılarak kaspaz-3, -7, -8 ve -9'un fazla ekspresyonunun apoptozu tetiklediği belirlenmiştir. Örneğin bazı tümör hücrelerinde kemoterapi ilaçlarına yanıt olarak Fas L ve TRAIL ölüm reseptör ligandlarının fazla ekspresyonunun, apoptotik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir. Diğer yandan IAP (inhibitör apoptotik proteinler) hedeflenerek yeni uygulamalar denenmiştir. XIAP inhibisyonu ile apoptoz tetiklenmiştir. XIAP

protein geni XAF1'in fazla ekspresyonu kaspaz 3 aktivitesini arttırmaktadır ve apoptotik hücre ölümünü dolaylı yoldan tetiklemektedir. İnhibe IAP fonksiyonu ile apoptoz tetiklenmesinin mekanizması hala araştırılmaktadır (Yang, 2005).

Kanserde mikroRNA'lar ve siRNA'lar, onkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri düzenleme de rol oynar. Bu genler apoptoz ile bağlantılı olduğu için miRNA'lar anti-apoptotik ve pro-apoptotik etkiler gösterebilmektedir (Garcia ve ark., 2012).

1.4. Kanserde mikroarray sistemler

Mikroarray teknolojisi, moleküler kanser yolaklarını teşhis etmede ve yeni terapötik ilaçların moleküler yolaklardaki etkilerini belirlemede kullanılan önemli bir sistemdir (Perez-Plasencia ve Duenos-Gonzalez, 2006). Özellikle mRNA ekspresyon mikroarraylerinden gen ekspresyonlarını görüntüleme normal ve kanser hücrelerinde, hüresel cevabın analizinde güçlü bir araç olarak bilinmektedir (Wallqvist ve ark., 2002).

Gen ekspresyon mikroarrayleri, biyolojik bir örnekte tüm transkripsiyonel aktiviteyi görüntüleyebilmektedir. Bunun aksine çoğu moleküler biyoloji aracı tek bir geni veya küçük bir gen setini görüntüleyebilmektedir. Tüm bu teknolojik araçlar hastalık tiplerinin ve mekanizmalarının, bunun yanı sıra hastalıkta kullanılan ilaca yanıtın belirleyicisi olarak birçok uygulama da işlev görebilmektedir (Slonim ve Yanai, 2009). Gen ekspresyon mikroarrayleri farklı tümör tiplerini belirlemede de kullanılmaktadır. Mikroarray data, farklı çoğu kanser tiplerinde önemli bilgiler sağlamaktadır. Mikroarray sistemler, kanser gelişim süreci ile bağlantılı işlev gören genlerin belirlenmesinde önemli araçlardır. Buna bağlı olarak gelişen farmakogenomik, yani ilaca yanıt veren genleri belirlemek kemoterapinin gelişmesi açısından önemlidir (Brice, 2004; Watters ve Mcleod, 2003).

Mikroarray teknolojisindeki gelişmeler ve data analizi teknikleri, maliyeti azaltmak ve bu metotun potansiyelini arttırmak için gereklidir. İnsan ve farelerde ilaç yanıtına bağlı genom profili oluşturmak kanser kemoterapisinde önemli bilimsel bir temel sağlayacaktır (Watters ve Mcleod, 2003; Wadlow ve Ramaswamy, 2005). Kanser biyolojisinde uygulanan ekspresyon profillenmesi,

onkogenler veya tümör baskılayıcı genler gibi kanserle ilgili genlerin ekspresyonu veya değişen dizilerden oluşan epigenetik değişiklikler ve bunların yanı sıra hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, adhezyon, DNA onarımı ve anjiyogenezis ile ilgili binlerce genin ekspresyonunu göstermektedir (Macgregor ve Squire, 2002).

1.5. Kanser kemoterapi stratejileri

Kanser, biyomedikal alanda bilim adamlarının yoğun bir şekilde araştırma konusudur (Song ve ark., 2006). Kanserlin erken teşhis ve tedavisinde gelişen avantajlara rağmen, zayıf spesifisitenin, yan etkilerin veya şu anda kullanılan yöntemlerin sınırlı erişilebilirliğinin üstesinden gelmek için yeni alternatifler geliştirmeye ihtiyaç vardır (Boca ve ark., 2011).

Kanser ile mücadelede uygulanan yöntemler tümörlü bölgenin alınması, radyoterapi ve kemoterapidir. Bu yöntemler kanserlin cinsine ve bulunduğu bölgeye göre uygulanmaktadır. Bu yöntemler arasında en yaygın olarak kullanılanı kemoterapidir (Berger, 1998; Duncan, 2006; Oh ve Baik, 2009).

Kanser kemoterapisi, yaklaşık 60 yıl önce çalışılmaya başlamıştır. Kemoterapi ağız ya da damar yolu ile yapılmaktadır. Kemoterapi, kanser hücrelerinin yayılmasını engeller, çoğalmasını yavaşlatır ve kanser hücrelerini öldürür (Garza-Ortiz, 2008). Kemoterapi, antikanser ajanların kanserli ve sağlıklı dokular üzerindeki toksik ve yan etkilerini belirleyen bir yöntemdir (Ding ve ark. 2012). Antikanser etki ve toksisite arasındaki denge kemoterapinin başarılı olması açısından önemlidir.

Kanserli bölge etrafındaki sağlıklı doku ve organlara kemoterapötik ilaçların zarar vermesi ciddi bir sorundur (Oh ve Baik, 2009). Kemoterapötik ilaçların sınırlı dozajlarda uygulanması çok büyük zararlara yol açmadan tedavi edici olabilir (Heath ve Davis, 2008). Çoğu antikanser ilaçların suda az çözünür olması da onların etkilerini bozmakta ve azaltmaktadır. Antikanser ajanların sudaki çözünürlüğünü arttıracak hedef ilaç taşıyıcılarının geliştirilmesi ile sağlıklı dokuları yan etkilerden koruyan, sadece kanserli dokuları hedef alan etki sağlanabilmektedir (Ding ve ark., 2012).

Kanser için çeşitli stratejiler geliştirilmiş olmasına rağmen hala çözülemeyen en büyük problemlerden biri de ilaç direncidir (Zhang ve ark.,

2009). Birkaç farklı biyofiziksel süreç ilaç direncini etkilemektedir. Bu süreçler, dokulardan ilacın alınımının azalması, ilaç akışında ve metabolizmasında artış veya ilacın hedefindeki değişikliklerdir (Song ve ark. 2006).

Antikanser ilaçlar, kemoterapi, hormonal terapi ve immünoterapi olarak sınıflandırılır. Kemoterapi, alkilleyici ajanlar, antibiyotikler, antimetabolitler, topoizomeras I ve II inhibitörleri, mitoz inhibitörleri, platin bileşikleri ve diğerlerini içermektedir. Bu gruptan diğerleri çok geniş bir sınıfa sahiptir. Genelde kemoterapi, tümör hücrelerinde DNA seviyesinde etkilidir. Antikanser ilaçlar DNA heliks yapısını kırarak, DNA ile ilgili proteinlerle bağlantı kurarak ya da spesifik genlerin ekspresyonunu düzenleyerek etkili olabilirler. Çoğu antikanser ajan bu etki mekanizmalarından birisini kullanmaktadır (Espinosa ve ark., 2003).

Kanser kemoterapisi, mustin hidrokloridin antitümör ve antilökemik özelliklerinin bulunması ile başlamıştır. Mustin hidrokloridin türevleri yapılmıştır ve diğer bileşikler için önder olmuştur (Wiltshaw, 1979).

Metaller, metal oksitler, yarı iletken nanopartiküller ve solid nanopartikül çeşitleri benzersiz kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptir (Jang ve ark., 2012). Metal bileşikleri tüm kanser terapilerinin % 50'sinde kullanılmaktadır (Jakupc ve ark., 2007).

Antikanser ajanların yan etkilerini azaltmak için geliştirilen yeni ilaç sistemlerine ilgi yoğunlaşmıştır. İstenmeyen yan etkiler ve toksisite problemlerini çözmek için nanoölçekli tümör hedefli dağıtıcı sistemler geliştirilmektedir. Yeni ilaç sistemlerinden nanotüpler (Khorramizadeh ve ark., 2010), lipozomlar, dendrimerler (Guo ve ark., 2011; Khorramizadeh ve ark., 2010), polimerik nanopartiküller, blok kopolimer miseller(Guo ve ark., 2011), metalik ve metalik olmayan nanopartiküller (Gurunathan ve ark., 2009) olarak çeşitli nanotaşıyıcılar kanserli dokular için geliştirilmektedir (Guo ve ark., 2011). Nanopartiküller genelde 1-100 nanometre arasında değişen boyutlarda kullanılır. Bu yüzden ultrafin partiküller olarak ifade edilirler (Liu ve ark., 2012). Nanopartiküllerin etkisi, tümörlü bölgeye partiküllerin başarılı şekilde dağılmasına ve tümör hücreleri içine internalizasyonuna dayanmaktadır (Valodkar ve ark., 2011). Metal nanopartikülleri farmasötikal uygulamalarda potansiyel kullanımlarından dolayı kabul edilmişlerdir (Jacob ve ark., 2012).

1.6. Antikanser metal bileşikler

Metaller ve metal bileşikler binlerce yıldır tıpta kullanılmaktadır. Çeşitli hastalıkların tedavisinde platin, gümüş, demir ve titanyum metal bileşiklerinin tıpta kullanımı bilinmektedir. Kanser ve lösemide metal ve metal içerikli bileşiklerin terapötik kullanımı 16. yüzyıla kadar dayanmaktadır. Anti-tümör etkinliği açısından, geçiş metalleri ve ana grup elemanlarının her ikisinin de bileşimlerinin etkileri incelenmiştir (Desoize, 2004). Antikanser ajanlar olarak geçiş metal bileşiklerinin kullanımı üzerine çok sayıda rapor bulunmaktadır. Bu bileşiklerden en iyi bilinenide sisplatin [cis-diamindikloroplatinyum(II)] dir (Thati ve ark., 2009). Sisplatinin antiproliferatif etkisinin keşfi ile kanser tedavisinde metal temelli ilaçlara yönelme olmuştur (Laine ve Passirani, 2012).

Platin türevleri üç bin tane sentezlenmiş ve kanser hücrelerine karşı kullanılmıştır. Fakat bunlardan sadece otuz bileşik kliniksel deneylerde kullanılmıştır ve yarısından fazlası kabul edilmemiştir. Günümüzde dört tanesi tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Bunlardan 1978'den beri sisplatin, karboplatin, oksaliplatin ve nedaplatin kullanılan bileşiklerdir. Bazı platin kompleksler hala araştırılmaktadır (Desoize, 2004).

Geçiş metalleri tıbbi biyokimyada önemli bir yere sahiptir. Karsinomalar, limfomalar, enfeksiyon kontrolü, diyabetler ve nörolojik bozukluklar gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmışlardır. Geçiş metalleri farklı oksidasyon durumları gösterebilir ve çok sayıda yüklü molekülle bağlantı kurabilir. Geçiş metallerinin bu aktivitesi farmakolojik uygulamalarda kullanılmak üzere girişimleri başlatmıştır ve benzersiz terapötikler oluşturulabilir (Rafique ve ark., 2010). Geçiş metalleri, tüm sınırlamalarına ve yan etkilerine rağmen hala en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardır (Warra, 2011). Antikanser ajanlar olarak geçiş metal bileşikleri platin temelli antikanser metal bileşikler ve platin olmayan antikanser metal bileşikler olarak ikiye ayrılmaktadır (Rafique ve ark., 2010).

1.6.1. Platin temelli antikanser metal bileşikler

Platin (II) kompleksleri uzun zamandan beri çok etkili kemoterapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır ve bu bileşiklerden en etkili olarak görüleni sisplatindir (Rafique ve ark., 2010). Sisplatin bileşiğinin keşfi ile bunu takiben sisplatinin aktif fragmentini içeren karboplatin ve kliniksel başarısı kabul edilerek sisplatin dirençli kanserlere karşı kullanılmış oksaliplatindir. Platin ilaçlardan satraplatin, miriplatin, prolindac, BP-C1, sisplatin lipid kompleks, aroplatin ve pikoplatin araştırılmaktadır (Hannon, 2007).

Platin bileşikleri birçok yan etkiler göstermesine rağmen testiküler, ovaryum, mesane, baş ve boyun, özafagal, küçük ve küçük olmayan akciğer kanseri, göğüs kanseri, servikal, mide ve prostat kanserlerini içeren çok sayıda kanser türünde kullanılmaktadır. Bu yan etkiler, sağlıklı hücrelerde defektler, azalan kan hücreleri, bağışıklık hücrelerinin azalması şeklinde görülen etkilerdir. Daha spesifik olarak böbrek toksisitesi (nefrotoksisite), nörotoksisite ve işitme kaybı yan etkiler olarak söylenebilir (Florea ve Büsselberg, 2011). Platin temelli metal bileşiklerin etkisi DNA'ya bağlanarak DNA replikasyon ve transkripsiyonunu inhibe etme şeklindedir (Zhang ve Lippard, 2003).

1.6.1.1. Sisplatin

Kanser tedavisinde kullanılan ilk platin içerikli bileşik sisplatindir. İlk kez 1845 yılında sentezlenmiştir ve Peyrone'nin kloridi olarak bilinmektedir. Daha sonra Rosenberg tarafından inhibitör aktivitesi belirlenmiştir (Desoize, 2004). Alfred Werner 1893'de sisplatinin yapısını belirlemiştir (Florea ve Büsselberg, 2011). Sisplatinin antitümör aktivitesi 1960'da keşfedilmiştir. Sisplatin katı karsinomların tedavisinde en etkili ilaç olarak kullanılmıştır (Rafique ve ark., 2010).

Sisplatin, DNA replikasyon ve transkripsiyon mekanizmasına bağlı olarak tümör hücre ölümünü tetiklemektedir. Sisplatin, sarkoma yumuşak doku kanserleri, kemik, kas ve kan damarları kanserlerinde başarılı şekilde uygulanmıştır. Sisplatin başka ilaçlar ile kombine edilerek de kullanılmaktadır. Sisplatin, ilk kez 1971'de kanserli bir hastaya uygulanmıştır (Florea ve Büsselberg, 2011).

1.6.2. Platin olmayan antikanser metal bileşikler

Kemoterapi araştırmalarında, platin temelli antikanser ilaçlara direnç gelişmesi ve yan etkilerin oluşmasından dolayı platin içermeyen metal ajanlara ilgi artmıştır (Yang ve Guo, 1998; Ott ve Gust, 2007). Platin içermeyen metal temelli antikanser metal bileşiklerden titanyum, rutenyum gibi metalleri içeren bileşiklerin iyi antitümör aktivite ve düşük toksisite gösterdiği belirlenmiştir (Yang ve Guo, 1998). Rutenyum, arsenik, titanyum, bakır, altın, gümüş, kalay ve rodyum içeren kemoterapötik potansiyeli olan metal bileşiklerin platin temelli ilaçlardan benzer ya da farklı etki mekanizmalarına sahip oldukları ve daha az toksik oldukları bilinmektedir (Bharti ve Singh, 2009). Klinik deneylerde test edilen ilk platin içermeyen metal bileşik titanyum kompleksidir. Platin bileşiklerine kıyasla titanyum bileşiği olan titanosen diklorid, nefrotoksisite veya myelotoksisite gibi yan etkiler göstermemiştir. Titanyum bileşiklerinin etki mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir (Desoize, 2002).

1.6.2.1. Gümüş nitrat

Gümüş bileşiklerinden özellikle gümüş nitrat, son yirmi yıl boyunca antimikrobiyal tedavilerde kullanılmıştır (Arora ve ark., 2008; Foldjberg ve ark., 2009). Gümüş ve çok sayıda bileşiğinin bakteriler, virüsler ve ökaryotik mikroorganizmalar dahil birçok patojene etkisi kanıtlanmıştır. Örneğin gümüş sülfadiazinin 1947’de bakteri ve mantarlara karşı inhibitör etkisi gözlenmiştir. Araştırmacılar gümüş iyonlarının patojenik aktivitesini elektron taşıma sistemi, hücre membranları ve DNA bağlanma bölgeleri ile etkileşime geçerek yaptıklarını belirlemişlerdir (Cavicchioli ve ark., 2010). Aynı zamanda patojenlere olan etkisini nükleik asitlere, metabolik enzimlerin sülfidril gruplarına bağlanarak göstermektedir (Greulich ve ark., 2011).

Gümüş metal iyonları patojenlere karşı aktif iken, normal hücrelere karşı düşük toksisiteye sahiptir (Ahmad ve ark., 2006). Gümüş metal bileşikleri düşük dozlarda etkili olmaktadır ve deney hayvanları (fare) üzerinde yapılan çalışmalarda gümüş nitratın yüksek dozlarda kullanımı renal toksisiteye neden olmamıştır (U.S. Environmental Protection Agency, 1992). Gümüş iyonlarının

antikanser potansiyeli son zamanlarda önemli bir araştırma konusudur (Siciliano ve ark., 2011).

1.6.2.2. Titanyum dioksit

Titanyum dioksit, Fujishima ve Honda'nın 1972'deki bu madde ile ilgili yayınlarından bu yana onlarca yıldır araştırılmaktadır (Lai ve Lee, 2009). Titanyum dioksit, titanyumun en önemli endüstriyel bileşimidir. Dioksit, salisilat ve tannat gibi titanyum bileşikleri günümüzde birçok farmasötik ve kozmetik ürünlerinde önemli bir bileşen olarak kullanılmaktadır (Lazau ve ark., 2007). Araştırmacılar son yıllarda titanyum dioksitin kanser tedavisinde yeni bir araç olup olmadığını araştırmaktadır (Kubota ve ark., 1994; Xu ve ark., 2007). Özellikle tümör tedavisinde TiO_2 , tümör hücrelerini öldüren güçlü oksidatif reaksiyonlar gibi özelliklere sahiptir (Islam ve ark., 2011).

1.7. Kanser hedefli nanoboyutlu dağıtıcı sistemler

Nanoboyut bilim ve teknolojisi, araştırma ve geliştirme alanında geniş ve disiplinlerarası bir alandır. Nanobilim, 21. yüzyılın önemli teknolojilerinden biridir. Nanoteknolojik uygulamalar medikal bilim, kimya mühendisliği, materyal bilim gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Nanobilimin tıbbi uygulaması, hem in vitro hem in vivo tedavide ilaç dağıtım uygulamalarını içermektedir (Athar ve Das, 2014).

Nanopartiküller, ilaç dağıtımı için farklı şekillerde uygulanmaktadır. Bunlar nanotüpler, dendrimerler, polimerik nanopartiküller, nanokristaller, inorganik nanopartiküller, metal temelli nanopartiküller ve lipozomlar olarak sınıflandırılır. Nanopartiküller, 10-100 nanometre boyutlarında türevlenebilmektedir (Athar ve Das, 2014). Nanopartiküllerin hacim miktarlarında ayarlanabilir boyutlarda olmaları onların deneysel kullanım potansiyelini arttırmaktadır. İlaç dağıtım sistemlerinden daha çok kalsiyum fosfat, altın, demir oksit, polimerik miseller, lipozomlar, hidrojel nanopartiküller ve dendrimerleri içeren farklı tipte nano yapılara ilgi artmaktadır. İlaç dağıtım sistemlerinde özellikle 10-200 nm arasında boyutlara sahip nanopartiküller uygun bulunmaktadır (Athar ve Das, 2014).

Nanopartikül yapımında biyolojik orijinler (fosfolipid, lipidler, laktik asit, dekstran, sitosan gibi) veya biyolojik olmayan orijinler (metaller gibi) kullanılmaktadır. Nanopartikül ilaç taşıyıcılarının avantajları hedef bölgeye (hücresele ya da dokusal) ilacın dağıtılmasını sağlamak ve böylece enzimatik bozulmalara karşı terapötik korunma uyumunu sağlamaktır. Bu partiküllerin küçük boyutlu olması, çeşitli hücre tiplerinden etkin alınım ve hedef bölgelerde seçici ilaç birikimini sağlamaktadır (Athar ve Das, 2014).

1.7.1. Antikanser metal nanopartiküller

Metal temelli nanopartiküller, demir oksit, altın, gümüş, gadolinyum ve nikel gibi metaller kullanılarak elde edilmektedir. Metalik nanopartiküller, büyük yüzey alanına sahiptir. Bu sayede yüksek ilaç dozları uygulanabilir özelliktedirler (Ochekpe ve ark., 2009). Nanopartiküller tümör dokulara ya da hedef hücrelere ilaç taşıyıcı olarak hareket edebilir, sevkiyat sırasında inaktive ilacı koruyabilirler. Nanopartiküllerin formülasyonu, nanotaneçikler ve pH, monomer konsantrasyonu gibi fiziko-kimyasal parametreler, ilave stabilizatör, iyonik kuvvet ve yüzey yükü, partikül boyutu ve moleküler ağırlığı, ilaç iletimi için önemlidir (Serpe, 2006).

1.7.1.1. Magnetit demir (II, III) oksit nanotozu

Nanopartikül formülasyonları içinde en yaygın şekilde kullanılan metal demir oksittir. Demir oksitin temel olarak iki tipi magnetik nanopartikül formülasyonu kullanımı için araştırılmıştır. Bu demir oksitler, maghemit (γ - Fe_2O_3) ve magnetit (Fe_3O_4) dir. Magnetitin güçlü magnetik özelliği katı tümörlerin belirlenmesi, görüntülenmesi ve tedavisinde çok uygun bir ajan olmasını sağlar (Vlerken ve Amiji, 2006). Süperparamagnetik demir oksit nanopartikülleri (SPION), son zamanlarda potansiyel biyomedikal uygulamalarından dolayı birçok alan dahil ilaç dağıtım tümör tedavi veya kardiovasküler hastalıklarda kullanılmaktadır (Zhu ve ark., 2009; Zhang ve ark. 2012).

Chen ve arkadaşları, Fe_3O_4 nanopartiküllerini ferromagnetik, stabil, nontoksik ve nonkanserojenik özelliklerinden dolayı çalışmalarında kullanmışlardır (Chen ve ark., 2009). Fe_3O_4 MNP'lerinin tümör hücreleri

üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Fe₃O₄ MNP'lerinin hem *in vitro* hem *in vivo* modellerde biyolojik aktiviteleri gözlemlenmiştir (Khorramizadeh ve ark., 2010).

1.8. Sitotoksosite analizleri

Hücre biyolojisinde metabolik aktiviteyi ölçmek için en yaygın şekilde kullanılan analizlerden bazıları tetrazolyum indirgenmesine dayanmaktadır. Bu analizlerden en çok kullanılanlar olarak başta MTT (2-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür) olmak üzere XTT (sodyum 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-karbonil]-2H tetrazolyum), MTS (5-[3-(karboksimetoksi) fenil] -3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil) -2-(4-sulfo-fenil)-2H-tetrazolyum) ve WST-1 (sodyum 5-(2,4-disulfofenil)-2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-tetrazolyum) monotetrazolyum indirgenmeleri olarak bilinmektedir (Berridge ve ark., 2005). Diğer hücre canlılığı analizlerinden en çok kullanılan yöntemler resazurin redüksiyonu, proteaz marker analizi ve ATP analizidir (Riss ve ark., 2013).

1.8.1. MTT analizi

Hücre canlılığını belirlemek için kullanılmaktadır. Kültür hücrelerinde kimyasalların sitotoksik etkilerini değerlendirmek için çeşitli analizler kullanılır. MTT analizi de en çok kullanılanlardan biridir. MTT analizi, çözünebilir sarı renkli MTT tetrazolyum tuzunun, çözünmez mavi renkli mor formazan ürününe dönüşmesi için mitokondriyal süksinik dehidrojenaz yardımı ile alınımına ve indirgenmesine dayanmaktadır (Chiba ve ark., 1998). Formazan kristalleri dimetil sülfoksit çözücüsünde çözüldükten sonra spektrofotometrik olarak renkli formazan ürününün miktarı belirlenmektedir. Oluşan formazan tuzlarının miktarı direkt olarak hücre sayısının oranını gösterir (Siewerts ve ark., 1995).

Mitokondride üretilen NADH (nikotinamid adenin dinükleotit), NADPH (nikotinamid adenin dinükleotit fosfat), askorbik asit, dihidrolipoik asit, sistein, glutatyon gibi hücre içi ajanların indirgenmesi yardımıyla sarı renkteki MTT tuzları, mor formazan kristallerine dönüşmektedir (Stockert ve ark., 2012). MTT, antikanser ajanlara karşı tümör hücresi direncini test etmek için kullanılan en temel tekniklerden birisi olarak görülmektedir (Maioli ve ark., 2009).

1.9. Apoptotik analizler

Apoptotik hücre ölümünü belirlemek modern biyolojide özellikle kanser biyolojisinde büyük öneme sahiptir (Willingham, 1999). Apoptoz, gelişim, seleksiyon ve homeostazis için önemli bir role sahip olan hücre ölümü şeklidir. Apoptotik hücre morfolojisinde nüklear yoğunlaşma, membran cepçığı, hücre daralması gibi özellikler görülmektedir. Bunun dışında DNA fragmentasyonu, mitokondriyal membran fonksiyonunun bozulması ve plazma membranında değişiklikler görülmektedir (Brady, 2004).

1.9.1. Flow sitometrik (Akış Sitometrik) analizler

Flow sitometri, analiz edilen örnekte ışık tarama ve floresan yayma özelliklerini yüksek boyutta ölçebilmeyi sağlamaktadır (Aghaeepour ve ark., 2013). Flow sitometri, süspanse hücrelerin fizikokimyasal özelliklerini ölçmektedir. Flow sitometri analizi, hücresel komponentleri floresan probalar (Anneksin V FITC, PI vb.) kullanarak boyama ile ölçmeye dayanır (Huh ve ark., 2005).

1.9.1.1. Anneksin V-FITC/PI analizi

Apoptozun erken olaylarından birisi, plazma membranının iç yüzeyinden fosfatidilserin (PS)'in membranın dış yüzeyine çıkmasıdır. Anneksin V, 'Ca⁺² bağımlı fosfolipid bağlayıcı protein' PS için yüksek affiniteye sahiptir. Anneksin V, fosfatidil serine bağlanarak erken apoptotik hücreyi işaretlemektedir. Anneksin V boyama, erken ve geç apoptotik hücrelerin birbirinden ayrılması için kullanılan propidyum iyodid (PI) boya ile birlikte kullanılmaktadır. Ölü ve hasar görmüş membrana sahip hücreler PI'ya karşı geçirgendir. Erken apoptotik hücrelerde Anneksin V pozitif, PI negatiftir. Hücreler çoktan ölmüşse veya geç apoptotik evredeyse hem Anneksin V hem de PI pozitifdir (Hingorani ve ark., 2011).

1.9.1.2. Kaspaz analizi

Kaspazlar, apoptotik sinyaller tarafından aktive edildiklerinde hücresel ve nüklear proteinleri tetikleyerek hücreyi parçalar. Kaspazlar etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır. Apoptotik başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10),

apoptotik öldürücü kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) ve sitokin işlevci kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13 ve -14) olarak sınıflandırılmaktadır (Jiang ve ark., 2001). Kaspaz-3 yöntemi, apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunositokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir. Bunun için, hücrenin kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan hücrede apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu analizle tespit edilebilirler (Overbeeke ve ark., 1998). Bunun dışında fluorogenik substratlar kullanılarak kaspaz-3 aktivitesi flow sitometri analizi yapılarak belirlenebilmektedir (Belloc ve ark. 2000).

1.9.1.3. Mitokondriyal membran potansiyeli analizi

Mitokondri işlev bozukluğu apoptoz indüklenmesinde önemli bir etken olarak gösterilmektedir. Apoptogenik faktörlerin ortaya çıkması ve oksidatif fosforilasyon kaybı, transmembran potansiyelinin depolarizasyonunu tetikleyerek, mitokondriyal geçirgenlik geçiş porlarının açıldığı gösterilmiştir. Bazı apoptotik sistemlerde $\Delta\psi_m$ (membran potansiyeli) kaybı olabilir ya da olmayabilir. Bu $\Delta\psi_m$ fonksiyonunu belirlemek için (Ly ve ark., 2003) fluorokromlar (JC-1, CMX-Ros, DiOC₆(3) ve TMRE) kullanılmaktadır (Marchetti ve ark., 2004).

1.9.2. İmmünohistokimyasal analizler

Hücre kültürü ve doku kesitlerinde yapıların yerini belirlemek için antikorların kullanımı büyük öneme sahiptir. İmmünohistokimya, 1942 de Albert Coons ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar ile başlamıştır. İmmünohistokimyada kullanılan işaretleme metotları üç şekilde gruplandırılabilir: floresans, enzimler (proteinler) ve partikülerdir. Floresans metodu, floresan uyarıcı için kullanılan ışığın farklı bir dalga boyuna sahip bir floresandan yayılan ışımaya dayanmaktadır. Histolojik enzimler, renkli suda çözünür yaygın olarak kullanılan enzim olan HRP'yi renksiz suda çözünür substrata dönüştüren proteinlerdir. Partikül işaretler, elektron mikroskopisinde kullanılan koloidal altın ya da küçük altın parçacıkları gibi ağır metallerdir (Burry, 2011).

1.9.2.1. Hematoksilen/Eozin parafin gömme ile boyama

Hematoksilen ve eozin (H&E) boyamalar en az bir yüzyıl boyunca kullanılmıştır ve halen çeşitli doku tiplerini tanımak ve günümüz kanser tanısının temelini oluşturan morfolojik değişiklikleri tanımak için kullanılmaktadır. Bu boyama yıllardır değişmeden kullanılmıştır. Çünkü yöntem çeşitli fiksatiflerle iyi çalışmaktadır ve sitoplazmik, nüklear ve ekstrasellüler matriks özelliklerini büyük miktarda görüntülemeyi sağlar. Hematoksilen, mavi-mor renge sahiptir ve nükleik asitleri boyar. Eozin pembe renktedir ve proteinleri boyamaktadır. Çekirdek mavi renge boyanırken, sitoplazma ve ekstrasellüler matriks pembe renge boyanmaktadır. İyi fikse edilmiş hücreler hücre altı detayları göstermektedir. Hematoksilen boya heterokromatin yoğunlaşmasını net bir şekilde göstermektedir. Çok fazla poliribozom varsa sitoplazma mavi renk alacaktır. Golgi tabakası, çekirdeğin yakınındaki bölgede boyanma olmaması sayesinde belirlenebilir. Böylece bir çok bilgi edinilebilmektedir (Fischer ve ark., 2006).

1.9.2.2. TUNEL parafin gömme ile boyama

Apoptoz, terminal deoksinükleotidil transferaz [TdT]- aracılı deoksiüridin trifosfat [dUTP] kesme ve işaretleme (TUNEL) kullanılarak, DNA zincir kırıkları enzimatik şekilde işaretlenerek belirlenmektedir (Plastina ve ark., 2012). TUNEL, doku kesitlerinde apoptoz miktarını belirlemek için en yaygın şekilde kullanılan tekniklerden biridir (Negoescu, 1998). Nüklear DNA'nın yoğun fragmentasyonu apoptozun en karakteristik özelliklerinden biridir (Darzynkiewicz ve ark., 2008). Parafin gömme kesitleri DNA fragmentasyonunu (kırılmalarını) belirlemektedir. TUNEL yönteminin başarısı, apoptoz süresince kayda değer çok sayıda DNA kırılımına dayanmaktadır (Negoescu, 1998).

1.9.2.3. BrdU parafin gömme ile boyama

BrdU işaretleme, nüklear morfoloji hakkında detaylı bilgi vermektedir. BrdU işaretleme, *in vitro* çalışmalarda apoptotik hücreleri belirleyebilmektedir. BrdU ile işaretlenen hücrelerde nüklear görüntü genellikle beneklenme şeklinde görülür. BrdU işaretleme aynı zamanda hücre popülasyonunu belirlemek için de kullanılmaktadır (Weiner, 2008). BrdU (bromodeoksiüridin) timidinin bir

analoğudur. Hücre siklusunda S (sentez) fazı süresince DNA içine yerleşmektedir ve böylece çoğalan hücreler işaretlenmektedir (Garrett ve Guthrie, 1998). İmmünolojik çalışmalarda BrdU antibodi, denatüre DNA'nın içerisine girebilmektedir (Garrett ve Guthrie, 1998)

1.9.2.4. Bcl-2 parafin gömme ile boyama

Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri Bcl-2, Bcl-x1, Mcl-1 ve A1, hücre ölümü olan apoptozun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Antiapoptotik faktör üyelerinden örneğin Bcl-2'nin fazla ekspresyonu kanser hastalığına neden olmaktadır. Aynı zamanda kanser tedavisinde direnç gösterebilen etkiye sahiptir ve ekspresyon seviyelerinin araştırılması apoptoz mekanizmasının çalışmasında nasıl bir etkiye sahip olduğunu belirlemektedir (Santini ve ark., 2005). Bcl-2 antibodileri, antiijenini içeren hücreleri işaretleyerek immünohistokimya kullanılabilir (Leong ve ark., 2003).

1.9.2.5. Bax parafin gömme ile boyama

Bcl-2 ailesinin apoptotik üyelerinden Bax, Bcl-xs, Bak, Bad ve Bik hücre ölümü olan apoptozun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bax, antiapoptotik etkili Bcl-2'yi etkisiz hale getirmektedir ve böylece apoptozu tetikleyebilir. Proapoptotik Bax, dış mitokondri membranında yer almaktadır. Bax'ın fazla ekspresyonu, sitokrom c salınımına öncülük ederek mitokondriyal geçirgenliği tetiklemektedir. Sitokrom c, kaspaz 9'un aktif hale geçmesini tetikler ve sonraki aşamada efektör kaspaz 3 aktivasyonu başlar. Birçok kanser türü dahil küçük hücreli akciğer kanserinde Bax'ın prognostik değeri apoptozun arttığına önemli bir kanıt olarak görülmektedir (Santini ve ark., 2005).

1.9.3. Mikroskopik analizler

1.9.3.1. Konfokal mikroskopu

Lazer taramalı konfokal mikroskopu, biyolojik ve bilimsel araştırmalarda canlı ve fikse edilmiş, 100 mikrometre kalınlığında değişen ince hücre ve doku kesitlerini görüntülemek için kullanılmaktadır (Claxton ve ark., 2006). Konfokal mikroskobu teknikleri ilk kez Marvin Minsky tarafından yaklaşık 50 yıl önce

açıklanmıştır. Konfokal mikroskopi lazer ve bilgisayar teknolojisi açısından avantajlara sahiptir. Bu avantaj hüresel ve moleküler seviyedeki etkileşimleri görüntülemeyi sağlamaktadır. Konfokal mikroskopi birçok mekanizma dahil apoptoza neden olan moleküler sinyalleri belirleyebilmektedir (Renshaw, 2007).

1.9.3.2. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobu veya TEM (Transmission Electron Microscope) çok ince bir örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanır. Elektronların örnek ile etkileşimleri sonucu oluşan görüntü büyütülür ve floresans ekran, fotoğrafik film katmanı ya da CCD kamera gibi bir sensör üzerine odaklanır. Max Knoll ve Ernst Ruska tarafından 1930'larda yapılan çalışmaların sonucu ortaya çıkan geçirimli elektron mikroskobu, optik mikroskoba kıyasla çok daha küçük ayrıntıları görmeye olanak tanır (Ruska ve ark., 1986).

TEM, materyal biliminde boyanan ve gömülen dokuların ultramikrotomlarını görüntülemeye kullanılabilmektedir (Reimer ve Kohl, 2008). TEM, hücrelerin yapısal özelliklerini 2 veya 3 boyutlu görüntülemeyi sağlayabilmektedir (Sochacki ve ark., 2014).

1.9.4. Gen profileme analizleri

Gen ekspresyon analizleri, gen fonksiyonlarını belirlemede uzun zamandır kullanılmaktadır. Bu amaçla çok sayıda teknik geliştirilmiştir. Her bir teknik avantajlara ve dezavantajlara sahiptir. Northern blot analizi, ribonükleaz koruma analizi (RPA), reverz transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), eksprese edilmiş dizi işaretleme, diferansiyel görüntüleme, cDNA arrayleri ve gen ekspresyonu sıralı analizi (SAGE) bu teknikler arasında en çok kullanılanlardır. Northern blot veya ribonükleaz koruma analizleri sadece küçük bir gen setinin ekspresyonlarını ölçebilirken, SAGE, RT-PCR, cDNA mikroarrayler ve yüksek çözünürlüklü jel elektroforezis analizleri binlerce genin ekspresyon seviyelerini ölçmeye izin vermektedir (Grant ve Keohavong, 2005).

1.9.4.1. Mikroarray analizi

Mikroarray teknolojisi, mikroskop lamı gibi cam, plastik veya silikondan katı bir yüzey üzerine spesifikliği bilinen yapıların (DNA, protein vb) sabitlenmesi ile elde edilen mikroarray'lerin (çip) kullanıldığı test yöntemine denir. Kullanılan çipin üzerinde bulunan farklı spesifiktteki binlerce noktanın her birine prob denilmektedir. Her prob kendi içinde homologdur ve her probda bu homolog yapılardan belirli miktarda (DNA, protein) bulunmaktadır. Ancak, problemlerin her biri birbirinden farklıdır. Farklı spesifiktte binlerce probun oluşturduğu bir mikroarrayin her probunun neye spesifik olduğu bilinir (Bal ve Budak, 2012).

DNA mikroarray, 90'lı yılların ortalarında geliştirilmeye başlanan, günümüzde hücre ve dokulardaki gen ekspresyonlarının topluca incelenmesine olanak sağlayan yeni ve güçlü bir teknolojidir (Yoltaş ve Karaboz, 2010). DNA mikroarray teknolojisi, genlerin ve gen polimorfizmlerinin araştırılması, ekspresyon analizleri, mutasyon analizleri, evrimsel çalışmalar, sekans analizleri, potansiyel terapötik ajanların geliştirilmesi, genlerin sınıflandırılması gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Bal ve Budak, 2012). Günümüzde kullanılan en geniş mikroarrayler yaklaşık olarak 40.000 geni temsil eden elemanlardan oluşmaktadır. DNA mikroarraylerin dizaynı ve uygulanmasındaki temel basamaklar substrat seçimi, DNA tipi (genomik DNA, cDNA, EST klonları, cRNA, bakteriyel koloni), çip üretimi, hedef hazırlanması, scanning (görüntüleme) ve veri analizidir (Yoltaş ve Karaboz, 2010).

Moleküler biyolojik ve robotik tekniklerin bir arada kullanımını yapılarak, cam matriks üzerine spesifik bir geni temsil eden binlerce DNA parçasının yapıştırılması ile elde edilen arrayler sayesinde hücrelerde, gen ekspresyon analizleri ve tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) genotiplemelerini yapmak mümkün olmuştur. Test ve referans DNA örnekleri array üzerinde bulunan prob DNA'lar ile uygun koşullarda hibridize edilir. Hibridizasyondan sonra fazla olan işaretli DNA örneklerini ortamdan uzaklaştırmak için cam matriks yıkama işlemine tabi tutularak kurutulur. Floresan lazer ile elde edilen ışınlar bir dedektör yardımıyla algılanmaktadır. Işıma emisyon spektrumu ölçülür. Okunan emisyon spektrumu bilgisayar ortamına aktarılarak çeşitli analiz programları ile

değerlendirilir. Test ve referans DNA örneklerinin verileri birbiri üzerine çakıştırılarak, her noktacığın yeni bir renk vermesi sağlanır. Noktaların kırmızı yeşil oranları kaydedilir. Bu oranlara göre değerlendirme yapılır. Oran bir ise gen ekspresyonunda değişim yok, birden yüksek ise gen ekspresyonunda artış, birden düşük değerlerde ise gen ekspresyonunda düşme olarak değerlendirilir (Zamane, 2007).

Mikroarray temelli moleküler tayin birkaç temel avantaja sahiptir: i) Sınırsız sayıda çok sayıda analiz mümkündür (yani >tek bir çip üzerine sığabilen 250,000 özellik) ii) Tanımlamayı arttırmak için ihtiyaç fazlası probler her taksona kullanılabilir iii) Farklı DNA fragmentlerini aynı anda işaretleme mümkündür (Rao ve ark., 2006).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kimyasallar

Bu tezde kullanılan kimyasallar Çizelge 2.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasallar listesi

Kimyasallar	Üretici Firma
DMSO	Sigma Aldrich, ABD
RPMI 1640	Sigma Aldrich, ABD
FBS	Gibco, Güney Amerika
Penicilin- Streptomycin	Gibco, Güney Amerika
Tripsin-EDTA	Biochrom, Almanya
PBS 10X	Biological Industries, İsrail
Sisplatin	Sigma Aldrich, ABD
Gümüş nitrat	Himedia, Hindistan
Titanyum dioksit	ABCR GmbH 250 gram
Demir (II, III) oksit nanotozu (50-100 nm)	Sigma Aldrich, ABD
MTT kiti	Alfa Aesar, Almanya
Anneksin V-FITC flow kiti	BD Pharmingen, San Diego
Kaspaz-3 kiti	BD Pharmingen PE Caspase-3, San Diego
JC-1 kiti	BD MitoScreen, San Diego
TUNEL kiti	Santa Cruz Biotechnology, ABD
BrdU kiti	Santa Cruz Biotechnology, ABD
Hematoksilen/Eozin kiti	Santa Cruz Biotechnology, ABD

Çizelge 2.1. (Devam) Kullanılan kimyasallar listesi

Bcl-2 kiti	Santa Cruz Biotechnology, ABD
Bax kiti	Santa Cruz Biotechnology, ABD
Akridin oranj	Santa Cruz Biotechnology, ABD
Anneksin FITC	Santa Cruz Biotechnology, ABD
96 kuyucuklu plaka	Biofil
6 kuyucuklu plaka	Biofil
Flask 25 cm ² lik	TPP, ABD
Flask 75 cm ² lik	Thermo, Kore
Thoma lamı	Marienfeld, Almanya
Flow tüpleri (12x75 mm)	BD Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, ABD
High pure RNA izolasyon kiti (50 reaksiyon)	Roche, İsviçre
Ambion total RNA prep kit 24 reaksiyonluk	Illumina, ABD
Human HT-12 V 4 Bead mikroarray çip kiti (12 reaksiyon)	Illumina, ABD

2.2. Kullanılan araç ve gereçler

Kullanılan araç ve gereçler Çizelge 2.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Kullanılan teçhizat listesi

Kullanılan mevcut makine – Teçhizat listesi	
Adı/Modeli	Kullanım amacı
Sterilizatör/ Heraeus, Almanya	Hücre kültürü cam malzemelerin sterilizasyonu
Su banyosu/ Nüve BM 302	Hücre kültürü besiyerlerinin hazırlanması
Hassas terazi/ Ohaus, ABD	Kimyasalların tartımı
CO ₂ inkübatör/ Heraeus, Almanya	Hücre çoğaltılma ortamı
Mikroplaka okuyucu (ELİZA) / Bio.Tek.ELx808IU	Hücrelere uygulanan MTT testi için
Biogüvenlik kabini/ Holten, İngiltere	Hücrelerin pasajlanması, besi yeri hazırlığı gibi aşamalarda steril ortam sağlanması
Soğutmalı santrifüj/ Heraeus, Almanya	Hücrelerin çöktürülüp sediment oluşturulmasında
Pipet tabancası/ Eppendorf, Almanya	Besi yeri hazırlanmasında
Çok kanallı pipet seti/ Eppendorf, Almanya	Hücre kültürü çalışmalarında sıvı transferi için
Tek kanallı pipet seti / Eppendorf, Almanya	Hücre kültürü çalışmalarında sıvı transferi için

Çizelge 2.2. (Devam) Kullanılan teçhizat listesi

Sıvı azot taşıma ve materyal saklama tankı / Taylor Wharton RS-Series, ABD	Hücre stoklarının saklanması
Inverted mikroskop/ Olympus, ABD	Besi ortamındaki hücre çoğalmasının izlenmesinde ve immünohistokimyasal boyamaların görüntülenmesinde
Konfokal mikroskop/ Leica TCS-SP5 II, Almanya	Hücre çekirdek morfolojisinin görüntülenmesinde
TEM/ FEI, Hollanda	Hücre ultrastruktural yapıların görüntülenmesinde
Ultramikrotom cihazı/ LEICA EM UC6, Almanya	Hücrelerden 70-100 nm kalınlığında kesitlerin alınmasında
iScan cihazı/Illumina, ABD	Gen profillemeye analizinde

2.3. Hücre kültür modeli

A549 hücreleri, adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleridir. A549 hücreleri ilk kez 1972 de D.J. Giard ve ark. tarafından elde edilmiştir. Kanserli akciğer doku kültürü 58 yaşındaki bir Kafkasyalı erkekten alınmıştır (Giard ve ark., 1973). Bu hücreler tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir. A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleri, % 10 FBS ve % 1 penisilin-streptomisin içeren RPMI besiyeri içerisinde % 5 CO₂ ortamlı 37 °C’de bekletilerek kültüre edildi.

2.4. MTT canlılık belirleme

Hücreler, 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 5×10^3 yoğunlukta ekildi. Hücreler üzerine uygulanan maddeler çeşitli dozlarda (1-5-10-25-50-100-125-250-500-1000 μ M) % 5 CO₂ içeren hava ortamında 37 °C’de 24, 48 ve 72 saat süresince bekletildi. Maddelerin ana stok solüsyonu DMSO, PBS ve medyum

içerisinde hazırlandı. Bekleme sonunda PBS içerisinde 5mg/mL olacak şekilde çözülen MTT tozundan hazırlanan solüsyon her bir kuyucuğa 20 µl olacak şekilde eklendi ve 2-4 saat bekletildi. Sonrasında plakadan ortamdaki besiyeri uzaklaştırılıp 100 µl DMSO boyanın çözünmesi için her bir kuyucuğa ilave edildi ve 10 dakika bekletildi. ELİZA okuyucuda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okutuldu.

2.5. Anneksin V-FITC/ PI işaretleme

Hücreler, 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 10^5 yoğunlukta ekildi. Pozitif kontrol sisplatin ve gümüş nitratın IC_{50} (hücre canlılığını % 50 inhibe eden konsantrasyon) dozları, titanyum dioksitin (TiO_2) ve demir (II, III) oksitin (Fe_3O_4) IC_{30} dozları kuyucuklardaki hücreler üzerine uygulandı. Hücreler sonrasında % 5 CO_2 içeren hava ortamında $37\text{ }^\circ C$ 'de 72 saat süresince bekletildi. Sonrasında hücreler PBS ile yıkandı ve tripsin ya da hücre kazıyıcı kullanılarak kaldırıldı. Hücreler 15 ml lik tüplere toplanıp iki kez PBS ile yıkanarak her defasında santrifüj edildi. Bu işlem sonunda kitin Binding Buffer solüsyonu ile 100 µl her bir örneğe ilave edilerek bu hücreler Anneksin V-FITC (5µg/mL) ve PI (5µg/mL) ile oda sıcaklığında ($20-25\text{ }^\circ C$) karanlık ortamda 15 dakika işaretlendi. Örnek hücreler üzerine 400 µl Binding Buffer ilave edildi. En son olarak BD FACS Aria Cell Sorter flow cytometry cihazı ile analiz edildi.

2.6. Kaspaz- 3 işaretleme

Hücreler, 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 10^5 yoğunlukta ekildi. Pozitif kontrol sisplatin ve gümüş nitratın IC_{50} (hücre canlılığını % 50 inhibe eden konsantrasyon) dozları, titanyum dioksitin (TiO_2) ve demir (II, III) oksitin (Fe_3O_4) IC_{30} dozları kuyucuklardaki hücreler üzerine uygulandı. Hücreler sonrasında % 5 CO_2 içeren hava ortamında $37\text{ }^\circ C$ 'de 72 saat süresince bekletildi. Sonrasında hücreler kaldırıldı ve PBS ile iki kez yıkandı. BD Cytofix/Cytoperm solüsyon (her bir örnek için 0,5 ml) ile yeniden süspanse edilerek 20 dakika buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda santrifüj yapıldı. Pellet hücrelerden BD Cytofix/Cytoperm uzaklaştırıldı. BD Perm/Wash buffer (1X) (her bir örnek için 0,5 ml) ile hücreler iki kez yıkandı. Sonrasında her bir örnek için 100 µl BD

Perm/Wash buffer (1X) ve 20 µl antibodi eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda her örnek 1 ml BD Perm/Wash buffer ile yıkanarak ve santrifüj edilerek akış sitometri (Flow sitometri) cihazında okutulmak üzere 0,5 ml BD Perm/Wash buffer (1X) da süspansiyon edildi ve analiz yapıldı.

2.7. Mitokondriyal membran potansiyeli (JC-1 boyama)

Hücreler, 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 10^5 yoğunlukta ekildi. Pozitif kontrol sisplatin ve gümüş nitratın IC₅₀ (hücre canlılığını % 50 inhibe eden konsantrasyon) dozları, titanyum dioksit (TiO₂) ve demir (II, III) oksit (Fe₃O₄) IC₃₀ dozları kuyucuklardaki hücreler üzerine uygulandı. Hücreler sonrasında % 5 CO₂ içeren hava ortamında 37 °C'de 72 saat süresince bekletildi. Sonrasında hücreler kaldırıldı ve PBS ile yıkandı. Hücreler 400 x g de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. JC-1 boyama solüsyonu (1X assay buffer + JC1 stok solüsyon) her bir örneğe 0,5 ml şeklinde uygulandı. JC1 stok solüsyon 125 µl DMSO ile çözülerek hazırlandı. 1X assay buffer için (12.375 ml) 125 µl JC1 stok solüsyon gereklidir. Bu JC1 boyama solüsyonu içerisinde hücreler 10-15 dakika 37°C de inkübe edilir. İnkübasyon sonunda hücreler iki kez yıkandı. İlk yıkamada her bir örneğe 2 ml 1X assay buffer, ikinci yıkamada 1 ml 1X assay buffer uygulanarak yıkama sonrası 0,5 ml 1X assay buffer ile süspansiyon edilen hücreler flow sitometride okutuldu.

2.8. İmmünohistokimyasal işlemler

2.8.1. Doku tespiti

Gece boyunca veya en fazla 24 saat uygulanır. % 10 Formaldehit (nötral-tamponlanmış), 900 ml distile su (PH:7), 4 gr sodyum fosfat monobazik, 6.5 gr sodyum fosfat dibazik, 100 ml saf formol, itil, % 37-40 kullanıldı.

2.8.2. Doku gömme (Bloklaşma)

Amaç: Dokuların mikrotom cihazının blok tutucu yuvasına monte edebilir hale getirmek. Bunun için metal gömme kalıbına az miktarda parafin döküldü, pens yardımıyla dokular kalıba yerleştirildi. Soğuk bir kısma alındı. Kalıp içindeki

dokulara bastırılarak tabana eşit olarak yapışmaları sağlandı. Üzerine blok kaseti koyuldu. Blok kasetini deliklerini geçinceye kadar parafin ilave edildi.

2.8.3. Doku kesimi (mikrotom cihazı)

Mikrotom cihazı blok tutucu yuvasına blok kaseti takıldı. Dokunun ön yüzü tıraşlanarak doku bütünlüğüne ulaşıldı. 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Fırça yardımıyla 45 derece su banyosuna alınan kesitler kırıştırılmadan atıldı. Suda açılan kesitler lama alındı.

2.8.4. Doku takibi (yarı kapalı – tam kapalı doku takip cihazı)

Kesitler 1 er saat süresince % 60, % 70, % 80, % 90 alkol ve % 96 alkol serisinden geçirildi. En son olarak 1 saat absolu alkolde bekletildi. Bu süre sonunda ½ saat aseton, ksilen ve tekrar ksilen maddeleri kullanıldı. Üç kez de ½ saat parafinde bırakıldı. Doku takibi toplamda 16 saat sürdü.

2.9. Hematoksilen/Eozin işaretleme

Kesitlerin boyanmasında hematoksilen-eozin ikili boyası kullanılmıştır. Bu amaçla Harris Alum hematoksilen ve alkollü eozin boyaları hazır alınmıştır.

2.9.1. Deparaffinize işlem

Kesitler, 60 derecede 60 dakika etüv içinde bekletildi. Sonrasında 3 kere 5 dakika boyunca ksilene maruz bırakıldı.

2.9.2. Hidratasyon

Yüksek alkolden düşük alkole geçiş yapıldı. Absolu alkolde 1 dakika bekletildi. Sonrasında % 96, % 90, % 80, % 70 ve % 50 alkol serilerinde 1 er dakika bekletildi.

2.9.3. Boyama tekniği (Biopsi)

Akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi. Hematoksilen boyası 2 dakika bekletildi. Tekrar akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi. Asit-alkol (% 0.3) karışımına, 1 kez batırılıp çıkarıldı. Bu işlem fazla boyayı almak için yapılır. Akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi. Amonyak-su (% 1) karışımına 1 kez

batırılıp çıkarıldı. Amonyak parlak görüntü için yapılır. Akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi. % 96 alkole 5 kez batırılıp çıkarıldı (çalkalandı). Eozin Y (alkolik) 2 dakika bekletildi.

2.9.4. Dehidratasyon

Dehidratasyonun tekrar yapılma nedeni hücrelerde şeffaflığı sağlamaktır. % 70, % 90, % 96 ve absölü alkol serisinde 10 kez çalkalandı. Ksilende (üç ayrı ksilende) 5 kez çalkalandı.

2.9.5. Monte etme (kapama işlemi)

Lam ortasına 1 damla entellan damlatıldı. 24x60 lamel 45 derece açı ile yayma yapar gibi kapatıldı.

2.10. TUNEL parafin gömme

2.10.1. Deparaffinize işlem

Kesitler, 60 derecede 60 dakika etüv içinde bekletildi. Sonrasında 3 kere 5 dakika boyunca ksilene maruz bırakıldı.

2.10.2. Hidratasyon

Yüksek alkolden düşük alkole geçiş yapıldı. Absölü alkolde 1 dakika bekletildi. Sonrasında % 96, % 90 % 80, % 70 ve % 50 alkol serilerinde 1 er dakika bekletildi.

2.10.3. Boyama tekniği (Biopsi)

Kesitler distile suya indirgenir. Proteinaz K enzim (37 derece etüv içinde) 15 dakika bekletildi. Bu enzim hücreyi şişirmek için uygulanır. Bu durum boyama kabiliyetini artırır. PBS, 3 dakika bekletildi. Hidrojen Peroksit (% 3 sulandırılmış) 5 dakika bekletildi. Endojen peroksit aktivitesini inhibe eder. İstenmeyen zemin boyanmasını önler. PBS, 3 dakika bekletildi. Sonrasında Equilibration Buffer 3 dakika bekletildi. İstenmeyen zemin boyanmasını önler. TdT enzim çalışma solüsyonu (37 derece etüv içinde) 60 dakika bekletildi.

Working Stop/Wash buffer 3 dakika bekletildi. PBS 3 dakika bekletildi. Digoksigenin peroksidaz 30 dakika bekletildi. Sekonder antikordur. Kromojene bağlanmayı sağlar. PBS, 3 dakika bekletildi. DAB Chromogen 5 dakika bekletildi. Distile su 1 dakika bekletildi. Metil Greene 10 dakika maruz bırakıldı. Zemin boyamaktadır. Distile su ile 2 kez 1'er dakika değiştirilmiştir. Absolü alkole 5 kez lamlar daldırılıp çıkarıldı. Hücrenin suyunu almak için yapılır. Ksilene (3 ayrı ksilende) 10 kez daldırılıp çıkarıldı. Hücreyi şeffaf hale getirmektedir. Böylece mikroskopta parlak görüntü elde edilir. Entellan 2 damla damlatıp lamel ile kapatıldı.

2.11. BrdU işaretleme

2.11.1. Deparaffinize işlem

Kesitler 60 derecede 60 dakika etüv içinde bekletildi. Ksilende (üç ayrı ksilende) 10 dakika bekletildi.

2.11.2. Hidratasyon

Yüksek alkolden düşük alkole geçiş yapılır. Absolü alkol, % 96, % 70 alkol serilerinden sırası ile 1 er dakika bekletildi. Akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi. Distile suda 1 dakika bekletildi.

2.11.3. Boyama tekniği (Biopsi)

Antigen retrievel ile hücrelerde ortamdaki antijen maskelenmesi kaldırılır. Düdüklü tencere içinde basınç uygulanarak yapılır. Düdüklü tencerenin içine sitrat (PH:6):1/10 dilue koyuldu. Kapalı kutu içinde nemli ortamda yapılır. Solüsyonlar lam yüzeyindeki doku üzerini örtecek şekilde damlatıldı. Doku sınırlama kalemi ile dokuların etrafı çizildi. Distile suda 30 saniye bekletildi. Hidrojen peroksit (% 3 sulandırılmış) 10 dakika bekletildi. Distile suda 30 saniye bekletildi. PBS 3 dakika bekletildi. Serum blok solüsyonu 5 dakika bekletildi. Primer antipodi (BrdU) 1 saat bekletildi. PBS 3 dakika bekletildi. HRP polimer 20 dakika bekletildi. Sekonder antikordur. PBS 3 dakika bekletildi. Kromogen DAB 3 dakika bekletildi. Akan çeşme suyunda 30 saniye bekletildi.

2.11.4. Dehidratasyon

Dehidratasyonun tekrar yapılma nedeni hücrelerde şeffaflığı sağlamaktır. % 70, % 90, % 96 ve absölü alkol serisinden sırasıyla geçirilerek 10 kez çalkalandı. Ksilende (üç ayrı ksilende) 5 kez çalkalandı.

2.11.5. Monte etme (kapama işlemi)

Lam ortasına 1 damla entellan damlatıldı. 24x60 lamel 45 derece açı ile yayma yapar gibi kapatıldı.

2.12. Bcl-2 işaretleme

Bcl-2 immünsitokimyasal incelenmesi için Anti-Bcl-2 antikor (ab7973)(Abcam) kullanılmıştır.

2.12.1. Deparaffinize işlem

Kesitler, 60 derecede 60 dakika etüv içinde bekletildi. Ksilen (üç ayrı ksilende) 10 dakika bekletildi.

2.12.2. Hidratasyon

Yüksek alkolden düşük alkole geçiş yapılır. Absölü alkol, % 96, % 90 ve % 70 alkol serilerinde 1 er dakika bekletildi. Akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi. Distile suda 1 dakika bekletildi. Uygulama düdüklü tencere içinde basınç uygulanarak yapıldı. Düdüklü tencerenin içine sitrat (PH:6):1/10 dilue koyuldu.

2.12.3. Boyama tekniği (Biopsi)

Boyama tekniği, kapalı kutu içinde nemli ortamda yapıldı. Solüsyonlar lam yüzeyindeki doku üzerini örtecek şekilde damlatıldı. Doku sınırlama kalemi ile dokuların etrafı çizildi. Distile suda 30 saniye bekletildi. Hidrojen peroksit (%3 sulandırılmış) 10 dakika bekletildi. Distile suda 30 saniye bekletildi. PBS 3 dakika bekletildi. Serum blok solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Primer antipodi (Bcl-2) 1 saat bekletildi. PBS 3 dakika bekletildi. Amplifier 20 dakika bekletildi. PBS, 3 dakika bekletildi. HRP polimer, 20 dakika bekletildi. PBS, 3 dakika bekletildi.

Kromojen AEC, 3 dakika bekletildi. Akan çeşme suyu, 30 saniye bekletildi. Hematoksilen boyası, 1 dakika bekletildi. Akan çeşme suyu, 1 dakika bekletildi. Distile su, 30 saniye bekletildi. Lam üzerindeki kesitler oda ısısında kurutuldu. Su bazlı kapama maddesi (Aqueous mounting medium) 2 damla damlatılıp lamel ile kapatıldı.

2.13. Bax işaretleme

Bax immünsitokimyasal incelenmesi için Anti-Bax antikor (ab7977) (Abcam)'ları kullanılmıştır.

2.13.1. Deparaffinize işlem

Kesitler, 60 derecede 60 dakika etüv içinde bekletildi. Ksilen (üç ayrı ksilende) 10 dakika bekletildi.

2.13.2. Hidratasyon

Yüksek alkolden düşük alkole geçiş yapılır. Absolü alkol, % 96, % 90 ve % 70 alkol serisinde sırasıyla 1 er dakika bekletildi. Akan çeşme suyunda 1 dakika bekletildi. Distile suda 1 dakika bekletildi. Uygulama düdüklü tencere içinde basınç uygulanarak yapıldı. Düdüklü tencerenin içine sitrat (PH:6):1/10 dilue koyuldu.

2.13.3. Boyama tekniği (Biopsi)

Kapalı kutu içinde nemli ortamda yapılır. Solüsyonlar lam yüzeyindeki doku üzerini örtecek şekilde damlatıldı. Doku sınırlama kalemi ile dokuların etrafı çizildi. Distile su, 30 saniye bekletildi. Hidrojen peroksit (% 3 sulandırılmış), 10 dakika bekletildi. Distile su, 30 saniye bekletildi. PBS, 3 dakika bekletildi. Serum blok solüsyonu, 5 dakika bekletildi. Primer antipodi (Bax), 1 saat bekletildi. PBS, 3 dakika bekletildi. Amplifier, 20 dakika bekletildi. PBS, 3 dakika bekletildi. HRP polimer, 20 dakika bekletildi. PBS, 3 dakika bekletildi. Kromojen, AEC, 3 dakika bekletildi. Akan çeşme suyu, 30 saniye bekletildi. Hematoksilen boyası, 1 dakika bekletildi. Akan çeşme suyu, 1 dakika bekletildi. Distile su, 30 saniye bekletildi.

Lam üzerindeki kesitler oda ısısında kurutuldu. Su bazlı kapama maddesi (Aqueous mounting medium) 2 damla damlatılıp lamel ile kapatıldı.

2.14. Konfokal mikroskopi analizi

Uygulanan maddelerin (Pozitif kontrol sisplatin, gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir (II, III) oksit nanotozunun) IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonları verilen A549 hücreleri 6 kuyucuklu plakada 37 ° C de 72 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler PBS ile yıkanıp akridin oranj ve Anneksin FITC floresan boya ile boyanarak hücrelerde çekirdek ve hücre zarlarının yapısına bakıldı. Apoptotik ve nekrotik hücreler belirlenmiştir. Doku üzerindeki yapısal değişiklikler Leica TCS-SP5 II konfokal mikroskop kullanılarak görüntülendi ve Leica confocal Software version 2.00 programı kullanıldı.

2.15. Geçirimli elektron mikroskopi analizi

Uygulanan maddelerin (Pozitif kontrol sisplatin, gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir (II, III) oksit nanotozunun) IC₅₀ ve IC₃₀ konsantrasyonları verilen A549 hücreleri 75 cm² lik flaklarda 37 ° C de 72 saat süresince inkübe edildi. Sonrasında kaldırılan hücreler 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve 0.1 M PBS içindeki % 2.5 glutaraldehit ile fikse edildi. Fikse edilen pelletler aynı fiksatif içerisinde 4 ° C de gece boyunca bırakıldı. Bu süre sonunda pelletler agara gömüldü ve bir kez daha osmiyum tetroksit (% 2) içerisinde fikse edildi. Daha sonra dehidratasyon (% 70, % 90, % 96 etil alkol) yapıldı ve en son saf etanolde (% 100) dehidre edildi. EPON 812 epoxy resine gömülen dehidre hücrelerin ultramikrotom (LEICA EM UC6) ile 100 nm kalınlığında elmas bıçak kullanılarak ince kesitleri alındı. Kesitler kurşun sitrat ve uranil asetat ile boyandı ve TEM görüntüleme yapıldı.

2.16. Gen ekspresyonu analizi (cDNA mikroarray)

2.16.1. RNA izolasyonu

2.16.1.1. Yüksek saflıkta RNA izolasyon kiti

Kültür hücreleri, memeli kanı, beyaz kan hücreleri (WBCs), maya ve bakteriler gibi çok sayıda örnekten bozulmamış toplam RNA'yı izole etmek için yüksek saflıkta RNA izolasyon kiti kullanılmaktadır. RT-PCR ve diğer uygulamalarda yüksek hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve özgünlük sağlamaktadır (Roche, 2008).

2.16.1.2. Prosedür

Hücreler, 10^6 - 10^7 75 cm²'lik flasklarda kültüre edildi. Üzerlerine maddelerin belirlenen dozları (Pozitif kontrol sisplatin IC₅₀, gümüş nitrat IC₅₀, titanyum dioksit IC₃₀ ve demir (II, III) oksit nanotozu IC₃₀) uygulanarak 72 saat süresince inkübe edildi. Sonrasında hücreler ortamından kaldırıldı ve santrifüj edildi. Sonrasında her bir örneğin pelleti üzerine 200 µl PBS ilave edilerek 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Bu örnekler -80 ° C ortamda saklandı (Roche, 2008).

RNA izolasyonu için her bir örneğe 400 µl Lysis/Binding Buffer eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Vorteksten sonra örnekler filtrelili kolon tüplere aktarıldı. İstenilen mRNA bu filtrelerden geçmektedir. Filtrelili tüpler 15 saniye 8000 x g'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra filtrelili kısım toplanan tüpten ayrıldı. Bu aşamadan sonra Elution Buffer'da çözülen DNaz 1 -20 ° C'den alınarak her reaksiyon için 90 µl DNaz I Incubation Buffer + 10 µl DNaz I ilave edildi. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Sonrasında her bir örneğe 500 µl Wash Buffer I koyuldu ve 15 saniye 8000 x g'de santrifüj edildi. Bunu takiben Wash Buffer II 500 µl her bir örneğe ilave edildi ve 15 saniye 8000 x g'de santrifüj edildi. Son olarak 200 µl Wash Buffer II den koyuldu ve 13000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. Filtrelili tüplerden örnekleri mikrosantrifüj eppendorf tüplere aktarmak için 50 µl Elution Buffer koyuldu. Tüpler 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpler pürifiye RNA'yı içermektedir. Örneklerin,

nanodrop cihazında saflık ve konsantrasyon miktarı ölçüldü. Mikrolitrede kaç nanogram olduğu ölçülmektedir (Şekil 2.1). Bu örnekler doğrudan RT-PCR analizi için kullanılabilir ya da sonraki analizler için -80 ° C’de saklanmaktadır (Roche, 2008).



Şekil 2.1. DNA ve RNA saflık konsantrasyonunu ölçen nanodrop cihazı

2.16.2. cDNA sentezi

cDNA sentezi için örnekler -80 ° C’den alındı ve 200 µl’lik PCR tüplerine 2 µl Total mRNA + 1µl T7 Oligo (dT) primeri olacak şekilde aktarıldı ve 65 ° C de 5 dakika Thermal Cycler cihazında bekletildi. Cihazdan alınan örneklerde Oligo dTler, Poli A kuyruğuna tutunmaktadır. Örnekler santrifüj edildi. Hazırlanan karışımdan (1.5 µl 1-st-Strand cDNA PreMix + 0.25 µl DTT + 0.25 µl SuperScript III Reverse Transcriptase = 2 µl Total reaksiyon) her bir örneğe 2 µl koyuldu. Thermal Cycler cihazında 50 ° C de 30 dakika bekletildi. Strand DNA polimeraz 65 ° C de 10 dakika bekletildi ve spin yapıldı. Sonrasında 80 ° C de 3 dakika bekletildi. cDNA oluşturuldu. Bu aşamadan sonra cDNA transkripsiyonu yapıldı. T7 Transkripsiyon Buffer ve NTP Premix solusyonlar karıştırıldı. 2 µl T7 Transkripsiyon Buffer + 3 µl UTP/Biotin-UTP + 10 µl NTP Premix + 3 µl DTT + 2 µl T7 RNA polimeraz = 20 µl Total reaksiyon volume her bir örnek için kullanıldı. Bu karışım örneklere ilave edildikten sonra 4 saat süresince 42 ° C de bekletildi. Bekleme sonunda 2 µl RNaz-Free DNaz I eklendi ve 37 ° C de 15 dakika bekletildi. Bunları koymanın amacı kalıntı olan ortamdaki DNA’lardan kurtulmak ve ortamda sadece cRNA’ların kalmasını sağlamaktır. Sonraki aşama için örnekler bir süre -80 ° C de saklandı.

2.16.3. Saflaştırma (cRNA elde edilmesi)

Saflaştırma aşamasında örneklerin her birine 20 µl DNaz/RNaz Free Water ve RNA binding Bufferdan 100 µl koyuldu. Ne kadar karışım varsa o miktarda etanol eklendi. Örnekler kolon tüplere aktarıldı ve 12000 x g 'de 1 dakika santrifüj edildi. Örnekler 400 µl RNA Prep Buffer eklendi ve 12000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında 800 µl RNA Wash Buffer koyuldu ve 12000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi. Sonra 400 µl RNA Wash Buffer ile tekrar yıkama yapıldı. Santrifüj 12000 x g'de 30 saniye yapıldı. Filtreli tüplerin alt kolon tüpleri değiştirildi ve 12000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. RNA'nın kolon tüplere filtreden geçişi için 25 µl DNaz/RNaz Free Water her bir örneğe ilave edildi. Sonrasında 10000 x g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Nanodrop cihazında örnekler kontrol amaçlı okutuldu (Şekil 2.1). Mikrolitredeki cRNA miktarı bir sonraki aşama için önemlidir. Bir sonraki aşama için örnekler -80 °C de saklandı.

2.16.4. Array çalışması (Hibridizasyon)

Array aşamasında cRNA seyreltildi. Örnekler, 1000 µl lik tüplerden 200 µl lik tüplere aktarıldı. Örneklerden kontrol 4 tekrarlı diğer 4 örnek 2 tekrarlı olacak şekilde dizayn edildi (Şekil 2.2). Çünkü array çalışmasında kullanacağımız çip 12 örneklilik bölmeye sahiptir. Analizimiz bu bölme sayısına göre ayarlandı. Her bir örnekten 10 µl alınarak geri kalan kısmı steril su ile 150 µl ye tamamlandı ve spinlendi. Örnekler yoğunluk miktarını belirlemek için nanodrop cihazında okutuldu (Şekil 2.1). Sonrasında örnekler 65 °C'de 5 dakika bekletildi. Bekleme sonunda santrifüj yapıldı. Örneklerden 5 µl ve Hyb Bufferdan 10 µl alınarak karışımlar 200 µl'lik 12 tüpe aktarıldı.



Şekil 2.2. Array için çipe aktarılabacak örnek sayısı

Sonrasında çip platformu hazırlandı (Şekil 2.3). Platformdaki yuvalara 200 µl Hyb Buffer koyuldu. Platforma yerleştirilen array çipine 12 örnek yuva başlarından yüklendi (Şekil 2.4). Çip platforma yerleştirilerek hibridizasyon fırınında 14-20 saat 58 °C de bekletildi. Ertesi gün için 55 °C de su banyosu hazırlandı. Bu işlem için High Temp Wash Buffer (1X) 50 ml + 450 ml steril su, su banyosuna koyularak beklemeye bırakıldı.

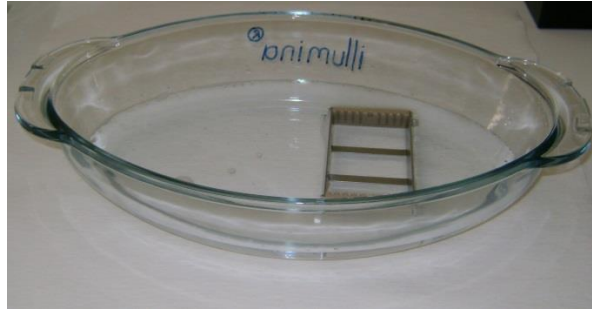


Şekil 2.3. Çip platformu

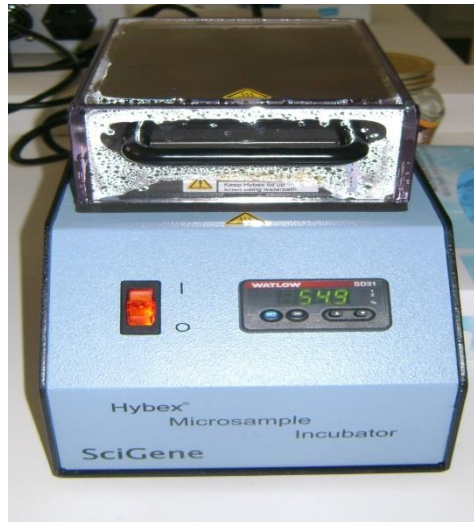


Şekil 2.4. Array çipi

Bekleme sonunda 1 litre suya 3 ml WC Wash Buffer koyularak 250 ml bir küvete 250 ml başka bir küvete koyuldu. Çip hibridizasyon cihazından alınarak küvetlerden birine yerleştirildi (Şekil 2.5). Sonrasında çip rekine yerleştirilip 10 dakika 55 °C de su banyosunda bekletildi (Şekil 2.6).



Şekil 2.5. Yıkama küveti



Şekil 2.6. Su banyosu

Su banyosundan alınan çipin bulunduğu rek, küvete yerleştirilip shakerda karıştırıldı (Şekil 2.7).



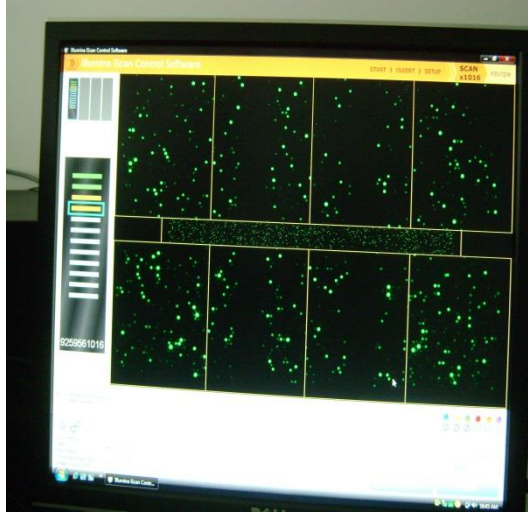
Şekil 2.7. Shaker (karıştırıcı)

2.16.5. Bloklama (Boyama ve yıkama)

Bloklama işleminde küvete 4 ml Block Buffer koyularak çip rekine yerleştirilip 10 dakika shakerda karıştırıldı. Beyaz küvetten başka bir küvete aktarılan çip 2 ml Block Buffer + 2 µl Streptovadin boyasından hazırlanmış karışım eklenerek üstü kapalı şekilde 10 dakika karıştırıldı. Shakerdan alınan çip kurutma cihazında 1400 rpm’de 4 dakika bekletildi. Sonrasında çip Illumina Scan Control Software programı kullanılarak (Şekil 2.9) Illumina iScan cihazında okutuldu (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. iScan (Görüntüleme) cihazı



Şekil 2.9. Illumina Scan Control Software programı kullanılarak eksprese genlerin belirlenmesi

2.17. İstatistiksel analiz

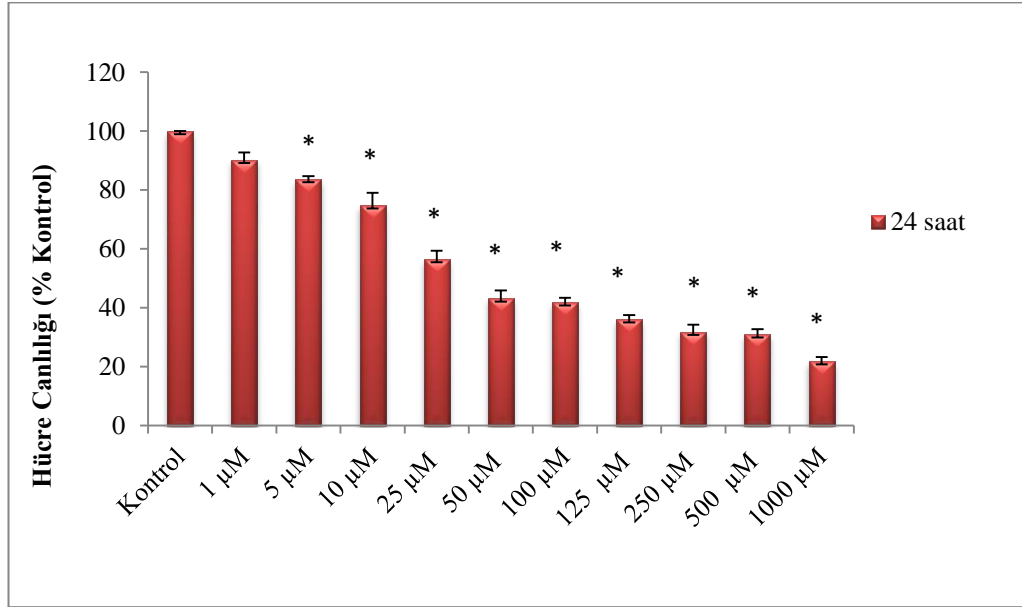
MTT sonuçlarının Microsoft Excell programında canlılık yüzdeleri belirlendikten sonra istatistiksel kıyaslama, SPSS 11.5 for Windows (Statistical Package for the Social Sciences) programında tek yönlü ANOVA ile post-hoc Tukey testi kullanılarak yapıldı. Anlamlılık değeri \pm SDs olarak ifade edildi ve $p < 0.05$ olarak gösterildi.

3. BULGULAR

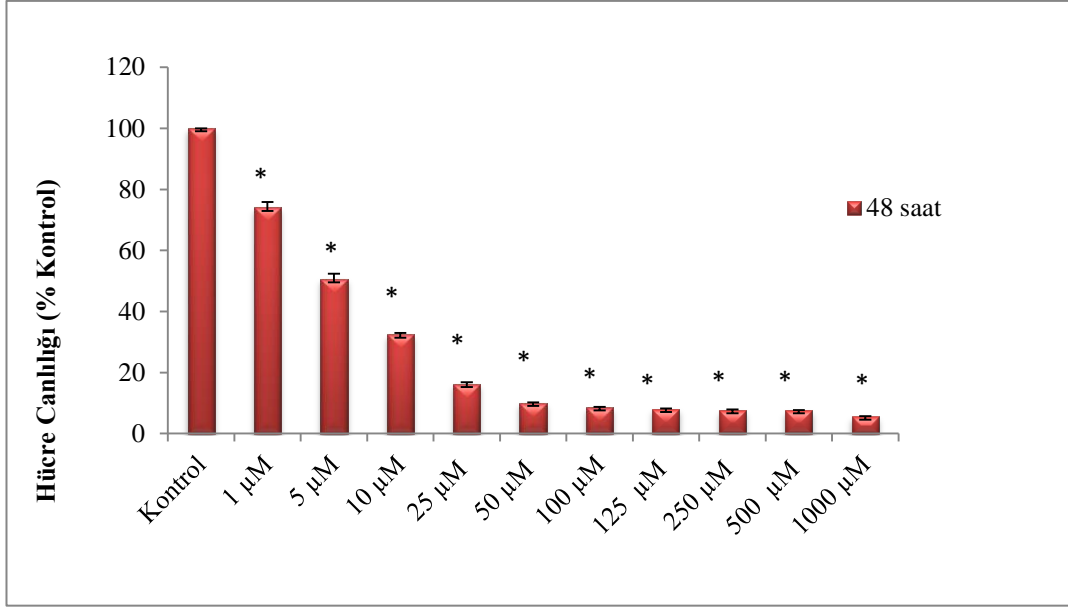
3.1. MTT sonuçları

3.1.1. Pozitif kontrol sisplatinin sitotoksik etkisi

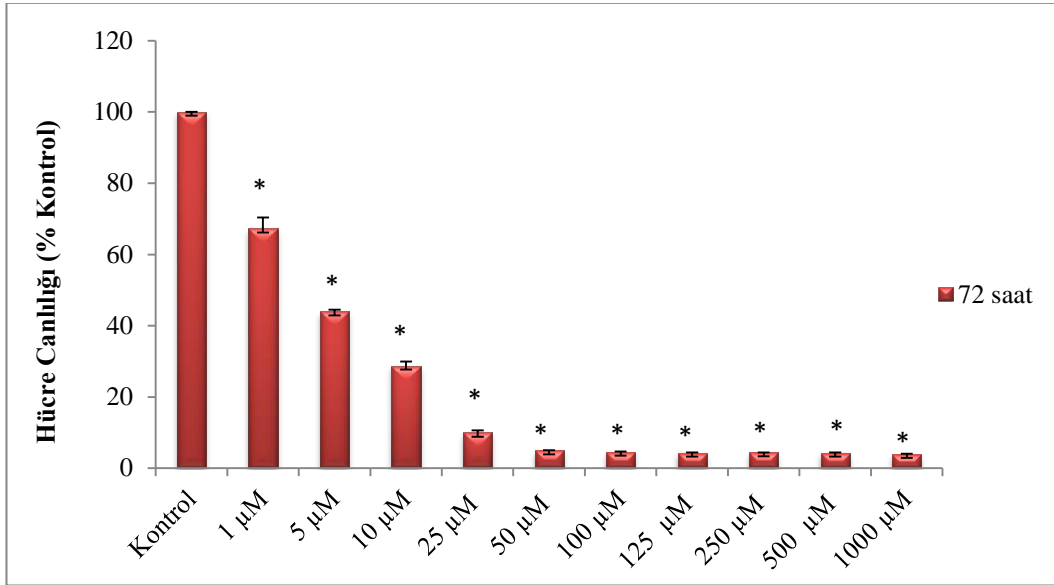
Sisplatinin sitotoksik etkisi, A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel kanseri hücre hatlarında 1-5-10-25-50-100-125-250-500-1000 μM doz aralığında 24, 48 ve 72 saat süre sonundaki etkileri belirlendi. Sisplatin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler gösterdi (Şekil 3.4). Sisplatinin sitotoksik etkisi sonucu A549 hücrelerinin canlılığı azalmıştır (Çizelge 3.1).



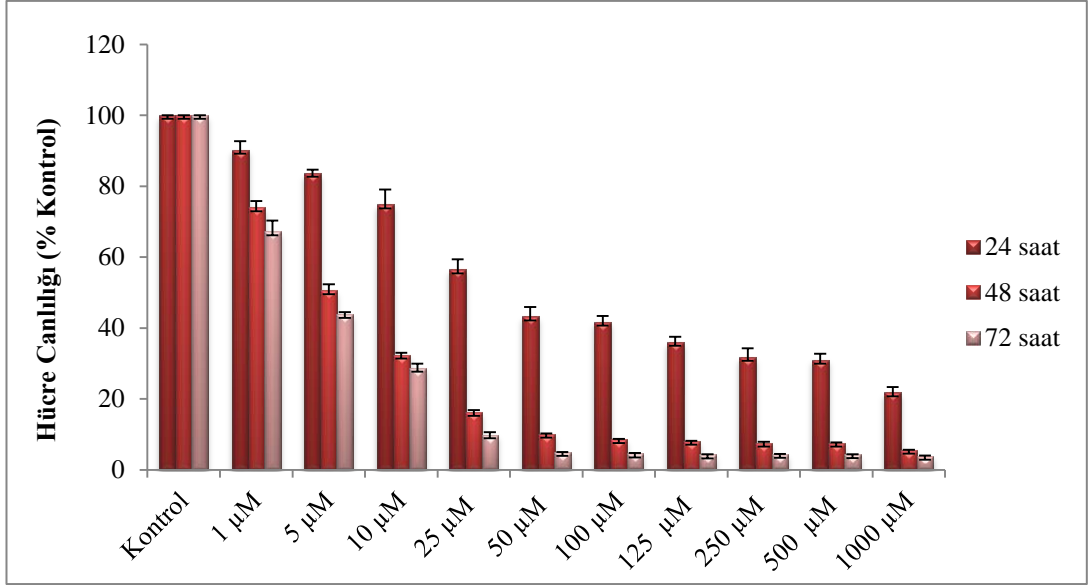
Şekil 3.1. Pozitif kontrol sisplatinin 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 3.2. Pozitif kontrol cisplatinin 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 3.3. Pozitif kontrol cisplatinin 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



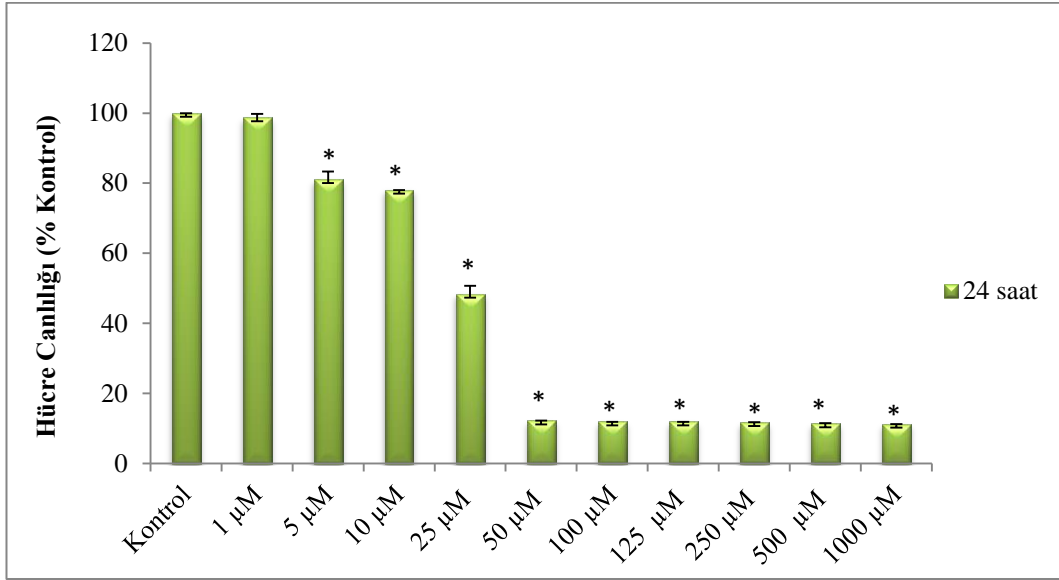
Şekil 3.4. Pozitif kontrol sisplatinin 24, 48 ve 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi

Çizelge 3.1. Pozitif kontrol sisplatinin MTT analizi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonundaki canlılık yüzdeleri

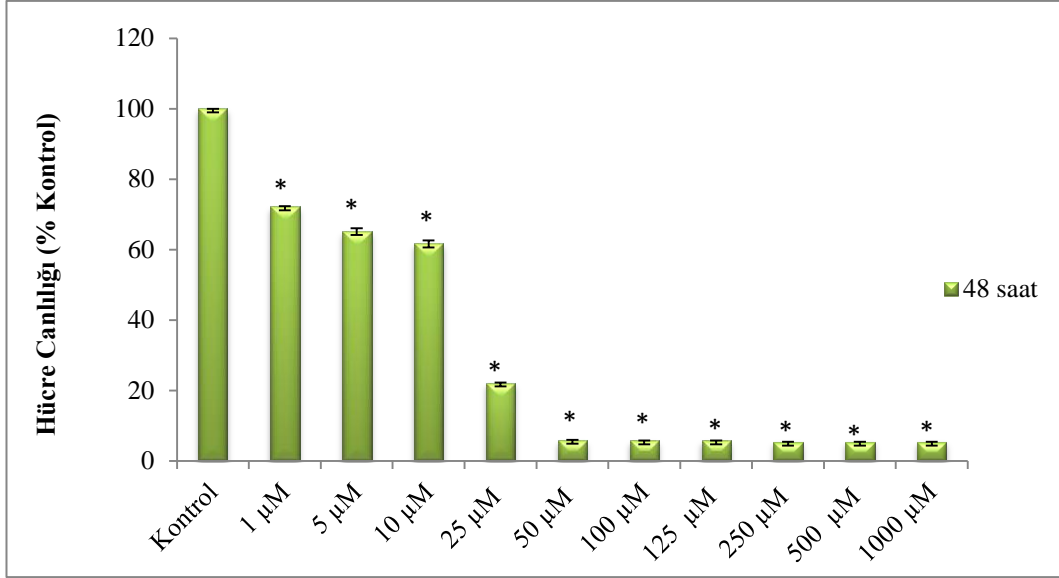
Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık (%)	48 saat canlılık (%)	72 saat canlılık (%)
1	90.1	73.9	67.1
5	83.6	50.5	43.8
10	74.7	32.3	28.6
25	56.4	16.2	9.8
50	43.1	10.0	4.8
100	41.7	8.5	4.4
125	36.0	8.0	4.2
250	31.7	7.5	4.3
500	30.9	7.5	4.2
1000	21.7	5.5	3.8

3.1.2. Gümüş nitratın (AgNO₃) sitotoksik etkisi

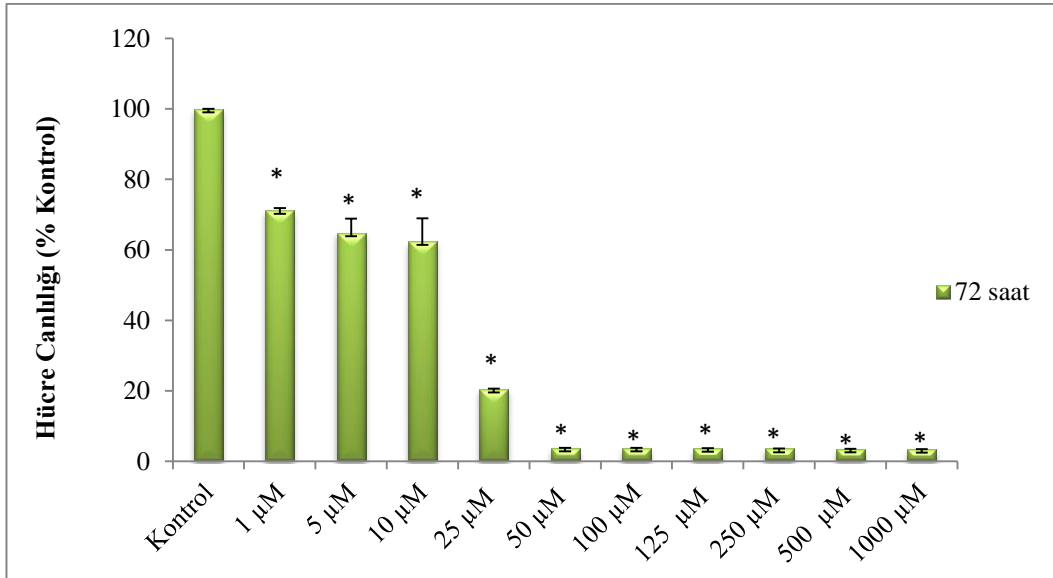
Gümüş nitratın sitotoksik etkisi, A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel kanseri hücre hatlarında 1-5-10-25-50-100-125-250-500-1000 µM doz aralığında 24, 48 ve 72 saat süre sonundaki etkileri belirlendi. Gümüş nitrat kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler gösterdi (Şekil 3.8) Gümüş nitratın sitotoksik etkisi sonucu A549 hücrelerinin canlılığı azalmıştır (Çizelge 3.2).



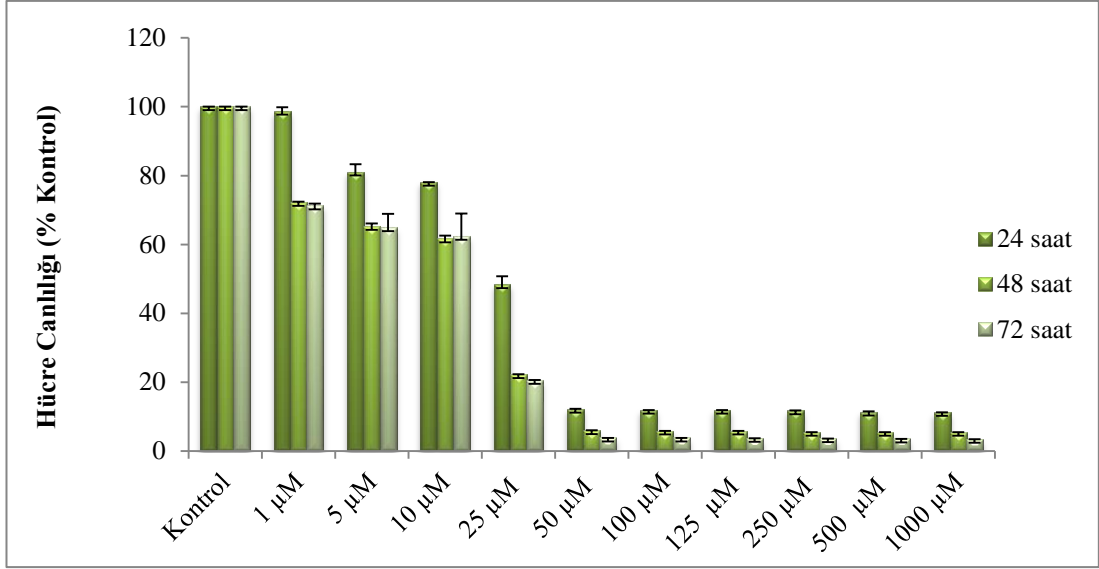
Şekil 3.5. Gümüş nitratın (AgNO₃) 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p<0,05



Şekil 3.6. Gümüş nitratın (AgNO_3) 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 3.7. Gümüş nitratın (AgNO_3) 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



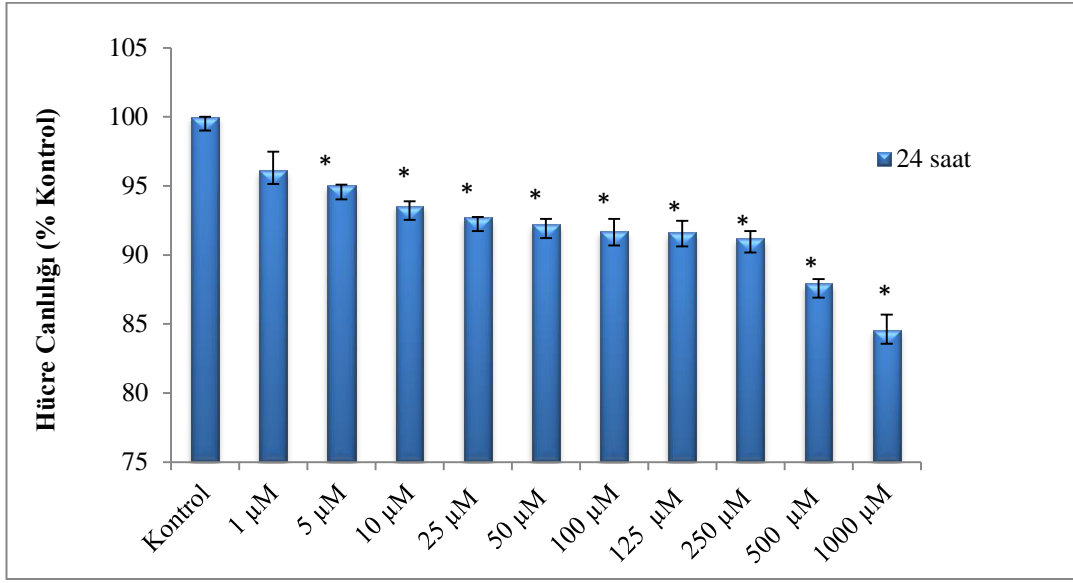
Şekil 3.8. Gümüş nitratin (AgNO_3) 24, 48 ve 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi

Çizelge 3.2. Gümüş nitratin MTT analizi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonundaki canlılık yüzdeleri

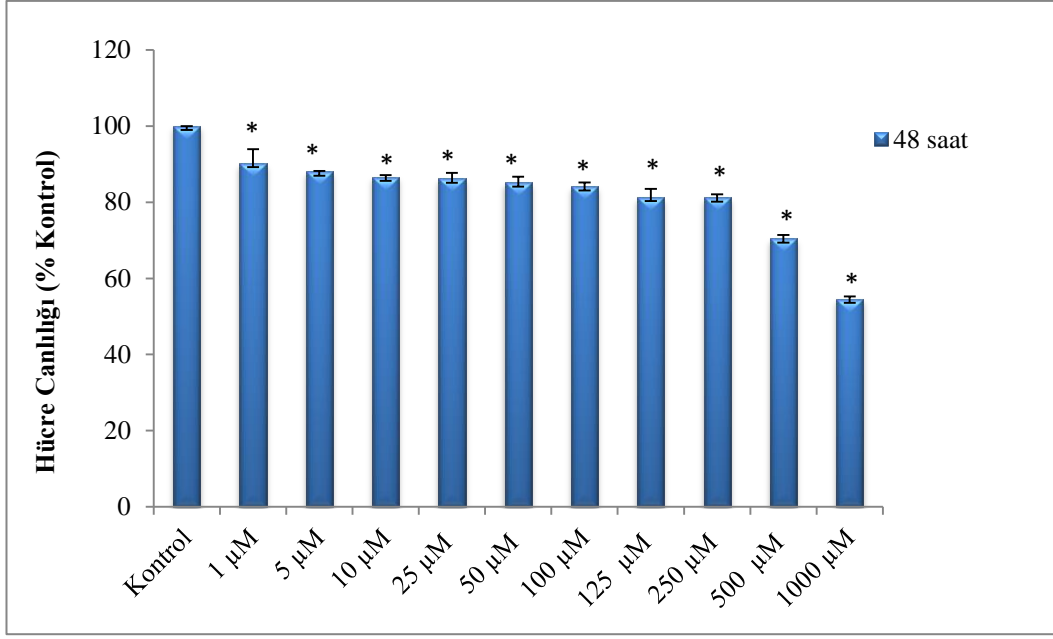
Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık (%)	48 saat canlılık (%)	72 saat canlılık (%)
1	98.6	72.2	71.1
5	81.0	65.1	64.8
10	78.0	61.6	62.3
25	48.2	22.1	20.4
50	12.1	5.9	3.7
100	11.8	5.7	3.7
125	11.8	5.7	3.6
250	11.6	5.3	3.5
500	11.3	5.3	3.5
1000	11.1	5.3	3.4

3.1.3. Titanyum dioksitin (TiO₂) sitotoksik etkisi

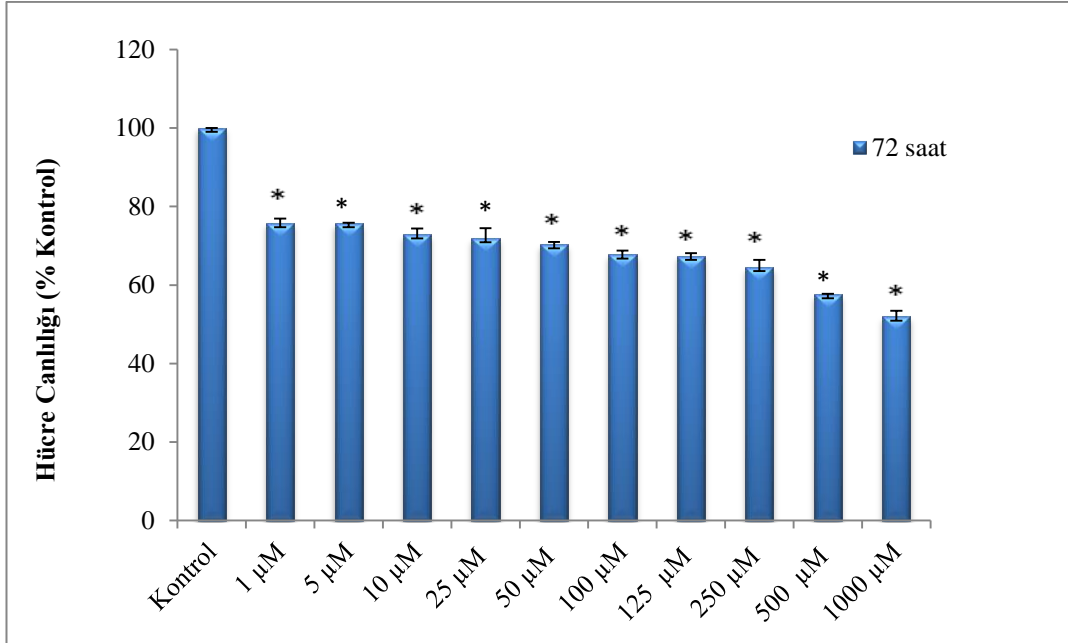
Titanyum dioksitin (TiO₂) sitotoksik etkisi, A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel kanseri hücre hatlarında 1-5-10-25-50-100-125-250-500-1000 µM doz aralığında belirlendi. Titanyum dioksit, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler gösterdi (Şekil 3.12). Titanyum dioksitin sitotoksik etkisi sonucu A549 hücrelerinin canlılığı azalmıştır (Çizelge 3.3).



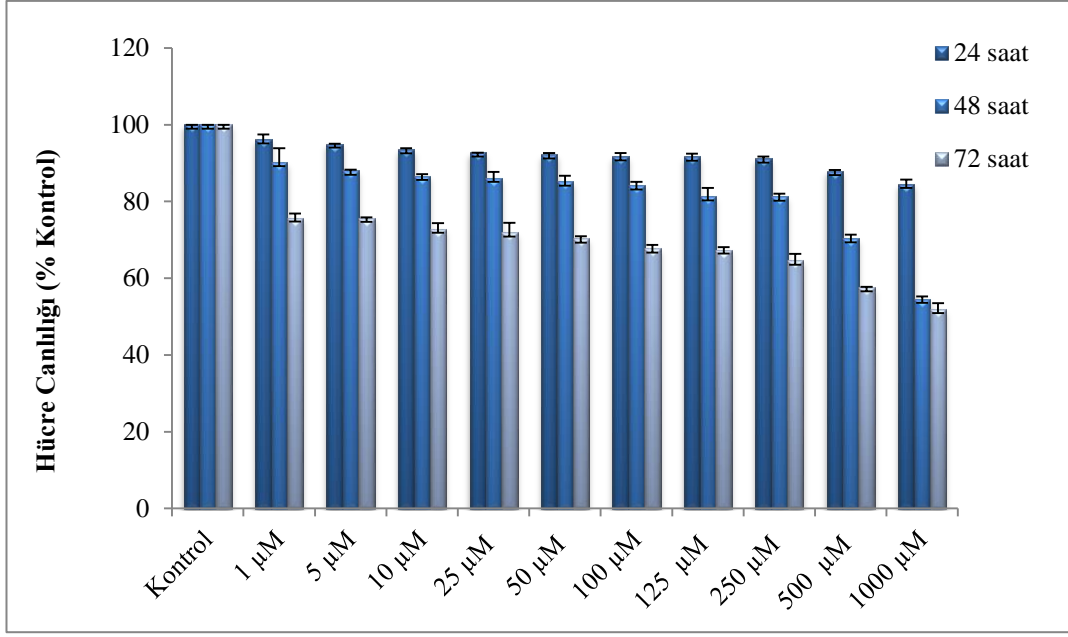
Şekil 3.9. Titanyum dioksitin (TiO₂) 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p<0,05



Şekil 3.10. Titanyum dioksitin (TiO_2) 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 3.11. Titanyum dioksitin (TiO_2) 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



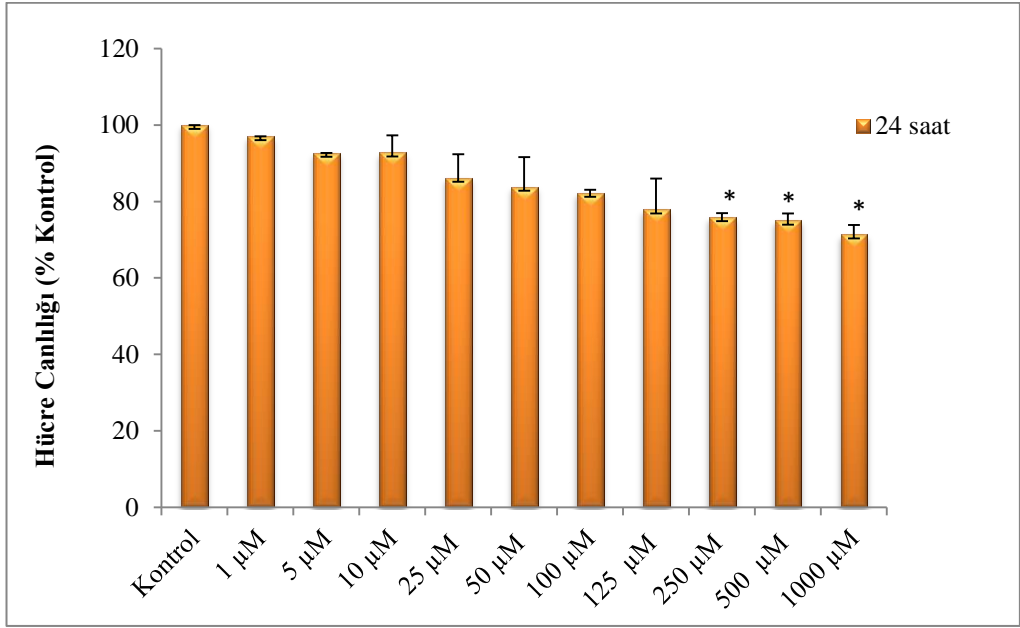
Şekil 3.12. Titanium dioksitin (TiO₂) 24, 48 ve 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi

Çizelge 3.3. Titanium dioksitin, MTT analizi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonundaki canlılık yüzdeleri

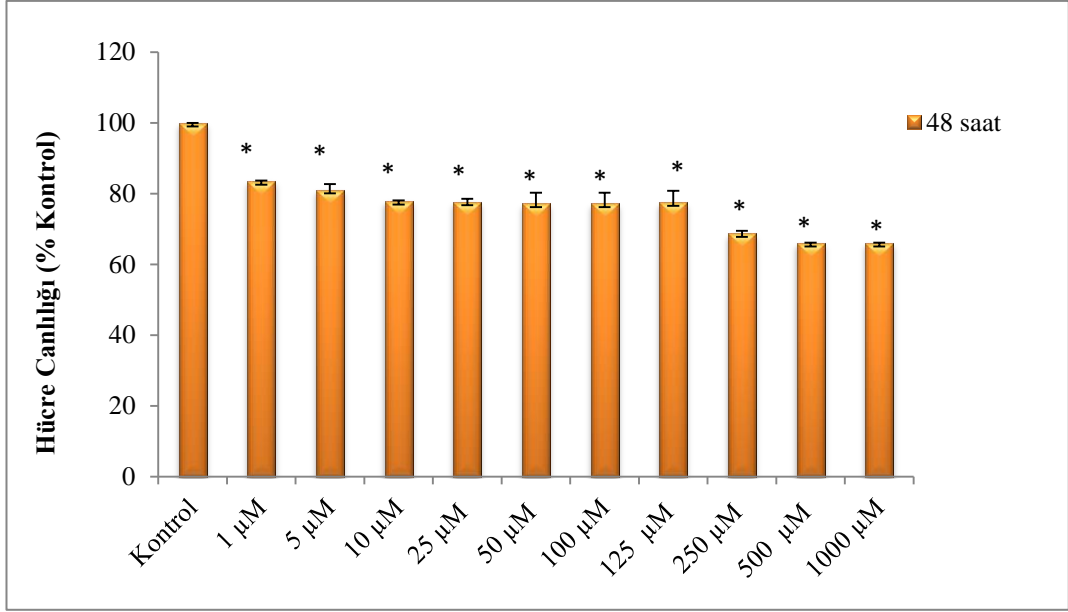
Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık (%)	48 saat canlılık (%)	72 saat canlılık (%)
1	96.1	90.2	75.7
5	95.0	88.0	75.6
10	93.5	86.6	72.8
25	92.7	86.1	71.9
50	92.2	85.1	70.3
100	91.6	84.1	67.7
125	91.6	81.3	67.4
250	91.1	81.1	64.5
500	87.9	70.3	57.5
1000	84.5	54.5	51.9

3.1.4. Demir (II, III) oksit (Fe₃O₄) nanotozunun sitotoksik etkisi

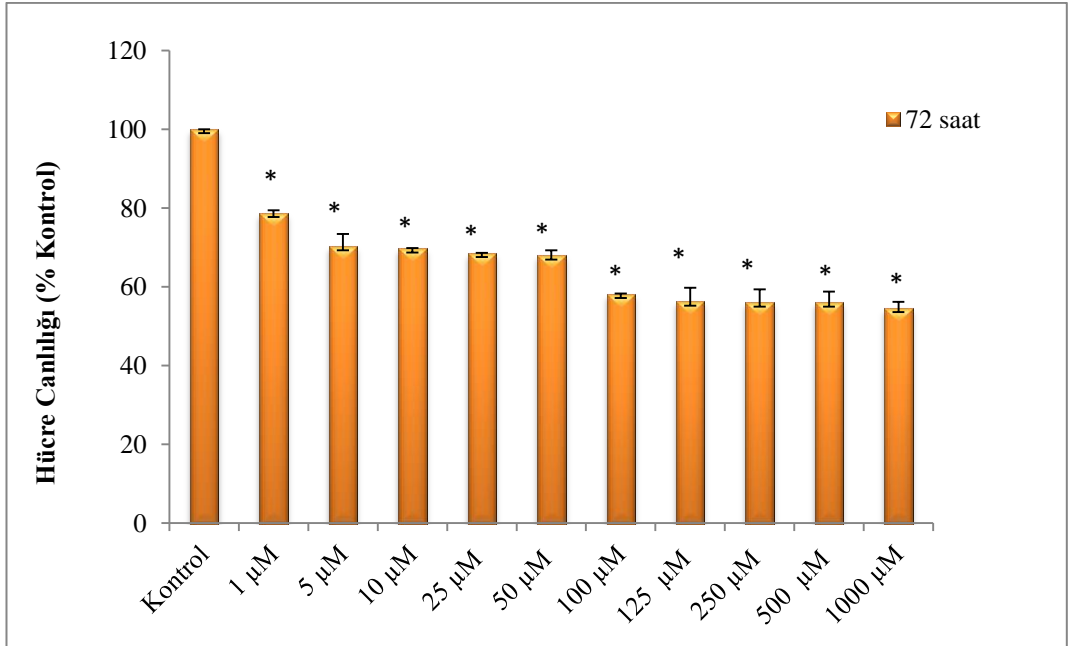
Demir (II, III) oksit nanotozlarının sitotoksik etkisi, A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel kanseri hücre hatlarında 1-5-10-25-50-100-125-250-500-1000 µM doz aralığında belirlendi. Demir (II, III) oksit nanotozları, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler gösterdi (Şekil 3.16). Demir oksit nanotozunun sitotoksik etkisi sonucu A549 hücrelerinin canlılığı azalmıştır (Çizelge 3.4).



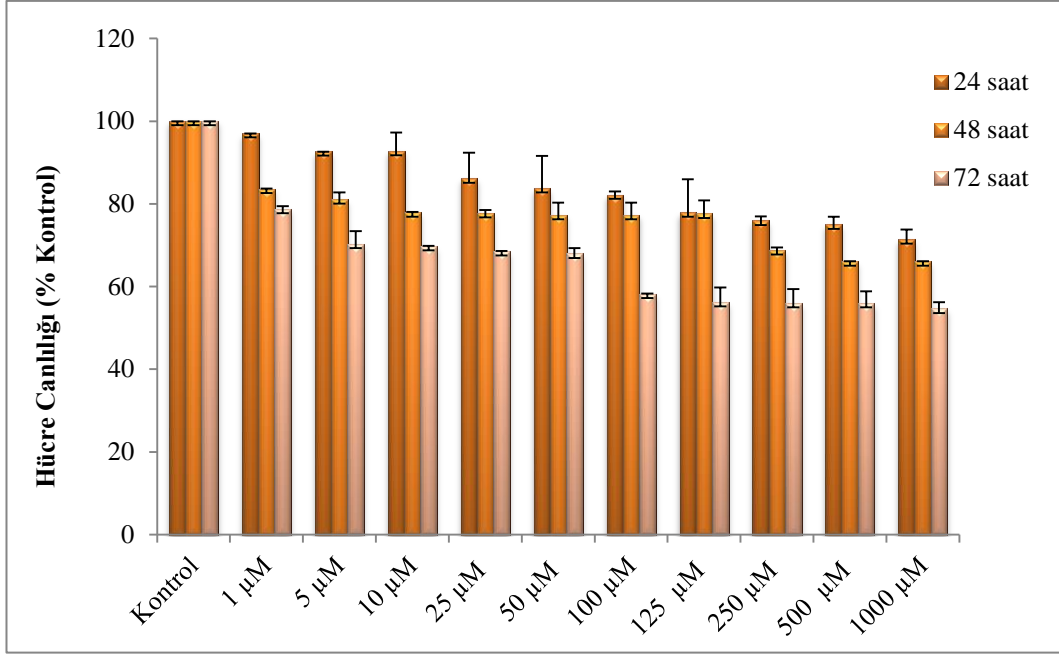
Şekil 3.13. Demir (II, III) oksit (Fe₃O₄) nanotozları 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p<0,05



Şekil 3.14. Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 3.15. Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$



Şekil 3.16. Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları 24, 48 ve 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda A549 hücreleri üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi

Çizelge 3.4. Demir (II, III) oksit nanotozunun, MTT analizi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonundaki canlılık yüzdeleri

Uygulanan konsantrasyonlar (µM)	24 saat canlılık (%)	48 saat canlılık (%)	72 saat canlılık (%)
1	97.0	83.5	78.7
5	92.6	81.0	70.2
10	92.7	77.9	69.7
25	86.1	77.7	68.5
50	83.7	77.2	67.9
100	82.2	77.2	58.2
125	77.8	77.5	56.2
250	75.8	68.7	55.9
500	74.9	66.0	55.9
1000	71.3	66.0	54.5

MTT analizi sonuçlarına göre maddelerin 24, 48 ve 72 saat sonundaki IC₅₀ (Pozitif kontrol sisplatin ve gümüş nitrat) ve IC₃₀ (Titanyum dioksit ve demir oksit nanotozu) değerleri Microsoft Excell grafiksel değerlendirmeleri sonucunda belirlendi. Sonraki deneyler maddelerin (Pozitif kontrol sisplatin, gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir oksit nanotozu) 72 saat sonundaki IC₅₀ ve IC₃₀ değerleri baz alınarak yapıldı. Pozitif kontrol sisplatinin IC₅₀ (hücre canlılığını %50 oranında inhibe eden değer) değeri 24 saat sonunda 31.25 µM, 48 saat sonunda 5.1 µM ve 72 saat sonunda 3 µM değerinde belirlendi. Gümüş nitratın IC₅₀ (hücre canlılığını %50 oranında inhibe eden değer) değeri 24 saat sonunda 24.75 µM, 48 saat sonunda 15 µM ve 72 saat sonunda 13.5 µM değerinde belirlendi. Titanyum dioksitin IC₃₀ (hücre canlılığını %30 oranında inhibe eden değer) değeri 72 saat sonunda 50 µM ve demir oksit nanotozunun IC₃₀ (hücre canlılığını %30 oranında inhibe eden değer) değeri 72 saat sonunda 5 µM olarak belirlendi (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. MTT analizleri sonucu 24, 48 ve 72 saat sonundaki IC₅₀ ve IC₃₀ değerleri

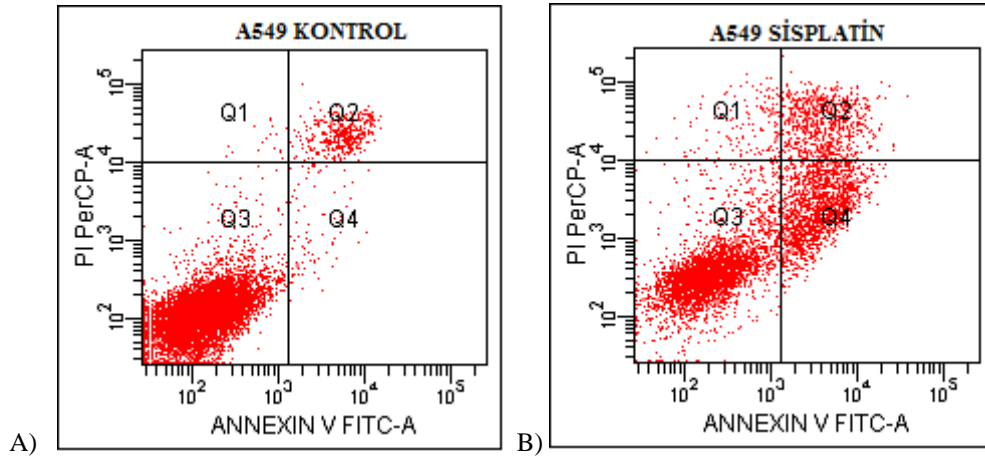
Maddeler (µM)	24 saat	48 saat	72 saat
Pozitif kontrol sisplatin (IC ₅₀)	31.25 ± 1.767	5.1 ± 1.69	3 ± 0
Gümüş nitrat (IC ₅₀)	24.75 ± 0.353	15 ± 0	13.5 ± 2.12
Titanyum dioksit (IC ₃₀)	yok	500 ± 0	50 ± 0
Demir (II, III) oksit nanotozu (IC ₃₀)	yok	225 ± 35.35	5 ± 1.41

Gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir oksit nanotozu pozitif kontrol sisplatin ile kıyaslandığında üç maddeninde sisplatin kadar sitotoksik ve antiproliferatif olmadığı saptandı. Bunlara ek olarak pozitif kontrol sisplatin, gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir oksit nanotozunun IC₅₀ ve IC₃₀ dozları A549 hücrelerine uygulandı ve flow analizlerinden Anneksin V-FITC /PI boyamasını kullanarak maddelerin apoptotik ve nekrotik etkileri yüzde canlılık değerleri belirlenerek gösterildi (Şekil 3.17).

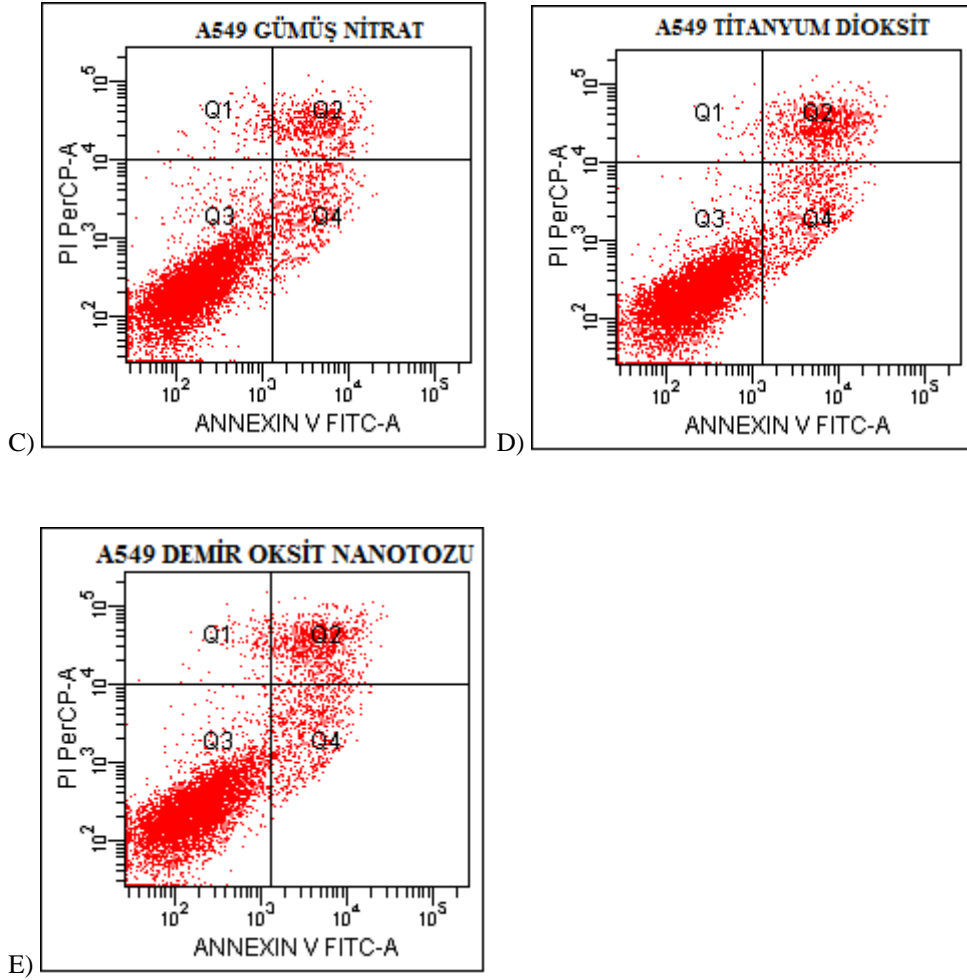
Maddeler (pozitif kontrol sisplatin, gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir (II, III) oksit) A549 hücreleri üzerinde kontrol grubu hücrelerine kıyasla daha fazla erken ve geç apoptotik etkiler (Çizelge 3.6) gösterdi. Ayrıca flow analizi

yoluyla, apoptozun meydana gelmesinde etkili kaspaz-3 aktivitesi (Şekil 3.18) ve mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi (Şekil 3.19) parametreleri ölçülerek hücre canlılığı belirlendi. Kontrole göre pozitif kontrol sisplatin uygulanan hücreler %40 kaspaz-3 aktivitesi gösterdi. Maddelerin (gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir (II, III) oksit) uygulandığı hücreler kontrole göre kaspaz-3 aktivitesi göstermedi (Çizelge 3.7). Mitokondriyal membran potansiyeli analizi sonucunda kontrol hücrelerine göre maddelerin uygulandığı hücreler daha az mitokondriyal aktivite gösterdi. Ancak maddeler, hücrelerde pozitif kontrol sisplatin kadar mitokondriyal aktivitenin azalmasını sağlamadı (Çizelge 3.8).

3.2. Erken/geç apoptotik ve nekrotik etki



Şekil 3.17. Erken/geç apoptotik ve nekrotik etki için A549 hücrelerinin 72 saat sonunda Anneksin V- FITC ve PI (propidyum iyodid) boyaması. A) Kontrol. B) Pozitif kontrol sisplatin IC₅₀ (3µM). C) Gümüş nitrat IC₅₀ (13.5µM). D) Titanyum dioksit IC₃₀ (50µM). E) Demir oksit nanotozu IC₃₀ (5µM). (Q1=Nekroz, Q2=Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4=Erken apoptoz)



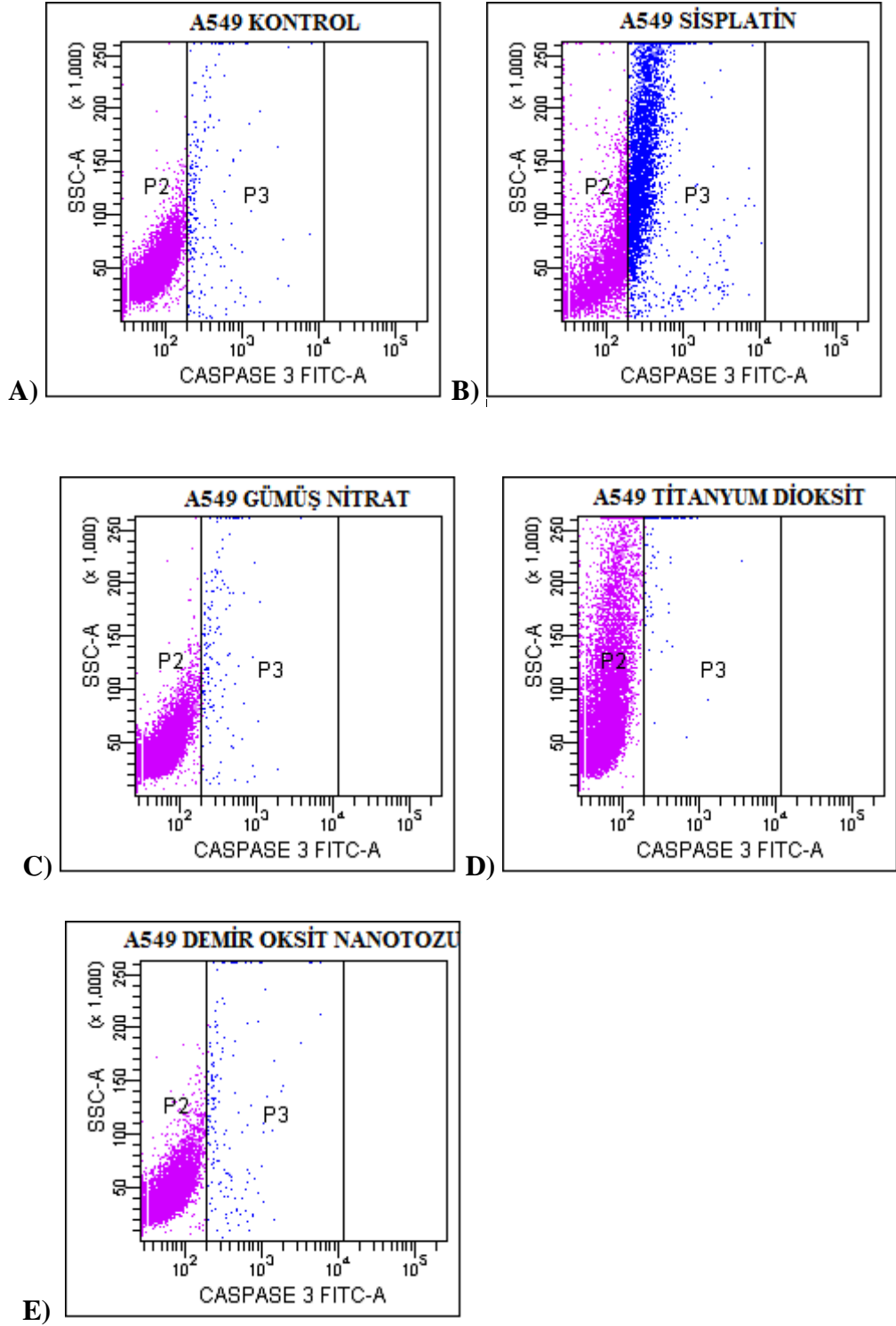
Şekil 3.17. (Devam) Erken/geç apoptotik ve nekrotik etki için A549 hücrelerinin 72 saat sonunda Annexin V- FITC ve PI (propidyum iyodid) boyaması. A) Kontrol. B) Pozitif kontrol sisplatin IC₅₀ (3µM). C) Gümüş nitrat IC₅₀ (13.5µM). D) Titanyum dioksit IC₃₀ (50µM). E) Demir oksit nanotozu IC₃₀ (5µM). (Q1=Nekroz, Q2=Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4=Erken apoptoz)

Çizelge 3.6. Annexin V-FITC ve PI boyaması sonucu A549 hücrelerinde % canlılık.

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

Annexin-V FITC ve PI boyama	Kontrol	Sisplatin (IC ₅₀)	Gümüş nitrat (IC ₅₀)	Titanyum dioksit (IC ₃₀)	Demir oksit (IC ₃₀)
Q1 (%)	0.2	2.6	1.5	0.5	1.4
Q2 (%)	4.1	11.5	7.2	10.9	10.5
Q3 (%)	94.8	61.5	83.2	79.8	80.2
Q4 (%)	0.9	24.5	8.1	8.8	7.9

3.3. Kaspaz-3 aktivitesi

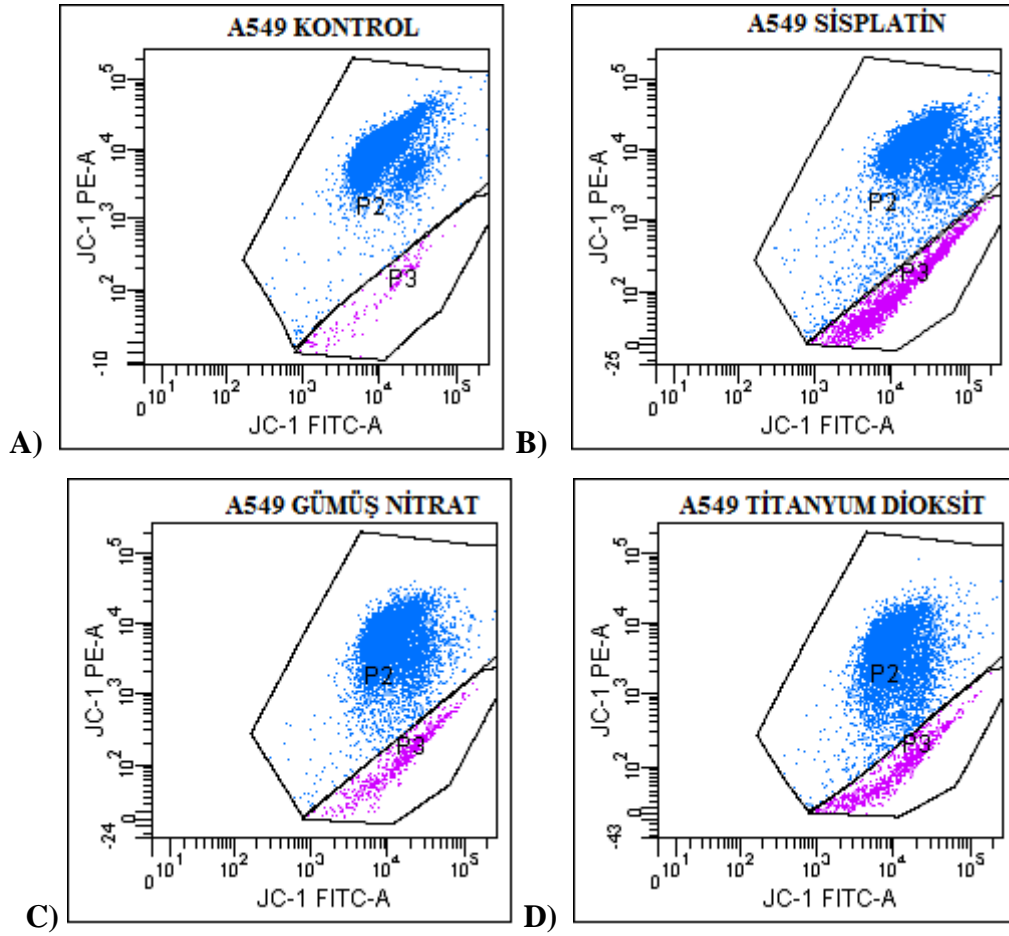


Şekil 3.18. Kaspaz-3 aktivitesi için A549 hücrelerinin 72 saat sonunda işaretlenmesi. A) Kontrol. B) Pozitif kontrol sisplatin IC₅₀ (3µM). C) Gümüş nitrat IC₅₀ (13.5µM). D) Titanyum dioksit IC₃₀ (50µM). E) Demir oksit nanotozu IC₃₀ (5µM). (P2= Kaspaz-3 aktivitesi yok, P3= Kaspaz-3 aktivitesi var)

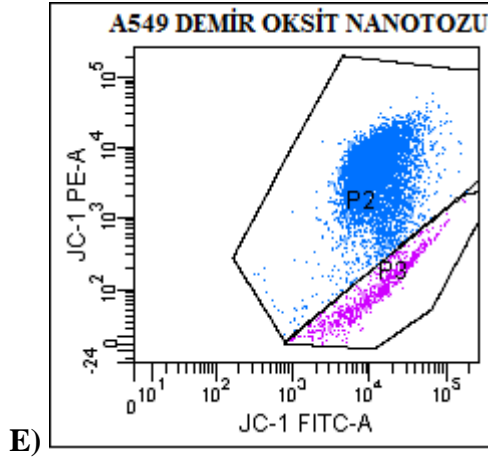
Çizelge 3.7. Kaspaz-3 aktivitesi sonucu A549 hücrelerinde % canlılık. (P2= Kaspaz-3 aktivitesi yok, P3= Kaspaz-3 aktivitesi var)

Kaspaz-3 aktivitesi	Kontrol	Sisplatin (IC ₅₀)	Gümüş nitrat (IC ₅₀)	Titanyum dioksit (IC ₃₀)	Demir oksit nanotozu (IC ₃₀)
P2(%)	98.1	61.2	98.6	99.0	98.6
P3(%)	2.1	40.7	1.5	1.1	1.6

3.4. Mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi



Şekil 3.19. Mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi için A549 hücrelerinin 72 saat sonunda JC-1 boyaması. A) Kontrol. B) Pozitif kontrol sisplatin IC₅₀ (3µM). C) Gümüş nitrat IC₅₀ (13.5µM). D) Titanyum dioksit IC₃₀ (50µM). E) Demir oksit nanotozu IC₃₀ (5µM). (P2= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık , P3=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık)



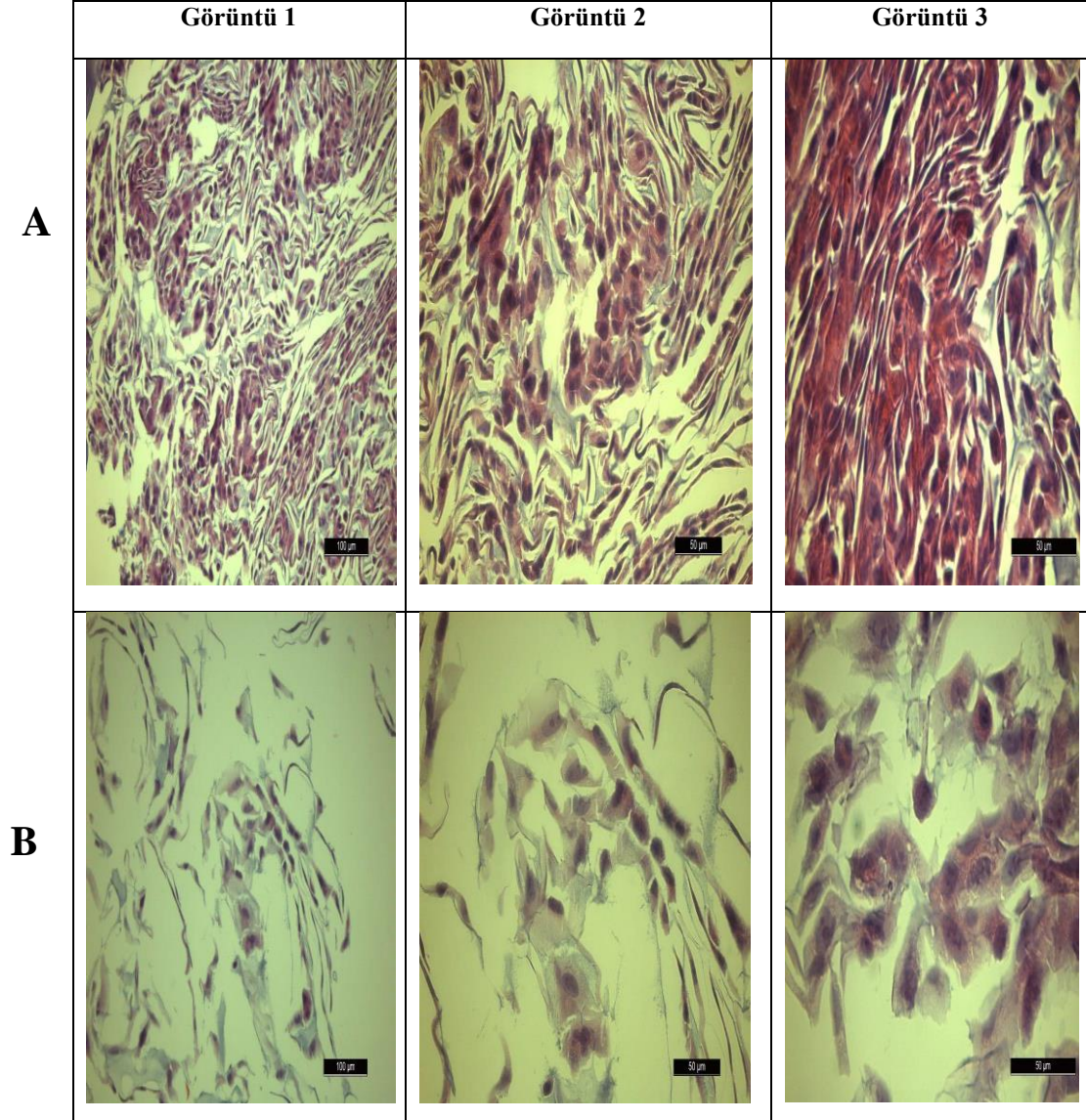
Şekil 3.19. (Devam) Mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi için A549 hücrelerinin 72 saat sonunda JC-1 boyaması. A) Kontrol. B) Pozitif kontrol sisplatin IC₅₀ (3µM). C) Gümüş nitrat IC₅₀ (13.5µM). D) Titanyum dioksit IC₃₀ (50µM). E) Demir oksit nanotozu IC₃₀ (5µM). (**P2**= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık, **P3**=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık)

Çizelge 3.8. JC-1 boyaması sonucu A549 hücrelerinde % canlılık. (**P2**= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık , **P3**=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık)

JC-1 boyama	Kontrol	Sisplatin (IC ₅₀)	Gümüş nitrat (IC ₅₀)	Titanyum dioksit (IC ₃₀)	Demir oksit nanotozu (IC ₃₀)
P2 (%)	95.3	76.6	93.6	90.2	92.3
P3 (%)	4.1	22.3	5.9	8.9	7.1

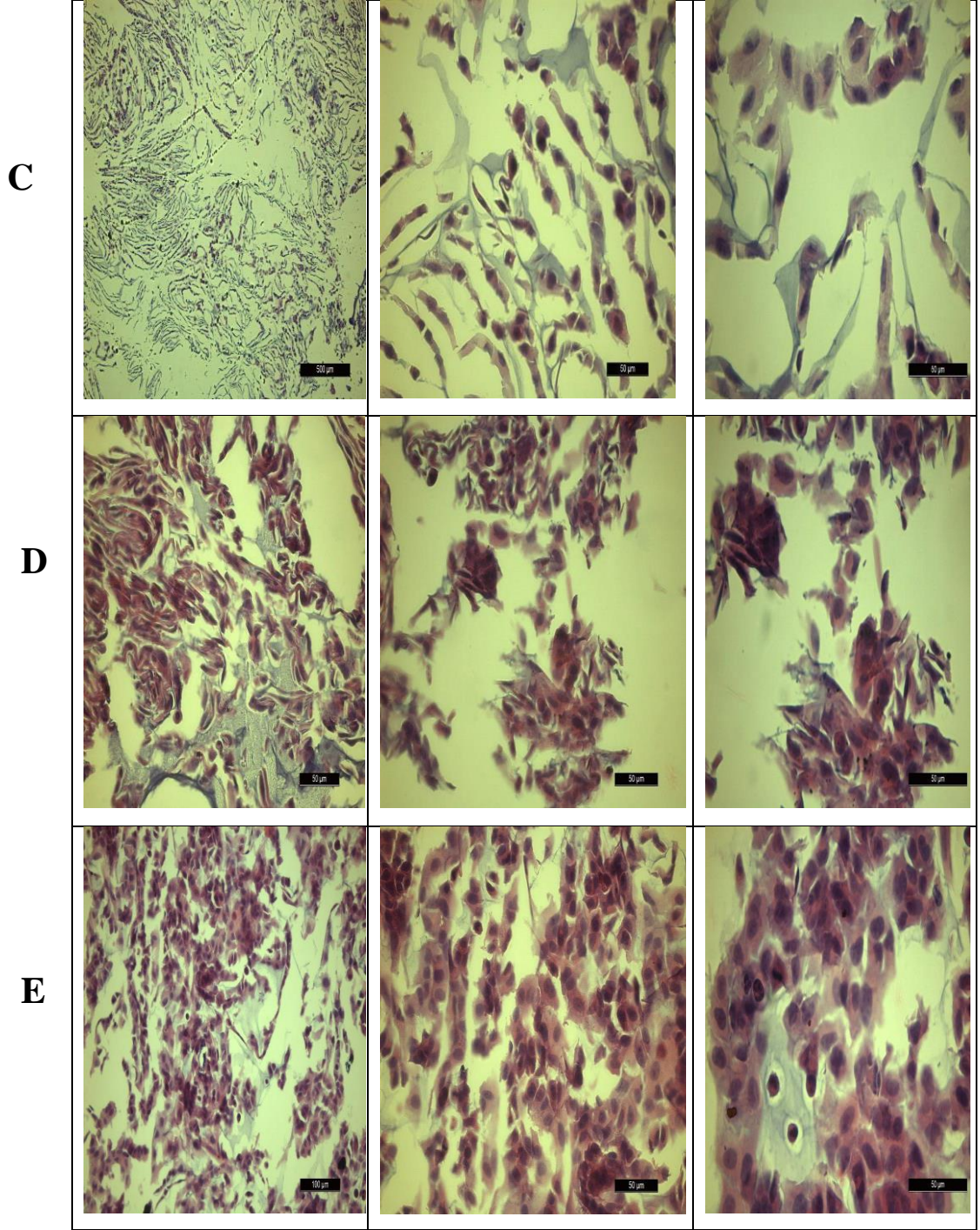
İmmünohistokimyasal boyama yöntemlerini [Hematoksilen/eozin işaretleme (Şekil 3.20), TUNEL parafin gömme (Şekil 3.21), BrdU işaretleme (Şekil 3.22), Bcl-2 işaretleme (Şekil 3.23) ve Bax işaretleme (Şekil 3.24)] kullanarak maddelerin (pozitif kontrol sisplatin, gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir (II, III) oksit nanotozu) A549 hücrelerindeki apoptotik etkileri ve buna bağlı olarak hücrelerdeki apoptoz skor miktarı belirlendi. Skor sayılarına bakıldığında kontrol grubuna kıyasla apoptoz olup olmadığı veya apoptoz artışı belirlenebilmektedir. Skor sayıları en çok boyanan (3) ve hiç boyanmayan (0) şeklinde gösterilerek apoptoz miktarının ne kadar arttığı ifade edildi. Görüntülemeye ışık mikroskobu kullanıldı.

3.5. Hematoksilen/Eozin işaretleme ve apoptotik etki



Şekil 3.20. Hematoksilen/Eozin işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi.

A) Kontrol. B) Sisplatinin IC_{50} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi C) Gümüş nitratın IC_{50} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi D) Titanyum dioksitin IC_{30} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi E) Demir (II, III) oksit nanotozunun IC_{30} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi



Şekil 3.20. (Devam) Hematoksilen/Eozin işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi. A) Kontrol. B) Sisplatinin IC_{50} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi C) Gümüş nitratin IC_{50} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi D) Titanyum dioksitin IC_{30} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi E) Demir (II, III) oksit nanotozunun IC_{30} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi

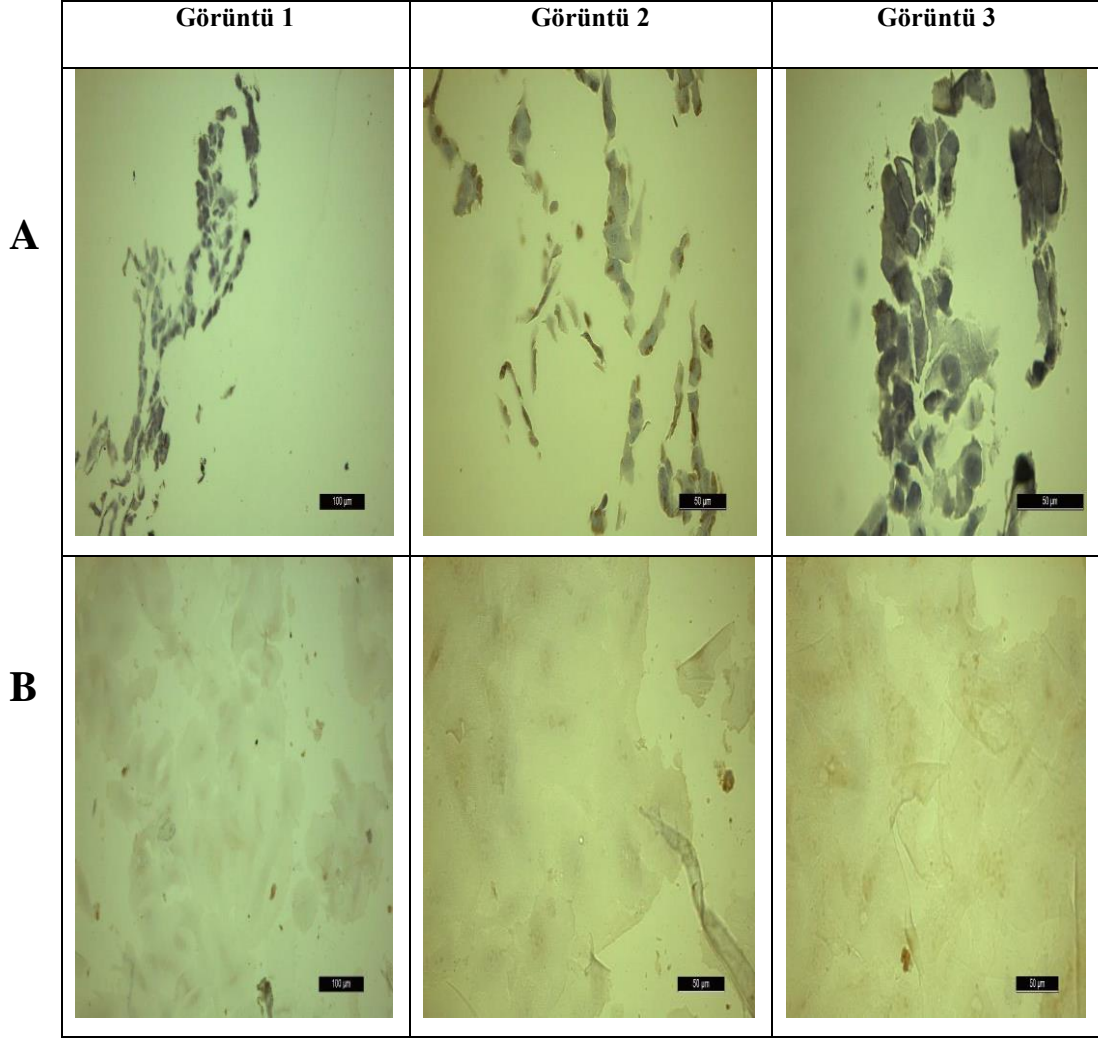
Hematoksilen/Eozin boyama sonucu pozitif kontrol sisplatin, gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir oksit nanotozlarının uygulandığı hücrelerde apoptotik etki gözlemlendi (Çizelge 3.9).

Hematoksilen/Eozin boyama sonucu kontrol hücrelerine kıyasla maddelerin uygulandığı hücrelerde skor sayılarına bakıldığında kontrole göre gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir oksit nanotozu uygulanan hücrelerde daha fazla boyanmaya bağlı olarak apoptotik etki gözlemlendi (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Hematoksilen/Eozin işaretleme sonucu apoptotik değerlendirme. 3: en fazla boyanma, 2: orta boyanma, 1: az boyanma, 0: hiç boyanma yok

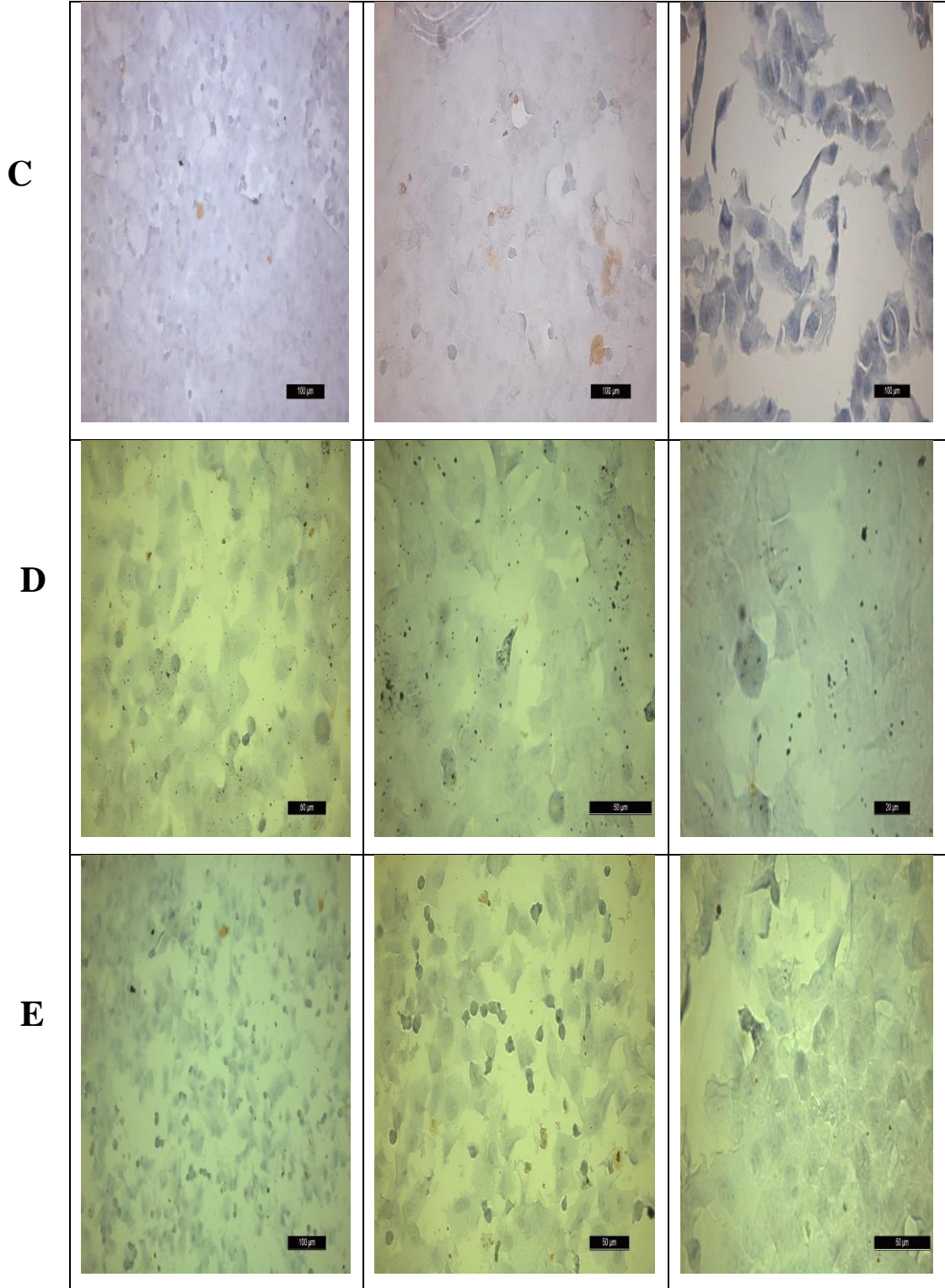
Boyama tipi	Hematoksilen/Eozin işaretleme			Ortalama
	SKOR			
Maddeler	Görüntü 1	Görüntü 2	Görüntü 3	Ortalama
Kontrol	2	2	3	2
Sisplatin IC ₅₀	2	2	2	2
Gümüş nitrat IC ₅₀	3	3	3	3
Titanyum dioksit IC ₃₀	3	3	3	3
Demir (II, III) oksit IC ₃₀	3	3	3	3

3.6. TUNEL parafin gömme ve apoptotik etki



Şekil 3.21. TUNEL parafin gömme boyama ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi.

A) Kontrol. B) Sisplatin IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi C) Gümüş nitrat IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi D) Titanyum dioksit IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi E) Demir (II, III) oksit nanotozunun IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi



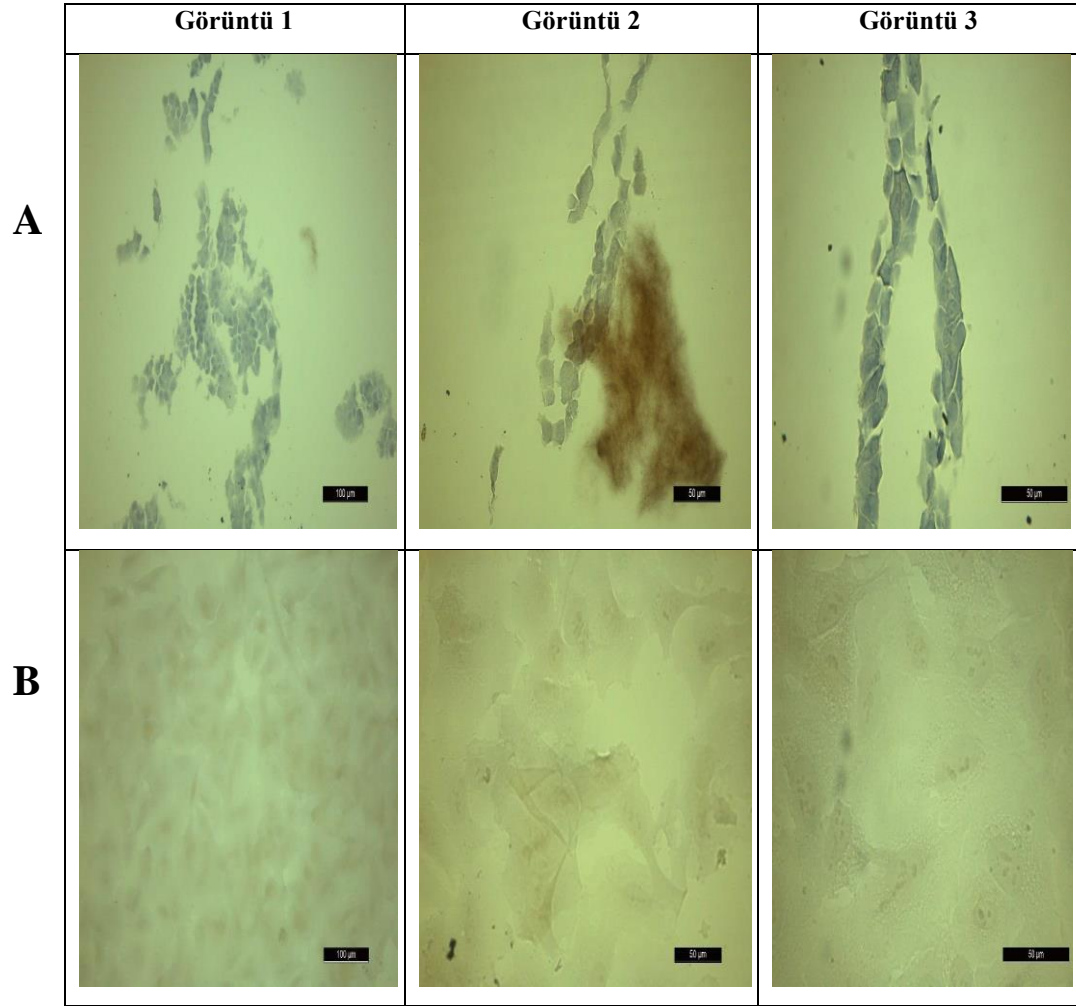
Şekil 3.21. (Devam) TUNEL parafin gömme boyama ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi. A) Kontrol. B) Sisplatin IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi C) Gümüş nitrat IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi D) Titanyum dioksit IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi E) Demir (II, III) oksit nanotozunun IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi

TUNEL boyama sonucu kontrol hücrelerine göre sisplatin uygulanan hücrelerde daha fazla apoptotik etki gözlemlendi. Gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir oksit nanotozu uygulanan hücrelerde eşit skor miktarında apoptotik etki görüldü (Çizelge 3.10).

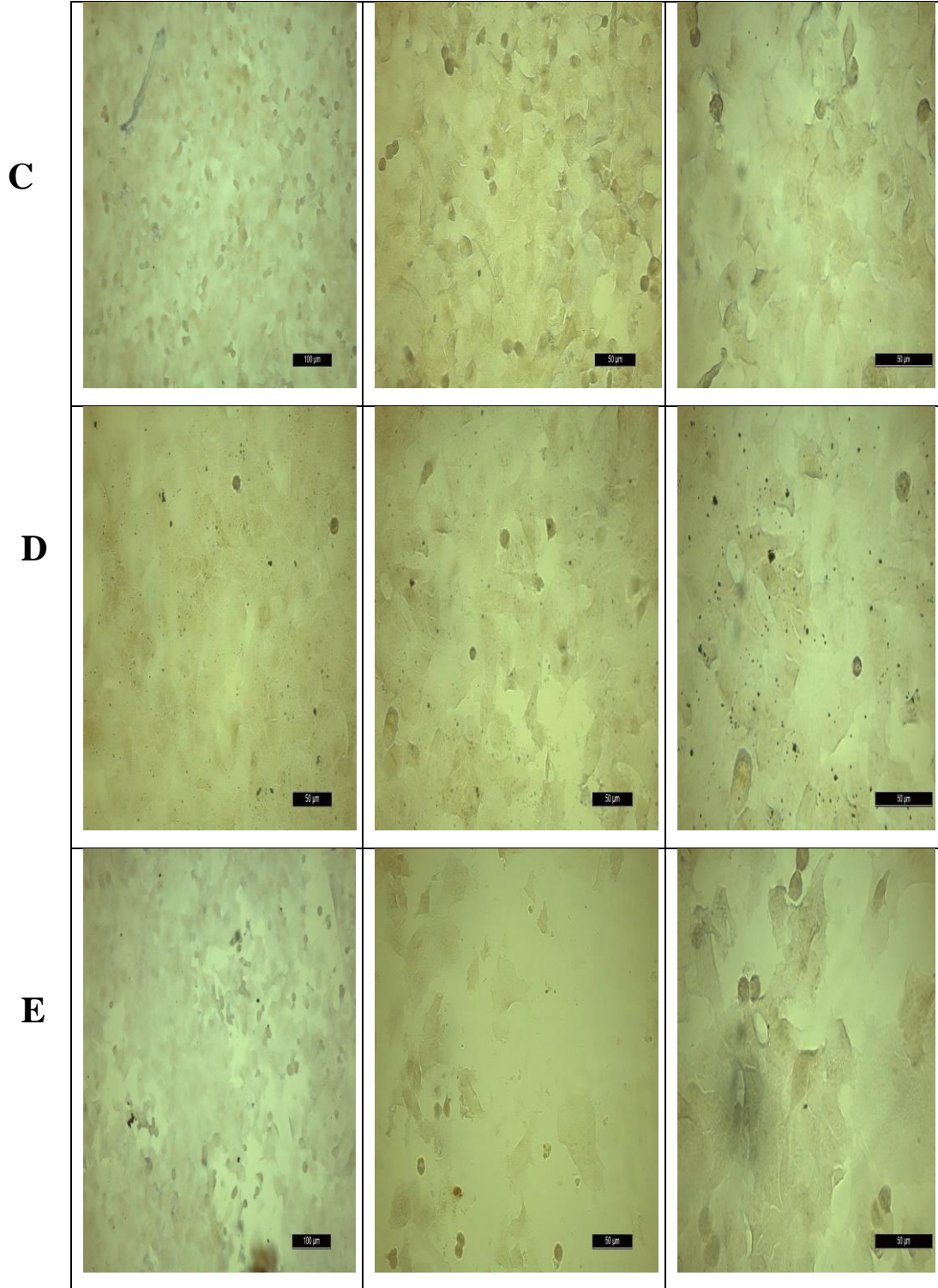
Çizelge 3.10. TUNEL parafin gömme sonucu apoptotik değerlendirme. 3: en fazla boyanma, 2: orta boyanma, 1: az boyanma, 0: hiç boyanma yok

Boyama tipi	TUNEL parafin gömme			Ortalama
	SKOR			
Maddeler	Görüntü 1	Görüntü 2	Görüntü 3	
Kontrol	1	0	0	0
Sisplatin IC ₅₀	3	3	3	3
Gümüş nitrat IC ₅₀	1	1	1	1
Titanyum dioksit IC ₃₀	1	1	0	1
Demir oksit nanotozu IC ₃₀	1	1	0	1

3.7. BrdU işaretleme ve apoptotik etki



Şekil 3.22. BrdU işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi. A) Kontrol. B) Sisplatin IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi C) Gümüş nitrat IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi D) Titanyum dioksit IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi E) Demir (II, III) oksit nanotozunun IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi



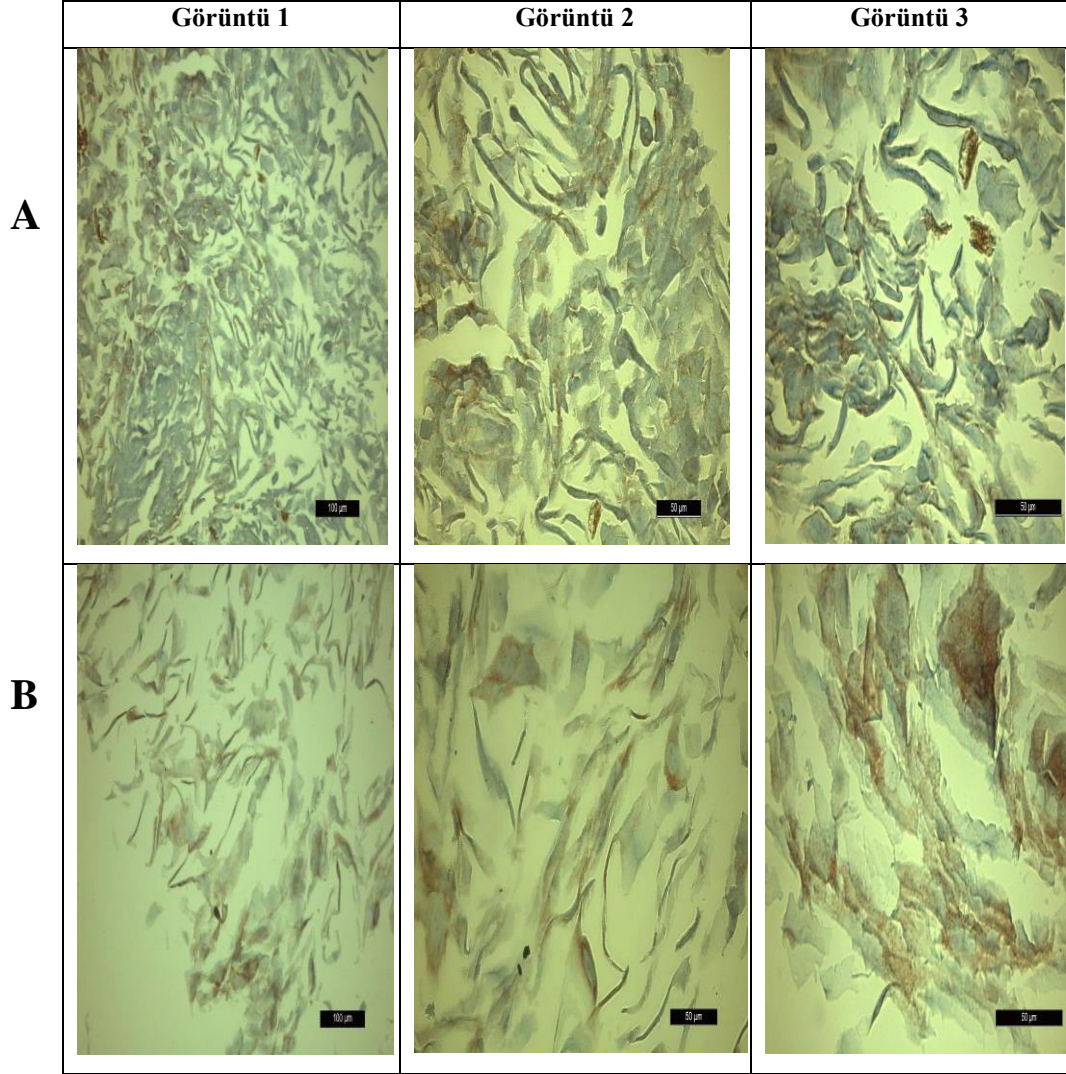
Şekil 3.22. (Devam) BrdU işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi. A) Kontrol. B) Sisplatin IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi C) Gümüş nitrat IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi D) Titanyum dioksit IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi E) Demir (II, III) oksit nanotozunun IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi

BrdU boyaması sonucu kontrol hücrelerine kıyasla maddelerin uygulandığı hücrelerde apoptotik etki artmıştır. Skor sayılarına bakıldığında gümüş nitrat ve demir oksit nanotozu maddeleri, kontrol hücrelerine kıyasla daha fazla ve eşit skor miktarında apoptotik etki gösterdi. Titanyum dioksit sadece kontrol hücrelerine göre daha fazla apoptotik etki gösterdi (Çizelge 3.11).

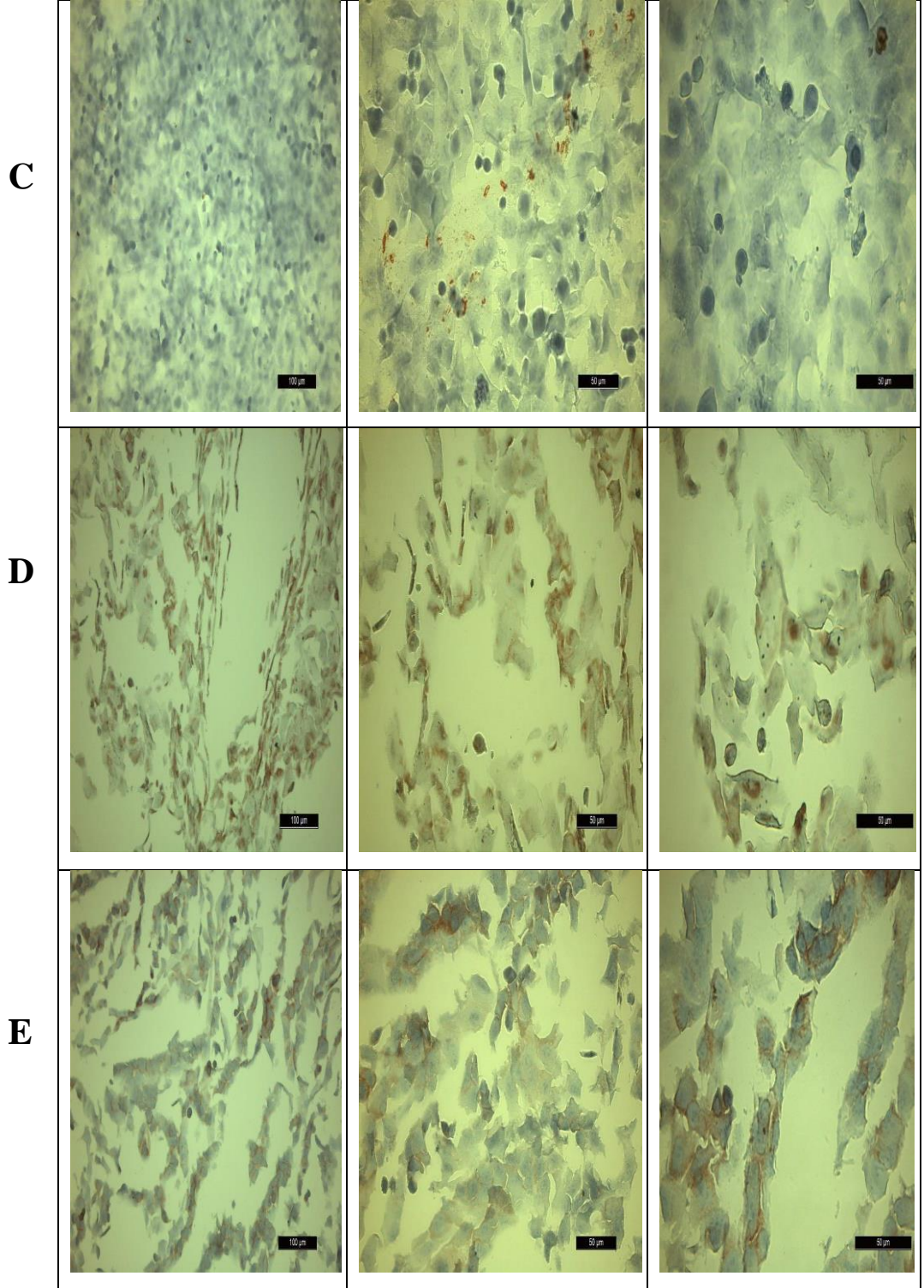
Çizelge 3.11. BrdU İşaretleme sonucu apoptotik değerlendirme. 3: en fazla boyanma, 2: orta boyanma, 1: az boyanma, 0: hiç boyanma yok.

Boyama tipi	BrdU işaretleme			Ortalama
	SKOR			
Maddeler	Görüntü 1	Görüntü 2	Görüntü 3	Ortalama
Kontrol	0	0	0	0
Sisplatin IC ₅₀	3	3	3	3
Gümüş nitrat IC ₅₀	3	3	3	3
Titanyum dioksit IC ₃₀	2	2	2	2
Demir oksit nanotozu IC ₃₀	3	3	3	3

3.8. Bcl-2 işaretleme ve apoptotik etki



Şekil 3.23. Bcl-2 işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi. A) Kontrol. B) Sisplatin IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi C) Gümüş nitrat IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi D) Titanyum dioksit IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi E) Demir (II, III) oksit nanotozunun IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi



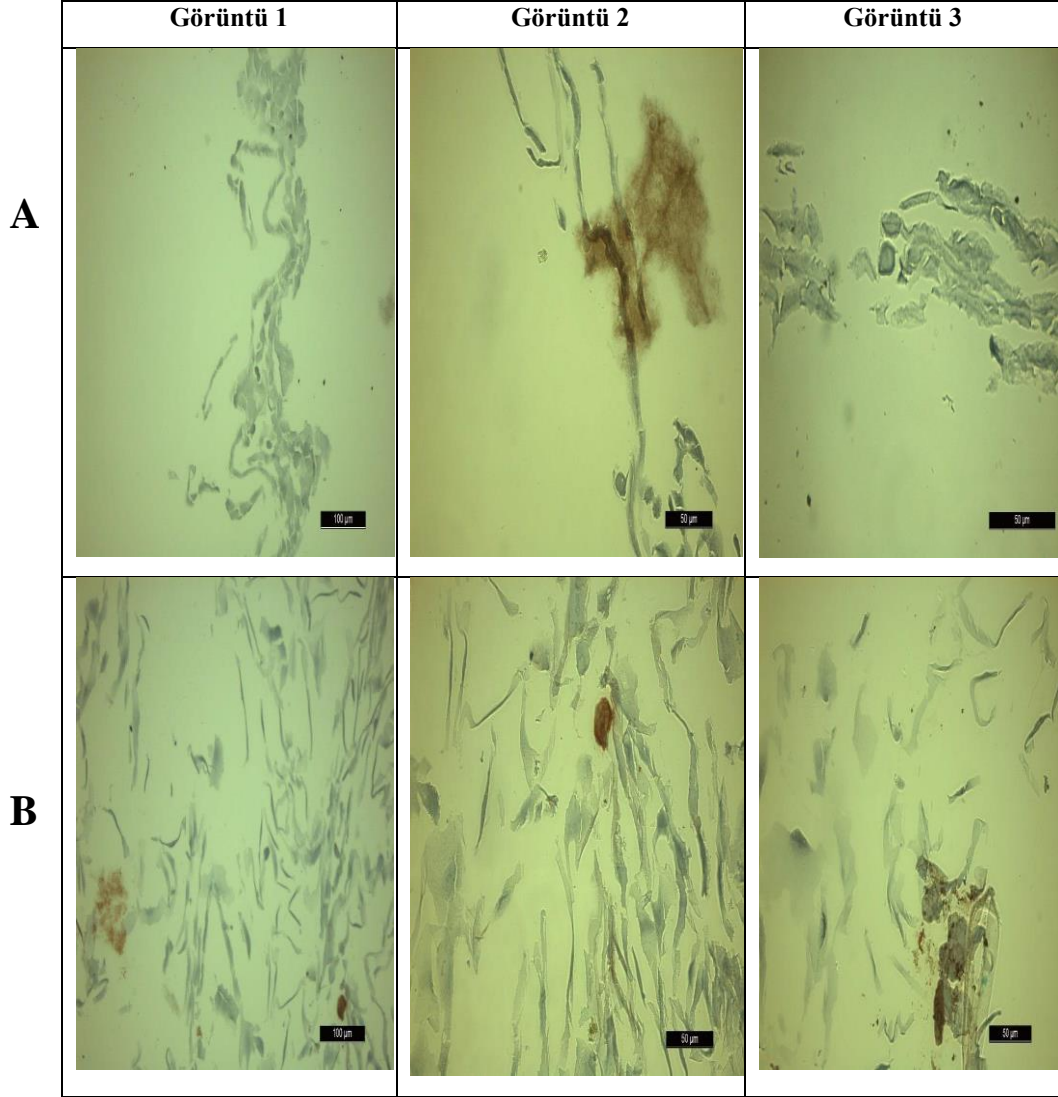
Şekil 3.23. (Devam) Bcl-2 işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi. A) Kontrol. B) Sisplatin IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi C) Gümüş nitrat IC₅₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi D) Titanyum dioksit IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi E) Demir (II, III) oksit nanotozunun IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi

Bcl-2 boyama sonucu kontrol hücrelerinde ve titanyum dioksit uygulanan hücrelerde bcl-2 aktivitesi artmıştır ve eşit skor miktarındadır. Skor sayılarına göre gümüş nitratın bcl-2 protein aktivitesini baskıladığı söylenebilir. Ancak cisplatin ve demir oksit nanotozları uygulanan hücrelerde bcl-2 aktivitesi kontrole göre az da olsa belirlendi (Çizelge 3.12).

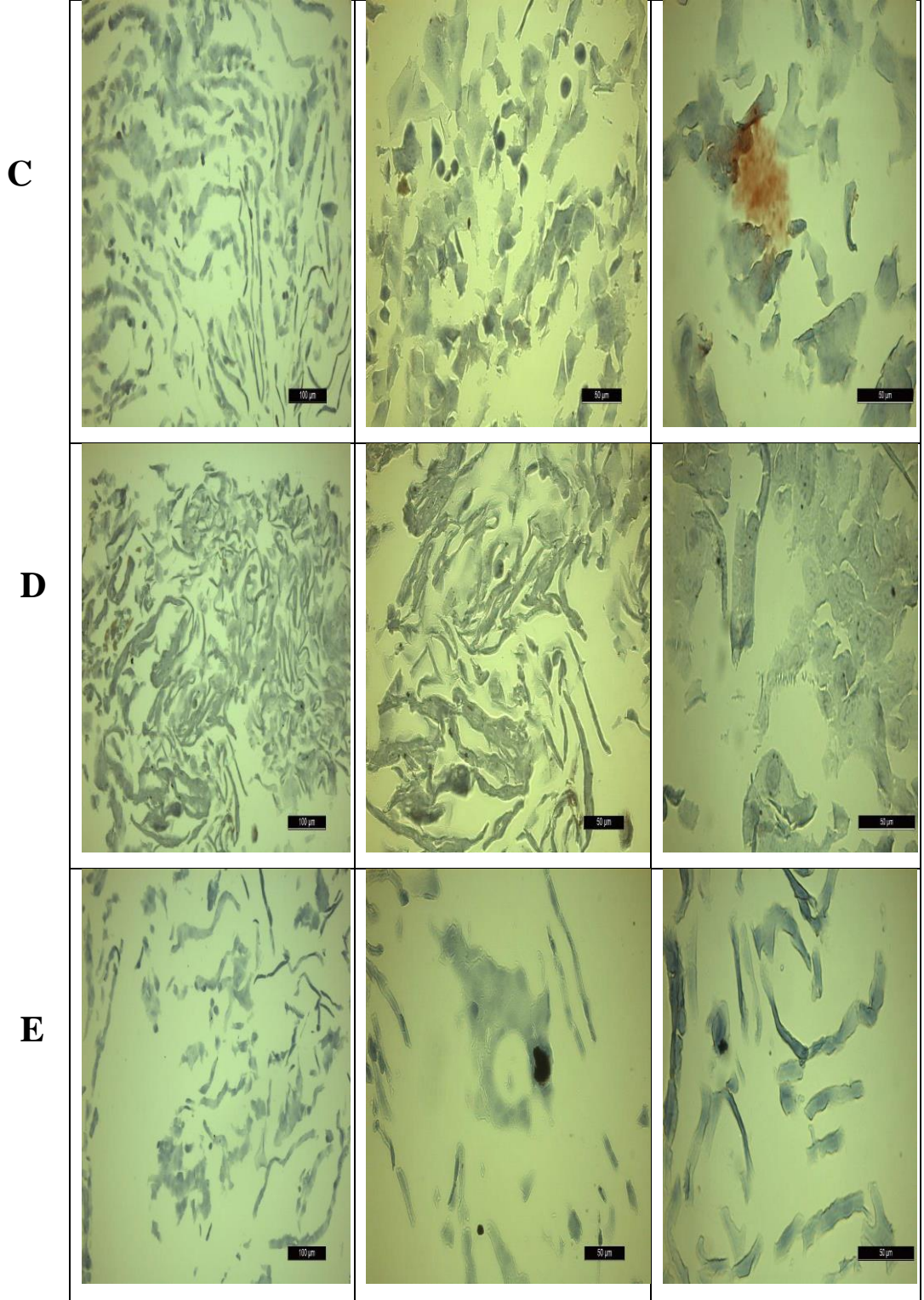
Çizelge 3.12. Bcl-2 işaretleme sonucu apoptotik değerlendirme. 3: en fazla boyanma, 2: orta boyanma, 1: az boyanma, 0: hiç boyanma yok.

Boyama tipi	Bcl-2 işaretleme			Ortalama
	SKOR			
Maddeler	Görüntü 1	Görüntü 2	Görüntü 3	Ortalama
Kontrol	3	3	3	3
Sisplatin IC₅₀	1	1	1	1
Gümüş nitrat IC₅₀	0	0	0	0
Titanyum dioksit IC₃₀	3	3	3	3
Demir oksit nanotozu IC₃₀	1	1	1	1

3.9. Bax işaretleme ve apoptotik etki



Şekil 3.24. Bax işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi. A) Kontrol. B) Sisplatinin IC_{50} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi C) Gümüş nitratin IC_{50} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi D) Titanyum dioksitin IC_{30} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi E) Demir (II, III) oksit nanotozunun IC_{30} konsantrasyonunun 72 saat sonundaki etkisi



Şekil 3.24. (Devam) Bax işaretleme ile A549 hücrelerinde apoptotik etkinin belirlenmesi. A) Kontrol. B) Sisplatinin IC_{50} konsantrasyonun 72 saat sonundaki etkisi C) Gümüş nitratin IC_{50} konsantrasyonun 72 saat sonundaki etkisi D) Titanyum dioksitin IC_{30} konsantrasyonun 72 saat sonundaki etkisi E) Demir (II, III) oksit nanotozunun IC_{30} konsantrasyonun 72 saat sonundaki etkisi

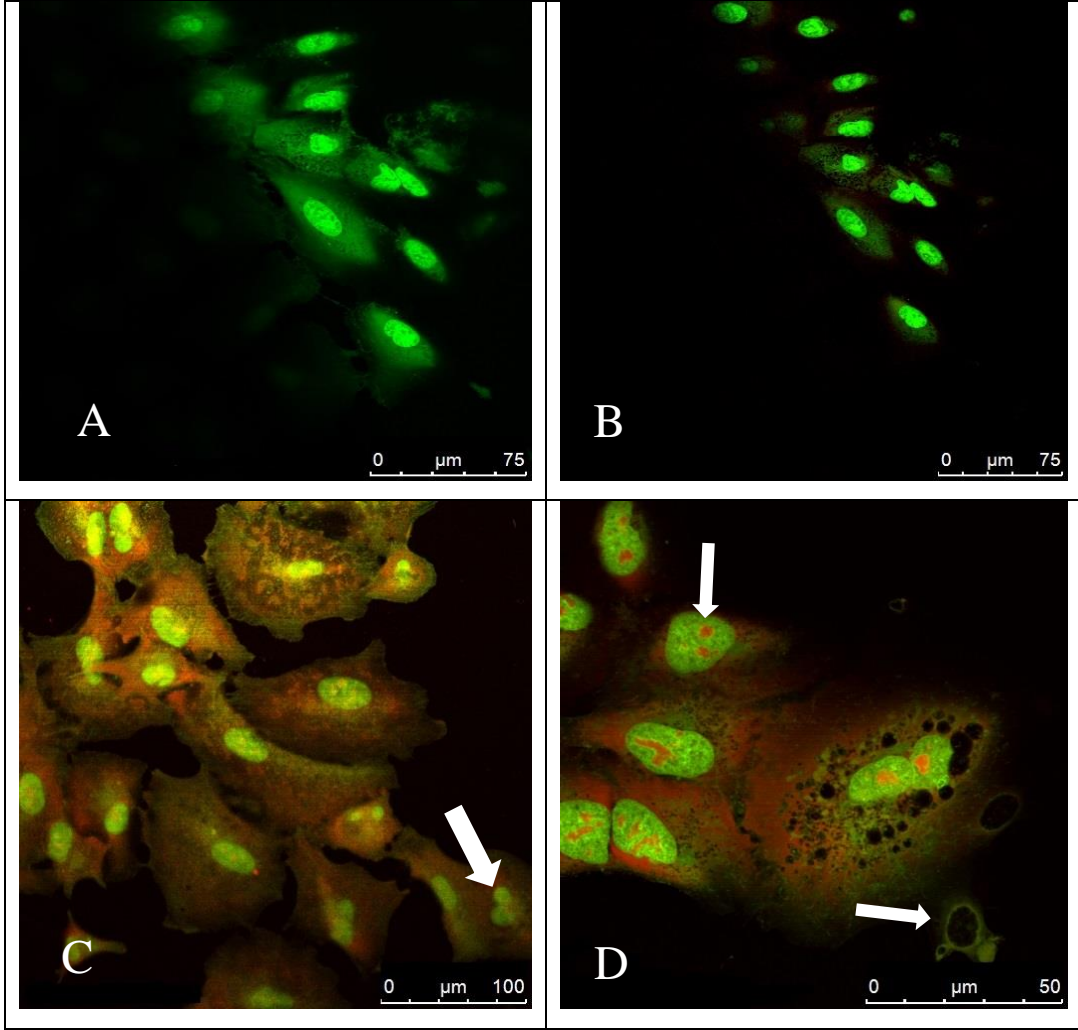
Bax boyama sonucu kontrol hücrelerine kıyasla pozitif kontrol sisplatin uygulanan hücreler bax aktivitesi gösterdi. Gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir oksit nanotozu uygulanan hücreler bax aktivitesi göstermedi (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13. Bax işaretleme sonucu apoptotik değerlendirme. 3: en fazla boyanma, 2.: orta boyanma, 1: az boyanma, 0: hiç boyanma yok.

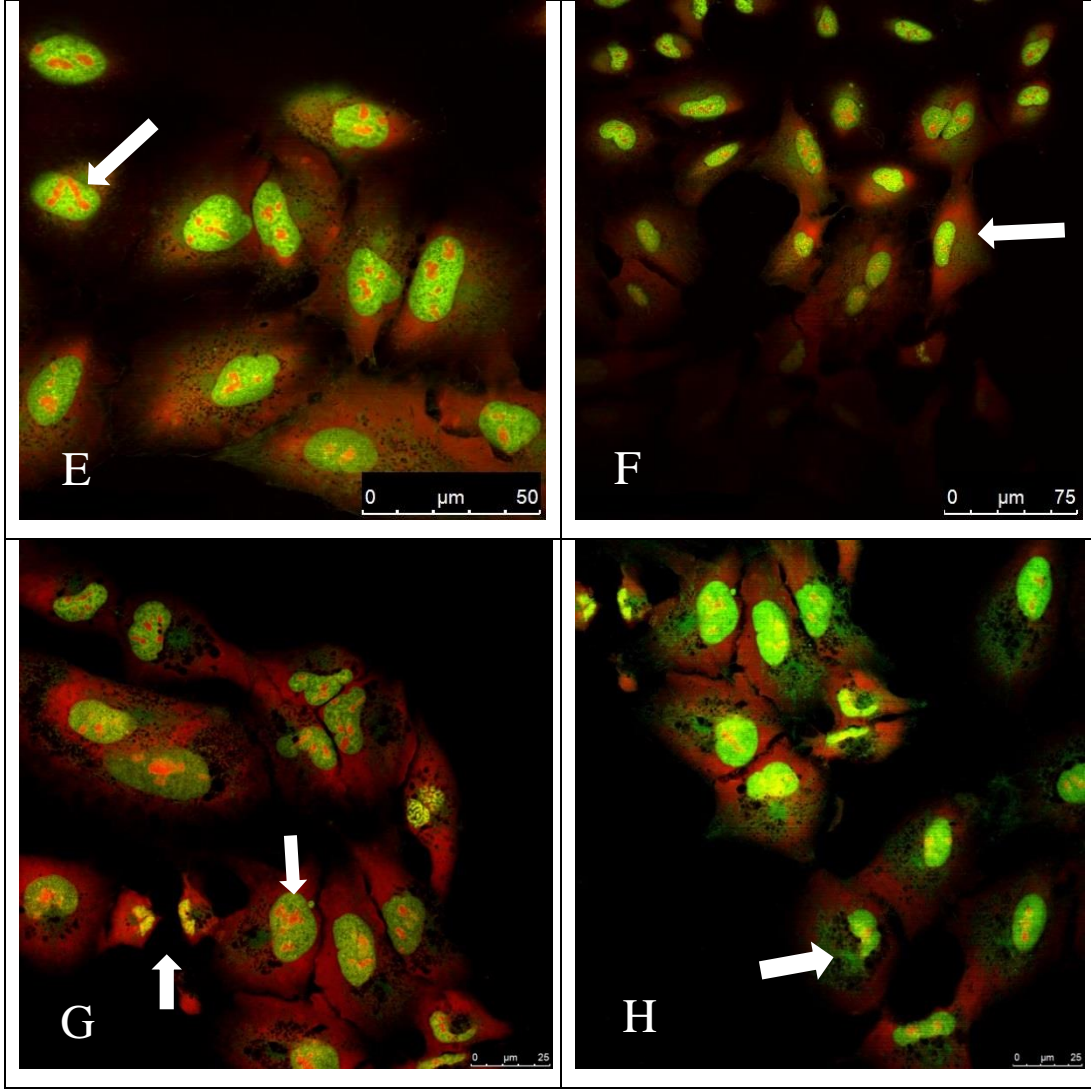
Boyama tipi	Bax işaretleme			Ortalama
	SKOR			
Maddeler	Görüntü 1	Görüntü 2	Görüntü 3	Ortalama
Kontrol	0	0	0	0
Sisplatin IC ₅₀	1	1	1	1
Gümüş nitrat IC ₅₀	0	0	0	0
Titanyum dioksit IC ₃₀	0	0	0	0
Demir oksit nanotozu IC ₃₀	0	0	0	0

İmmünohistokimyasal boyama yöntemlerinin sonucu kontrole kıyasla pozitif kontrol sisplatin TUNEL, BrdU, bcl-2 ve bax boyama sonucunda apoptotik etkili denebilir. Kontrole kıyasla gümüş nitrat hematoksilin/eozin, TUNEL, BrdU ve bcl-2 boyama sonuçlarına göre apoptotik etkili denebilir. Kontrole kıyasla titanyum dioksit hematoksilin/eozin, TUNEL ve BrdU boyama sonucu apoptotik etkili denebilir. Kontrole kıyasla demir oksit nanotozu, hematoksilin/eozin, TUNEL, BrdU ve bcl-2 boyama sonucu apoptotik etkili denebilir.

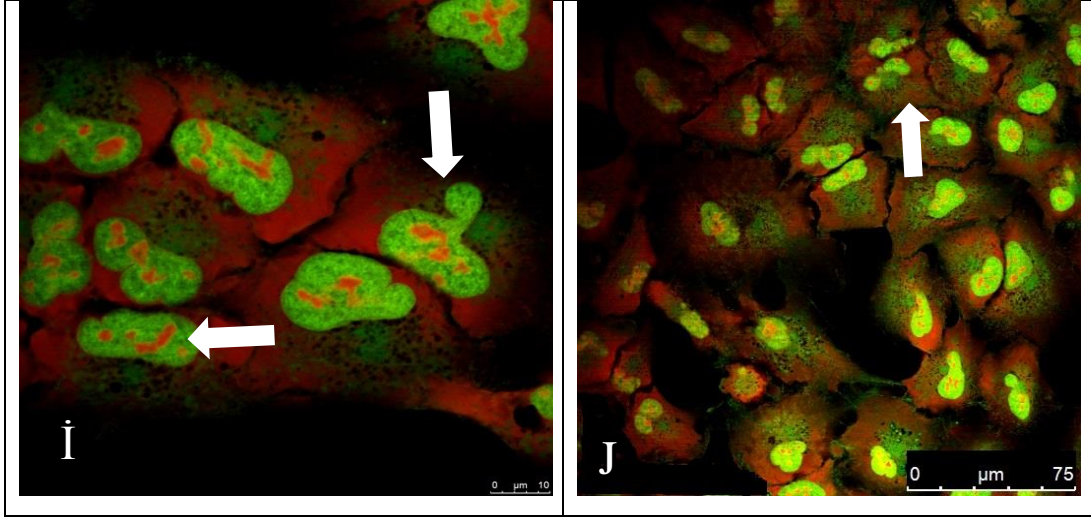
3.10. Konfokal mikroskobu ile morfoloji



Şekil 3.25. A549 hücrelerinin tedavi edilmesi sonucu Anneksin FITC (kırmızı boya) ve akridin oranj (yeşil boya) boya kullanılarak konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi (40X). A-B) Kontrol. C-D) Sisplatin (IC_{50} konsantrasyon: 3 μ M). E-F) Gümüş nitrat (IC_{50} konsantrasyon: 13.5 μ M). G-H) Titanyum dioksit (IC_{30} konsantrasyon: 50 μ M). İ-J) Demir oksit nanotozu (IC_{30} konsantrasyon: 5 μ M). Oklar, apoptotik yapıları göstermektedir



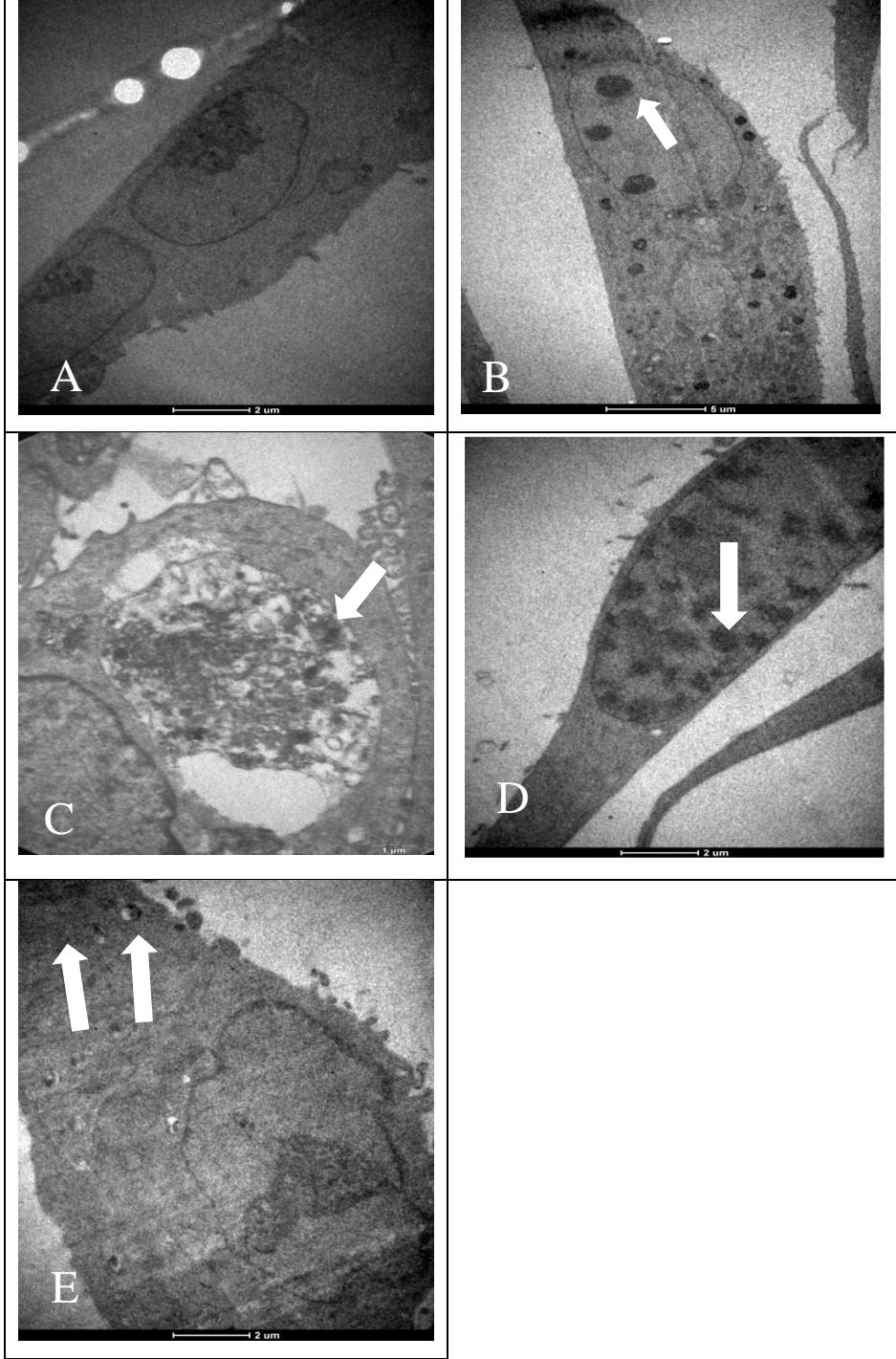
Şekil 3.25. (Devam) A549 hücrelerinin tedavi edilmesi sonucu Anneksin FITC (kırmızı boya) ve akridin oranj (yeşil boya) boyaları kullanılarak konfokal mikroskopi ile görüntülenmesi (40X). A-B) Kontrol. C-D) Sisplatin (IC_{50} konsantrasyon: $3 \mu M$). E-F) Gümüş nitrat (IC_{50} konsantrasyon: $13.5 \mu M$). G-H) Titanyum dioksit (IC_{30} konsantrasyon: $50 \mu M$). İ-J) Demir oksit nanotozu (IC_{30} konsantrasyon: $5 \mu M$). Oklar, apoptotik yapıları göstermektedir



Şekil 3.25. (Devam) A549 hücrelerinin tedavi edilmesi sonucu Anneksin FITC (kırmızı boya) ve akridin oranj (yeşil boya) boyaları kullanılarak konfokal mikroskopi ile görüntülenmesi (40X). A-B) Kontrol. C-D) Sisplatin (IC_{50} konsantrasyon: $3 \mu M$). E-F) Gümüş nitrat (IC_{50} konsantrasyon: $13.5 \mu M$). G-H) Titanyum dioksit (IC_{30} konsantrasyon: $50 \mu M$). İ-J) Demir oksit nanotozu (IC_{30} konsantrasyon: $5 \mu M$). Oklar, apoptotik yapıları göstermektedir

Konfokal mikroskobu sonuçlarına göre tedavi edilmeyen kontrol hücreleri yeşil renkli akridin oranj ile boyandı. Maddelerin uygulandığı hücreler kırmızı renkli Anneksin FITC ve yeşil renkli akridin oranj ile boyandı. Anneksin FITC ile boyanan yapılar apoptotik yapıları göstermektedir (Şekil 3.25). Oklar apoptotik yapıları göstermektedir. A-B: bozulmamış çekirdek morfolojisi. C: nükleer fragmentasyon. D: kromozom yoğunlaşması ve hayalet hücre. E: kromozom yoğunlaşması. F: hilal halka görünümü. G:nükleer fragmentasyon. H:membran bütünlüğünün kaybı. İ: membran cepçik. J: nükleer fragmentasyon (Şekil 3.25).

3.11. Geçirimli elektron mikroskobu ile morfoloji



Şekil 3.26. A549 hücrelerinin tedavi edilmesi sonucu geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi. A) Kontrol (X8200). B) Sisplatin (IC_{50} konsantrasyon: $3 \mu M$) (X4200). C) Gümüş nitrat (IC_{50} konsantrasyon: $13.5 \mu M$) (X16500). D) Titanyum dioksit (IC_{30} konsantrasyon: $50 \mu M$) (X8200). E) Demir oksit nanotozu (IC_{30} konsantrasyon: $5 \mu M$) (X8200). Oklar apoptotik yapıları göstermektedir

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) sonuçlarına göre kontrole kıyasla madde uygalanan hücreler apoptotik yapılar gösterdi. Oklar apoptotik yapıları göstermektedir. A: Tedavi edilmeyen A549 hücrelerinin ultrastruktural yapısı. B: Apoptotik çekirdek ve kromozom yoğunlaşması. C: nüklear fragmentasyon. D: Kromozom yoğunlaşması ve parçalara ayrılması. E: Sekonder lizozomda artış (Şekil 3.26).

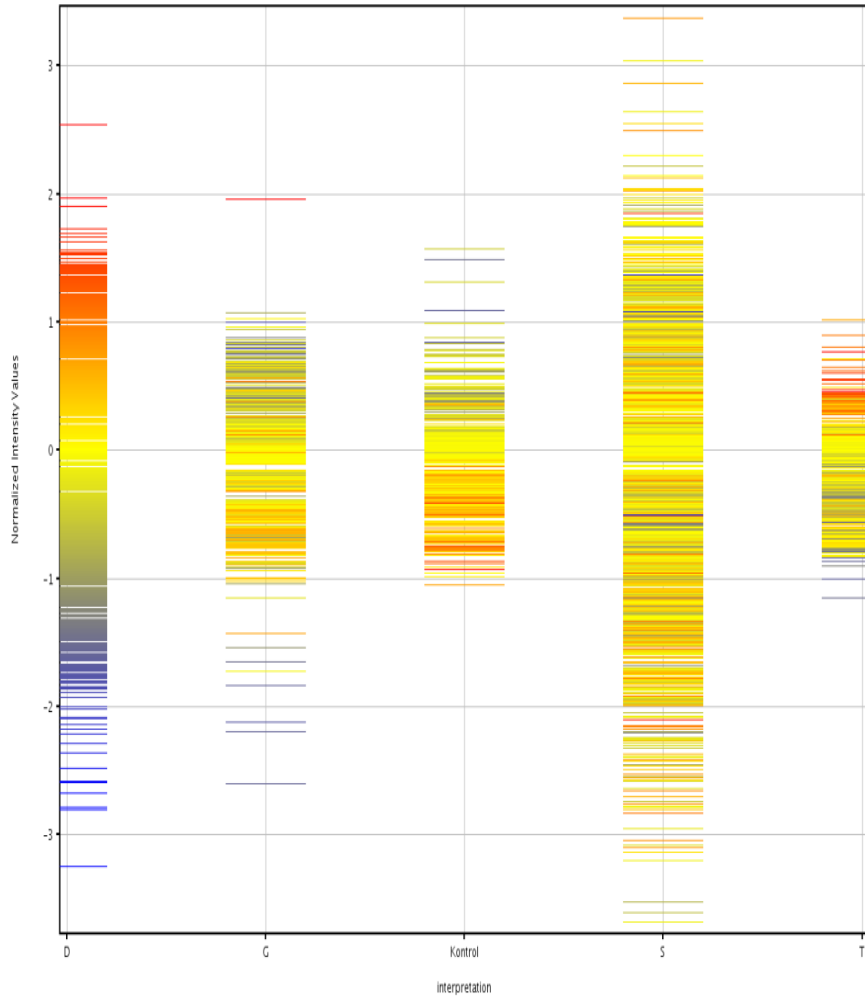
3.12. Tüm genom gen ekspresyonunun doğrudan analizi (Mikroarray analizi)

3.12.1. Örnek kodlaması

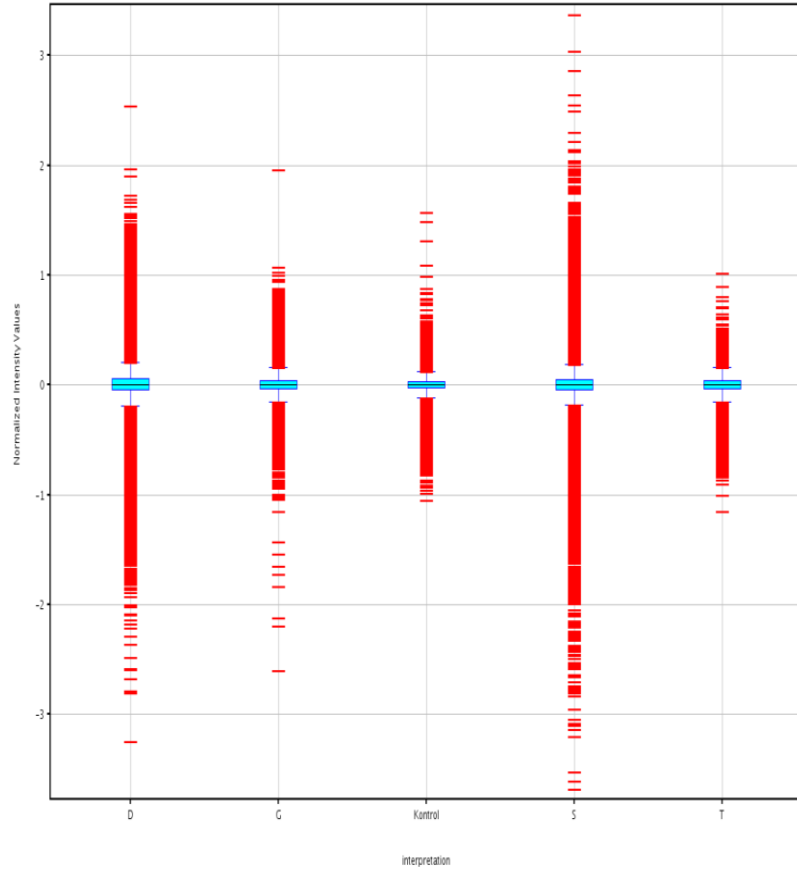
Çalışma kapsamında; 5 farklı gruptan toplam 12 adet RNA örneği alınmıştır. Bu örneklerin cRNA dönüşümleri yapılarak Illumina iScan platformunda 45 binden fazla prob (gen) kullanılarak, “HumanHT-12 V4 Expression BeadChip” ile tüm genom ekspresyon profili çıkarılmıştır. Çalışmada aynı örnek grubuna dahil olan örnekler aynı kodla adlandırılıp, teknik replika olarak değerlendirilmiştir.

3.12.2. Verilerin kalite kontrolü

Ham mikrodizi verisi GenomeStudio programı yardımı ile elektronik verilere dönüştürülmüştür. Mikroarray verilerinin kalite kontrol amaçlı oluşturulan sinyal yoğunluk grafikleri aşağıda gösterilmiştir. Yapılacak karşılaştırmalı analizler için her örneğin verisinden arka plan gürültüsü uzaklaştırılmış ve tüm örneklerin verisi yüzdeler (quantile) normalizasyona tabi tutulmuştur. Probların dağılım grafikleri Şekil 3.27 ve Şekil 3.28’de gösterilmiştir.



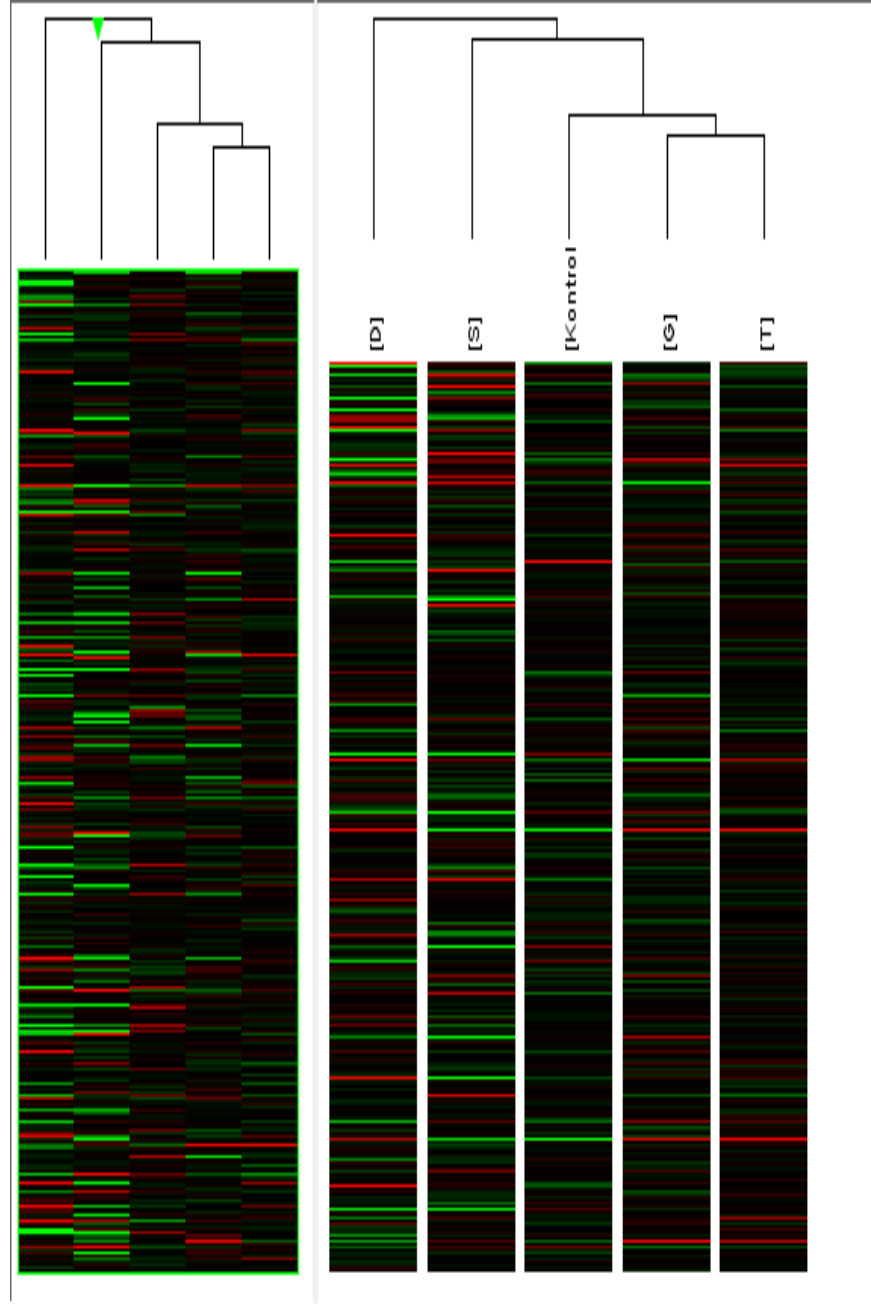
Şekil 3.27. Profil plot (Tek tek problu gösterim) gösterimi



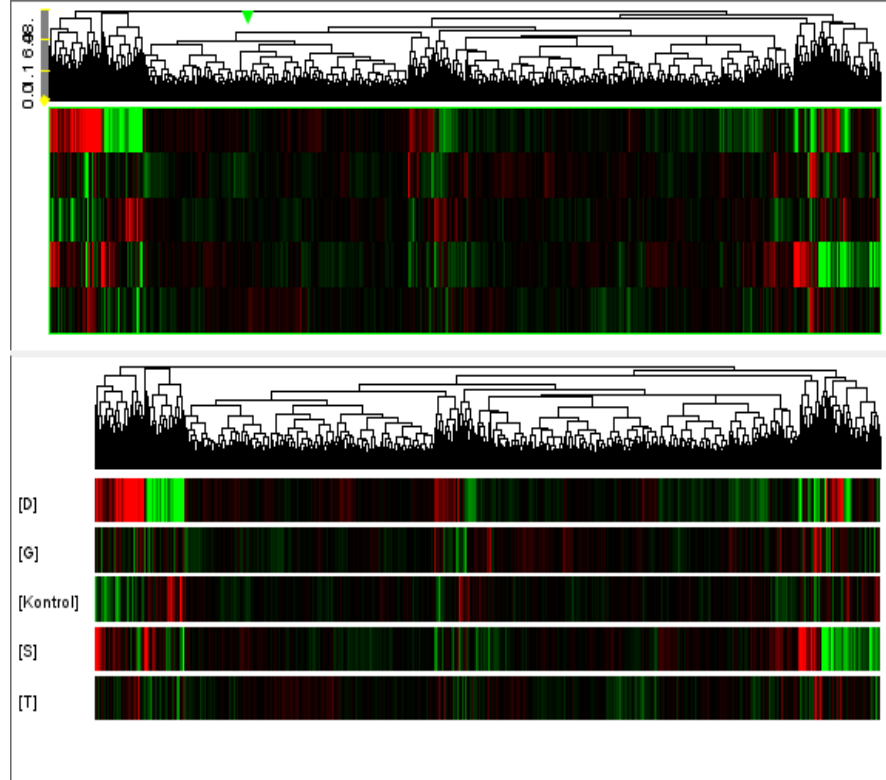
Şekil 3.28. Box plot (Kutu grafiği) gösterimi

3.12.3. Cluster (Kümeleme) analizleri

Normalize edilen veriler (hangi grupta oldukları göz önüne alınmadan) örneklerin tüm genom gen ekspresyon profilleri arasında yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu aşağıdadır. Hiyerarşik kümeleme ‘Hierarchical’ yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur. Uzaklık birimi olarak “Euclidean” ve bağlantı kuralı “Wards” olarak seçilmiştir. Ayrıca teknik replika olarak çalışılan örneklerden elde edilen prob ışımalarının ortalama verileri hesaplanarak elde edilen grup verisinin hiyerarşik kümeleme sonucu ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.29. Gruplar baz alınarak yapılan cluster analizi. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan



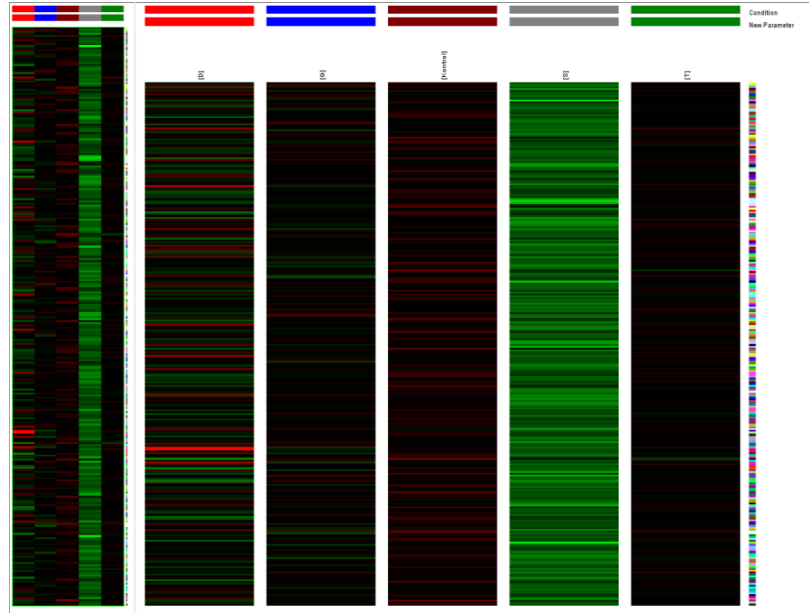
Şekil 3.30. Örnekler baz alınarak yapılan cluster analizi (probu gösterim). Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

3.12.4. İstatistiksel analizler

Çalışmalara 47.231 adet proba başlandı. Bu problemler ekspresyon seviyelerine göre filtrelendi. Normalized datalardan %20'nin altında ışığa alınan problemler filtreye takıldı. 47.217 adet proba çalışmaya devam edildi. Bir problemin, herhangi bir grupta %20'nin üzerinde ışığa alındıysa, filtreden geçmesi sağlandı ve bu sayede prob kaybı en aza indirildi. Standart sapması 0.1'den büyük olan problemler filtrelendi. 47.217 adet probdan 47.204 adet kaldı ve çalışmalara bu problemlerle devam edildi. FC (Fold Change) analizi yapılarak 2 den büyük kat değişimleri her bir prob için artış ve azalış olarak belirtilmiştir. 12 adet örnek 5 gruba ayrıldıktan sonra, 4 farklı karşılaştırma grubu oluşturulmuştur. Her bir grup için filtrelemeler, FC (Fold Change) hesaplaması yapılmıştır. Artan ve azalan problemler için heat-map (sıcaklık haritası) gösterimi raporlanmıştır.

3.12.5. Sisplatinin kontrole göre değerlendirilmesi

Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 280 adet probun (genin) ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 364 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır. Ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.31’de, ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.32’de gösterilmiştir.



Şekil 3.31. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla sisplatinin etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

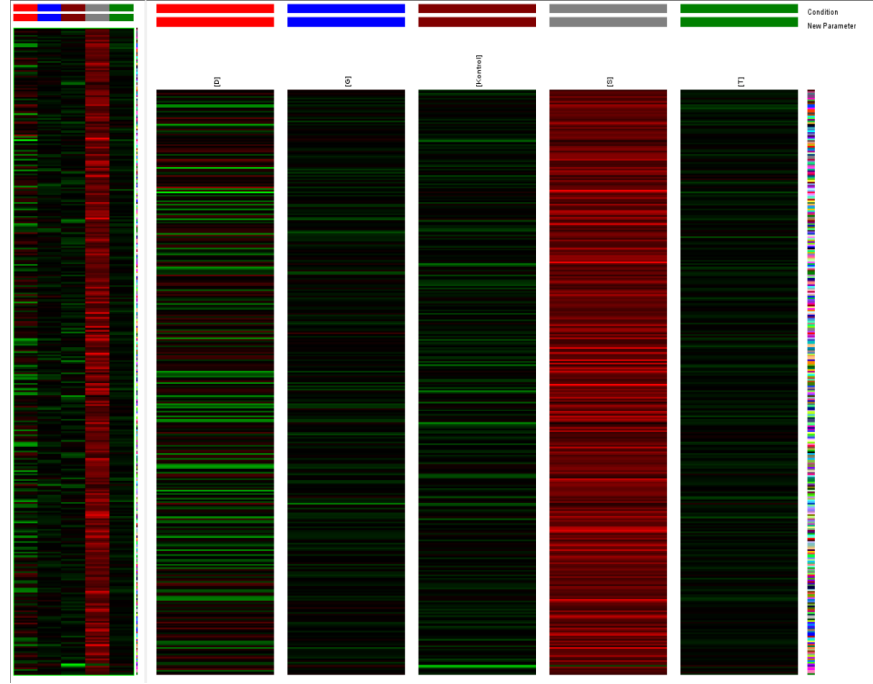
Tüm genom ekspresyonu array sonuçlarına göre, kontrole kıyasla pozitif kontrol sisplatin uygulanan hücrelerde ekspresyon artışı gösteren 280 genden 16 gen proapoptotik etkilidir (Çizelge 3.14). Bu genlerin ekspresyon seviyelerinin artması maddenin uygulandığı hücreyi apoptoza götürmektedir (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14. Kontrole göre sisplatinin etkisiyle ekspresyon artışı gösteren proplar

Prob kimliği	Prob sembolü	Konum	Ontoloji
3520092	BAX	Kromozom 19	İnsanda BCL2-bağlantılı X protein (BAX), transkript variant sigma, mRNA
5310707	EI24	Kromozom 11	İnsanda etoposidi tetikleyen 2,4 mRNA (EI24), transkript varyant 1, mRNA
3610228	PEA15	Kromozom 1	İnsanda astrositlerde zengin fosfoproteinler 15 (PEA15), mRNA
3520020	CYFIP2	Kromozom 5	İnsanda sitoplazmik FMR1 etkileşimli protein 2 (CYFIP2), transkript varyantı 1, mRNA
5570102	DKK1	Kromozom 10	İnsanda Dickkopf homologu 1 (Xenopus laevis) (DKK1), mRNA
5080543	TFPI2	Kromozom 7	İnsanda doku faktör yolu inhibitör 2 (TFPI2), mRNA
4060358	ABCA1	Kromozom 9	İnsanda ATP-bağlama kaseti alt ailesi A (ABC1), üye 1 (ABCA1), mRNA
3290458	FEZ1	Kromozom 11	İnsanda fasikülasyon ve uzama proteini zeta 1 (zygin I) (FEZ1), transkript varyantı 1, mRNA
5960296	CLDN1	Kromozom 3	İnsanda kludin 1 (CLDN1), mRNA
3400538	IGFBP7	Kromozom 4	İnsanda insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 7 (IGFBP7), mRNA

Çizelge 3.14. (Devam) Kontrolle göre sispaltinin etkisiyle ekspresyon artışı gösteren proplar

6660630	TP53INP1	Kromozom 8	İnsanda tümör proteini, p53 tetiklenebilen çekirdek proteini 1 (TP53INP1), mRNA
5420538	TP53INP1	Kromozom8	İnsanda tümör proteini, p53 tetiklenebilen çekirdek proteini 1 (TP53INP1), mRNA
3420026	FAS	Kromozom 10	İnsanda Fas (TNF reseptör süper ailesi, (FAS), transkript varyantı 7, mRNA
2600463	TNFRSF10B	Kromozom 8	İnsanda tümör nekroz faktörü reseptörü süper ailesi, 10b (TNFRSF10B) transkript varyantı 1 mRNA
1260020	TP53I3	Kromozom 2	İnsanda tümör proteini, p53 proteini, indüklenbilir (TP53I3) transkript varyantı 2 mRNA
6660382	CDKN1A	Kromozom 6	İnsanda sikline bağlı kinaz inhibitörü 1A (p21 CIP1) (CDKN1A), transkript varyantı 1 mRNA
610113	TNFSF14	Kromozom 19	İnsanda tümör nekroz faktörü (ligant) süper ailesi, 14 (TNFSF14), transkript varyantı 1 mRNA



Şekil 3.32. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla sislpatinin etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

Tüm genom ekspresyonu array sonuçlarına göre, kontrole kıyasla pozitif kontrol sislpatin uygulanan hücrelerde ekspresyon azalışı gösteren 364 genden 10 gen proapoptotik etkilidir (Çizelge 3.15). Bu genlerin ekspresyon seviyelerinin artması maddenin uygulandığı hücreyi apoptoza götürmektedir (Çizelge 3.15).

Çizelge 3.15. Kontrole göre sislpatinin etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler

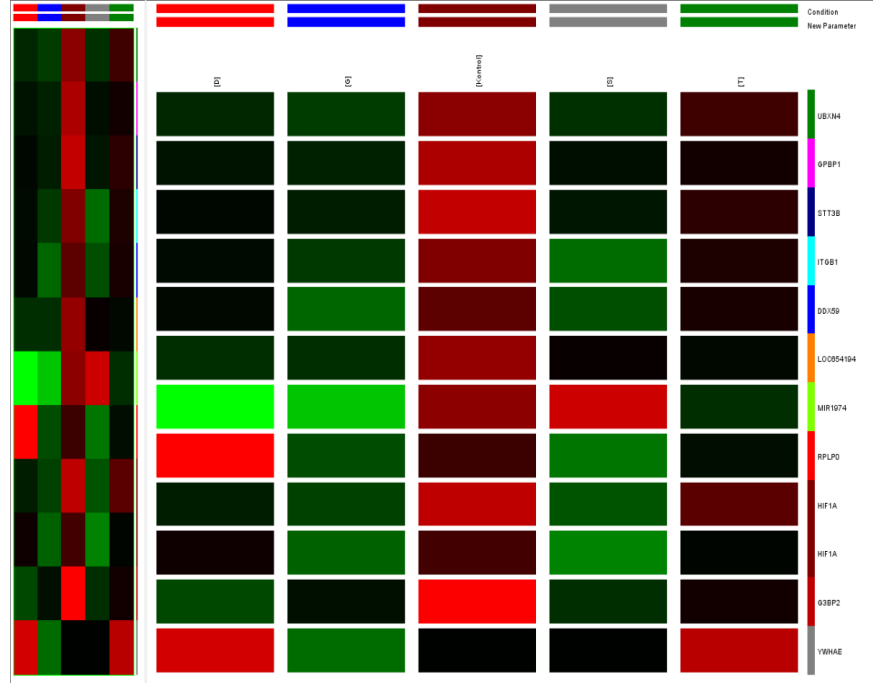
Prob kimliği	Prob sembolü	Konum	Ontoloji
4590040	CCNB1	Kromozom 5	İnsanda siklin B1 (CCNB1), mRNA
6520139	FGFR3	Kromozom 4	İnsanda fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (akondroplazi, tanatoforik cücelik) (FGFR3) transkript varyantı 2 mRNA
1400673	CDCA5	Kromozom 11	İnsanda hücre bölünmesi döngüsü ile ilişkili 5 (CDCA5), mRNA
5360070	CCNB2	Kromozom 15	İnsanda siklin B2 (CCNB2) mRNA
2630673	ASF1B	Kromozom 19	İnsanda ASF1 anti-susturma fonksiyonu 1 homolog B (S, cerevisiae) (ASF1B)

Çizelge 3.15. (Devam) Kontrole göre sispaltinin etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler

290468	EIF2C2	Kromozom 8	İnsanda ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2C, 2 (EIF2C2), mRNA
2760079	FOXC1	Kromozom 6	İnsanda forkhead kutusu C1 (FOXC1), mRNA
3930392	ANG	Kromozom 14	İnsanda anjiyojenin, ribonükleaz RNaz A ailesi, 5 (ANG), transkript varyant 2, mRNA
3890484	ANG	Kromozom 14	İnsanda anjiyojenin, ribonükleaz RNaz A ailesi, 5 (ANG), transkript varyant 2, mRNA
4390564	NUCKS1	Kromozom 1	İnsanda nükleer kazein kinaz ve siklin-bağımlı kinaz substrat 1 (NUCKS1), mRNA

3.12.6. Gümüş nitratın (AgNO₃) kontrole göre değerlendirilmesi

Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 12 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 56 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır. Ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.33'de, ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.34'de gösterilmiştir.



Şekil 3.33. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla gümüş nitratin (AgNO_3) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

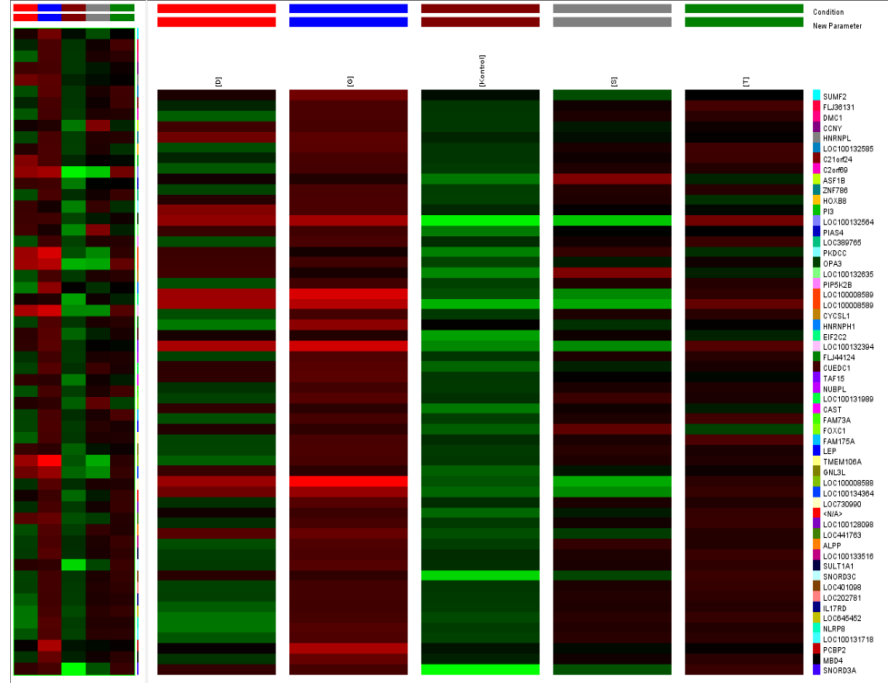
Tüm genom ekspresyonu array sonuçlarına göre, kontrole kıyasla gümüş nitratin uygulandığı hücrelerde ekspresyon artışı gösteren 12 genden hiçbirisinin apoptotik özelliği belirlenemedi (Çizelge 3.16).

Çizelge 3.16. Kontrole göre gümüş nitratin etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemler

Prob kimliği	Prob sembolü	Konum	Ontoloji
1450537	UBXN4 (Endoplazmik retikulum)	Kromozom 2	İnsanda UBX alanı proteini 4 (UBXN4), mRNA
6480315	GPBP1	Kromozom 5	İnsanda GC-zengin promotör bağlayıcı protein 1 (GPBP1), mRNA
1030674	STT3B	Kromozom 3	İnsanda STT3, oligosakkariltransferaz kompleksinin alt-birimi, homologu B (<i>S cerevisiae</i>) kullanılarak (STT3B), mRNA
110440	ITGB1	Kromozom 10	İnsanda integrin beta 1 (fibronektin reseptörü, beta polipeptid antijen CD29 MDF2, MSK12 içerir) (ITGB1) transkript varyantı 1D, mRNA

Çizelge 3.16. (Devam) Kontrolle göre gümüş nitratın etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemler

1300279	DDX59	Kromozom 1	İnsanda DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) kutu polipeptit 59 (DDX59), transkript varyantı 1, mRNA
1260156	LOC654194		İnsanda ribozomal protein benzeri S27 (LOC654194), mRNA
2260349	MIR1974		İnsanda microRNA 1974 (MIR1974), mikroRNA
3940370	RPLP0	Kromozom 12	İnsanda ribozomal protein, büyük, P0 (RPLP0) transkript varyant 1, mRNA
6220543	HIF1A	Kromozom 14	İnsanda hipoksi-indüklenebilir faktör 1, alfa alt birimi (temel helix-loop-helix transkripsiyon faktörü) (HIF1A), transkript varyantı 1, mRNA
4900010	HIF1A	Kromozom 14	İnsanda hipoksi-indüklenebilir faktör 1, alfa alt birimi (temel helix-loop-helix transkripsiyon faktörü) (HIF1A), transkript varyantı 1, mRNA
4540647	G3BP2	Kromozom 4	İnsanda GTPaz aktive edici protein (SH3 etki) bağlayıcı protein 2 (G3BP2), transkript varyantı 3, mRNA
2140762	YWHAE	Kromozom 17	İnsanda tirozin 3-monooksijenaz / triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon proteini, epsilon polipeptid (YWHAE), mRNA



Şekil 3.34. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla gümüş nitratın ($AgNO_3$) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

Tüm genom ekspresyonu array sonuçlarına göre, kontrole kıyasla gümüş nitratın uygulandığı hücrelerde ekspresyon azalışı gösteren 56 genden 10 genin apoptotik etkili olduğu söylenebilir (Çizelge 3.17).

Çizelge 3.17. Kontrole göre gümüş nitratın etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler

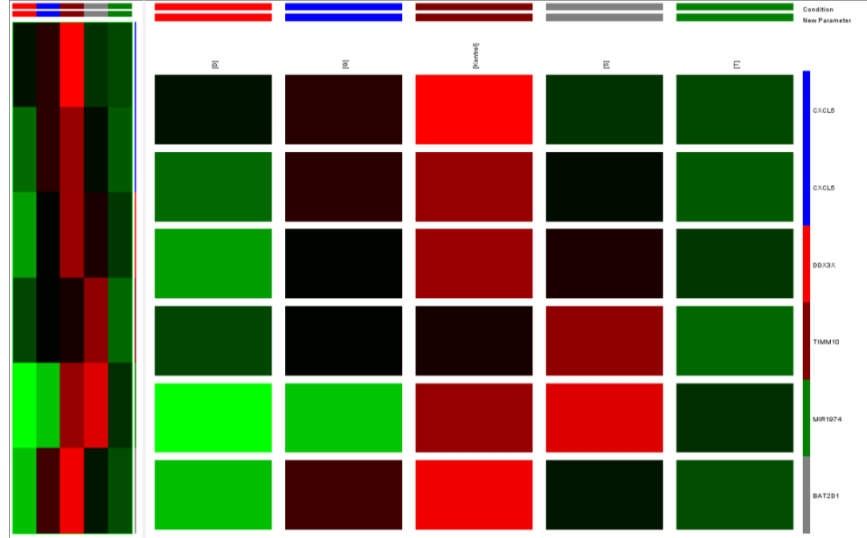
Prob kimliği	Prob sembolü	Konum	Ontoloji
5310605	CCNY	Kromozom 10	İnsanda siklin Y (CCNY), transkript varyantı 1, mRNA
2360608	HNRNPL	Kromozom 19	İnsanda heterojen nükleer ribonükleoprotein L (HNRNPL), transkript varyant 2 mRNA
2630673	ASF1B	Kromozom 19	İnsanda ASF1 anti-susturma fonksiyonu 1 homolog B (S, cerevisiae) (ASF1B), mRNA
1470315	PIAS4	Kromozom 19	İnsanda aktive edilmiş STAT, 4 (PIAS4), mRNA, protein inhibitörü

Çizelge 3.17. (Devam) Kontrolle göre gümüş nitratın etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler

5270754	HNRNPH1	Kromozom 5	İnsanda heterojen nükleer ribonükleoprotein H1 (H) (HNRNPH1), mRNA
290468	EIF2C2	Kromozom 8	İnsanda ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2C, 2 (EIF2C2), mRNA
4860463	TAF15	Kromozom17	İnsanda TAF15 RNA polimeraz II, TATA kutu bağlama proteini (TBP) enzimi yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde bir faktör, 68kDa (TAF15) transkript varyantı 2 mRNA
2760079	FOXC1	Kromozom 6	İnsanda forkhead kutusu C1 (FOXC1), mRNA
840309	LEP	Kromozom 7	İnsanda leptin (obezite homologu, fare) (LEP) mRNA
6480411	PCBP2	Kromozom 12	İnsanda poli (rC) bağlayıcı protein 2 (PCBP2) transkript varyantı 3 mRNA

3.12.7. Titanyum dioksit (TiO₂) kontrolle göre değerlendirilmesi

Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 6 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 11 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır. Ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.35’de, ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.36’da gösterilmiştir.

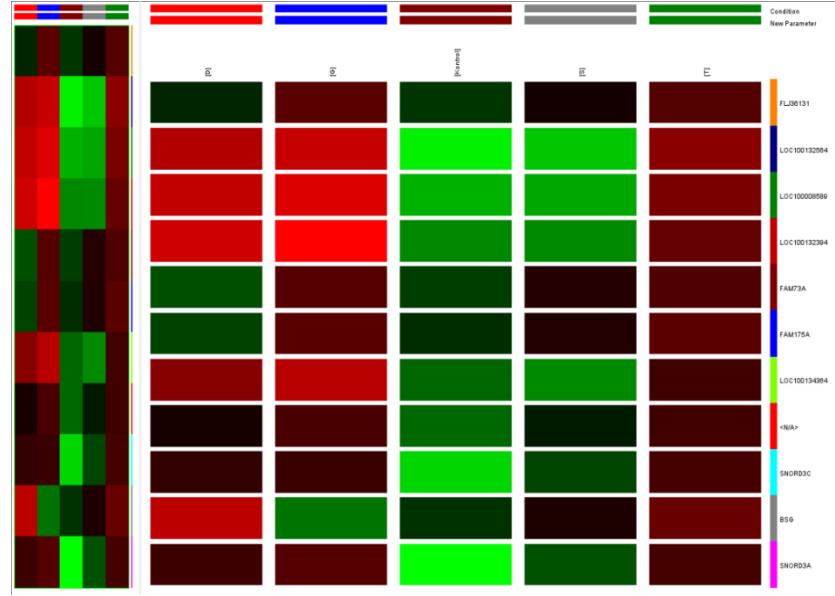


Şekil 3.35. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla titanyum dioksitin (TiO₂) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

Tüm genom ekspresyonu array sonuçlarına göre, kontrole kıyasla titanyum dioksitin uygulandığı hücrelerde ekspresyon artışı gösteren 6 genden hiçbirisinin apoptotik özelliği belirlenemedi (Çizelge 3.18).

Çizelge 3.18. Kontrole göre titanyum dioksitin etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemler

Prob kimliği	Prob sembolü	Konum	Ontoloji
380010	CXCL5	Kromozom 4	İnsanda kemokin (CXC motifi) ligandı 5 (CXCL5), mRNA
540377	CXCL5	Kromozom 4	İnsanda kemokin (CXC motifi) ligandı 5 (CXCL5), mRNA
2970195	DDX3X	Kromozom X	İnsanda DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) kutu polipeptidi 3 (DDX3X) X-bağlantılı, mRNA
3310376	TIMM10	Kromozom 11	İnsanda İç mitokondrial membran 10 homolog (maya) (TIMM10), nükleer gen kodlayan mitokondriyal protein, mRNA translokaz
2260349	MIR1974		İnsanda microRNA 1974 (MIR1974), mikroRNA
460711	BAT2D1	Kromozom 1	İnsanda (BAT2D1) mRNA içeren BAT2



Şekil 3.36. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla titanyum dioksitin (TiO_2) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

Tüm genom ekspresyonu array sonuçlarına göre, kontrole kıyasla titanyum dioksitin uygulandığı hücrelerde ekspresyon azalışı gösteren 11 genden hiçbirisinin apoptotik özelliği belirlenemedi (Çizelge 3.19).

Çizelge 3.19. Kontrole göre titanyum dioksitin etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler

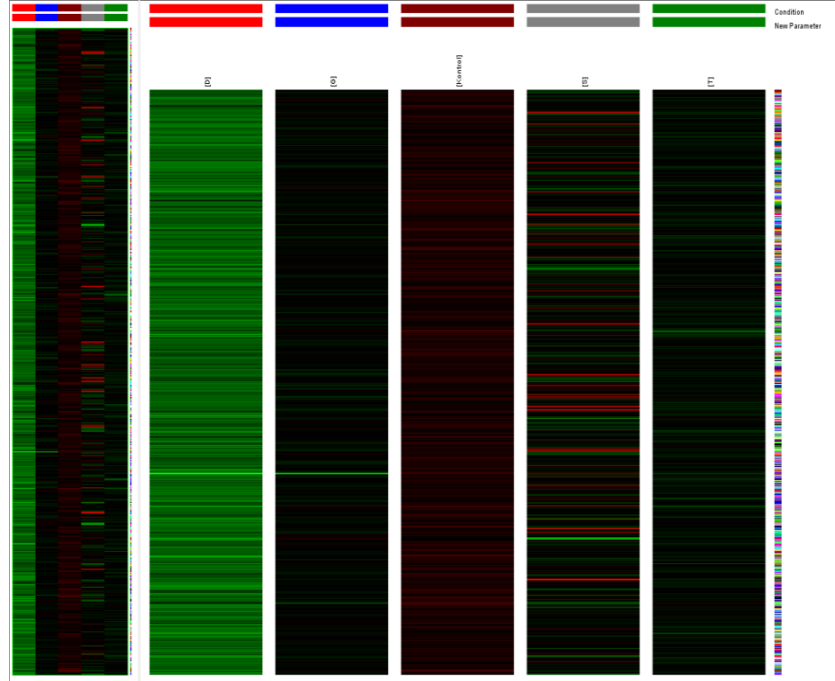
Prob kimliği	Prob sembolü	Konum	Ontoloji
3290537	FLJ36131		İnsanda varsayımsal protein FLJ36131, transkript varyantı 2 (FLJ36131), mRNA
3780767	LOC100132564	Kromozom 12	İnsanda hipotetik protein LOC100132564 (LOC100132564), mRNA
6290142	LOC100008589		İnsanda 28S ribozomal RNA (LOC100008589), kodlayıcı olmayan RNA
4670634	LOC100132394	Kromozom X	İnsanda hipotetik protein LOC100132394 (LOC100132394) mRNA

Çizelge 3.19. (Devam) Kontrole göre titanyum dioksitin etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler

460564	FAM73A	Kromozom 1	İnsanda dizi benzerliği ile Homo sapiens aile üyesi 73 A (FAM73A), mRNA
990332	FAM175A	Kromozom 4	İnsanda Dizi benzerliği ile Homo sapiens aile 175, üye A (FAM175A), mRNA
2630347	LOC100134364		İnsanda hipotetik protein LOC100134364 (LOC100134364), mRNA
3520168		Kromozom 19	İnsanda cDNA klonu GÖRÜNTÜ: 6.563.923 5 mRNA sekansı
580161	SNORD3C	Kromozom 17	İnsanda küçük nükleolar RNA, C / D kutusu 3C (SNORD3C), küçük nükleolar RNA
20673	BSG	Kromozom 19	İnsanda basigin (Tamamen kan grubu) (BSG), transkript varyantı 3, mRNA
2510164	SNORD3A	Kromozom 17	İnsanda küçük nükleolar RNA, C / D kutusu 3A (SNORD3A), küçük nükleolar

3.12.8. Demir (II, III) oksit nanotozunun kontrole göre değerlendirilmesi

Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 618 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 641 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır. Ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.37’de, ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.38’de gösterilmiştir.

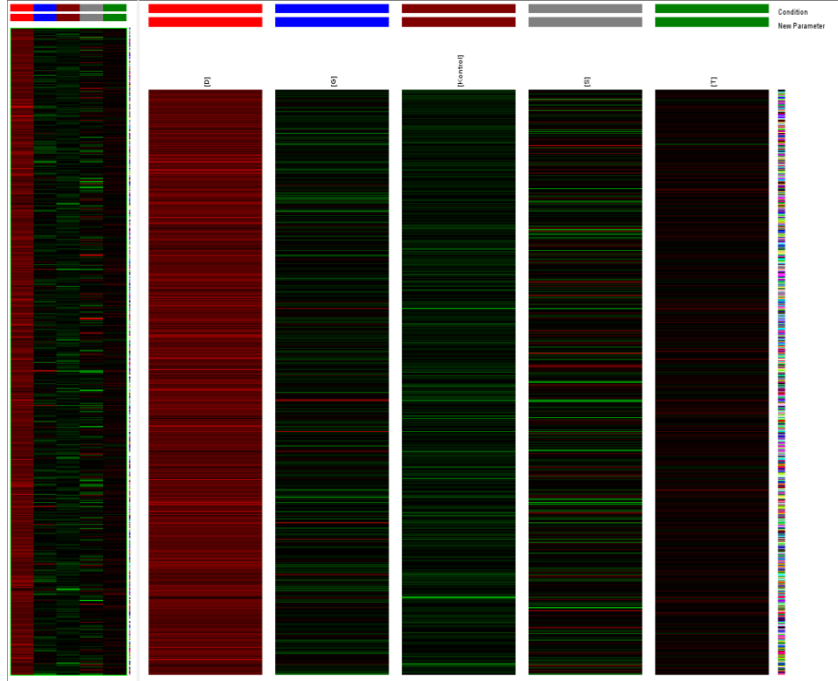


Şekil 3.37. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun (Fe_3O_4) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

Çizelge 3.20. Kontrole göre demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemler

Prob kimliği	Prob sembolü	Konum	Ontoloji
4200343	CYFIP1	Kromozom 15	İnsanda sitoplazmik FMR1 etkileşimli protein 1 (CYFIP1), transkript varyant 2 mRNA
5080543	TFPI2	Kromozom 7	İnsanda doku faktörü yol önleyicisi 2 (TFPI2), mRNA
4060358	ABCA1	Kromozom 9	İnsanda ATP-bağlayıcı kaset, alt ailesi A (ABCA1), üye 1 (ABCA1), mRNA
5960296	CLDN1	Kromozom 3	İnsanda Claudin 1 (CLDN1), mRNA

Tüm genom ekspresyonu array sonuçlarına göre, kontrole kıyasla demir oksit nanotozlarının uygulandığı hücrelerde ekspresyon artışı gösteren 618 genden 4 genin apoptotik etkili olduğu söylenebilir (Çizelge 3.20).



Şekil 3.38. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun (Fe_3O_4) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

Çizelge 3.21. Kontrole göre demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler

Prob kimliği	Prob sembolü	Konum	Ontoloji
5090619	STAT3	Kromozom 17	İnsanda sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 (akut faz tepki faktörü) (STAT3'ü) aktivatör, transkript varyant 3, mRNA
4480220	FGFRL1	Kromozom 4	İnsanda fibroblast büyüme faktörü reseptörü-1 gibi (FGFRL1) transkript varyantı 3, mRNA
2360608	HNRNPL	Kromozom 19	İnsanda heterojen nükleer ribonükleoprotein L (HNRNPL), transkript varyant 2, mRNA
670673	BCL2L1	Kromozom 20	İnsanda BCL2 gibi 1 (BCL2L1), nükleer gen kodlayan mitokondriyal protein, transkript varyantı 1, mRNA

Çizelge 3.21. (Devam) Kontrolle göre demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler

4780128	ATF3	Kromozom 1	İnsanda aktif transkripsiyon faktörü 3(ATF3), transkript varyant 4, mRNA
450164	RAB5C	Kromozom 17	İnsanda RAB5C, RAS aile üyesi (RAB5C), transkript varyant 1 onkojeninin, mRNA
3890484	ANG	Kromozom 14	İnsanda RNaz, anjiyojenin, ribonükleaz ,RNaz A ailesi, 5(ANG), transkript varyant 2, mRNA
2710068	EIF3I	Kromozom 1	İnsanda ökaryotik translasyon başlatma faktörü 3, alt ünite I (EIF3I), mRNA
6980164	NKIRAS2	Kromozom 17	İnsanda NFkB inhibitörü Ras-2 gibi (NKIRAS2), transkript varyant 2, mRNA
1470315	PIAS4	Kromozom 19	İnsanda aktive edilmiş STAT 4 (PIAS4), mRNA, protein inhibitörü
4570670	RRAS	Kromozom 19	İnsanda RAS viral (r-ras) onkogen homoloğu (RRAS), mRNA
4390564	NUCKS1	Kromozom 1	İnsanda nükleer kasein kinaz ve siklin-bağımlı kinaz substrat 1 (NUCKS1), mRNA
6200431	AKT1	Kromozom 14	İnsanda V-Akt murin timoma viral onkogen homologue 1 (AKT1) transkript varyantı 3 mRNA
5420592	SRC	Kromozom 20	İnsanda v-src sarkomu (Schmidt-Ruppin A-2), viral onkogen homologue (SRC) transkript varyantı 2, mRNA
3310427	PCBP2	Kromozom 12	İnsanda poli (rC) bağlayıcı protein 2 (PCBP2), transkript varyantı 1, mRNA

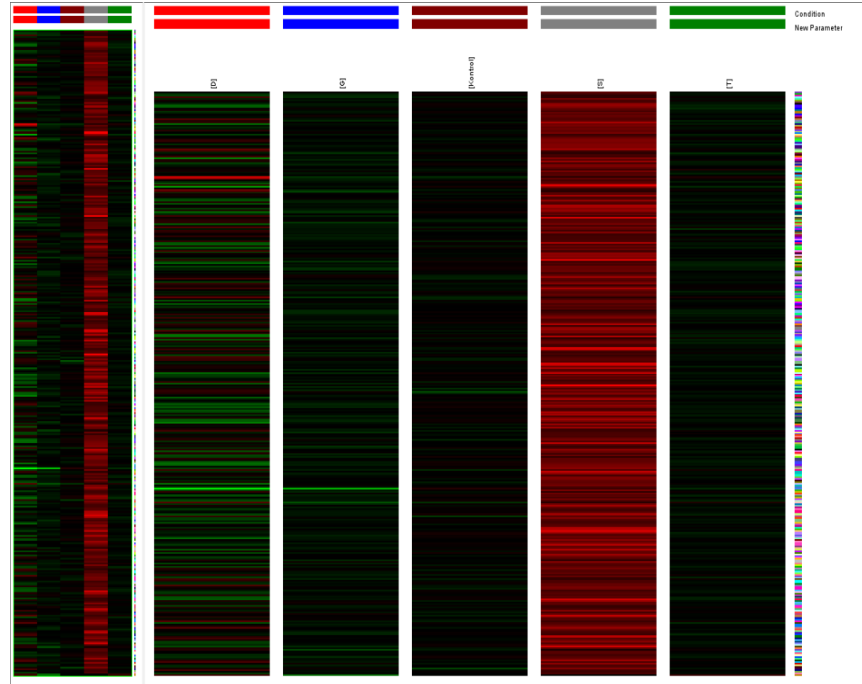
Çizelge 3.21. (Devam) Kontrolle göre demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemler

290468	EIF2C2	Kromozom 8	İnsanda ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2C, 2 (EIF2C2), mRNA
1770753	HRAS	Kromozom 11	İnsanda v-Ha-ras Harvey sıçan sarkomu viral onkogen homologu (HRAS), transkript varyantı 1, mRNA
1710278	CDC34	Kromozom 19	İnsanda hücre bölünme döngüsü 34 homologu (S cerevisiae) kullanılarak (CDC34), mRNA
1710504	NFKB2	Kromozom 10	İnsanda B -hücreleri kapa hafif polipeptid gen arttırıcı 2 (p49 / p 100) (NFKB2), transkript varyantı 3, nükleer faktör, mRNA
150577	EIF4G1	Kromozom 3	İnsanda ökaryotik çeviri başlatma faktörü 4 gama, 1 (EIF4G1), transkript varyantı 3, mRNA
3310615	NFKB2	Kromozom 10	İnsanda B -hücreleri kapa hafif polipeptid gen arttırıcı 2 (p49 / p 100) (NFKB2), transkript varyantı 3, nükleer faktör, mRNA
1850414	EIF5A	Kromozom 17	İnsanda ökaryotik translasyon başlatma faktörü 5A (EIF5A), mRNA

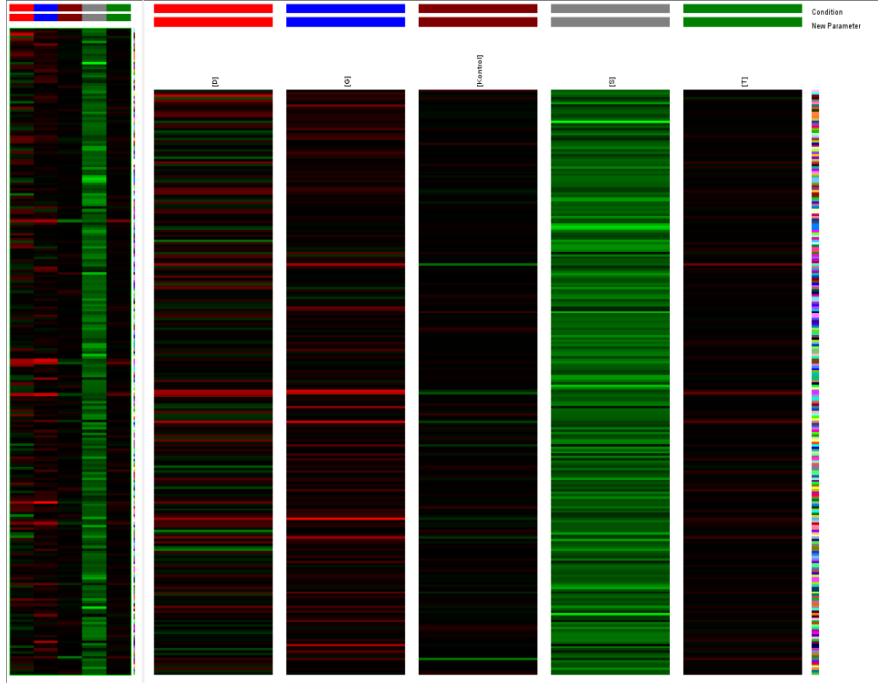
Tüm genom ekspresyonu array sonuçlarına göre, kontrolle kıyasla demir oksit nanotozlarının uygulandığı hücrelerde ekspresyon azalışı gösteren 641 genden 24 genin apoptotik etkili olduğu söylenebilir (Çizelge 3.21).

3.12.9. Gümüş nitratın (AgNO₃) sisplatine göre değerlendirilmesi

Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 373 adet probun ekspresyonu pozitif kontrol sisplatin uygulanan gruba göre artmış, 246 adet probun ekspresyonu sisplatin uygulanan gruba göre azalmıştır. Ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.39'da, ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.40'da gösterilmiştir.



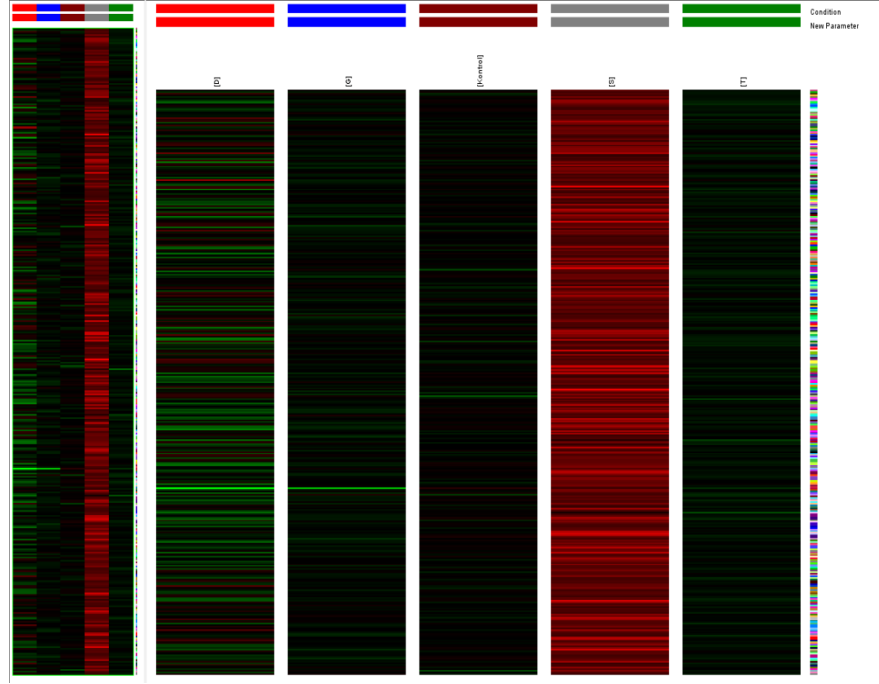
Şekil 3.39. A549 hücrelerinde sisplatinin etkisine kıyasla gümüş nitratın (AgNO₃) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan



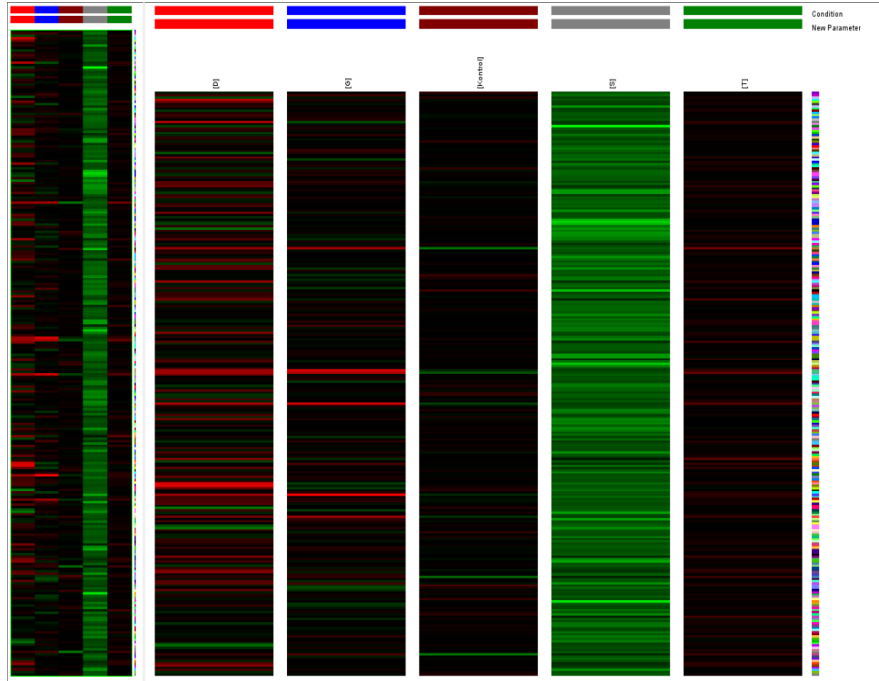
Şekil 3.40. A549 hücrelerinde cisplatinin etkisine kıyasla gümüş nitratın (AgNO_3) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

3.12.10. Titanyum dioksitin (TiO_2) cisplatine göre değerlendirilmesi

Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 385 adet probun ekspresyonu pozitif kontrol cisplatin uygulanan gruba göre artmış, 263 adet probun ekspresyonu pozitif kontrol cisplatin uygulanan gruba göre azalmıştır. Ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.41’de, ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 42’de gösterilmiştir.



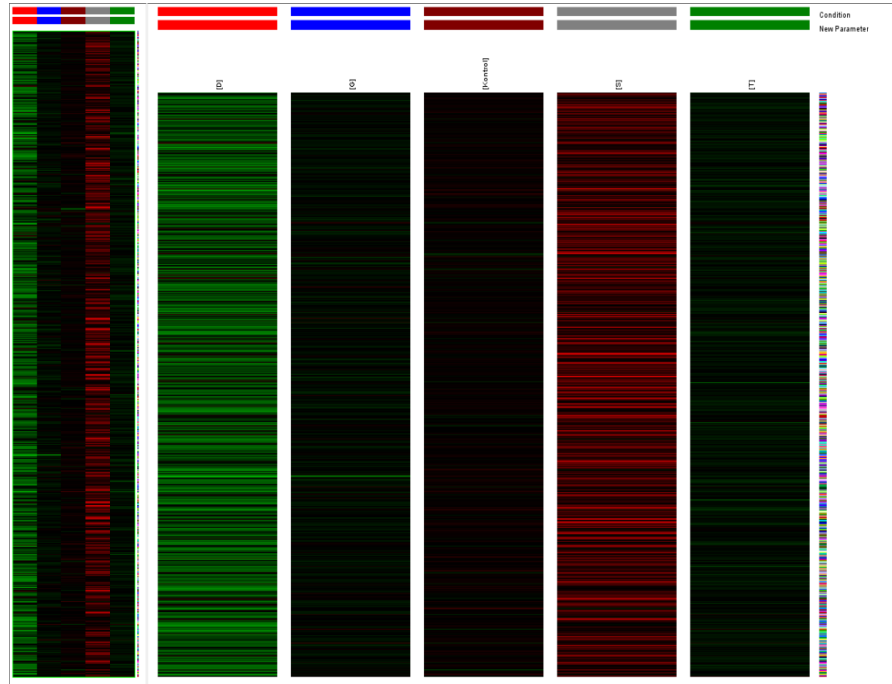
Şekil 3.41. A549 hücrelerinde sisplatinin etkisine kıyasla titanyum dioksitin (TiO_2) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemların sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan



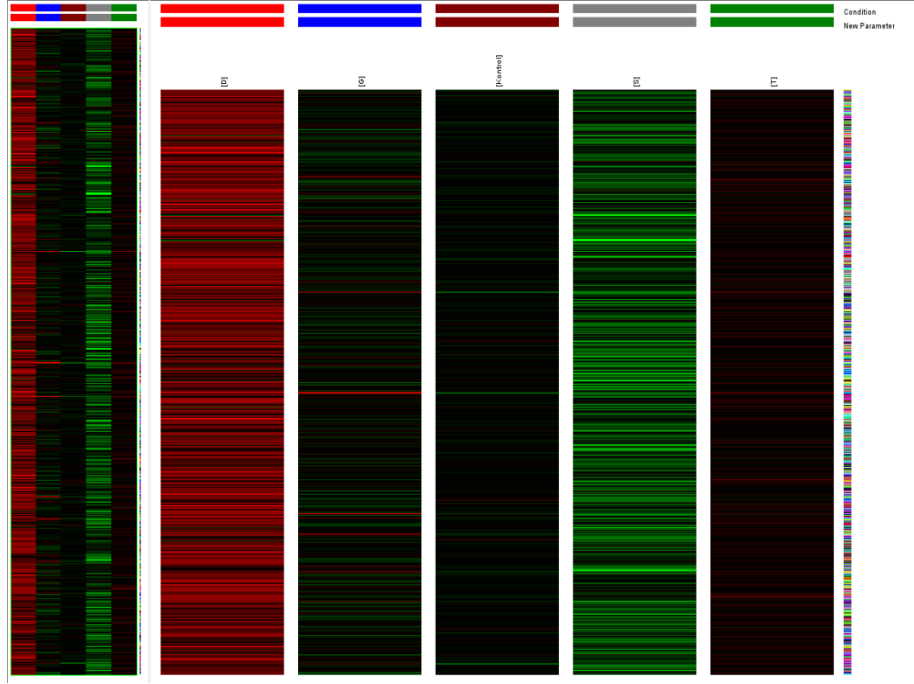
Şekil 3.42. A549 hücrelerinde sisplatinin etkisine kıyasla titanyum dioksitin (TiO_2) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemların sıcaklık haritası. . Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

3.12.11. Demir (II, III) oksit nanotozunun sisplatine göre değerlendirilmesi

Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 708 adet probun ekspresyonu pozitif kontrol sisplatin uygulanan gruba göre artmış, 817 adet probun ekspresyonu pozitif kontrol sisplatin uygulanan gruba göre azalmıştır. Ekspresyon seviyeleri artan problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.43’de, ekspresyon seviyeleri azalan problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.44’de gösterilmiştir.



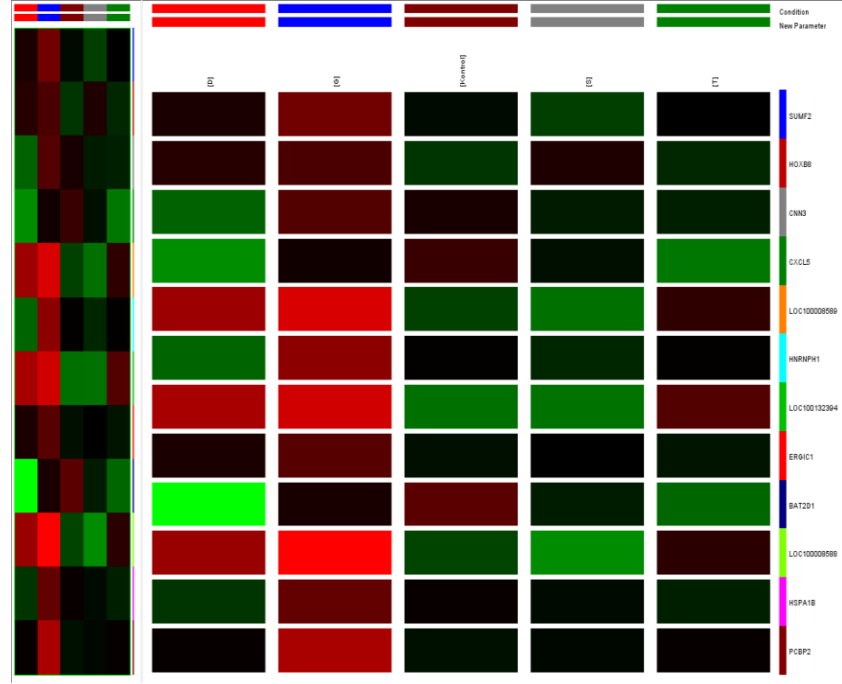
Şekil 3.43. A549 hücrelerinde sisplatinin etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan



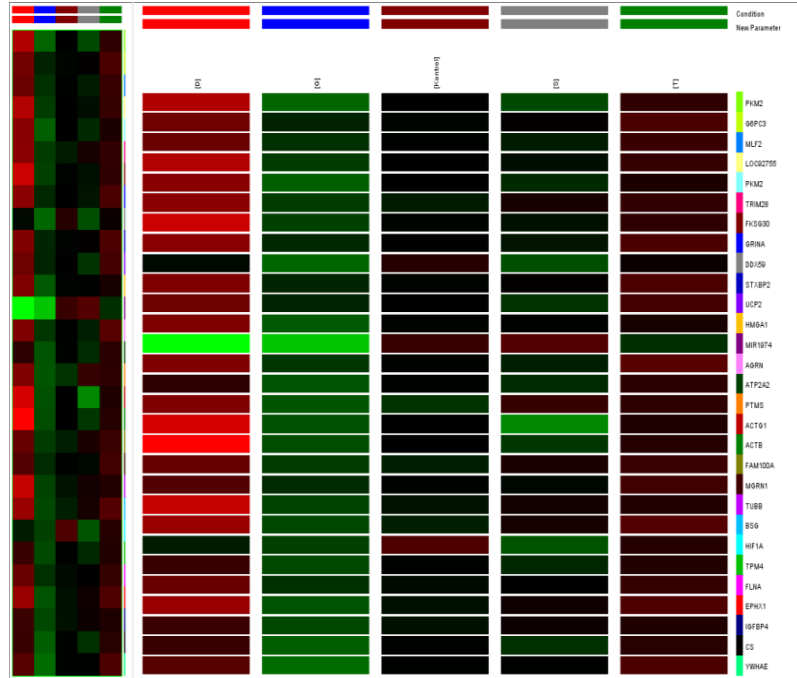
Şekil 3.44. A549 hücrelerinde sisplatinin etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

3.12.12. Titanyum dioksitin (TiO_2) gümüş nitrata ($AgNO_3$) göre değerlendirilmesi

Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 12 adet probun ekspresyonu gümüş nitrat maddesi uygulanan gruba göre artmış, 29 adet probun ekspresyonu gümüş nitrat uygulanan gruba göre azalmıştır. Ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.45’de, ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.46’da gösterilmiştir.



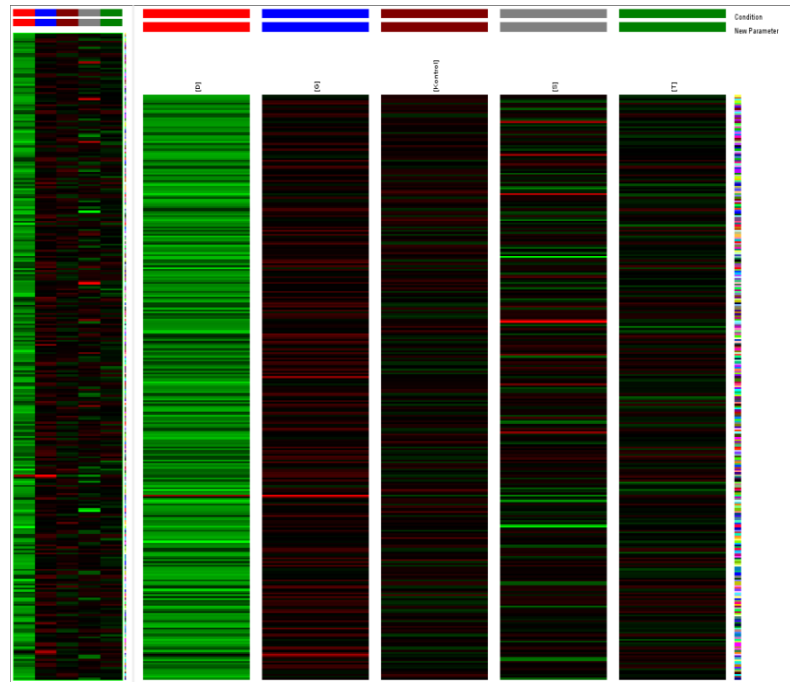
Şekil 3.45. A549 hücrelerinde gümüş nitratın (AgNO_3) etkisine kıyasla titanyum dioksitin (TiO_2) etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan



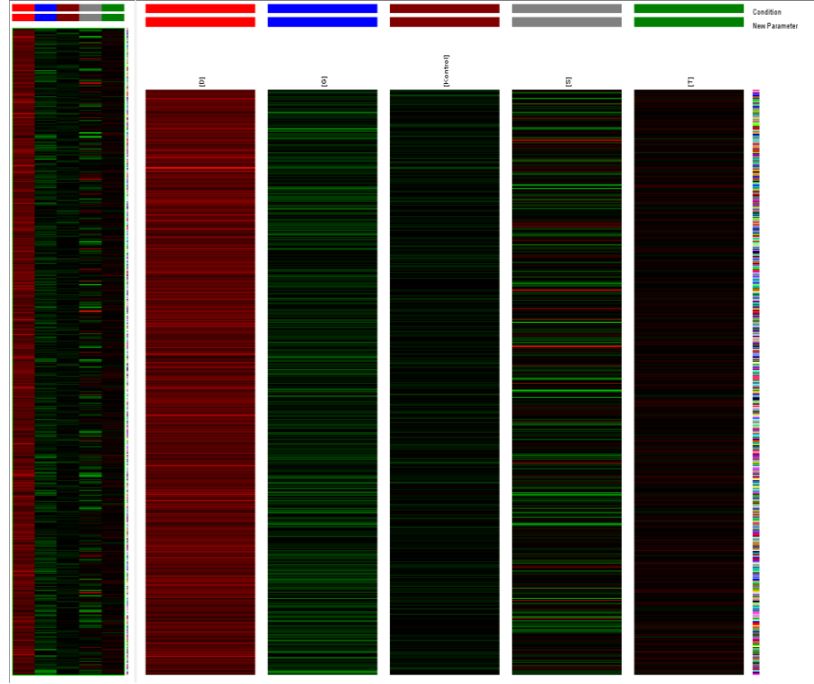
Şekil 3.46. A549 hücrelerinde gümüş nitratın (AgNO_3) etkisine kıyasla titanyum dioksitin (TiO_2) etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

3.12.13. Demir (II, III) oksit nanotozunun gümüş nitrata (AgNO_3) göre değerlendirilmesi

Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 316 adet probun ekspresyonu gümüş nitrat uygulanmış gruba göre artmış, 612 adet probun ekspresyonu gümüş nitrat uygulanmış gruba göre azalmıştır. Ekspresyonu artmış problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.47'de, ekspresyonu azalmış problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.48'de gösterilmiştir.



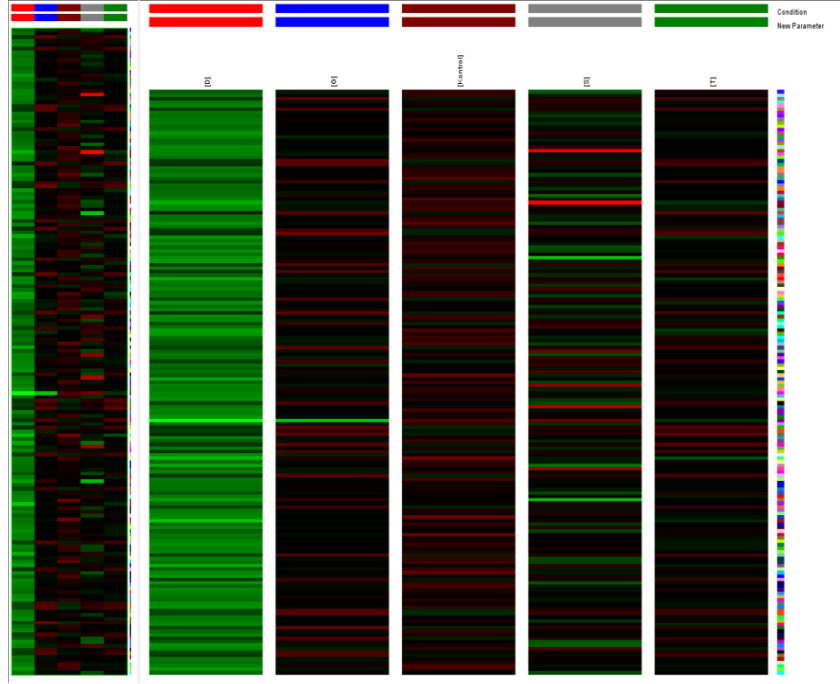
Şekil 3.47. A549 hücrelerinde gümüş nitratin (AgNO_3) etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan



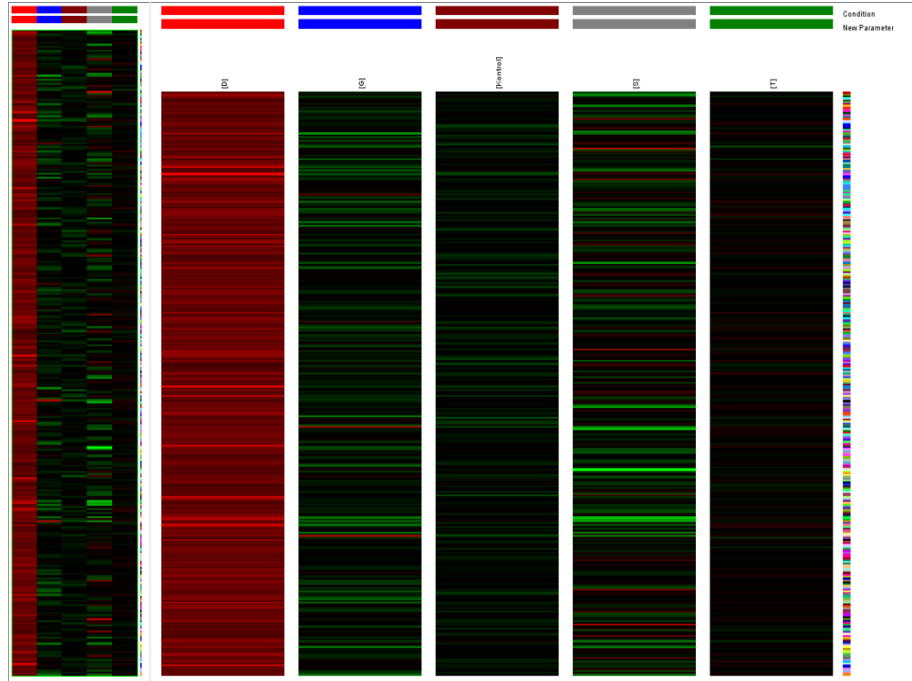
Şekil 3.48. A549 hücrelerinde gümüş nitratın (AgNO_3) etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

3.12.14. Demir (II, III) oksit nanotozunun titanyum dioksite (TiO_2) göre değerlendirilmesi

Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 169 adet probun ekspresyonu titanyum dioksit uygulanan gruba göre artmış, 316 adet probun ekspresyonu titanyum dioksit uygulanan gruba göre azalmıştır. Ekspresyon seviyeleri artmış problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.49'da, ekspresyon seviyeleri azalmış problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.50'de gösterilmiştir.



Şekil 3.49. A549 hücrelerinde titanyum dioksitin (TiO_2) etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon artışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan



Şekil 3.50. A549 hücrelerinde titanyum dioksitin (TiO_2) etkisine kıyasla demir (II, III) oksit nanotozunun etkisiyle ekspresyon azalışı gösteren problemlerin sıcaklık haritası. Kırmızı: ekspresyonu azalan. Yeşil: ekspresyonu artan

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Metal bileşiklerinin antikanser ajan potansiyeli üzerine çok sayıda çalışma ve rapor bulunmaktadır. Bunlardan en iyi bilineni cisplatin'dir [cis-diamin dikloroplatinyum(II)]. Cisplatin çeşitli kanser türlerinde özellikle mesane kanserinde kullanılmıştır ve %70-90 oranında etki göstermiştir. Ancak cisplatinin kliniksel başarısı onun bulantı, kusma, şiddetli nefrotoksisite ve genotoksisite gibi yan etkilerinden dolayı tedavide yetersiz kalmıştır (Thati ve ark., 2007). Yeni kemoterapötik antikanser ajanların denenmesi kanser tedavisinin geliştirilmesinde çok önemlidir (Medvetz ve ark., 2008).

Nanoteknoloji, biyoloji uygulamalarında benzersiz özellikleri elde etmeyi sağlamaktadır. Nanoteknoloji sağlık ve tıp alanında ilaç dağıtımı ve teşhisi, kanser terapisi, moleküler görüntüleme, kardiyovasküler hastalıkların tedavisi ve teşhisinde ve tıbbi ve materyal cihazlarının geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Ghosh ve ark., 2010; Martinez-Gutierrez ve ark., 2011). Nanomateryaller 1-100 nanometre (nm) boyutlarında yapılar (partiküller ve tüpler gibi) sahiptirler. Nanomateryaller genellikle 100 nm'den daha küçük boyutlarda üretilmektedir (Hernandez ve ark., 2009).

Bu tezde metal bileşikler (AgNO_3 ve TiO_2) ve bunların katı lipid nanopartikül (SLN) formlarının (AgNO_3+SLN ve TiO_2+SLN) ve hazır alınan nanopartiküllerle (Fe_3O_4 nanotozu) A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif (çoğalmaya karşı etki), sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkilerinin, ayrıca gen düzeyinde de etkili genlerin *in vitro* yöntemler kullanılarak araştırılması hedeflenmiştir. Katı lipid nanopartiküller (gümüş nitrat ve titanyum dioksit) AÜ. Fen Fakültesi, Kimya Bölümünden sayın hocam Doç. Dr. İlhami Çelik tarafından yapılan zeta sizer ölçümleri sonucunda istenilen nanoboyuta (1-100 nm) ulaşamadığı için sentezlenemedi. Bu nedenle satın alınan demir içeren nanotozlar kullanılarak nanopartikül çalışmaları yapıldı.

Gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir oksit (Fe_3O_4) nanotozlarının akciğer kanseri (A549) hücre hattı üzerindeki antiproliferatif, sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkilerinin, ışık, elektron ve konfokal mikroskopik ve parafin takip ile immün işaretlemeyle beraber gen düzeyinde de mikroarray teknolojisi

kullanılarak *in vitro* çalışılması hedeflenmiştir. Amaç kanser tedavisinde kullanılan metal türevli antikanser ilaçlara karşı yeni alternatif ilaçlar geliştirebilmek, biyokimyasal etki mekanizmalarını anlamak bu yollarda etkili olan genleri tespit etmek ve kanser tedavilerine yeni bir seçenek olabilecek aday moleküller bulabilmektir.

Gümüş gibi metaller antioksidan etki göstermektedir. Oksidatif stres için önemli mekanizmalardır. Gümüş, antibakteriyal etkilerinden dolayı yanık ve yaraların tedavisinde kullanılmaktadır (Greulich ve ark., 2011). Gümüş iyonlarının bakteriler üzerindeki inhibitör etkileri iyi bilinmektedir (Miura ve Shinohara, 2009). Gümüş bileşiklerinden özellikle gümüş nitrat, antimikrobiyal tedavide kullanılmaktadır (Cavicchioli ve ark., 2010; Foldjberg ve ark., 2009). Gümüş düşük konsantrasyonlarda aktiftir ve düşük toksisiteye sahiptir (Ahmad ve ark., 2006). Günümüze kadar gümüşün antikanser aktivitesi keşfedilmemişti. Son yıllarda gümüş bileşiklerinin antikanser ilaç gelişimi için kullanılmasına yoğun bir ilgi vardır (Cuin ve ark., 2011; Siciliano ve ark., 2011).

Son zamanlarda gümüş komplekslerinin *in vitro* antikanser aktivite gösterdiğine dair raporlar bulunmaktadır. Sisplatin ve gümüş nitrat (AgNO_3), OVCAR-3 (ovaryum), MB157 (göğüs) ve Hela (servikal) insan kanser hücre hatlarına uygulanmıştır. Sisplatinin 72 saat sonundaki IC_{50} değerleri OVCAR-3 hattında 12 μM , MB157 hattında 25 μM ve Hela hattında 25 μM olarak belirlenmiştir. Gümüş nitratın 72 saat sonundaki IC_{50} değerleri ise OVCAR-3 hattında 35 μM , MB157 hattında 5 μM ve Hela hattında 50 μM olarak saptanmıştır. Gümüş nitrat, OVCAR-3 ve Hela hücre hatlarında sisplatin kadar etkili olmasa da antikanser etki göstermiştir. Ancak MB157 hücre hatlarında sisplatinden daha etkili olduğu belirlenmiştir (Medvetz ve ark., 2008).

Miura ve Shinohara (2009) nın çalışmalarına göre gümüş nitrat, Hela hücre hatlarında güçlü sitotoksik etki göstermiştir ve oksidatif strese neden olarak apoptozu tetiklemiştir. Gümüş nitratın IC_{50} değeri 17 μg olarak belirlenmiştir. Gümüş nitrat, doz miktarının artışına bağlı olarak erken ve geç apoptotik etkiler göstermiştir. Gümüş nitrat, *ho-1* ve *mt-2A* stres genlerinin ekspresyonunu arttırarak apoptoza neden olmuştur (Miura ve Shinohara, 2009).

Yamazaki ve ark. göre (2006) gümüş iyonları, insan promyelotik lösemi HL-60 hücrelerinde mitokondriyal hasara neden olarak apoptotik hücre ölümünü tetiklemiştir. Bir araştırmaya göre gümüş nitratın A549 hücreleri üzerinde 24 saat sonundaki en düşük konsantrasyon etkisi 30 μM olarak belirlenmiştir (Koch ve ark., 2012). Gümüş metal bileşiklerinin, A-498 insan karaciğer adenokarsinoma, HK-2 insan proksimal tübular, insan karaciğer ve HepG2 insan hepatosellular karsinoma memeli hücre hatlarında in vitro antiproliferatif etkileri saptanmıştır (Thati ve ark., 2009). Gümüş nitrat, HaCaT keratinosit ve K562 eritrolösemi memeli hücre hatlarına uygulanmıştır ve sırasıyla 6.4 ve 3.5 μM dozlarda etkili olduğu belirlenmiştir (Nagy ve ark., 2011). Bir başka çalışmaya göre gümüş nitrat, L929 ölümsüz fare fibroblast hücre hatlarında denenmiştir ve sitotoksik etkiler gözlenmiştir (Müller ve Kramer, 2008).

Bu tezde gümüş nitratın A549 adenokarsinoma insan alveolar bazal epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik, antiproliferatif, apoptotik ve biyokimyasal etkileri belirlendi. Gümüş nitrat, yüksek sitotoksik etki gösterdi. Gümüş nitrat 1-5-10-25-50-100-125-250-500-1000 μM konsantrasyon aralığında denenerek IC_{50} değerleri 24 saat sonunda 24.75 μM , 48 saat sonunda 15 μM ve 72 saat sonunda 13.5 μM olarak saptandı (Çizelge 3.5). Pozitif kontrol sisplatinin IC_{50} değerleri 24 saat sonunda 31.25 μM , 48 saat sonunda 5.1 μM ve 72 saat sonunda 3 μM olarak belirlendi (Çizelge 3.5). Bu değerleri kıyasladığımızda gümüş nitrat 24 saat sonunda sisplatinden daha etkili görülse de 48 ve 72 saat sonunda sisplatin kadar etkili görülmedi. Medvetz ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmaya kıyasla bu tezde gümüş nitrat A549 hücreleri üzerinde daha sitotoksik etki göstermiştir denilebilir.

Gümüş nitratın IC_{50} (13.5 μM) dozu A549 hücrelerine uygulandığında Anneksin/PI boyaması sonucu erken ve geç apoptotik etkiler saptandı (Şekil 3.17). Erken ve geç apoptotik (Q2+Q4) etkiler toplamda % 15.3 olarak belirlendi. Nekrotik etki (Q1) % 1.5 oranında görüldü (Çizelge 3.6). Kontrol hücrelerine kıyasla gümüş nitratın apoptotik etkisi % 10.3 ve nekrotik etkisi % 1.3 daha fazla olarak saptandı. Pozitif kontrol sisplatinin IC_{50} (3 μM) dozu A549 hücrelerine uygulandığında erken ve geç apoptotik (Q2+Q4) etkiler toplamda % 36 olarak saptandı (Çizelge 3.6). Sisplatinin nekrotik etkisi % 2.6 olarak belirlendi. Kontrol

hücrelerine kıyasla sisplatinin apoptotik etkisi % 31 ve nekrotik etkisi % 2.4 daha fazla olarak belirlendi. Anneksin/PI boyaması sonuçlarına göre pozitif kontrol sisplatin daha fazla apoptotik ve nekrotik etki göstermektedir. Gümüş nitrat uygulanan hücrelerde kaspaz-3 aktivitesi gözlenmedi (Şekil 3.18). Pozitif kontrol sisplatin uygulanan hücrelerde % 40.7 kaspaz-3 aktivitesi gözlendi (Şekil 3.18). Gümüş nitrat, hücrelerde mitokondri aktivitesini % 5.9 azaltmıştır. Ancak kontrole kıyasla gümüş nitrat uygulanan hücrelerde mitokondri aktivitesi % 1.5 azalmıştır (Çizelge 3.8). Pozitif kontrol sisplatin uygulanan hücrelerde mitokondri aktivitesi % 22.3 azalmıştır (Şekil 3.19). Gümüş nitratın kaspaz-3 aktivitesini arttırıcı etkisi belirlenmedi (Şekil 3.18) ve kontrole göre mitokondriyal aktiviteyi azaltıcı etkisi söylenebilir (Şekil 3.19). Gümüş nitratın kaspaz-3 aktivitesi olmadığı, tüm genom ekspresyonu mikroarray analizi ile doğrulanmıştır. İmmünohistokimyasal boyamalar sonucu gümüş nitrat apoptotik etki göstermiştir. Konfokal (Şekil 3.25) ve TEM mikroskobu (Şekil 3.26) analizleri sonucunda, gümüş nitrat uygulanmış hücrelerde çeşitli apoptotik morfoloji görüldü.

Tüm genom ekspresyonu mikroarray analizi sonucunda gümüş nitrat *CCNY*, *HNRNPL*, *ASF1B*, *PIAS4*, *HNRNPH1*, *EIF2C2*, *TAF15*, *FOXCl*, *LEP* ve *PCB2* genlerinin ekspresyonlarını azaltarak hücre ölümüne neden olduğu söylenebilir (Çizelge 3.17).

CCNY geni siklin protein ailesine ait bir genidir. Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar hücre siklusunda görevlidir. Siklin proteinleri hücre çoğalmasında önemli düzenleyicilerdir. Ancak *CCNY* ekspresyonunun insan akciğer kanseri ile bağlantısı bilinmemektedir. *CCNY* geninin NSCLC (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) dokusunda ekspresyon artışı gösterdiği belirlenmiştir. Bu ekspresyon in vitro olarak da doğrulanmıştır. *CCNY* geninin ekspresyonunun azaltılması (sessizleştirilmesi) akciğer kanseri hücre çoğalmasını inhibe etmiştir ve H1299 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) kanser hücrelerinde hücre siklus sürecini inhibe etmiştir (Yue ve ark., 2010). Goehle ve arkadaşlarının (2010) araştırmasına göre *hmRNPL* küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) eksprese edilmektedir. *hmRNPL* ekspresyonunun azaltılması kaspaz 9 ekspresyon artışı sağlayarak tümörigenik kapasite kaybını tetiklemiştir. Yapılan bir çalışmaya göre göğüs kanserinde *Ash1b*'in aşırı eksprese edildiği gözlenmiştir

ve hücre çoğalmasında etkili bir faktör olarak görülmüştür. Asf1 ailesinden *Asf1b*, histon H3-H4 şaperon proteinidir. Bu nedenle *Asf1b* geninin ekspresyon azalışı, kanser tedavisi için önemli bir hedef olabilir (Corpet ve ark., 2011). *PIAS4*, pankreas kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılayarak hipoksi sinyal yolunun bir aktivatörü olarak gösterilmiştir. *PIAS4*, aktif STAT proteinin inhibitörüdür. Normal hücrelere kıyasla pankreas hücrelerinde *PIAS4* fazla eksprese edildiği ve hücre çoğalması ile ilgili genleri tetiklediği belirlenmiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (H1299), *PIAS4*'ün ekspresyonu p53 genini ve p53 geninin hedef genleri olan bax genlerini baskılamaktadır. *PIAS4* aktivitesinin inhibisyonu yeni bir terapötik uygulama olarak görülmüştür (Chien ve ark., 2013). MikroRNA (miRNA) düzenleyicisi olan *EIF2C* geninin sessizleştirilmesi MM (plazma hücre kanseri) hücre hatlarının canlılığını azaltmıştır (Zhou ve ark., 2010). *TAF15*, DNA ve RNA bağlanma protein ailesinin bir üyesidir. Yapılan bir çalışmaya göre *TAF15* sessizleştirilmesi hücre çoğalmasının inhibitörü olarak belirlenmiştir ve apoptoz artmasına neden olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda *TAF15* sessizleştirilmesi, miRNA (*miR-17-5p* ve *miR-20a*) seviyelerini azaltmaktadır. *TAF15*, hücre siklus düzenleyici genlere etki ederek hücre çoğalmasını etkilediği söylenebilir (Ballarino ve ark., 2013). *TAF15*, geni PI3K-Akt sinyal yolunu aktive etmektedir ve akciğer adenokarsinomasında aşırı eksprese edilmektedir. Kanser hücre tiplerinde, *TAF15* geninin sessizleştirilmesi önemli bir hedef olarak görülebilir (Bidkhorı ve ark., 2013). *FOXCI*, insan küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin (NSCLC) gelişim sürecinde önemli bir rol oynayabilir. *FOXCI* transkripsiyonel bir faktördür (Wei ve ark., 2013). *FOXCI* geninin sessizleştirilmesi, kanser tedavisinde önemli bir hedef olarak gösterilebilir. Leptin (*LEP*) ekspresyonunun HepG2 (hepatosellular karaciğer kanseri) hücrelerinin proliferasyonunu etkilediği belirlenmiştir. Yapılan farmakolojik inhibisyon deneylerine göre *LEP* ekspresyon artışı, siklin D1 seviyesini artırarak hücre çoğalmasını tetikler ve Bax ekspresyonunu azaltarak (JAK2-PI3K/Akt-MEK/ERK1/2 kaskad yolu boyunca) programlı hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2007). Bu nedenle *LEP* ekspresyonunun sessizleştirilmesi kanser tedavisinde hedef olarak gösterilebilir. *PCBP2*, posttranskripsiyonel ve translasyonel düzenlemede önemli bir rol oynar (Chen ve

ark., 2014). *PCBP2*'nin insan mide kanserinde onkogenik bir protein olduğu belirlenmiştir. *PCBP2*, in vitro ve in vivo mide kanserinin hücre çoğalmasını düzenlediği ve fazla eksprese edildiği belirlenmiştir. Bu düzenlemeyi, miR-34a genini inhibe ederek sağlamaktadır. *PCBP2*, mide kanserinin tedavisinde bir ilaç hedefi olarak gösterilmiştir (Hu ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada glioma hücre hatlarında (T98G, U87MG, A172, U251 ve CCF-STTG1) *PCBP2* inhibe edilmiştir ve kanser tedavisinde hedef olarak gösterilmiştir (Chen ve ark., 2014). *PCBP2* geni, bu çalışmada gümüş nitrat uygulanan A549 hücrelerinde ekspresyonu azaltıldı.

Tüm genom analizi sonucu gümüş nitrat etkisiyle ekspresyonu azalmış genlerin (*CCNY*, *HNRNPL*, *ASF1B*, *ZNF786*, *PI3*, *PIAS4*, *HNRNPH1*, *EIF2C2*, *TAF15*, *FOXC1*, *LEP* ve *PCB2*) apoptotik yollarda etkili olduğu söylenebilir.

Tüm genom ekspresyonu analizi sonucunda pozitif kontrol sisplatin maddesi *BAX*, *EI24*, *PEA15*, *CYFIP2*, *DKK1*, *TFPI2*, *ABCA1*, *FEZ1*, *CLDN1*, *IGFBP7*, *TP53INP1*, *FAS*, *TNFRSF10B*, *TP53I3*, *CDKN1A*, *TNFSF14* ekspresyon miktarlarını arttırdı (Çizelge 3.14). Bu genlerden özellikle *Bax*, *FAS*, *TNFRSF10B* ve *TNFSF14* genleri apoptotik etkili genler olarak bilinmektedir. Gümüş nitrat ve sisplatin gen ekspresyonlarını kıyasladığımızda gümüş nitrat sisplatine göre 373 prob ekspresyonunu arttırmıştır (Şekil 3.39) ve 246 prob ekspresyonunu azaltmıştır (Şekil 3.40). Sisplatinin ekspresyonunu azalttığı *ASF1*, *EIF2C2* ve *FOXC1* genlerinin gümüş nitrat tarafından da ekspresyonu azaltıldı. Bu genler apoptotik etkiye neden olan genler olarak belirlendi. Gümüş nitratın pozitif kontrol sisplatin gibi aynı hedef genleri etkilediği söylenebilir.

Titanyum, biyomedikal uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Lagopati ve ark., 2010; Stefanou ve ark., 2010). Titanyum bileşiklerinin aktivite mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Titanyumun, titanosen diklorür ve türevleri çok sayıda tümör hücre tiplerinde araştırılmıştır (Shavit ve ark., 2007). Titanyumun en önemli endüstriyel bileşiği titanyum dioksittir (Lazau ve ark., 2007). Titanyum dioksitin UV'den koruyucu etkileri araştırılmıştır (Cengiz ve ark., 2006). Titanyum dioksit, dezenfektan, antibiyotik, biyolojik sensör, tümör hücre-ölüm ajanı ve gen hedefleme ajanı olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Thurn ve ark., 2011). Biyoloji ve tıbbi çalışmalarda titanyum

dioksit antikanser etkili olarak araştırılmıştır (Kubota ve ark., 1994). Son yıllarda titanyum dioksit (TiO_2) kanser hücrelerinde uygulanmıştır (Harada ve ark., 2011). Hela hücreleri üzerine titanyum dioksit uygulanmıştır ve hücre ölümü gözlenmiştir. Aynı zamanda T-24 insan mesane kanser hücrelerine karşıda çalışılmıştır ve T24 hücreleri öldürülmüştür (Kubota ve ark., 1994). Yamaguchi ve ark. (2010) göre TiO_2 kanser hücrelerini öldürme yeteneğine sahiptir. TiO_2 , deneysel sıçanlarına enjekte edilmiştir ve önemli bir toksisite gözlenmemiştir.

Bu tezde titanyum dioksitin, A549 adenokarsinoma insan alveolar bazal epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik, antiproliferatif, apoptotik ve biyokimyasal etkileri belirlendi. Titanyum dioksit, A549 adenokarsinoma insan alveolar bazal epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdi. Ancak titanyum dioksit uygulanan A549 hücrelerinde, pozitif kontrol sisplatin ve gümüş nitrata uygulanan hücrelere kıyasla daha az sitotoksik etki gözlemlendi. Titanyum dioksit 1-5-10-25-50-100-125-250-500-1000 μM konsantrasyon aralığında denenerek IC_{30} değeri belirlendi (Çizelge 3.5) ve 72 saat sonundaki IC_{30} değeri (50 μM) diğer analizlerde uygulandı.

Titanyum dioksitin IC_{30} doz değeri (50 μM) A549 hücrelerine uygulandığında Anneksin/PI boyaması sonucu erken ve geç apoptotik etkiler saptandı. Erken ve geç apoptotik (Q2+Q4) etkiler toplamda % 19.7 olarak belirlendi. Nekrotik etki (Q1) % 0.5 oranında görüldü. Kontrol hücrelerine kıyasla titanyum dioksit, % 14.7 apoptotik etki ve % 0.3 nekrotik etki göstermiştir (Çizelge 3.6). Pozitif kontrol sisplatinin IC_{50} (3 μM) dozu A549 hücrelerine uygulandığında erken ve geç apoptotik (Q2+Q4) etkiler toplamda % 36 olarak saptandı (Çizelge 3.6). Anneksin/PI boyaması sonuçlarına göre pozitif kontrol sisplatin daha fazla apoptotik ve nekrotik etki gösterdi. Titanyum dioksit IC_{30} doz değeri (50 μM) uygulanan hücrelerde kaspaz-3 aktivitesi gözlenmedi (Çizelge 3.7). Pozitif kontrol sisplatin uygulanan hücrelerde % 40.7 kaspaz-3 aktivitesi belirlendi (Çizelge 3.7). Titanyum dioksit, mitokondri aktivitesini % 8.9 azaltmıştır. Ancak kontrole kıyasla titanyum dioksit IC_{30} (50 μM) dozu uygulanan hücrelerde mitokondri aktivitesi % 4.8 azalmıştır. Pozitif sisplatin uygulanan hücrelerde mitokondri aktivitesi % 22.3 azalmıştır (Çizelge 3.8). Titanyum dioksitin, kaspaz-3 aktivitesini arttırıcı etkisi belirlenmedi (Şekil 3.18). Titanyum

dioksitin kaspaz-3 üzerine etkisi olmadığı tüm genom analizi sonucunda da doğrulanmıştır. Kontrole kıyasla mitokondriyal membran aktivitesi azalmasına neden olduğu söylenebilir (Şekil 3.19). İmmünohistokimyasal boyamalarda, titanyum dioksit IC₃₀ doz değeri (50 µM) apoptotik etki gösterdi. Konfokal (Şekil 3.25) ve TEM (Şekil 3.26) mikroskopi analizleri sonucunda titanyum dioksit uygulanmış hücrelerde çeşitli apoptotik morfoloji belirlendi.

Tüm genom ekspresyonu mikroarray analizi sonucu titanyum dioksit, uygulandığı A549 hücrelerinde kontrole kıyasla *CXCL5*, *DDX3X*, *TIMM10*, *MIR1974*, *BAT2D1* genlerinin ekspresyonunu arttırmıştır (Çizelge 3.18). *FLJ36131*, *LOC100132564*, *LOC100008589*, *LOC100132394*, *FAM73A*, *FAM175A*, *LOC100134364*, *SNORD3C*, *BSG* ve *SNORD3A* genlerinin ekspresyonunu azaltmıştır (Çizelge 3.19). Bu genlerin literatür taramalarında antikanser ve apoptotik etkili olduğuna dair araştırmalar rapor edilmemiştir. Bu nedenle titanyum dioksit genom analizi sonuçlarına göre apoptotik etkili hedef genler belirlenemedi. Ancak bu tezdeki diğer analizlerde titanyum dioksitin apoptotik etkisi saptanmıştır. Kanser tedavisine yönelik gelecek çalışmalarda bu genlerin etki mekanizmaları araştırılabilir. Titanyum dioksit ve sisplatin gen ekspresyonlarını kıyasladığımızda titanyum dioksit, sisplatine göre 385 adet probun ekspresyonunu arttırmış (Şekil 3.41) ve 263 probun ekspresyonunu azaltmıştır (Şekil 3.42).

Metal nanopartiküller, insan hastalıklarının teşhis ve tedavisinde önemli bir araştırma alanıdır (Choi ve ark., 2010). Magnetik nanopartiküller, magnetik sıvılar, tıp, manyetik rezonans, veri depolama gibi birçok alanda araştırılmaktadır. Magnetik nanopartiküller insan vücuduna düşük toksisite gösterdiğinden dolayı biyomedikal alanda çok sık uygulanmaktadır (Chu ve ark., 2013; Islam ve ark., 2011; Li ve ark., 2012). Magnetik demir nanopartikülleri, Fe₃C, FePt, FePd, CoFe₂O₄, MnFe₂O₄, NiFe₂O₄, c-Fe₂O₃ ve Fe₃O₄ gibi metaller kullanılarak hazırlanmaktadır (Li ve ark., 2012). Fe₃O₄ nanopartikülleri kanser tedavi ve teşhisinde hedefe yönelik ilaç dağıtım gibi in vivo ve in vitro biyomedikal araştırmalarda değerlendirilmiştir (Ankamwar ve ark., 2010). Fe₃O₄ metal oksit nanopartiküllerinin biyomedikal uygulamalarda başarılı olması dağılım,

internalizasyon yeterliliği ve düşük toksisite özelliklerine bağlıdır (Choi ve ark., 2010).

A549, MCF7 (göğüs kanseri) ve T98G (beyin glioma) insan kanser hücre hatları üzerine Fe₃O₄ (12 nm) nanopartikülleri 500 µg/ml konsantrasyon olarak uygulanmıştır. Demir oksit nanopartikülleri 48 saat sonunda hücre canlılığını bu hücrelerde azaltmıştır. A549 ve MCF7 hücrelerinde Fe₃O₄ etkisi (5, 50, 500 µg/ml dozlar uygulanarak) lazer tarayıcı konfokal mikroskopunda görüntülenmiştir. MCF7 hücrelerine karşı daha etkili olduğu gözlenmiştir (Choi ve ark., 2010).

Yapılan bir çalışmada, Fe₃O₄ nanopartiküllerinin (0.1-1-10-100 µg) konsantrasyonları normal (WI-38, SVGP12, H184B5F5/M10), glia (D54MG, G9T, SF126, U87, U251 ve U373) ve göğüs kanseri hücreleri (MB157, SKBR3 ve T47D) kullanılarak in vitro sitotoksitesite analizi ile değerlendirilmiştir. Fe₃O₄ nanopartikülleri, glia ve göğüs kanseri hücre hatlarında hücre ölümüne neden olmuştur. Fe₃O₄ nanopartiküllerinin 0.1–10 µg konsantrasyon aralığında normal hücrelere karşı toksisitesi gözlenmemiştir. Ancak 100 µg doz uygulanan hücrelerde toksisite gözlenebileceği rapor edilmiştir (Ankamwar ve ark., 2010).

Yazdi ve arkadaşları (2012) 4T1 göğüs kanseri hücrelerinde Fe₃O₄ nanopartiküllerinin sitotoksitesitesini araştırmışlardır. Fe₃O₄ nanopartiküllerinin antiproliferatif etkileri 20-40-60-80 mcg/ml doz aralığında uygulanmıştır ve % 70 oranında antiproliferatif potansiyel göstermiştir.

Bu tezde demir (II, III) oksit (Fe₃O₄) nanotozlarının (50-100 nm) A549 adenokarsinoma insan alveolar bazal epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik, antiproliferatif, apoptotik ve biyokimyasal etkileri belirlendi. Demir (II, III) oksit (Fe₃O₄) nanotozları sitotoksik etki gösterdi. Ancak demir (II, III) oksit (Fe₃O₄) nanotozları uygulanan A549 hücrelerinde, pozitif kontrol sisplatin ve gümüş nitrata uygulanan hücelere kıyasla daha az sitotoksik etki gözlendi. Demir (II, III) oksit (Fe₃O₄) nanotozları 1-5-10-25-50-100-125-250-500-1000 µM konsantrasyon aralığında denenerek IC₃₀ değeri belirlendi (Çizelge 3.5) ve 72 saat sonundaki IC₃₀ değeri (5 µM) diğer analizlerde uygulandı.

Demir (II, III) oksit (Fe₃O₄) nanotozlarının IC₃₀ doz değeri (5 µM) A549 hücrelerine uygulandığında Anneksin/PI boyaması sonucu erken ve geç apoptotik etkiler saptandı. Erken ve geç apoptotik (Q2+Q4) etkiler toplamda % 18.4 olarak

belirlendi. Nekrotik etki (Q1) % 1.4 oranında görüldü (Çizelge 3.6). Kontrole kıyasla demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları, % 13.4 apoptotik ve % 1.2 nekrotik etki göstermiştir. Pozitif kontrol sisplatinin IC_{50} (3 μM) dozu A549 hücrelerine uygulandığında erken ve geç apoptotik (Q2+Q4) etkiler toplamda % 36 olarak belirlendi. Anneksin/PI boyaması sonuçlarına göre pozitif kontrol sisplatin daha fazla apoptotik etki gösterdi. Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları IC_{30} doz değeri (5 μM) uygulanan hücrelerde kaspaz-3 aktivitesi gözlenmedi (Çizelge 3.7). Pozitif kontrol sisplatin uygulanan hücrelerde % 40.7 kaspaz-3 aktivitesi belirlendi (Çizelge 3.7). Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları, mitokondri aktivitesini % 7.1 azaltmıştır. Ancak demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozlarının IC_{30} doz değeri (5 μM) uygulanan hücrelerde mitokondri aktivitesi kontrole kıyasla % 3 azalmıştır. Pozitif sisplatin uygulanan hücrelerde mitokondri aktivitesi % 22.3 azalmıştır (Çizelge 3.8). Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozlarının, kaspaz-3 aktivitesini arttırıcı etkisi yoktur (Şekil 3.18). Demir oksit nanotozlarının kaspaz-3 aktivitesini tetiklemediği tüm genom ekspresyonu analizi sonucunda da doğrulanmıştır. Mitokondriyal aktivite azalmasına neden olduğu söylenebilir (Şekil 3.19). İmmünohistokimyasal boyamalar sonucu demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları, IC_{30} doz değeri (5 μM) uygulanan hücrelerde apoptotik etki gösterdi. Konfokal (Şekil 3.25) ve TEM mikroskobu (Şekil 3.26) analizleri sonucunda, demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları uygulanmış hücrelerde çeşitli apoptotik morfoloji görüldü.

Tüm genom ekspresyonu analizi sonucunda demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozlarının *CYFIP1*, *TFPI2*, *ABCA1* ve *CLDN1* genlerinin ekspresyonunu arttırarak apoptoza neden olduğu söylenebilir. *ABCA1* ve *CLDN1* genlerinin pozitif kontrol sisplatin etkisiyle de ekspresyonları arttı.

CYFIP1 geni, potansiyel bir tümör baskılayıcısı olarak belirlenmiştir. *CYFIP1* geninin azalan ekspresyonu epitelyal tümörlerin artması sırasında gözlenmiştir (Silva ve ark., 2009). Bu nedenle *CYFIP1* geni kanser tedavisinde hedef bir gen olarak görülebilir. Bu tezde, demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozları, *CYFIP1* gen ekspresyonunu arttırarak tümör baskılayıcı bir etki gösterdi denilebilir. CALU-6 ve H460 akciğer kanseri hücrelerinde *TFPI-2* geni tetiklenmiştir ve tedaviye yanıt veren bir hedef olabileceği düşünülmüştür (Steiner

ve ark., 2005). *TFPI-2*, serin proteinaz inhibitör ailesinin bir üyesidir. Bir çalışmaya göre *TFPI-2* gen ekspresyonu artırılarak böbrek kanserli hücrelerinde apoptoz tetiklenmiştir ve hücre çoğalması inhibe edilmiştir (Gu ve ark., 2009).

ABCA1, ATP bağlanma transporter ailesinin bir üyesidir. *PPAR γ* aktivatörleri, *LXR α* ekspresyonunu tetikleyerek *ABCA1* ekspresyonuna aracılık etmektedir. *ABCA1* ekspresyon artışının LNCaP (İnsan prostat adenokarsinoma) hücrelerinde hücre içi kolesterol seviyelerini azaltarak hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Yang ve ark., 2012). *CLDN-1* geninin, in vivo insan akciğer adenokarsinoma hücrelerinde ekspresyonu arttığında kanser hücrelerinin migrasyonunu ve metastazını baskıladığı belirlenmiştir. *CLDN1* geni, akciğer adenokarsinomalı hastalar için potansiyel ilaç tedavi hedefi olarak gösterilmiştir (Chao ve ark., 2009).

Tüm genom ekspresyonu analizi sonucunda demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) nanotozlarının *STAT3*, *FGFRL1*, *HNRNPL*, *BCL2L1*, *ATF3*, *RAB5C*, *ANG*, *EIF3I*, *NKIRAS2*, *PIAS4*, *RRAS*, *NUCKS1*, *AKT1*, *SRC*, *PCBP2*, *EIF2C2*, *HRAS*, *CDC34*, *NFKB2*, *EIF4G1*, ve *EIF5A* genlerinin ekspresyonunu azaltarak apoptoza neden olduğu söylenebilir.

HNRNPL, *PIAS4*, *EIF2C2* ve *PCBP2* genlerinin ekspresyonları gümüş nitrat etkisi ile de azaldı. *EIF2C2*, *ANG* ve *NUCKS1* genlerinin sisplatin etkisiyle de ekspresyonu azalmıştır.

STAT3 inhibitörlerinin geliştirilmesi ile insan ve hayvan kanser hücrelerinde antitümör etkinin gösterileceği ve potansiyel terapötik gelişiminde etkili olacağı rapor edilmiştir (Siveen ve ark., 2014). Mikro RNA-210 etkisiyle *FGFRL1* geninin azalan ekspresyonu, özofagus skuamöz hücreli karsinomlarda hücre siklus tutuklanmasını sağladığı gösterilmiştir. Bu nedenle *FGFRL1* geni terapötik hedef olarak gösterilmiştir (Tsuchiya ve ark., 2011). *BCL2L1* (Bcl-xL), antiapoptotik bir proteindir. *BCL2L1* geninin baskılanması apoptoza neden olarak kanser hücrelerinin ölümünü tetiklediği belirlenmiştir (Hagenbuchner ve ark., 2010). *ATF3*, insan kolorektal kanser hücrelerinde sessizleştirilerek apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. *ATF3*, *GSK3b* ve *C/EBPb* moleküler mekanizmasına bağlı olarak sessizleştirilmiştir ve bu etki *NAG-1* geninin artan ekspresyonuna bağlı olarak saptanmıştır (Lee ve ark., 2010). *RAB5C* ekspresyonunun azaltılması

sisplatin dirençli ovaryum kanser hücre hatlarında ve insan kanser hücrelerinde potansiyel bir hedef olarak görülmüştür (Jin ve ark., 2014). *ANG* (anjyopöietinler) endotelial çoğalma faktörleridir. *ANG-2* geninin insan göğüs kanserlerinde bloke edilmesi yani sessizleştirilmesi terapötik bir hedef olarak belirlenmiştir (Niu ve Carter, 2007). *EIF3I*, tümörigenezis de önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir. *EIF3I* ekspresyonunun artması insan hepatosellüler karsinomasında onkogenik bir etkiye sahiptir. *EIF3I* ekspresyonunun azaltılması PC-3 (prostat kanseri) hücrelerinin yayılma yeteneğini önemli miktarda azaltmıştır (Lin ve ark., 2014). *NKIRAS2*, NF- κ B üzerinde inhibisyon etkisine sahiptir. *NKIRAS2*, apoptozdan direkt sorumlu gösterilmiştir. Glioblastoma kanser hücrelerinde (U87 MG, LN-18, U251, HS683 ve T98G) *NKIRAS2* geninin ekspresyonunun azaltılması terapötik bir hedef olarak belirlenmiştir (Haemmig ve ark., 2014). *RRAS* bir onkogendir ve mide kanserlerinin yarısından fazlasına neden olmaktadır. Mide kanserinde *RRAS* sinyal yolunun bloke edilerek kanser tedavisi için önemli bir potansiyel hedef olabileceği gösterilmiştir (Nishigaki ve ark., 2005). Bu tezde demir oksit nanotozlarının etkisiyle *RRAS* bloke edildi. *RRAS*, A549 hücreleri içinde önemli bir terapötik hedef olabilir. *NUCKS1*, nükleer kazein kinaz ve siklin bağımlı kinaz substratıdır ve çeşitli kanser dokularında ekspresyonu fazladır. *NUCKS1* ekspresyon durumu servikal pullu hücre karsinomlarında bilinmemektedir ve çalışmalar sonucunda bu kanser hücrelerinin nüksetme etkisine neden olmuştur. Bu nedenle *NUCKS1* yeni bir moleküler marker olarak gösterilmiştir (Gu ve ark., 2014). PI3K/AKT yolu hücre siklus sürecinde ve apoptozda önemli bir sinyal yoludur (Chang ve ark., 2003). *AKT1*, insan prostat kanser hücrelerinde bloke edilerek apoptoz tetiklenmiştir (Hsu ve ark., 2000). Tirozin kinazlardan *SRC* kanser ile en çok bağlantılı onkogendir. *SRC* sinyali çoğalma, invazyon ve metastaz gibi birçok onkogenik aktiviteye neden olmaktadır. *SRC* inhibisyonu solid tümörlerin tedavisinde yeni bir strateji olarak gösterilmiştir (Araujo ve Logothetis, 2010). *HRAS*, insan ras kanser genlerinden biridir ve birçok kanser türünde ekspresyonu artmıştır (Adjei ve ark., 2003; Weiwer ve ark., 2012). Bu nedenle *HRAS* inhibisyonu kanser kemoterapisinde önemli bir hedef olarak gösterilmektedir. *CDC34*, hücre siklusunda görevlidir. *CDC34* MM (multiple myeloma)

hücrelerinde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir ve bloke edilmesi MM hücrelerine uygulanan maddenin aktivitesini arttırmıştır (Chauhan ve ark., 2004). Bu nedenle *CDC34* yeni bir tedavi stratejisi olarak görülebilir. *NFKB*, karsinogenezde önemli bir rolü olan transkripsiyon faktörüdür. Çoğu kanser türünde *NFKB* aktivasyonu etki göstermektedir. Bu nedenle onun sinyal yolu potansiyel bir kanser terapi stratejisi sağlamaktadır. *NFKB* son yapılan çalışmalara göre tümör baskılayıcı görevine sahiptir (Lee ve ark., 2007). *EIF4G1*, nazofarenks karsinom hücrelerinde artan ekspresyonunun tümör süreci ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir (Tu ve ark., 2010). Bu nedenle *EIF4G1* kanser terapötik hedefi olabilir. *EIF5A*, translasyon başlatıcı bir faktördür. *EIF5A*, kanser gelişiminde onkogenik bir role sahiptir. *EIF5A*, HCC (hepatosellular karsinoma), ovaryum kanseri ve akciğer kanseri dahil pek çok kanser türünde anormal eksprese edildiği belirlenmiştir. *EIF5A*, potansiyel bir kemoterapötik hedef görülmektedir (Shek ve ark., 2012). Demir oksit nanotozu ve sisplatin gen ekspresyonlarını kıyasladığımızda demir oksit nanotozu sisplatine göre 708 prob ekspresyonunu arttırmıştır (Şekil 3.43) ve 817 prob ekspresyonunu azaltmıştır (Şekil 3.44).

Titanyum dioksit ve gümüş nitrat gen ekspresyonlarını kıyasladığımızda titanyum dioksit, gümüş nitrata göre 12 prob ekspresyonunu arttırmıştır (Şekil 3.45) ve 29 prob ekspresyonunu azaltmıştır (Şekil 3.46). Demir oksit nanotozu ve gümüş nitrat gen ekspresyonlarını kıyasladığımızda demir oksit nanotozu, gümüş nitrata göre 316 prob ekspresyonunu arttırmıştır (Şekil 3.47) ve 612 prob ekspresyonunu azaltmıştır (Şekil 3.48). Demir oksit nanotozu ve titanyum dioksit gen ekspresyonlarını kıyasladığımızda demir oksit nanotozu, titanyum dioksite göre 169 prob ekspresyonunu arttırmıştır (Şekil 3.49) ve 316 prob ekspresyonunu azaltmıştır (Şekil 3.50).

Sonuç olarak bu tezdeki çalışmalar ve öngörüler doğrultusunda, gümüş nitrat, titanyum dioksit ve demir oksit nanotozlarının sitotoksik, antiproliferatif etkileri ve bunlardan sorumlu genlerle hücre ölümü mekanizmalarının (apoptoz, nekroz, otofaji gibi) aydınlatılması kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklere alternatif ajanlar sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Adjei, A.A., Dy, G.K., Erlichman, C., Reid, J.M., Sloan, J.A., Pitot, H.C., Alberts, S.R., Goldberg, R.M., Hanson, L.J., Atherton, P.J., Watanabe, T., Geary, R.S., Holmlund, J., Dorr, F.A. (2003), "A phase I trial of isis 2503, an antisense inhibitor of h-ras, in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer", *Clinical Cancer Research*, Vol. 9, 115–123.
- Aghaeepour, N., Finak, G., Consortium, T.F., Consortium, T.D., Hoos, H., Mosmann, T.R., Brinkman, R., Gottardo, R., Scheuermann, R.H. (2013), "Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques", *Nature Methods*, Vol.10, No.3, 228-238.
- Ahmad S, Isab AA, Ali S, Al-Arfaj AR (2006), "Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents", *Polyhedron*, **25**: 1633–1645.
- Ankamwar, B., Lai, T.C., Huang, J.H., Liu, R.S., Hsiao, M., Chen, C.H., Hwu, Y.K. (2010), "Biocompatibility of Fe₃O₄ nanoparticles evaluated by *in vitro* cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells", *Nanotechnology*, **21**, 075102 (9pp).
- Araujo, J., Logothetis, C. (2010), "Dasatinib: A potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors", *Cancer Treatment Reviews*, **36**, 492–500.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M. (2008), "Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies", *Toxicology Letters*, **179**, 93–100.
- Athar, M., Das, A.J. (2014), "Therapeutic nanoparticles: State-of-the-art of nanomedicine", *Adv. Mater. Rev.*, **1**(1), 25-37.
- Bal, S.H., Budak, F. (2012), "Mikroarray Teknolojisi", *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **38** (3) 227-233.
- Ballarino M., Jobert, L., Dembélé ,D., de la Grange, P., Auboeuf, D., Tora, L.(2013), "TAF15 is important for cellular proliferation and regulates the expression of a subset of cell cycle genes through miRNAs", *Oncogene*. **32**(39):4646-55.

- Beadsmoore, C.J., Screaton, N.J. (2003), "Classification, staging and prognosis of lung cancer", *European Journal of Radiology*, **45**, 8-17.
- Belloc, F, Belaud-Rotureau, M.A., Lavignolle, V., Bascans, E., Braz-Pereira, E., Durrieu, F., Lacombe, F. (2000), "Flow cytometry detection of caspase 3 activation in preapoptotic leukemic cells", *Cytometry*. **40**(2):151-60.
- Berger, W.; Elbling, L. (1998), "Chemoresistance of human malignant melanoma: Cellular and molecular aspects", *Onkologie*, **21**, 105-110.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. (2005), "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction", *Biotechnology Annual Review*, Volume 11. 127-152.
- Bharti, S.K. Singh, S.K. (2009), "Recent developments in the field of anticancer metallopharmaceuticals", *International Journal of PharmTech Research*, Vol.1, No.4, pp 1406-1420.
- Bidkhorji, G., Narimani, Z., Ashtiani, S. H., Moeini, A., Nowzari-Dalini, A., Masoudi-Nejad, A. (2013), "Reconstruction of an integrated genome-scale co-expression network reveals key modules involved in lung adenocarcinoma" *PLOS ONE*, vol.8, Issue 7, e67552.
- Blake, D.M., Maness, P.-C., Huang, Z., Wolfrum, E.J., Huang, J., Jacoby, W.A. (1999), "Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells", *Separation and purification methods*, **28**(1), 1-50.
- Boca SC, Potara M, Gabudean AM, Juhem A, Baldeck PL, Astilean S (2011). "Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for in vitro cancer cell therapy", *Cancer Lett.*, **311**: 131–140.
- Brady, H.J.M. (2004), "Measurement of Apoptosis by DNA Fragmentation", *Methods in Molecular biology*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, Vol 282, 31-42.

- Brice, P., (2004) *Cancer therapeutics in the 'omics' era: Moving towards practical application in the NHS*, Workshop organised by the Cambridge Genetics Knowledge Park in collaboration with the Cambridge NTRAC Centre Workshop.
- Bruin, E.C., Medema, J.P. (2008), "Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response", *Cancer Treatment Reviews*, **34**, 737–749.
- Bury, R.W. (2011), "Controls for Immunocytochemistry: An Update", *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **59**(1) 6–12.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., Mak, T.W. (2011), "Regulation of cancer cell metabolism", *Nature Reviews, Cancer* Volume 11. 85-95.
- Cavicchioli M, Massabni AC, Heinrich TA, Costa-Neto CM, Abrao EP, Fonseca BAL, Castellano EE, Corbi PP, Lustri WR, Leite CQF (2010), "Pt(II) and Ag(I) complexes with acesulfame: Crystal structure and a study of their antitumoral, antimicrobial and antiviral activities", *J Inorg Biochem.*, **104**: 533–540.
- Cengiz, E., Wissing, S.A., Müller, R.H., Yazan, Y. (2006), "Sunblocking efficiency of various TiO₂- loaded solid lipid nanoparticle formulations", *International Journal of Cosmetic Science*, **28**, 371-378.
- Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A., McCubrey, J.A. (2003), "Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy", *Leukemia*, **17**, 590–603.
- Chao, Y.-C., Pan, S.-H., Yang, S.-C., Yu, S.-L., Che, T.-F., Lin, C.-W., Tsai, M.-S., Chang, G.-C., Wu, C.-H., Wu, Y.-Y., Lee, Y.-C., Hong, T.-M., Yang, P.-C. (2009), "Claudin-1 Is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma", *Am J Respir Crit Care Med.*, Vol 179. pp 123–133.

- Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Shringarpure, R., Mitsiades, C., Munshi, N., Yew, P.R., Anderson, K.C. (2004), “Blockade of ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 enhances anti-myeloma activity of bortezomib/proteasome inhibitor PS-341”, *Oncogene*, **23**, 3597–3602.
- Chen, C., Chang, Y.-C., Liu, C.-L., Liu, T.-P., Chang, K.-J., Guo, I.-C. (2007), “Leptin induces proliferation and antiapoptosis in human hepatocarcinoma cells by up-regulating cyclin D1 and downregulating bax via a Janus kinase 2-linked pathway” *Endocrine-Related Cancer.*, **14**, 513–529.
- Chen, A-Z., Kang, Y-Q., Pu, X-M., Yin, G-F., Li, Y., Hu, J-Y. (2009), “Development of Fe₃O₄-poly(l-lactide) magnetic microparticles in supercritical CO₂”, *Journal of Colloid and Interface Science*, **330**, 317–322.
- Chen, X., Hao, B., Liu, Y., Dai, D., Han, G., Li, Y., Wu, X., Zhou, X., Yue, Z., Wang, L., Cao, Y., Liu, J. (2014), “The histone deacetylase SIRT6 suppresses the expression of the RNA-binding protein PCBP2 in glioma”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **446**, 364–369.
- Chiba, K., Kawakami, K., Tohyama, K. (1998), “Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells”, *Toxicology in Vitro*, **12**, 251-258.
- Chien, W., Lee, K. L., Ding, L.W., Wuensche, P., Kato, H., Doan, N.B., Poellinger, L., Said, J.W., Koeffler, H.P. (2013), “PIAS4 is an activator of hypoxia signalling via VHL suppression during growth of pancreatic cancer cells” *British Journal of Cancer*, **109**, 1795–1804.
- Choi, J.Y., Lee, S.H., Na, H.B., An, K., Hyeon, T., Seo, T.S. (2010), “In vitro cytotoxicity screening of water-dispersible metal oxide nanoparticles in human cell lines”, *Bioprocess Biosyst Eng.*, **33**:21–30.
- Chu, M., Shao, Y., Peng, J., Dai, X., Li, H., Wu, Q., Shi, D. (2013), “Near-infrared laser light mediated cancer therapy by photothermal effect of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles”, *Biomaterials*, **34**, 4078-4088.

- Claxton, N.S., Fellers, T.J., Davidson, M.W. (2006), *Laser scanning confocal microscopy*, Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, 37 p., Unpublished (<http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf>).
- Corpet, A., De Koning, L., Toedling, J., Savignoni, A., Berger, F., Lemaitre, C., O’Sullivan, R. J., Karlseder, J., Barillo, E., Asselain, B., Sastre-Garau, X., Almouzni, G. (2011), “Asf1b, the necessary Asf1 isoform for proliferation, is predictive of outcome in breast cancer”, *The EMBO Journal*, **30**, 480–493.
- Cotter, T.G. (2009), “Apoptosis and cancer: the genesis of a research field”, *Nature Reviews, Cancer*, Vol.9, 501-507.
- Cuin, A., Massabni, A.C., Pereira, G.A., Leite, C.Q.F., Pavan, F.R., Sesti-Costa, R., Heinrich, T.A., Costa-Neto, C.M. (2011), “6-Mercaptopurine complexes with silver and gold ions: Anti-tuberculosis and anti-cancer activities”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **65**, 334–338.
- Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D., Zhao, H. (2008), “Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay”, *Methods*. **44**(3): 250–254.
- Desoize, B. (2002), “Cancer and metals and metal compounds”, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **42**, 213–215.
- Desoize, B. (2004), “Metals and metal compounds in cancer treatment”, *Anticancer Research*, **24**: 1529-1544.
- Ding, G., Guo, Y., Lv, Y., Liu, X., Xu, L., Zhang, X. (2012), “A double-targeted magnetic nanocarrier with potential application in hydrophobic drug delivery”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **91**, 68–76.
- Duncan, R. (2006), “Polymer conjugates as anticancer nanomedicines”, *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 688-701.
- Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J., Baron, M.G. (2003), “Classification of anticancer drugs a new system based on therapeutic targets”, *Cancer Treatment Reviews*; **29**: 515–523.

- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J., Zeller, R. (2006), “Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections”, *Basic Methods in Microscopy*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Florea, A.-M., Büsselberg, D. (2011), “Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects”, *Cancers*, **3**, 1351-1371.
- Foldbjerg R, Olesena P, Hougaard M, Danga DA, Hoffmann HJ, Autrupa H (2009), “PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes”, *Toxicol Lett.*, **190**: 156–162.
- Fujishima, A., Honda, K. (1972), “Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode”, *Nature*, 238, 37.
- Fulda, S. (2010), “Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer”, *International Journal of Cell Biology*, Article ID 370835, 6 pages doi:10.1155/2010/370835.
- Garcia, M.A., Carrasco, E., Ramirez, A., Jimenez, G., Lopez-Ruiz, E., Peran, M., Picon, M., Campos, J., Boulaiz, H., Marchal, J.A. (2012), “Apoptosis as a Therapeutic Target in Cancer and Cancer Stem Cells: Novel Strategies and Futures Perspectives”, *Apoptosis and Medicine*, Intech, Chapter 5, 111-154.
- Garza-Ortiz, A. (2008), *Design, synthesis, characterization and biological studies of ruthenium and gold compounds with anticancer properties*, Leiden Institute of Chemistry, Faculty of Science, Leiden University.
- Grant, S.G., Keohavong, P. (2005), *Strategies for Measurement of Biotransformation Enzyme Gene Expression*, Methods in Molecular Biology, Human Press, Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208 Totowa, New Jersey 07512, Vol 291, 387-397.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. (2005), “Targeting apoptosis pathways in cancer therapy”, *CA Cancer J Clin.*, **55**:178–194.

- Ghosh, S., Kaushik, R., Nagalakshmi, K., Hoti, S.L., Menezes, G.A., Harish, B.N., Vasan, H.N. (2010), "Antimicrobial activity of highly stable silver nanoparticles embedded in agar-agar matrix as a thin film" *Carbohydrate Research*, **345**, 2220–2227.
- Giard, DJ; Aaronson, SA; Todaro, GJ; Arnstein, P; Kersey, JH; Dosik, H; Parks, WP (1973). "In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors", *Journal of the National Cancer Institute*, **51** (5): 1417–23.
- Goehe, R.W., Shultz, J.C., Murudkar, C., Usanovic, S., Lamour, N.F., Massey, D.H., Zhang, L., Camidge, D.R., Shay, J.W., Minna, J.D., Chalfant, C.E. (2010), "hnRNP L regulates the tumorigenic capacity of lung cancer xenografts in mice via caspase-9 pre-mRNA processing" *J Clin Invest.*, **120** (11):3923–3939.
- Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B.(2009), "Mitochondria as targets for cancer chemotherapy", *Seminars in Cancer Biology*, **19**, 57–66.
- Gopinath, P., Kumar Gogoi, S., Sanpui, P., Paul, A., Chattopadhyay, A., Sankar Ghosh, S. (2010), "Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **77**, 240–245.
- Greulich C, Diendorf J, Geßmann J, Simon T, Habijan T, Eggeler G, Schildhauer TA, Epple M, Köller M (2011), "Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles", *Acta Biomater.*, **7**: 3505–3514.
- Gu, B., Ding, Q., Xia, G., Fang, Z.(2009), "EGCG inhibits growth and induces apoptosis in renal cell carcinoma through TFPI-2 overexpression", *Oncology Reports*, **21**: 635-640.
- Gu, L., Xia, B., Zhong, L., Ma, Y., Liu, L., Yang, L., Lou, G. (2014), "NUCKS1 overexpression is a novel biomarker for recurrence-free survival in cervical squamous cell carcinoma", *Tumor Biol.*, **35**:7831-7836.
- Guo, M., Que, C., Wang, C., Liu, X., Yan, H., Liu, K. (2011), "Multifunctional superparamagnetic nanocarriers with folate-mediated and pH-responsive targeting properties for anticancer drug delivery", *Biomaterials* **32**, 185-194.

- Gurunathan S, Lee KJ, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, Vaidyanathan R, Eom SH (2009), “Antiangiogenic properties of silver nanoparticles”, *Biomaterials*, **30**: 6341–6350.
- Haemmig, S., Baumgartner, U., Gluck, A., Zbinden, S., Tschan, M.P., Kappeler, A., Mariani, L., Vajtai, I., Vassella, E. (2014), “miR-125b controls apoptosis and temozolomide resistance by targeting TNFAIP3 and NKIRAS2 in glioblastomas”, *Cell Death and Disease* **5**, e1279; doi:10.1038/cddis.2014.245.
- Hagenbuchner, J., Ausserlechner, M.J., Porto, V., David, R., Meister, B., Bodner, M., Villunger, A., Geiger, K., Obexer, P.(2010), “The Anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-xL is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression”, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285, No. 10, pp. 6904–6912.
- Hannon, M.J. (2007), “Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology”, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 79, No. 12, pp. 2243–2261.
- Hannun, Y.A. (1997), “Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy”, *Blood*, Vol 89, No 6 (March 15), pp 1845-1853.
- Harada, Y., Ogawa, K., Irie, Y., Endo, H., Ferik, L.B., Uemura, T., Tachibana, K. (2011), “Ultrasound activation of TiO₂ in melanoma tumors”, *Journal of Controlled Release*, **149**, 190–195.
- Heath, J.R.; Davis, M.E. (2008), “Nanotechnology and cancer”, *Annu. Rev. Med.*, **59**, 251-265.
- Hingorani, R., Deng, J., Elia, J., McIntyre, C., Mittar, D. (2011), *Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser™ System*, BD Biosciences.
- Hou, Z.-B., Lu, K.-J., Wu, X.-L., Chen, C., Huang, X.-E., Yin, H.-T. (2014), “*In vitro* and *in vivo* antitumor evaluation of berbamine for lung cancer treatment”, *Asian Pac J Cancer Prev.*, **15** (4), 1767-1769.

- Hsu, A.-I., Ching, T.-T., Wang, D.-S., Song, X., Rangnekar, V.M., Chen, C.-S. (2000), “The Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2”, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 15, Issue of April 14, pp. 11397–11403.
- Hu, C.-E., Liu, Y.-C., Zhang, H.-D., Huang, G.-J. (2014), “The RNA-binding protein PCBP2 facilitates gastric carcinoma growth by targeting miR-34a”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **448**, 437–442.
- Huh, D., Gu, W., Kamotani, Y., Grotberg, J.B., Takayama, S. (2005), “Microfluidics for flow cytometric analysis of cells and particles”, *Physiol. Meas.*, **26**, R73–R98.
- Indran, I.R., Tufo, G., Pervaiz, S., Brenner, C. (2011), “Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells”, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1807**, 735–745.
- Islam, Md. S., Kusumoto, Y., Abdulla- Al-Mamun, Md., Horie, Y. (2011), “Photocatalytic and AC magnetic-field induced enhanced cytotoxicity of Fe₃O₄-TiO₂ core-shell nanocomposites against HeLa cells”, *Catalysis Communications*, **16**, 39–44.
- Jang, E.-S., Shin, J.-H., Ren, G., Park, M.-J., Cheng, K., Chen, X., Wu, J.C., Sunwoo, J.B., Cheng, Z. (2012), “The manipulation of natural killer cells to target tumor sites using magnetic nanoparticles”, *Biomaterials*, **33**, 5584-5592.
- Jacob, S.J.P., Finub, J.S., Narayanan, A. (2012), “Synthesis of silver nanoparticles using Piper longum leaf extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **91**, 212– 214.
- Jakupec, M.A., Galanski, M., Arion, V.B., Hartinger, C.G., Keppler, B.K. (2008), “Antitumour metal compounds: more than theme and variations”, *Dalton Trans.*, 183–194.
- Jiang, C., Wang, Z., Ganther, H., Lu, J. (2001), “Caspases as key executors of methyl selenium-induced apoptosis (anoikis) of DU-145 prostate cancer cells”, *Cancer Research*, **61**, 3062–3070.

- Jin, L., Huo, Y., Zheng, Z., Jiang, X., Deng, H., Chen, Y., Lian, Q., Ge, R., Deng, H. (2014), “Down-regulation of Rab 5C-dependent endocytosis and glycolysis in cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines”, *Mol Cell Proteomics.*, Nov;**13**(11):3138-51.
- Kasibhatla, S., Tseng, B. (2003), “Why target apoptosis in cancer treatment?”, *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. 2, 573–580.
- Khorramizadeh, M.R., Esmail-Nazari, Z., Zarei-Ghaane, Z., Shakibaie, M., Mollazadeh-Moghaddam, K., Iranshahi, M., Shahverdi, A.R. (2010), “Umbelliprenin-coated Fe₃O₄ magnetite nanoparticles: Antiproliferation evaluation on human fibrosarcoma cell line (HT-1080)”, *Materials Science and Engineering, C* **30**, 1038–1042.
- Kim, M.-O., Moon, D.-O., Jung, J. M., Lee, W.S., Choi, Y.H., Kim, G.-Y. (2011), “Agaricus blazei extract induces apoptosis through ROS-dependent JNK activation involving the mitochondrial pathway and suppression of constitutive NF-κB in THP-1 cells”, *Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 838172, 10 pages.doi:10.1093/ecam/nep176
- Koch M, Kiefer S, Cavalius C, Kraegeloh A. (2012), “Use of a silver ion selective electrode to assess mechanisms responsible for biological effects of silver nanoparticles”, *J Nanopart Res.*, **14**: 646.
- Kubota, Y., Shuin, T., Kawasaki, C., Hosaka, M., Kitamura, H., Cai, R., Sakai, H., Hashimoto, K., Fujishima, A. (1994), “Photokilling of T-24 human bladder cancer cells with titanium dioxide”, *Br. J. Cancer*, **70**, 1107 -1111.
- Lagopati, N., Kitsiou, P.V., Kontos, A.I., Venieratos, P.,Kotsopoulou, E., Kontos, A.G., Dionysiou, D.D., Pispas, S., Tsilibary, E.C., Falaras, P. (2010), “Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution”, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **214**, 215–223.
- Lai, T-Y., Lee, W-C. (2009), “Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles”, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **204**, 148–153.

- Laine, A.-L., Passirani, C. (2012), “Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery”, *Current Opinion in Pharmacology*, **12**:420–426
- Lazau, C., Mocanu, L., Miron, I., Sfirloaga, P., Tanasie, G., Tatu, C., Gruia, A., Grozescu, I. (2007), “Consideration regarding the use of TiO₂ doped nanoparticles in medicine”, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, Vol. 2, No. 3, p. 257 – 263.
- Lee, C.H., Jeon, Y.-T., Kim, S.-H., Song, Y.-S. (2007), “NF- κ B as a potential molecular target for cancer therapy”, *BioFactors*, **29**, 19–35.
- Lee, S.-H., Krisanapun, C., Baek, S.J. (2010), “NSAID-activated gene-1 as a molecular target for capsaicin-induced apoptosis through a novel molecular mechanism involving GSK3b, C/EBPb and ATF3”, *Carcinogenesis*, vol.31 no.4 pp.719–728.
- Leong, A, S-Y; Cooper, K., Leong, F., Joel W.-M. (2003), *Manual of Diagnostic Cytology* (2 ed.), Greenwich Medical Media, Ltd. pp. XX. ISBN 1-84110-100-1.
- Li, P., Jiao, J., Gao, G., Prabhakar, B.S. (2012), “Control of mitochondrial activity by miRNAs”, *Journal of Cellular Biochemistry*, **113**:1104–1110.
- Lin, V. C.-H., Kuo, P.-T., Lin, Y.-C., Chen, Y., Hseu, Y.-C., Yang, H.-L., Kao, J.-Y., Ho, C.-T., Way, T.-D. (2014), “Penta-O-galloyl- β -D-glucose suppresses EGF-induced eIF3i expression through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway in prostate cancer cells”, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 8990–8996.
- Liu, Y., Guan, W., Ren, G., Yang, Z. (2012), “The possible mechanism of silver nanoparticle impact on hippocampal synaptic plasticity and spatial cognition in rats”, *Toxicology Letters*, **209**, 227– 231.
- Lowe, S.W., Lin, A.W. (2000), “Apoptosis in cancer”, *Carcinogenesis* vol.21 no.3 pp.485-495.
- Macgregor, P.F., Squire, J.A. (2002), “Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer”, *Clinical Chemistry*, **48**:8, 1170–1177.

- Maioli, E., Torricelli, C., Fortino, V., Carlucci, F., Tommassini, V., Pacini, A. (2009), "Critical appraisal of the MTT assay in the presence of rottlerin and uncouplers", *Biological Procedures Online*, Volume 11, Number 1, 227-240.
- Marchetti, C., Jouy, N., Leroy-Martin, B., Defosse, A., Formstecher, P., Marchetti, P. (2004), "Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility", *Human Reproduction*, Vol.19, No.10 pp. 2267–2276.
- Martinez-Gutierrez, F., Thi, E.P., Silverman, J.M., Camargo de Oliveira, C., Svensson, S.L., Vanden Hoek, A., Morales Sanchez, E., Reiner, N.E., Gaynor, E.C., Prydzial, E.L.G., Conway, E.M., Orrantia, E., Ruiz, F., Av-Gay, Y., Bach, H. (2011), "Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, xx, xxx–xxx.
- Medvetz DA, Hindi KM, Panzner MJ, Ditto AJ, Yun YH, Youngs WJ (2008), "Anticancer activity of Ag(I) n-heterocyclic carbene complexes derived from 4,5-dichloro-1H-imidazole", *Met. Based Drugs*, 384010.
- Miura, N., Shinohara, Y. (2009), "Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells", *Biochem Biophys Res. Commun.* **390**:733–737.
- Müller, G., Kramer, A. (2008), "Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity", *J Antimicrob Chemother.*, **61**: 1281–1287.
- Nagy, G., Turani, M., Kovacs, K. E., Banfalvi, G. (2011), "Chromatin changes upon silver nitrate treatment in human keratinocyte HaCaT and K562 erythroleukemia cells", *Cellular Effects of Heavy Metals*. pp. 195-217.
- Negoescu, A., Guillerment, Ch., Lorimier, Ph., Robert, C., Lantuejoul, S., Brambilla, E., Labat-Moleur, F. (1998), "TUNEL apoptotic cell detection in archived paraffin-embedded tissues", *Biochemica*, · No. 3, 36-47.

- Nishigaki, M., Aoyagi, K., Danjoh, I., Fukaya, M., Yanagihara, K., Sakamoto, H., Yoshida, T., Sasaki, H. (2005), “Discovery of aberrant expression of r-ras by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays”, *Cancer Res* ; **65**: (6), 2115-2124.
- Niu, G., Carter, W.B. (2007), “Human epidermal growth factor receptor 2 regulates angiopoietin-2 expression in breast cancer via AKT and mitogen-activated protein kinase pathways”, *Cancer Res* ; **67**: (4): 1487–93.
- Ochekpe, N.A., Olorunfemi, P.O., Ngwuluka, N.C. (2009), “Nanotechnology and drug delivery part 2: nanostructures for drug delivery”, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **8** (3): 275-287.
- Oh, K.; Baik, H. (2009), “The reversal of drug-resistance in tumors using a drug-carrying nanoparticulate system”, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 3776-3792.
- Ott, I., Gust, R. (2007), “Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs”, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **340**, 117 – 126.
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Hanen, C. (1998): “Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays”, *Apoptosis*, **3**: 115.
- Perez-Plasencia, C., Duenas-Gonzalez, A. (2006), “Can the state of cancer chemotherapy resistance be reverted by epigenetic therapy?”, *Molecular Cancer*, **5**:27 doi:10.1186/1476-4598-5-27.
- Plastina, P., Bonofiglio, D., Vizza, D., Fazio, A., Rovito, D., Giordano, C., Barone, I., Catalano, S., Gabriele, B. (2012), “Identification of bioactive constituents of Ziziphus jujube fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells”, *Journal of Ethnopharmacology*, **140**, 325– 332.
- Rafique, S., Idrees, M., Nasim, A., Akbar, H., Athar, A. (2010), “Transition metal complexes as potential therapeutic agents”, *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 5(2), pp. 38-45.
- Rao, J.R., Fleming, C.C., Moore, J.E. (2006), *Molecular Diagnostics Current Technology and Applications*, Horizon Bioscience 32 Hewitts Lane Wymondham Norfolk NR18 0JA U.K.

- Reed, J.C. (1999), “Dysregulation of apoptosis in cancer”, *Journal of Clinical Oncology*, Vol 17, No 9, pp 2941-2953.
- Reimer, L., Kohl, H. (2008), *Transmission Electron Microscopy*, Physics of Image Formation, Fifth Edition, Springer Science+ Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, USA Physics of Image Formation, Fifth Edition.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L. (2004-2013) “Cell Viability Assays”, *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Roche Diagnostics GmbH (2008), Roche Applied Science, 68298 Mannheim, Germany.
- Rosas-Hernandez, H., Jimenez-Badillo, S., Martinez-Cuevas, P.P., Gracia-Espino, E., Terrones, H., Terrones, M., Hussain, S.M., Ali, S.F., Gonzalez, C. (2009), “Effects of 45-nm silver nanoparticles on coronary endothelial cells and isolated rat aortic rings”, *Toxicology Letters*, **191**, 305–313.
- Ruska, E., Binning, G., Rohrer, H. (1986), *Nobel Lecture*, The Development of the Electron Microscope and of Electron Microscopy, The Nobel Prize in Physics.
- Santini, D., Tonini, g., Vecchio, F.M., Borzomati, D., Vincenzi, B., Valeri, S., Antinori, A., Castri, F., Coppola, R., Magistrelli, P., Nuzzo, G., Picciocchi, A. (2005), “Prognostic value of Bax, Bcl-2, p53, and TUNEL staining in patients with radically resected ampullary carcinoma”, *J Clin Pathol.*, **58**:159–165.
- Serpe, L. (2006), “Conventional chemotherapeutic drug nanoparticles for cancer treatment”, *Nanotechnologies for the Life Sciences*, Vol. 6
- Shavit, M., Peri, D., Melman, A., Tshuva, E.Y. (2007), “Antitumor reactivity of non-metallocene titanium complexes of oxygen-based ligands: is ligand lability essential?”, *J Biol Inorg Chem.*, **12**:825–830.

- Shek, F.H., Fatima, S., Lee, N.P. (2012), “Implications of the use of eukaryotic translation initiation factor 5a (eif5a) for prognosis and treatment of hepatocellular carcinoma”, *International Journal of Hepatology*, Article ID 760928, 6 pages.
- Siciliano TJ, Deblock MC, Hindi KM, Durmus S, Panzner MJ, Tessier CA, Youngs WJ (2011), “Synthesis and anticancer properties of gold(I) and silver(I) N-heterocyclic carbene complexes”, *J. Organomet. Chem.*, **696**: 1066-1071.
- Sieuwerds, A.M., Klijn, J.G.M., Peters, H.A., Foekens, J.A. (1995), “The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC₅₀-values and cell survival”, *Eur J Clin Chem Clin Biochem.*, **33**:813-823.
- Sihoe, A.D.L., Yim, A.P.C. (2004), “Lung cancer staging”, *Journal of Surgical Research*, **117**, 92–106.
- Silva, J.M., Ezhkova, E., Silva, J., Heart, S., Castillo, M., Campos, Y., Castro, V., Bonilla, F., Cordon-Cardo, C., Muthuswamy, S.K., Powers, S., Fuchs, E., Hannon, G.J. (2009), “Cyfip1 is a putative invasion suppressor in epithelial cancers”, *Cell*, **137**, 1047–1061.
- Siveen, K.S., Sikka, S., Surana, R., Dai, X., Zhang, J., Kumar, A.P., Tan, B.K.H., Sethi, G., Bishayee, A. (2014), “Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors”, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1845**, 136–154.
- Slonim, D.K., Yanai, I. (2009), “Getting started in gene expression microarray analysis”, *PLoS Computational Biology*, Volume 5, e1000543.
- Song, M., Zhang, R., Dai, Y., Gao, F., Chi, H., Lv, G., Chen, B., Wang, X. (2006), “The in vitro inhibition of multidrug resistance by combined nanoparticulate titanium dioxide and UV irradiation”, *Biomaterials*, **27**, 4230–4238.

- Steiner, F.A., Hong, J.A., Fischette, M.R., Beer, D.G., Guo, Z.-S., Aaron Chen, G., Weiseri T.S., Kassis, E.S., Nguyen, D.M., Lee, S., Trepel, J.B., Schrupp, D.S. (2005), “Sequential 5-Aza 20-deoxycytidine/depsipeptide FK228 treatment induces tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI-2) expression in cancer cells”, *Oncogene*, **24**, 2386–2397.
- Stewart., B.W., Kleihues, P. (2003), *World cancer report*, World Health Organization, Who Oms, International Agency for Research on Cancer, IARC Press. 182-185.
- Stockert, J.C., Blazquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A. (2012), “MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets”, *Acta Histochemica*, **114**, 785– 796.
- Tang, HL., Yuen, KL., Tang, HM., Fung, MC. (2009), “Reversibility of apoptosis in cancer cells”, *British Journal of Cancer*, **100**, 118 – 122.
- Thati, B., Noble, A., Creaven, B.S., Walsh, M., McCann, M., Kavanagh, K., Devereux, M., Egan, D.A. (2007), “In vitro anti-tumour and cyto-selective effects of coumarin-3-carboxylic acid and three of its hydroxylated derivatives, along with their silver-based complexes, using human epithelial carcinoma cell lines”, *Cancer Letters*, **248**, 321–331.
- Thati, B., Noble, A., Creaven, B.S., Walsh, M., McCann, M., Devereux, M., Kavanagh, K. Egan, D.A. (2009), “Role of cell cycle events and apoptosis in mediating the anti-cancer activity of a silver(I) complex of 4-hydroxy-3-nitro-coumarin-bis(phenanthroline) in human malignant cancer cells”, *Eur J Pharmacol.*, **602**: 203–214.
- Thurn, K.T., Arora, H., Paunesku, T., Wu, A., Brown, E. M.B., Doty, C., Kremer, J., Woloschak, G. (2011), “Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **7**, 123–130.
- Tsuchiya, S., Fujiwara, T., Sato, F., Shimada, Y., Tanaka, E., Sakai, Y., Shimizu, K., Tsujimoto, G.(2011), “MicroRNA-210 regulates cancer cell proliferation through targeting fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1)”, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286, No. 1, pp. 420–428.

- Tu, L., Liu, Z., He, X., He, Y., Yang, H., Jiang, Q., Xie, S., Xiao, G., Li, X., Yao, K., Fang, W. (2010), "Over-expression of eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 correlates with tumor progression and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma", *Molecular Cancer*, **9**:78.
- U.S. Environmental Protection Agency (1992), *Integrated risk information system (IRIS)*. Cincinnati, OH, USA: Environmental Criteria and Assessment Office of Environmental Assessment.
- Valodkar, M., Jadeja, R.N., Thounaojam, M.C., Devkar, R.V., Thakore, S. (2011), "In vitro toxicity study of plant latex capped silver nanoparticles in human lung carcinoma cells", *Materials Science and Engineering, C* **31**, 1723–1728.
- Vlerken L.E., Amiji, M.M. (2006), "Multi-functional polymeric nanoparticles for tumour-targeted drug delivery", *Expert Opin. Drug Deliv.* 3(2):205-216.
- Wadlow, R., Ramaswamy, S.(2005), "DNA microarrays in clinical cancer research", *Current Molecular Medicine*, **5**, 111-120.
- Wallqvist, A., Rabow, A.A., Shoemaker, R.H. (2002), "Establishing connections between microarray expression data and chemotherapeutic cancer pharmacology", *Mol Cancer Ther.*, **1**:311-320.
- Warra, A.A. (2011), "Transition metal complexes and their application in drugs and cosmetics", *J. Chem. Pharm. Res.*, **3**(4):951-958.
- Watters, J.W., McLeod, H.L. (2003), "Cancer pharmacogenomics: current and future applications", *Biochimica et Biophysica Acta*, **1603**, 99– 111.
- Wei, L.-X., Zhou, R.-S., Xu, H.-F., Wang, J.-Y., Yuan, M.-H. (2013), "High expression of FOXC1 is associated with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer patients", *Tumor Biol.*, **34**:941-946.
- Willingham, M.C. (1999), "Cytochemical methods for the detection of apoptosis", *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Volume **47**(9): 1101–1109.
- Wiltshaw, E. (1979), "Cisplatin in the treatment of cancer", *Platinum Metals Rev.*, **23**, (3), 90-98.
- Wong, R.SY. (2011), "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment" *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **30**:87.

- Xu, H., Aguilar, Z.P., Yang, L., Kuang, M., Duan, H., Xiong, Y., Wei, H., Wang, A. (2011), "Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood", *Biomaterials*, **32**, 9758-9765.
- Xu J.; Sun Y., Huang, J., Chen,C., Liu, G., Jiang, Y., Zhao, Y., Jiang, Z. (2007), "Photokilling cancer cells using highly cell-specific antibody-TiO₂ bioconjugates and electroporation", *Bioelectrochemistry*.;**71**(2):217-22.
- Yamaguchi, S., Kobayashi, H., Narita, T., Kanehira, K., Sonezaki, S., Kubota, Y., Terasaka, S., Iwasaki, Y. (2010), "Novel photodynamic therapy using water-dispersed TiO₂-polyethylene glycol compound: evaluation of antitumor effect on glioma cells and spheroids in vitro", *Photochemistry and Photobiology*, **86**: 964–971.
- Yamazaki, T., Yamazaki, A., Hibino, Y., Chowdhury, SA, Yokote, Y., Kanda, Y., Kunii, S., Sakagami, H., Nakajima, H., Shimada, J. (2006), "Biological impact of contact with metals on cells", *In Vivo*, **20**: 605–611.
- Yang, P., Guo, M. (1998), "Interaction of some non-platinum metal anticancer complexes with nucleotides and DNA and the two-pole complementary principle (tpcp) arising therefrom", *Met. Based Drugs.*, Vol.5, No.1, 41-58.
- Yang, C.-M., Lu, I.-H., Chen, H.-Y., Hu, M.-L. (2012), "Lycopene inhibits the proliferation of androgen-dependent human prostate tumor cells through activation of PPAR γ -LXR α -ABCA1 pathway", *Journal of Nutritional Biochemistry*, **23**, 8–17.
- Yang, L.(2005), "Disfunction of the apoptotic pathway in cancer cells", "Chapter 1, *Application of Apoptosis to Cancer Treatment*, 1-28.
- Yazdi, M.H., Niazzadeh, Z., Khorramizadeh, M.R., Amini, M., Shahverdi, A.R. (2012), "Fabrication of docetaxel surfaced Fe₃O₄ magnetite nanoparticles and their cytotoxicity on 4 T1 breast cancer cells", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **20**:15.
- Yoltaş, A., Karaboz, İ. (2010), "DNA mikroarray teknolojisi ve uygulama alanları", *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* TR(Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi) Cilt: 08 Sayı: 1 Sayfa: 01-19.

- Yue, W.T., Zhao, X.T., Zhang, L., Liu, Z., Ma, L., Jia, W.Y., Qian, Z., Zhang, C.Y., Wang, Y., Yang, X., Xu, S. (2010), “Overexpression of cyclin Y in non-small cell lung cancer is associated with cancer cell proliferation”, *Science China Press and Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, Vol.53, No.4: 511-516.
- Zamane, A.G., (2007), “Genetik tanı yöntemleri”, İç:Toraks Derneği 10.Yıllık Kongresi, *Kurs kitabı*, Antalya :143-161.
- Zhang, G., MS, Lai, B.B., MD, Zhou, Y.Y., BS, Chen, B.A., MD, Wang, X.M., PhD, Lu, Q., PhD, Chen, Y-H., PhD. (2011), “Fe₃O₄ nanoparticles with daunorubicin induce apoptosis through caspase 8-PARP pathway and inhibit K562 leukemia cell-induced tumor growth in vivo”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **7**, 595–603.
- Zhang, C.X., Lippard, S.J. (2003), “New metal complexes as potential therapeutics”, *Current Opinion in Chemical Biology*, **7**:481–489.
- Zhang, H., Wang, C., Chen, B. ,Wang, X. (2012), “Daunorubicin-TiO₂ nanocomposites as a “smart” pH-responsive drug delivery system”, *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 235–242.
- Zhang, R., Wu, C., Wang, X., Sun, Q., Chen, B., Li, X., Gutmann, S., Lv, G. (2009), “Enhancement effect of nano Fe₃O₄ to the drug accumulation of doxorubicin in cancer cells”, *Materials Science and Engineering, C* **29**, 1697–1701.
- Zhou, Y., Chen, L., Barlogie, B., Stephens, O., Wu, X., Williams, D.R., Cartron, M.-A., Rhee, F., Nair, B., Waheed, S., Pineda-Roman, M., Alsayed, Y., Anaissie, E., Shaughnessy, J.D. (2010), “High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2”, *PNAS*, vol.107, no.17.
- Zhu, A., Yuan, L., Jin, W., Dai, S., Wang, Q., Xue, Z., Qin, A.(2009), “Polysaccharide surface modified Fe₃O₄ nanoparticles for camptothecin loading and release”, *Acta Biomaterialia*, **5**, 1489–1498.