

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**OKSİDATİF STRESİN HÜCRE DÖNGÜSÜ FAZLARI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ**

FULYA DAL

**DANIŞMAN
PROF.DR. RÜSTEM NURTEN**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Fulya Dal tarafından hazırlanan Oksidatif Stresin Hücre Döngüsü Fazları Üzerindeki Etkileri başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

14 / 12 / 2011

Tez Sınav Jürisi

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u> | <u>İmzası</u> |
|---|---|
| 1.Prof.Dr.Rüstem NURTEN İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı |  |
| 2.Doç.Dr.İşıl ALBENİZ İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı |  |
| 3.Doç.Dr.Muhammet BEKTAŞ İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı |  |
| 4.Doç.Dr.Handan AKÇAKAYA İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı |  |
| 5.Doç.Dr.Handan TUNCEL İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı |  |

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasında elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Fulya Dal


İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde bana destek olan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Rüstem Nurten ve sevgili hocam Doç. Dr. Handan Akçakaya'ya, çalışmalarında beni her zaman destekleyen Bora Yöntem ve tüm Biyofizik Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

İ.Ü.DETAE İmmunoloji A.B.D Akım Sitometri Laboratuvarı'ndan Sayın Dr. Suzan Adın Çınar'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 12616

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET.....	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Serbest Radikaller.....	3
2.1.1. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	4
2.1.2. ROT Kaynağı Olarak Mitokondri	4
2.2. Oksidatif Stres	6
2.3. Hücre Ölüm Yolları	6
2.3.1. Apoptoz.....	7
2.3.1.1. Mitokondrinin Apoptozdaki Rolü	9
2.3.2. Nekroz.....	9
2.4. Hücre Döngüsü.....	10
2.4.1. Hücre Döngüsü ve Siklinler	11
2.4.2. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	12
2.5. Hücre Senkronizasyonu	13
2.5.1. Hücre Senkronizasyon Tartışmaları	14
2.5.2. Hücre Senkronizasyon Yöntemleri.....	15
2.5.2.1. Mimosin ile Hücreleri G ₁ Fazında Tutuklama	15
2.5.2.2. Genistein ile Hücreleri G ₂ /M Fazında Tutuklama	15
2.6. Hücre Döngüsü Analizi	16
2.6.1. Hücresel DNA İçeriğinin Akım Sitometrik Analizi	16

2.6.2. İkili Hücreler veya Hücresel Agregatların Ayırımı	19
2.7. Anneksin V ve Propidium İodid ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. GEREÇLER	22
3.1.1. Kimyasal maddeler	22
3.1.2. Kitler	22
3.1.3. Cihazlar	22
3.1.4. Çalışmada kullanılan eriyikler.....	23
3.1.4.1. Floresan Boyama İçin Kullanılan Eriyikler	23
3.2. YÖNTEMLER	24
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	24
3.2.1.1. Hücrelerin Çoğaltılması	24
3.2.1.2. Hücrelerin Dondurulması.....	24
3.2.1.3. Hücre Sayısı ve Canlılığın Belirlenmesi.....	24
3.2.2. Senkronize Hücrelerin Hazırlanması	25
3.2.2.1. Mimosinin Hücreleri G ₁ Fazında Senkronize Edici Derişim ve Süresinin Belirlenmesi	25
3.2.2.2. Mimosinin Etkisinin Geri Dönüşümlü Olup Olmadığının Belirlenmesi.....	26
3.2.2.3. Mimosinin Hücreleri S Fazında Senkronize Edici Süresinin Belirlenmesi	26
3.2.2.4. Genisteinin Hücreleri G ₂ /M Fazında Senkronize Edici Derişim ve Sürenin Belirlenmesi.....	26
3.2.3. DNA Analizi İçin Akım Sitometri Cihazı Kalibrasyonunda Kullanılacak Hücrelerin Hazırlanması.....	27
3.2.4. K562 Hücrelerinin H ₂ O ₂ İle Muamele Edilmesi	27
3.2.5. Mitokondri Membran Potansiyelinin Belirlenmesi	27
3.2.6. Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Belirlenmesi	28
3.2.6.1. Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Belirlenmesinde Kullanılan Kalibrasyon İşlemleri	28
3.2.6.2. Asenkron Hücrelerde Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi.....	28
3.2.6.3. Senkron Hücrelerde Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi.....	29
4. BULGULAR	30
4.1. Oksidatif Stresin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	30

4.2. Oksidatif Stresin Asenkron Hücrelerin Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi.....	31
4.3. Mimosinin K562 Hücreleri Üzerine Senkronizasyon Etkisi	33
4.4. Genisteinin K562 Hücreleri Üzerine Etkisi	36
4.5. K562 Hücrelerinde Mimosinin Geri Dönüşümlü Etkisi.....	39
4.6. Farklı Fazlarda Senkronize Edilmiş Hücelere H_2O_2 'nin Etkisi	43
4.6.1. G_1 Fazında Senkronize Edilmiş Hücelere H_2O_2 'nin Etkisi	43
4.6.2. S Fazında Senkronize Edilmiş Hücelere H_2O_2 'nin Etkisi	44
4.6.3. G_2/M Fazında Senkronize Edilmiş Hücelere H_2O_2 'nin Etkisi.....	45
4.7. Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi	46
4.7.1. Asenkron Hücre Popülasyonunda Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Belirlenmesi	46
4.7.2. Senkron Hücre Popülasyonunda Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Belirlenmesi	49
4.7.2.1. Apoptoz ve Nekrozun G_1 Fazında Senkronize Hücrelerdeki Dağılımı	49
4.7.2.2. Apoptoz ve Nekrozun S Fazında Senkronize Hücrelerdeki Dağılımı	50
4.7.2.3. Apoptoz ve Nekrozun G_2/M Fazında Senkronize Hücrelerdeki Dağılımı.....	52
5. TARTIŞMA	53
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	68

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Farklı hücre ölüm tipleri.	7
Tablo 4-1. Farklı derişim ve sürelerde asenkron hücrelerdeki hücre canlılık oranları....	30
Tablo 4-2. 12 saat 200 μ M mimozin ile işlem görmüş, 12 saat normal CDMEM’de inkübe edilmiş hücrelerin DNA analiz sonuçları.	40
Tablo 4-3. 24 saat 200 μ M mimozin ile işlem görmüş, 24 saat normal CDMEM’de inkübe edilmiş hücrelerin DNA analiz sonuçları.	42
Tablo 4-4. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H_2O_2 ile inkübe edilmiş asenkron K562 hücrelerinin, boyanmamış, yalnız anneksin V, yalnız PI ve anneksin V + PI boyanmış hücre dağılım tablosu.	48
Tablo 4-5. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H_2O_2 ile inkübe edilmiş G_1 fazında senkron K562 hücrelerinin, boyanmamış, yalnız anneksin V, yalnız PI ve anneksin V + PI boyanmış hücre dağılım tablosu.	50
Tablo 4-6. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H_2O_2 ile inkübe edilmiş S fazında senkron K562 hücrelerinin boyanmamış, yalnız anneksin V, yalnız PI ve anneksin V + PI boyanmış hücre dağılım tablosu.	51
Tablo 4-7. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H_2O_2 ile inkübe edilmiş G_2/M fazında senkron K562 hücrelerinin, boyanmamış, yalnız anneksin V, yalnız PI ve anneksin V + PI boyanmış hücre dağılım tablosu.....	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Oksidatif fosforillenme.....	5
Şekil 2-2. Zaman-ayarlı çekim yapabilen mikroskop ile kaydedilmiş apoptotik trofoblast hücrelerinin morfolojisi.	8
Şekil 2-3. Nekrotik Hücre Ölümü.	10
Şekil 2-4. Hücre döngüsü fazları.....	11
Şekil 2-5. Hücre döngüsünün dört ana fazı arasındaki geçişi düzenleyen siklin/Cdk komplekslerinin şematik sunumu.....	12
Şekil 2-6. Hücre döngüsü kontrol noktaları.....	13
Şekil 2-7. L-Mimozinin kimyasal yapısı.	15
Şekil 2-8. L-Genisteinin kimyasal yapısı	16
Şekil 2-9. Akım sitometri ile belirlenen DNA içeriği.	17
Şekil 2-10. DNA içeriği ve ikili ayrımı için FL2W/FL2A' nın noktasal grafiği.	18
Şekil 2-11. DNA ve hücre döngüsü analizi.	18
Şekil 2-12. Asenkron popülasyon için hücre döngüsündeki DNA içeriği ve hücre pozisyonu arasındaki ilişkinin şematik olarak gösterimi.....	19
Şekil 2-13. Canlı / apoptotik hücrelerin Annexin V/ PI boyamasının noktasal grafiği.	21
Şekil 4-1. Farklı süre ve derişimlerde H ₂ O ₂ ile işlem görmüş asenkron hücrelerin ışık mikroskobu görüntüsü.....	30
Şekil 4-2. Oksidatif strese maruz kalmış asenkron hücrelerin histogram grafiği.	31
Şekil 4-3. Oksidatif strese maruz bırakılmış asenkron hücrelerin noktasal grafiği.	32
Şekil 4-4. 24 saat farklı derişimlerde mimozin ile muamele görmüş K562 hücrelerinin DNA analizi.	34
Şekil 4-5. 24 saat farklı derişimlerde mimozin ile muamele görmüş ve dondurulup çözölmüş K562 hücrelerinin DNA analizi.	34
Şekil 4-6. 24 saat 200 µM mimozin ile muamele görmüş hücrelerin mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi.	35
Şekil 4-7. 8, 12 ve 16 saat mimozin ile inkübe edilmiş K562 hücrelerinin DNA analizi.	35
Şekil 4-8. 8, 12 ve 16 saat mimozin ile işlem görmüş hücrelerin G1 fazındaki oranlarının grafiği.....	36

Şekil 4-9. 25-200 μM arasındaki genistein derişimleri ile işlem görmüş K562 hücrelerinin G2/M popölasyon oranlarının grafiği	36
Şekil 4-10. 25, 50 ve 100 μM derişimlerde genistein ile 72 saat inkübe edilmiş K562 hücrelerinin DNA analizi.....	37
Şekil 4-11. 72 saat 100 μM genistein ile muamele görmüş K562 hücrelerinin mitokondri membran potansiteli analizi.	37
Şekil 4-12. 48 saat farklı derişimlerde genistein ile muamele edilmiş K562 hücrelerinin DNA analizi.	38
Şekil 4-13. 48 saat 120 μM genistein ile muamele görmüş K562 hücrelerinin mitokondri membran potansiyeli analizi.	39
Şekil 4-14. 12 saat mimosin ile muamele gördükten sonra 12 saat normal CDMEM'de bekletilmiş hücrelerin 3 boyutlu DNA analiz histogramı.....	41
Şekil 4-15. 24 saat mimosin ile muamele gördükten sonra 24 saat normal CDMEM'de bekletilmiş hücrelerin 3 boyutlu DNA analiz histogramı.....	42
Şekil 4-16. Farklı derişim ve sürelerde G_1 fazında oksidatif strese maruz bırakılan hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi.....	43
Şekil 4-17. Farklı derişim ve sürelerde S fazında oksidatif strese maruz bırakılan hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi.....	44
Şekil 4-18. G_2/M fazında senkronize edilmiş ve farklı derişim ve sürelerde oksidatif strese maruz bırakılan hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi.....	45
Şekil 4-19. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılan canlı boyasız hücreler.	46
Şekil 4-20. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılan apoptoz-indüklenmiş anneksin V boyalı hücreler.	47
Şekil 4-21. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılan nekroz-indüklenmiş PI boyalı hücreler.	47
Şekil 4-22. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H_2O_2 ile inkübe edilmiş asenkron K562 hücrelerinin noktasal grafiği.....	48
Şekil 4-23. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H_2O_2 ile inkübe edilmiş G_1 fazında senkronize K562 hücrelerinin noktasal grafiği.	49
Şekil 4-24. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H_2O_2 ile inkübe edilmiş S fazında senkronize K562 hücrelerinin noktasal grafiği.	51

Şekil 4-25. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H_2O_2 ile inkübe edilmiş G_2/M fazında senkronize K562 hücrelerinin noktasal grafiği.....	52
---	----

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

$\Delta\Psi_m$	Mitokondri membran potansiyeli
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
ATP	Adenozin 5' - trifosfat
Cdk	Siklin bağımlı kinaz
CDMEM	Complete DMEM
CEN	Tavuk eritrosit çekirdeği (Chicken Erythrocyte Nucleus)
CTN	Buzağı timosit çekirdeği (Calf Thymocyte Nucleus)
CV	Varyasyon katsayısı
DI	DNA içeriği (indeksi)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FACS	Floresan Aktive Hücre Ayırıcı (Florescein Activating Cell Sorter)
FBS	Fetal sığır serumu
FITCH	Floreseinizotiyosiyonat
G ₀	G ₀ fazı
G ₁	G ₁ fazı
G ₂	G ₂ fazı
K562	İnsan eritrolösemi hücresi
M	Mitoz
NADH	Redüklenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid
PBS	Fosfat tuzu tamponu (Phosphate Buffer Saline)
PI	Propidium iodid
pRb	Retinablastoma proteini
PS	Fosfatidil serin
ROT	Reaktif oksijen türleri
S	Sentez

SOD	Süperoksit dismutaz
Tris	Tris (hidroksimetil) aminometan

ÖZET

Dal, F. Oksidatif Stresin Hücre Döngüsü Fazları Üzerindeki Etkileri. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul 2011.

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif nitrojen türleri (RNS) gibi oksitleyici ajanların hücre içerisindeki artışı ya da antioksidatif savunma mekanizmalarıyla oksidanlar arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanır. Oksidatif stresin zararlı etkilerine karşın canlı organizmaların geliştirdiği mekanizmalar arasında temel ve indüklenabilen antioksidanlar, katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi oksidan savunma enzimleri, DNA onarım enzimleri ve hücre döngüsü kontrol noktaları sayılabilir. Hücre döngüsü kontrol noktası yanıtı, zarar verici ajanlara maruz kaldıktan sonra hücre döngüsü işleyişindeki duraksama olarak tanımlanabilir. Bu geçici duraksama bir bakıma tekrar hücre döngüsüne girip mitozu tamamlamadan önce hücrelere özellikle DNA hasarını onarma için verilen bir zaman dilimi olarak düşünülebilir.

Bu bilgilerin ışığında, oksidatif stresin etkilerinin farklı hücre döngüsü fazları üzerinde belirlenebilmesi için, mimozin ve genistein kullanılarak insan eritrolösemi hücre dizisi (K562) senkron hale getirildi. Senkron hücreler, reaktif oksijen türlerinden biri olan hidrojen peroksit (H_2O_2) aracılığı ile farklı derişim ve sürelerde oksidatif strese maruz bırakıldı. Hücrelerin mitokondri membran potansiyellerindeki ($\Delta\Psi_m$) değişiklikler hücre döngüsünün farklı fazlarında (G_1 , S ve G_2/M) analiz edildi. Senkronize edildikten sonra oksidatif strese maruz bırakılmış hücrelerde apoptoz ve nekroz, anneksin V - PI boyama yöntemi kullanılarak akım sitometri analizleriyle belirlendi. Oksidatif strese maruz kalmış asenkron hücreler ile senkron hücreler arasındaki mitokondri membran potansiyelindeki değişiklikler gösterildi. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlendiği çalışmalarda, asenkron hücreler ile senkron hücrelerin boyanmamış hücre, yalnız anneksin V ile boyanmış, yalnız PI ile boyanmış ve hem anneksin V hem de PI ile boyanmış hücre oranları belirlendi. Her iki analiz sonuçları da değerlendirilerek hücrelerin oksidatif stresin etkilerine S fazında dirençli, G_2/M fazında ise $500\ \mu M$ ve artan H_2O_2 derişimlerinde duyarlı oldukları belirlendi.

Anahtar kelimeler: Oksidatif stres, hücre döngüsü, K562, apoptoz, nekroz.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 12616

ABSTRACT

Dal, F. Effects of Oxidative Stress on Cell Cycle Phases. Istanbul University Institute of Health Science, Department of Biophysics, Master Thesis, Istanbul 2011.

Oxidative stress can be defined as the increasement of oxidizing agents like reactive oxygen species and reactive nitrogen species or the imbalance between antioxidative defense mechanism and oxidants. Primary and inducible antioxidants, oxidant defense enzymes like catalase and superoxide dismutase (SOD), DNA repair enzymes and cell cycle checkpoints can be considered as the mechanisms of living organisms developed for the deleterious effects of the oxidative stress. Cell cycle checkpoint response can be defined as the arrest of the cell cycle functions after damaging chemical exposure. This temporary arrest can be thought as a period of time given to the cells to repair the DNA damage before entering the cycle again and completing the mitosis.

In the view of such information in order to determine the effects of oxidative stress on several cell cycle phases, human erytroleuchemia cell line (K562) synchronized with mimosine and genistein. Synchronized cells were exposed to oxidative stress by hydrogen peroxide (H_2O_2), a reactive oxygen species, at several concentrations and times. Changes on mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of cells were analyzed at several phases of the cell cycle (G_1 , S and G_2/M). After synchronization, to determine the apoptosis and necrosis, cells exposed to oxidative stress were stained with annexin V and propidium iodide and analyzed at flow cytometry. Changes in the mitochondrial membrane potential of synchronized and asynchronized cells which exposed to oxidative stress have been shown. Non stained, stained with annexin V, stained with PI and annexin V and PI stained cell rates were determined at apoptotic and necrotic cell studies. By evaluating both these analyze results, it has been shown that synchronized cells at S phase is resistant to the effects of the oxidative stress and synchronized cells at G_2/M phase is sensitive to the effects of oxidative stress at 500 μM and above H_2O_2 concentrations.

Key words: Oxidative stress, cell cycle, K562, apoptosis, necrosis.

This work has been supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit. Project No: 12616

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Biyolojik sistemler için faydalarının yanı sıra yan etkileri de bulunan oksijen, oksidatif fosforillenme üzerinden ATP üretimine katkıda bulunurken diğer yandan oksidatif stresin oluşumuna neden olmaktadır. Oksidatif stresin oluşmasında görev alan kaynaklar arasında mitokondriyal oksidatif fosforillenme sırasında üretilen ROT'lar, iyonize radyasyona maruz kalma ve ekzojen bileşiklerin metabolizmaları yer almaktadır. Mitokondri, oksidatif stresin oluşmasında rol alan reaktif oksijen türlerinin ana kaynağı olmasının yanı sıra ROT'ların hedefi olarak da ön planda olan bir organeldir. Özellikle ekzojen oksidatif stres etkenleri, hücre cevabının mitokondri merkezli bir yolak üzerinden oluşmasına neden olmaktadır. Mitokondri membran potansiyelindeki değişimler, programlı hücre ölüm yollarından biri olan apoptozun geri dönüşümü olmayan noktalarından biridir. Bu nedenlerden ötürü oksidatif stres çalışmalarında mitokondri membran potansiyelindeki değişimlerin araştırılması günümüzde oldukça yaygın çalışılan bir konudur.

İyonlaştırıcı radyasyon ve diğer karsinojenlerin hücre döngüsü üzerine etkileri ile ilgili günümüzde birçok veri bulunsada, oksidatif stresin senkronize hücreler üzerine etkileri özgünlüğünü korumaktadır. Senkronize hücreler elde edebilmek için kullanılan yöntemler arasında tüm kültür "whole culture" ve bebek makinesi "baby machine" sayılabilir. Bu yöntemler ile ilgili olarak, araştırmacılar farklı görüşleri savunmaktadırlar. Bebek makinesi yöntemini savunan S. Cooper, tüm kültür yöntemi ile senkronizasyon işleminin gerçekleştiremeyeceğini belirtmektedir. Bu araştırmacıya göre hücrelerin senkron sayılabilmeleri için hücre yaşlarının da aynı olması gerekir. Tüm kültür çalışmalarında farklı yaşlarda hücreler aynı ortamda bir noktada durdurulsa bile, tekrar döngüye devam etmelerinin sağlandığı noktadan itibaren farklı hızlarda döngüye devam edeceklerini belirtir. Buna karşın P.T. Spellman ve G. Scherlock adlı araştırmacılar ise tüm kültür yönteminin hücre senkronizasyon işlemleri için kullanılabileceğini çünkü hücre yaşı ve hücre döngüsünün bağlantısız olduğunu belirtirler. Her iki görüşünde eksik kaldığını vurgulayan araştırmacılar da bulunmaktadır (1).

Bu çalışmanın amacı farklı hücre fazlarında senkronize edilen hücrelerde oksidatif stresin etkilerini araştırmaktır. Senkronizasyon işlemleri tüm kültür "whole culture" yöntemi kullanılarak yapıldı. Senkronize hücrelerde oksidatif stresin etkileri

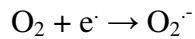
mitokondri membran potansiyeli analizleri üzerinden araştırıldı. Oksidatif ajan olarak kullanılan H_2O_2 'nin birçok hücre soyunu apoptoza yönlendirdiği bilinmektedir (2-7). Çalışmamızda kullandığımız K562 hücreleri de H_2O_2 derişimine ve uygulama süresine bağılı olarak apoptotik sürece yönlenmektedir. G_1 , S ve G_2/M fazlarındaki hücelere H_2O_2 'nin etkisi asenkron hücelerle karışlaştırılarak nispi olarak değerlendirilmiştir. Oksidatif strese duyarlı ya da dirençli hücre döngüsü fazlarının belirlenmesi, özellikle kanser hastalarında kullanılan ilaçların senkronize edici ajanlarla birlikte kullanıldığında etkilerinin arttırılması açısından önemlidir. Çalışmadan elde edilecek verilerin bu yönde değerlendirilmesi de amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

Atomlar proton ve nötronlardan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşur. Elektronlar, çekirdeğin etrafında orbital olarak tanımlanan bölgelerde hareket ederler ve her orbitalde spinleri birbirine zıt en fazla iki elektron bulunur (8). Dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküller “serbest radikal” olarak adlandırılır (2). Eşleşmemiş elektronlarından dolayı oldukça reaktif olan serbest radikaller, kovalent bağların homolitik kırılması, normal bir molekülün elektron kaybetmesi ve normal bir moleküle tek bir elektron transferi gibi üç temel yolla oluşmaktadır (3,4). Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en çok elektron transferi sonucunda oluşurlar. İçinde bulunduğumuz çevrede, radyasyon gibi çeşitli fiziksel olaylar ve kimyasal etkenler nedeniyle, hücresel koşullarda ise stres ve mitokondriyal elektron taşıma zinciri sırasında devamlı bir radikal oluşumu vardır.

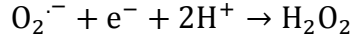
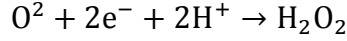
Serbest radikallerin büyük bir kısmı oksijen radikalleridir. Son orbitalinde eşleşmemiş iki elektronu bulunan oksijen biradikal olarak değerlendirilir. Ancak bu iki elektronun paralel spinli olmasından dolayı oksijen molekülünün reaktif özelliği son derece kısıtlıdır (1-4). “Spin kısıtlaması” olarak da adlandırılan bu durum, oksijene elektron transferi ile ya da enerji absorpsiyonu ile ortadan kaldırılır. Oksijen radikalleri, aerobik bir ortamda fiziksel ve kimyasal etkenlerle ya da zorunlu metabolik tepkimeler sonucu üretilebilir. Moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenerek, radikal form süperoksitin oluşması;



şeklinde ifade edilir. Biyolojik sistemlerde bulunan en önemli oksijen radikalleri arasında süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) sayılabilir. Reaktif oksijen türleri (ROT) olarak da adlandırılan bu moleküllerin, DNA, RNA, protein, lipid gibi makromoleküllere katılarak hücresel bileşenlere ve dokulara zarar verme özellikleri vardır (5). Doymamış yağ asitleri ile tepkimeleri sonucunda alkoksil radikali (RO), peroksil radikali (ROO) ve organik hidroperoksitler (ROOH) gibi diğer reaktif oksijen türleri oluşur. Bu tür radikallerin oluşumu lipid peroksidasyonuna ve membran hasarına sebep olur.

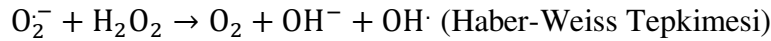
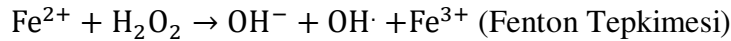
2.1.1. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

H₂O₂, moleküler oksijenin, çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu oluşur ve sırasıyla;



şeklinde ifade edilir. Biyolojik sistemlerde ise H₂O₂, süperoksidin enzimatik olmayan veya süperoksit dismutaz (SOD) katalizli dismutasyon tepkimesi ile oluşmaktadır.

H₂O₂, yapısında eşleşmemiş elektron içermediği için radikal değildir, ancak geçiş metal iyonları varlığında Fenton tepkimesi sonucu; süperoksit radikali varlığında ise Haber-Weiss tepkimesi sonucu hidroksil radikaline dönüşür (6) ve



şeklinde ifade edilir. H₂O₂ lipitte çözünebilir ve biyolojik membranları geçerek hücrelerin arasına veya içine kolayca difüzlenerak hasar oluşturabilmektedir (2-7).

Haber-Weiss ve Fenton tepkimeleri sonucu OH oluşumu, vücutta üretilen H₂O₂ derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır (9,10). Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakırdır.

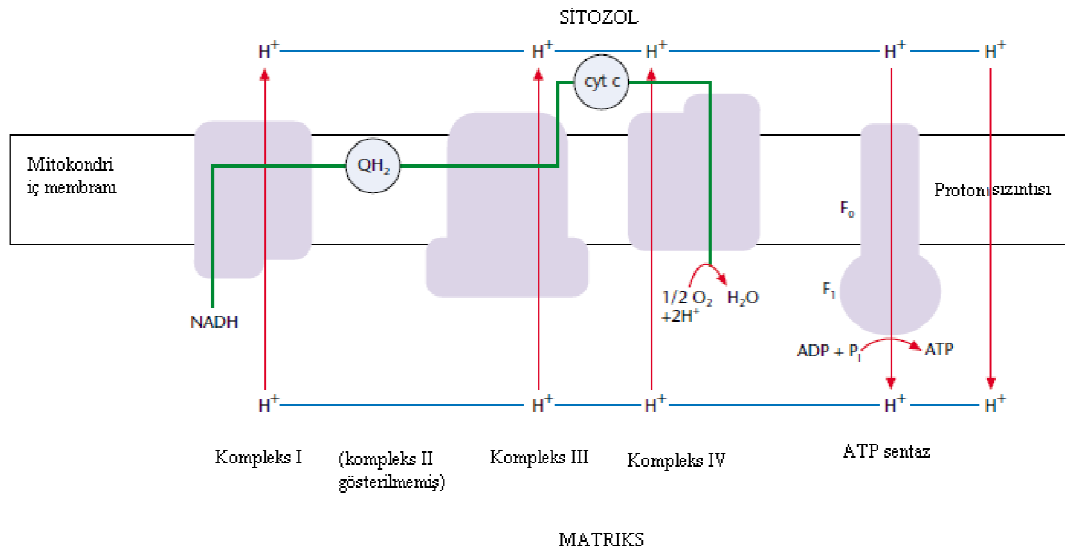
2.1.2. ROT Kaynağı Olarak Mitokondri

Hücrelerin temel enerji kaynağı olan mitokondri, ökaryotik hücrelerde oksidatif fosforillenme üzerinden adenosin 5'-trifosfat (ATP) sentezinde rol oynar. Mitokondride ATP sentezinin gerçekleşmesinde görev alan beş kompleks bulunmaktadır (kompleks I,II,III,IV ve ATP sentaz). Bu kompleksler mitokondri matriksinden iç membrana proton pompalayarak, iç membranda bir elektrokimyasal gradiyent (Δp) oluştururlar. Δp 'nin membran potansiyeli ($\Delta \Psi_m$) ve pH olmak üzere iki bileşeni bulunmaktadır ve

$$\Delta p = \Delta \Psi_m - \Delta pH$$

eşitliği ile belirlenir. İç membran üzerinde bulunan ATP sentaz kompleksi elektrokimyasal gradiyent ile ATP sentezini gerçekleştirmektedir. Ancak oksidatif fosforillenme sürecinde oldukça reaktif oksijen türleri de oluşmaktadır. Mitokondri elektron taşıma sistemindeki oksidan üretiminin en büyük bölümü O₂'nin H₂O'ya indirgenmesi sırasında oluşmaktadır. Bu süreç NADH'tan ayrılan elektronların,

kompleks I'e (NADH dehidrogenaz kompleksi) ve süksinattan ayrılan elektronların ise kompleks II'ye (süksinat dehidrogenaz kompleksi) gönderilmesi ile başlar. Koenzim Q veya UQ olarak da bilinen ubikuinon her iki kompleksten de elektron alarak, her seferinde bir elektronu ubisemikuinon ve ubikuinol'a indirir. Elektronlar kompleks III (UQ-sitokrom c redüktaz), sitokrom c ve kompleks IV (sitokrom c oksidaz) üzerinden taşınır ve sonuç olarak O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesi gerçekleşir (Şekil 2-1). Mitokondri elektron transferi sırasında pompalanan protonlar bazı durumlarda matrikse sızabilir. Ubisemiquinonun, ubiquinolü oluşturmak için bir elektron ve proton almak yerine, bir elektron sızdırarak, O_2 'nin $O_2^{\cdot-}$ 'ye indüklenmesine sebep olduğu düşünülmektedir. $O_2^{\cdot-}$ 'nin enzimatik dismutasyonu, diğer önemli bir biyolojik oksidan olan H_2O_2 'ye yönlendirir (11).



Şekil 2-1. Oksidatif fosforillenme.

Elektron transfer zinciri bileşenleri ve kemiozmotik proton çevriminin fiziksel organizasyonu. Elektronlar (NADH ve $FADH_2$ 'den alınan) zincir boyunca transfer edildikçe (yeşil çizgi), protonlar mitokondri matriksinden mitokondri iç membranının sitozolik kesimine doğru pompalanır ve böylece bir proton gradiyenti elde edilir. Bu gradiyent ATP sentaz tarafından ATP üretimi için veya proton sızıntısı yoluyla üzerinden harcanarak ısı eldesinde kullanılabilir.

2.2. Oksidatif Stres

Organizmada normal metabolik olaylar sırasında ve patolojik süreçlerde üretilen serbest radikaller, hücresel savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırıldıkları için, ROT miktarı belirli sınırlar içinde dengede tutulmaktadır. Ancak bazı durumlarda hücresel savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılanlardan daha fazla ROT oluşumu oksidatif stres durumunu ortaya çıkarır. Dolayısı ile oksidatif stres, serbest radikal üretiminin hücre içerisindeki artışı ya da antioksidatif savunma mekanizmalarıyla oksidanlar arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanabilir (12-14).

Geri dönüşümsüz oksidatif hasarın birikimi ile önce hücre daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve işlevsel bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Kanseri, diyabet, damar sertliği, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, multiple sklerozis, hava kirliliğinin neden olduğu rahatsızlıklar, iskemi/reperfüzyon hasarı, hipertansiyon, felç, katarakt, şizofreni, artrit gibi birçok hastalığın moleküler temelinde oksidatif stresin yattığı bilinmektedir (15). Oksidatif stresin oluşmasında görev alan olası kaynaklar arasında, mitokondriyal oksidatif fosforillenme tarafından üretilen ROT'lar (11), iyonize radyasyona maruz kalma (16-19) ve ekzojen bileşiklerin metabolizmaları yer almaktadır. Canlılarda oksidatif stresin etkilerinden korunmak için geliştirilen mekanizmalar arasında; radikal oluşumunun engellenmesi, oluşan radikallerin temizlenmesi, güçlü radikallerin metal iyonlarının varlığında daha zayıf radikallere dönüştürülmesi, hasar oluşmuş hedefin onarılması ve hedef dokuların antioksidan kapasitelerinin artırılması sayılabilir.

2.3. Hücre Ölüm Yolları

Hücrelerin farklılaşarak doku ve organları oluşturma süreci, çoğalma ve farklılaşma dışında hücre ölümünü de içermektedir. Hücre ölümü, bu şekilde embriyonik gelişim sırasında ya da normal fizyolojik sürecin bir parçası olarak programlanmış şekilde gerçekleşebildiği gibi, toksik kimyasallara maruz kalma ve beklenmedik travmatik olaylar sonucu da meydana gelebilmektedir. Hücre ölümü, ölüm sürecinin morfolojik yapısına (apoptotik, nekrotik, otofajik veya mitoz ilişkili), enzimolojik kriterlere (nükleazların, kaspazların veya kathepsinlerin dahil olup olmadığına), işlevsel durumuna (programlanmış veya kazara, fizyolojik veya patolojik) veya immünolojik karakteristiklerine (immünogenik veya immünogenik olmayan) bakılarak sınıflandırılabilir (20). Bu kriterlere göre belirlenmiş 11 farklı hücre ölüm

yolu bulunmaktadır. Bu hücre ölüm yolları arasında nekroz, apoptoz, anoikis, kaspaz-bağımlı apoptoz, otofaji, wallerian dejenerasyonu, eksito-toksisite, eritropoez, plateletler, kornifikasyon ve LENS'i saymak mümkündür (Tablo 2-1) (21).

Tablo 2-1. Farklı hücre ölüm tipleri.

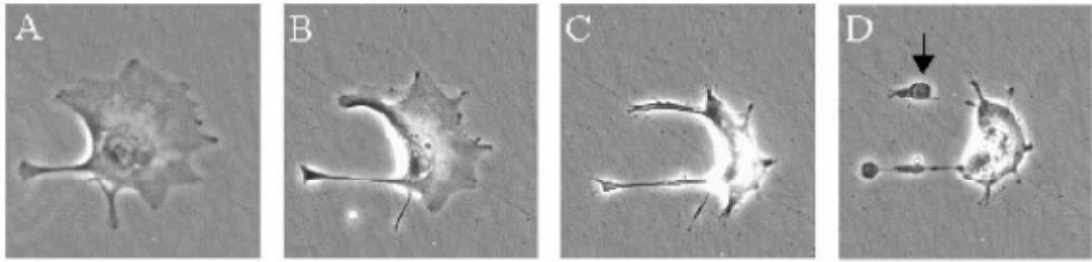
	Nekroz	Apoptoz	Anoikis	Kaspaz Bağımlı Apoptoz	Otofaji	WD	Eksito-toksisite	Eritropoez	PLT	Kornifikasyon	LENS
Genetik Program	Yok	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var
Membran	Parçalanmış	Sağlam PS açığa çıkmış	Sağlam PS açığa çıkmış	Sağlam PS açığa çıkmış	Sağlam PS açığa çıkmış	Sağlam	Sağlam	Sağlam	Sağlam	Sağlam	Sağlam
Organeller	Parçalanmış	Sağlam	Sağlam	Sağlam	Sağlam Lipid yeniden düzenlenmesi	Sağlam	Sağlam	Sağlam	Sağlam	Çapraz bağlı lipid-yeniden düzenlenmesi	Sağlam
Nükleus		Kromatin yoğunlaşması DNA fragmentasyonu	Kromatin yoğunlaşması DNA fragmentasyonu	Kromatin yoğunlaşması DNA fragmentasyonu	Kromatin yoğunlaşması DNA fragmentasyonu			Kayıp	Kayıp	Kayıp	Kayıp
Enzimler	Yok	Kaspazlar	Kaspazlar	Kalpainler	Lizozomal beclin 1	VPR	Kalpainler NCX	Kalpainler	TG 1, 3, 5	TG	
Reseptörler		Ölüm Reseptörleri									
Regülatörler		Bcl Ailesi IAP					NO Kalsiyum	GAT A2		AP1 Kalsiyum	
	-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	-7-	-8-	-9-	-10-	-11-

Satırlar şematik şekliyle farklı ölüm tiplerinin karakteristiklerini ve plazma membranı, nükleus, mitokondri ve diğer sitozolik organellerdeki bulguları vermektedir. WD; Wallerian dejenerasyonu, PLT; platelet, TG; transglutaminaz, NO; nitrik oksit, NCX; sodyum kalsiyum değişim kanalı, IAP; apoptoz proteinleri inhibitörü.

2.3.1. Apoptoz

Hücre ölüm yollarından biri olan apoptoz, çok hücreli organizmaların normal gelişimi, farklılaşması, çoğalması, düzenlenmesi ve özdengeşi için gerekli, doğal olarak ortaya çıkan bir programlanmış hücre ölüm sürecidir. Hasarlı, iltihaplı veya potansiyel ur yapısındaki hücrelerin uzaklaştırılması için önemli bir süreç olan apoptozun hücrelerde aşırı veya az görülmesi çeşitli patolojik sonuçlar doğurabilmektedir. Apoptotik süreçte meydana gelen tıkanma ya da inhibisyon, romatizmal atar damar yangısı ve kanser gibi hastalıklara neden olurken, iskemik kalp hastalığı, AIDS, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları ise aşırı apoptoz sonucu ortaya çıkmaktadır (22-24). Apoptotik süreçte, hücre yapısında deformasyonlar, büzülme, kromatin

yoğunlaşması ve plazma membranının çıkıntı veya tomurcuk oluşturmaları gibi çeşitli morfolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır (Şekil 2-2). Hücrede oluşan bu gibi morfolojik değişimler, çeşitli moleküler ve biyokimyasal olaylar ile gerçekleşmektedir (25). Sonunda apoptotik hücreler, apoptotik cisimler adı verilen yoğun bir membranla çevrili yapılara dönüşürler. Apoptotik cisimler, dokuda iltihap oluşturabilecek herhangi bir etki bırakmadan makrofajlar tarafından yutularak uzaklaştırılırlar.



Şekil 2-2. Zaman-ayarlı çekim yapabilen mikroskop ile kaydedilmiş apoptotik trofoblast hücrelerinin morfolojisi.

Çekimler 6 saat ara ile yapılmıştır. **A.** Nukleusta kromatinlerin yıkımı. **B.** Hücrelerin büzölmeye devam etmesi. **C.** Apoptik hücrelerin apoptotik cisimlere dönüşmek üzere paketlenmesi. **D.** Membranda çıkıntı ve tomurcuk oluşumu ve apoptotik cisim oluşumu. (26)

Apoptoz, hücre yüzey reseptörlerine ligandların (apoptotik sinyal) bağlanması, DNA onarım mekanizmalarında meydana gelen bir hata nedeniyle oluşmuş DNA hasarı, sitotoksik ilaç veya radyasyona maruz kalma, tutarsız hücre döngüsü sinyalleri veya gelişimsel ölüm sinyalleri gibi dış veya iç uyaranlar tarafından tetiklenebilir (27). Hücrelerin bu uyaranlara karşı duyarlılıkları, pro ve anti apoptotik proteinlerin (Bcl-2 proteinleri veya apoptozis proteinlerinin inhibitörleri) ifadelerine, uyarının şiddetine ve hücre döngüsü fazlarına göre değişebilmektedir. Hücrelerde apoptozun uyarılması ile oluşan apoptotik sinyal yolağı elemanları arasında; ölüm reseptörleri, membran değişiklikleri, proteaz kaskadı, mitokondriyal değişiklikler ve DNA fragmentasyonu bulunmaktadır.

Apoptozun erken aşamalarında, hücre yüzeyinde meydana gelen değişikliklerinden biri de plazma membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine fosfatidilserinin (PS) translokasyonudur. Bu durum apoptotik hücrelerin fagositler tarafından sindirimi için bir sinyal oluşturmaktadır.

Ölüm reseptörleri aracılığı ile gerçekleşen apoptozda, Fas ligandı, TNF alfa (tümör nekroz faktörü), ve TRAIL (TNF-iliskili apoptoz indükleyici ligand) gibi ligandlar sinyalleri iletmede görev alan hücre yüzey reseptörlerine bağlanır. Ligand bağlanmasının ardından sistein proteazlar olarak da bilinen enzim grubuna dahil kaspazlar devreye girer. Apoptotik sürecin icraatçı molekülleri olan bu enzimler, kaspaz kaskadı olarak adlandırılan bir dizi geri dönüşümsüz tepkime sonunda hücre ölümünü gerçekleştirir.

2.3.1.1. Mitokondrinin Apoptozdaki Rolü

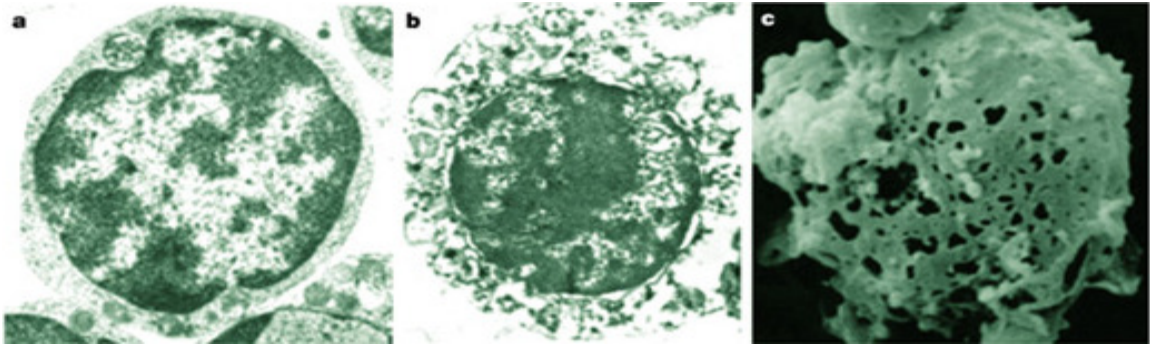
Apoptoz-indükleyici sinyallerin birçoğu $\Delta\Psi_m$ bozulması ile tetiklenmektedir. Bu bozulma ile birlikte, mitokondri ara membran bölgesinde bulunan apoptoz indükleyici faktör (AIF), Smac/DIABLO ve sitokrom c gibi proapoptotik proteinler sitoplazmaya salınırlar (28, 29). Mitokondrial faktörlerin sitoplazmaya salınımı ve $\Delta\Psi_m$ 'deki değişiklik, hücrenin biyokimyasal dengesini bozarak ATP sentezinin durmasına, NADH, NADPH ve glutatyon gibi redoks moleküllerinin oksitlenmesine ve ROT'ların oluşumunun hızlanmasına neden olur (30, 31). Artan ROT seviyesi, lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin oksitlenmesine neden olarak $\Delta\Psi_m$ değişikliklerine pozitif geri beslemede bulunur (32).

2.3.2. Nekroz

Nekroz, bir veya daha fazla sayıda hücrenin, dokunun veya organın geri dönüşümsüz şekilde hasar görmesi sonucu görülen patolojik ölümdür. Nekrotik ölüm şeklinde, hücreler metabolik işlevlerini ve hücre membran bütünlüklerini kaybederler ve bu nedenle protein ve ATP üretimlerini durdururlar. Nekrozun başlangıç safhalarında hücre organelleri büzülür ve işlev göremez hale gelir. Hücre membranı baloncığa benzer kabarcık şeklinde çıkıntılar oluşturur ve bu kabarcıklar birbirleri ile birleşerek genişlerler. Sonuç olarak hücre membranı parçalanır ve hücre içeriği onu çevreleyen dokuya dağılır (Şekil 2-3). Hücrenin bu şekilde bozulmasına sitolizis denir. Dağılan hücre içeriği, etki ettiği dokuda yangısal bir cevap oluşturur ve bu cevaba üç içerik aracılık eder;

- a) bağışıklık sisteminin doku ile ilişkili hücreleri,
- b) sitokinler olarak adlandırılan ve hücre iletişimde görevli olan küçük moleküller ve
- c) ROT.

Nekrozun oluşmasına yardımcı çeşitli faktörler arasında ATP'nin tükenmesi, oksijen seviyelerindeki düşüş ve oksidatif stres direkt hücresel hasara neden olurken, endotoksinler ve oksidatif stresin arttığı bazı durumlar nekroz ile ilişkili yangısal cevabı başlatarak veya şiddetlendirerek indirekt bir rol oynar (33).



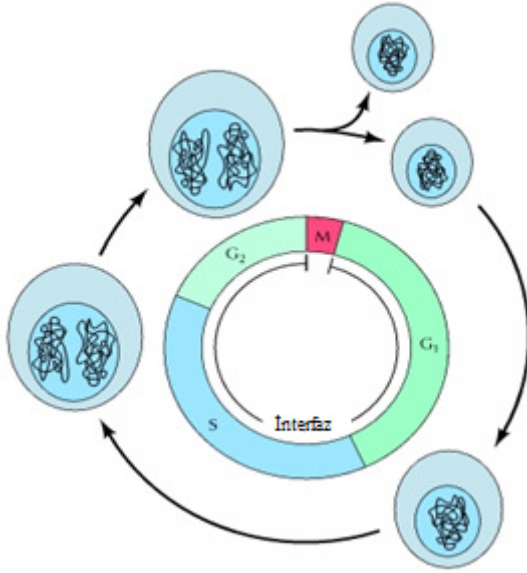
Şekil 2-3. Nekrotik Hücre Ölümü.

a. Normal hücrenin elektron mikroskobu görüntüsü. **b.** Nekrotik hücre ölümü gerçekleşen hücrenin elektron mikroskobu görüntüsü. **c.** Nekrotik hücre ölümünün son safhalarında plazma membranı üzerindeki lezyonların elektron mikroskop görüntüleri (34).

2.4. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, hücre bölünmesi (mitoz) ve ara evre (interfaz) olarak iki ana bölüme ayrılır. Ara evre sürecinde, hücre kütlesi yaklaşık iki kat artar ve hücre mitoz için gerekli molekülleri sentezler. Ara evre kendi içinde, G_1 (G_1 fazı), S (sentez) ve G_2 (G_2 fazı) olarak üç alt evreye ayrılır (Şekil 2-4). G_1 fazında metabolik olarak aktif olan hücreler devamlı büyür ancak DNA'larını eşleyemezler. G_1 fazını izleyen S fazında DNA sentezi gerçekleşir. Hücreler, DNA sentezinin tamamlanması ile birlikte hücre büyümesinin devam ettiği ve mitoz için gerekli proteinlerin sentezine başladığı G_2 fazına girer. Daha sonra hücre bölünmesinin (sitokinez) gerçekleştiği mitoz (M) fazına geçerler. Hücre döngüsünü oluşturan fazlar dışında durağan faz, G_0 (gap 0) olarak adlandırılan ve hücrelerin metabolik olarak aktif halde bulundukları ancak ekstrasellüler

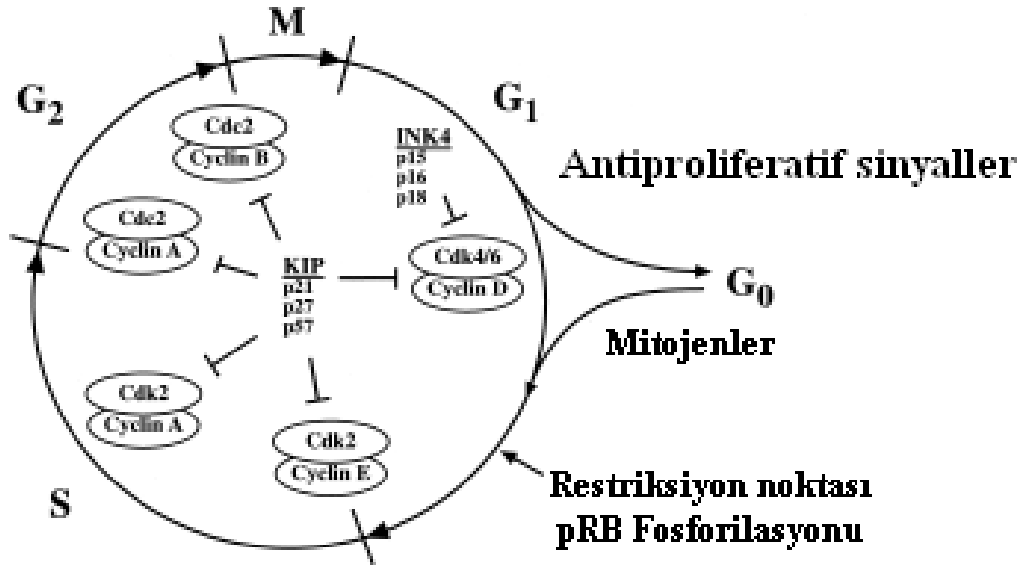
sinyaller ile uyarılmadıkları sürece çoğalmadıkları bir evre bulunmaktadır. 24 saatlik hücre döngüsüne sahip hücrelerde, G_1 fazının yaklaşık olarak 11, S fazının 8, G_2 fazının 4 ve M fazının bir saat sürdüğü bilinmektedir (35).



Şekil 2-4. Hücre döngüsü fazları.

2.4.1. Hücre Döngüsü ve Siklinler

Hücre döngüsünün işleyişinden sorumlu moleküllerin merkezinde serin/treonin kinazlardan olan siklin bağımlı kinaz (Cdk) ailesi yer almaktadır (36). Cdk'lar, hücre döngüsü ilerleyişini çeşitli fazlarda görev alan proteinlerin fosforillenmesi üzerinden kontrol ederler (Şekil 2-5). G_1 fazı ilerleyişinin düzenlenmesinde D tipi siklinler ve retinoblastoma tümör baskılayıcı gen ürünü olan pRb (retinoblastoma proteini) görev almaktadır (37). S fazına geçişi düzenleyen siklin E'nin fazla ifadesi, hücrelerin G_1 fazında geçirdikleri süreyi kısaltmaktadır. S fazı boyunca siklin A ifadesi artmakta ve Cdk'lardan bağımsız bir protein kinaz olan Cdc7, S fazı ilerleyişinin düzenlenmesinde görev almaktadır. S fazındaki Cdk'ların temel görevi DNA'nın hücre döngüsü boyunca yalnızca bir kere kopyalanmasını kesinleştirmektir. G_2 fazından M fazına ilerleyişi ise, siklin A ve siklin B/Cdc2 düzenlemektedir.



Şekil 2-5. Hücre döngüsünün dört ana fazı arasındaki geçişi düzenleyen siklin/Cdk komplekslerinin şematik sunumu.

2.4.2. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

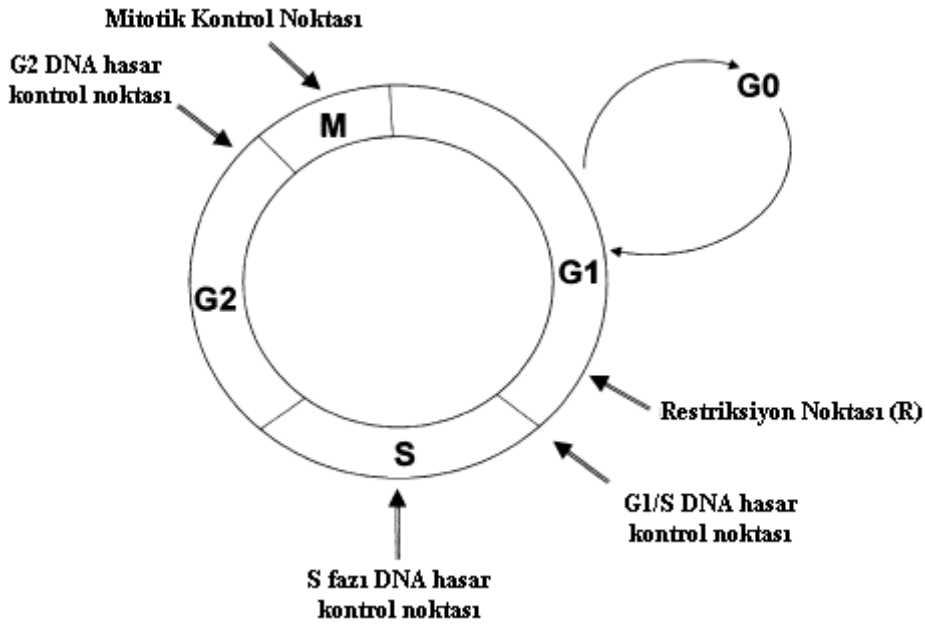
Hücre döngüsünde yer alan fazlar arasındaki geçişin düzenlenmesinde kontrol noktaları görev alır (Şekil 2-6). Kontrol noktaları, hücresel mekanizmayı denetler ve herhangi bir hasar oluşumunda hücre döngüsü ilerleyişinde duraksama oluştururlar. Her bir kontrol noktasının üç bileşeni bulunmaktadır;

- a) DNA hasarı gibi, anormal hücre döngüsü olaylarını saptayan sensör mekanizması;
- b) Sensörden efektöre sinyal taşıyan, sinyal dönüştürme yolağı;
- c) Hasar giderilene kadar hücre döngüsünü tutuklamada işlev gören efektör.

Temel kontrol noktalarından ilki G₁/S geçişinde bulunan DNA hasar sensörüdür. Erken ve orta G₁ fazı arasında hasar gören hücreler G₁ fazında duraksarken, geç G₁ fazında hasar gören hücreler S fazına devam ederler ancak DNA sentezine hasar görmemiş hücrelerden çok daha yavaş bir şekilde başlarlar. DNA eşlemesinde oluşabilecek bir sorunu denetleyen kontrol noktası ise S fazında bulunmaktadır. Bu kontrol noktasını, DNA eşlemesinin uygunluk derecesini kontrol eden ve G₁/S geçişindeki gibi DNA hasar sensörü işlevi gören G₂/M geçiş kontrol noktası izler. Erken ve orta G₂ fazı arasında hasar gören hücreler G₂ fazında duraksarken, geç G₂

fazında hasar gören hücreler mitotik girdiklerinde duraksarlar. Mitotik kontrol noktası ise, mitoz süresince meydana gelebilecek işlevsel bozuklukları denetler. Kontrol noktası duraksamaları genellikle bir siklin/Cdk etkinliğinin baskılanmasını içermektedir (38 - 40).

Fazlar arası geçişlerin düzenlenmesine yarayan kontrol noktalarından bir diğeri de orta ve geç G_1 fazı arasında bulunan restriksiyon noktasıdır. Restriksiyon noktası, hücre için gerekli büyüme sinyallerinin alınması ile hücrelerin G_1 fazından S fazına geçişini düzenleyen kontrol noktasıdır (41). Hücreye büyüme sinyallerinin ulaşmaması durumunda, hücreler S fazına geçemez ve G_0 fazında kalırlar (42).



Şekil 2-6. Hücre döngüsü kontrol noktaları.

2.5. Hücre Senkronizasyonu

Senkron olmayan hücrelerin, çeşitli işlemler sonucu hücre döngüsünün belirli bir fazında tutuklanması hücre senkronizasyonu olarak adlandırılır. Hücreleri senkron etmede kimyasal ya da biyolojik işlemlerin kullanıldığı çeşitli teknikler geliştirilmiştir (43). Hücrelerin serumsuz ortamda çoğaltılması, kontakt inhibisyon ve uygun süre ve derişimlerde çeşitli kimyasalların uygulanması en sık kullanılan senkronizasyon işlemleri arasındadır (44). Başarılı bir hücre senkronizasyonu, G1 fazında mimosin veya

serum yoksunluğu, S fazında DNA eşlemesini bloke eden timidin, hidroksiüre veya aphidikolin gibi kimyasallar ve mitozda ise kolşisin ve nocodazole gibi mikrotübül zehirleri ile sağlanır (45).

2.5.1. Hücre Senkronizasyon Tartışmaları

Kültürdeki hücrelerin hepsinin aynı şekilde işlem görerek hücre döngüsünün aynı fazında bir dizi hücre oluşturulması tüm kültür senkronizasyonu olarak adlandırılır. Hücre döngüsünün belirli bir fazında tutuklanan hücrelerin normal döngüye devam etmeleri sağlandığında, senkron şekilde büyüdükleri varsayılır. Bu konuda çalışan araştırmacılar gerçek anlamda bir senkronizasyonun sağlanıp sağlanamayacağı konusunda ikiye ayrılmışlardır. Tüm kültür senkronizasyonunun, hücre büyümesinin temel yasası olan hücre-yaş ilişkisinin korunması kanununa aykırı olduğu için yapılamayacağını savunan Stephen Cooper, bu yasa nedeniyle eksponansiyel büyüyen kültürler uygulanacak hiçbir işlemin tam bir senkronizasyon oluşturamayacağını belirtmektedir. Hücre-yaş ilişkisinin korunması kanununa göre; genetik olarak saf, dengelenmiş eksponansiyel büyümeye sahip bakteri (veya ökaryotik hücre) kültürü için hücre-yaş düzenini değiştirebilecek herhangi bir seri muamele bulunmamaktadır (46). Tüm kültür senkronizasyonunun hücrelerin yaş farkından ötürü yapılamayacağını savunan Cooper, hücrelerin seçim yöntemi ile senkronize edilebileceklerini belirtmektedir. Bebek makinesi “baby machine” adı verilen yöntemde, membrana bağlı hücreler gelişimlerine devam ederken yeni oluşan hücrelerin membrandan salınımına izin verilir. Böylece yeni oluşmuş hücrelerin yaşlarının aynı olduğu kabul edilerek hücreler senkronizasyon işlemine maruz bırakılabilirler (47 - 48).

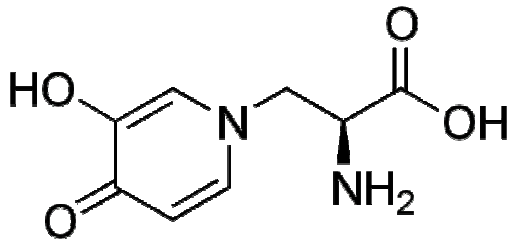
Hücre yaşı ve hücre döngüsünün ilişkilerinin bulunmadığını savunan P.T.Spellman ve G.Sherlock ise tüm kültür senkronizasyonunun yapılabileceğini gösteren deneysel desteklerin bulunduğunu ve bu nedenle tüm kültür senkronizasyonunun yapılabileceğini savunan araştırmacılarıdır (49).

Her iki görüşünde belirli noktalarını savunan Shi V. Liu ise tüm kültür senkronizasyonunun doğru içerik ve uygun veriler ile yapılabileceğini savunurken, hücre döngüsü ve hücre yaşının bağlantılı olduklarını ve Cooper’ın bebek makinesinin her hücre için uygun bir yöntem olmadığını belirtmektedir (1).

2.5.2. Hücre Senkronizasyon Yöntemleri

2.5.2.1. Mimosin ile Hücreleri G₁ Fazında Tutuklama

Aphidikolin, hidroksiüre veya aşırı timidin gibi yaygın şekilde kullanılan DNA eşleme inhibitörlerinin hepsi DNA eşlemesinin uzama evresini bloke ederken başlangıç evresinin meydana gelişine izin vererek, hücreleri S fazında tutuklarlar (50). *Mimosa* ve *Leucaena* bitkilerinden elde edilen ve DNA sentezinin tersinir inhibitörü olan mimosin ise (Şekil 2-7), hücre döngüsü sürecini G₁/S geçişine yakın bir yerde, geç G₁ fazında inhibe eder (51-53). DNA sentezinin tersine çevrilebilir inhibitörü olan mimosinin DNA sentezinin hem başlangıç hem de uzama evrelerini etkileyen genel bir antimitotik aktivitesi bulunmaktadır (54-56). Mimosinin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da, demir bağlama aktivitesinin onun hareket mekanizmalarından biri olduğu düşünülmektedir. Mimosin, demir iyonları ile kompleksler oluşturarak ribonükleotid redüktaz ile indirekt olarak etkileşime girer dolayısıyla hücresel dNTP derişimlerdeki azalma ile DNA sentezini bloke eder (57-59). Ayrıca mimosinin mitokondri, SV40 minikromozomları ve hücre çekirdeğindeki DNA eşlemesini de inhibe ettiği bilinmektedir (60).

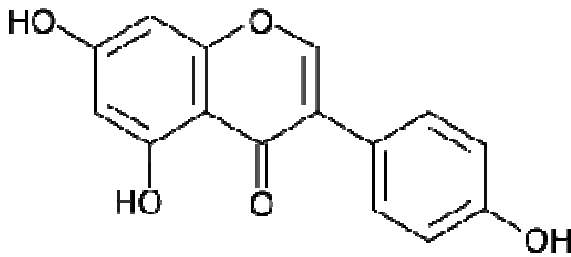


Şekil 2-7. L-Mimosinin kimyasal yapısı.

2.5.2.2. Genistein ile Hücreleri G₂/M Fazında Tutuklama

Leguminosae ailesinin bir üyesi olan genisteinin (4,5,7-trihidroksisoflavone) (Şekil 2-8), kansere ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olduğu ve fitoestrogen aktivitesinin bulunduğu bilinmektedir (61). Genistein, östrojenik ve anti-östrojenik aktivitelerini doza bağlı olarak gerçekleştirmektedir (62). Östrojenik etkilerini, hücre çoğalması, anti-oksidatif faaliyetlerin artması ve düşük dozlarda apoptozun azalması şeklinde gösterirken (63, 64), anti-östrojenik etkilerini de yüksek dozlarda göstermektedir. Anti-östrojenik etkileri arasında, hücre çoğalmasındaki

inhibitör etkisi, telomeraz aktivitesi, hücre döngüsü tutuklanmasının indüksiyonu ve normal ve malignant hücrelerde apoptozun indüksiyonu bulunmaktadır (65, 66). Araştırmalar genisteinin lösemi, lenfoma, yumurtalık, servikal, leyomiyoma, melanom, nöroblastom, gastrik, pankreatik, göğüs ve prostat gibi çeşitli kanser hücrelerindeki büyümeyi engellediğini göstermiştir (67-70). Genisteinin göğüs kanseri, gastrik adenokarsinoma ve melanom hücrelerini, hücre döngüsünün G₂/M fazında tutukladığı bildirilmiştir (71).



Şekil 2-8. L-Genisteinin kimyasal yapısı

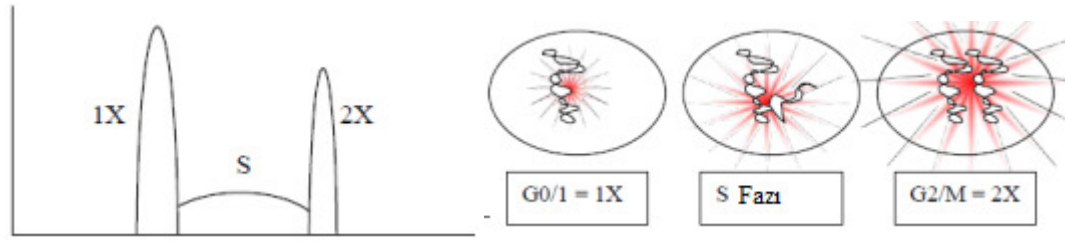
2.6. Hücre Döngüsü Analizi

2.6.1. Hücresel DNA İçeriğinin Akım Sitometrik Analizi

DNA, sitometrinin laboratuvar uygulamalarında kullanılmaya başlamasından itibaren, en fazla analizi yapılan hücresel bileşendir (72, 73). Hücresel DNA içeriği ve hücre döngüsü analizlerinin akım sitometre cihazı ile yapılabilmesi için ilk olarak geçirgenliği arttırılmış hücrelere veya çekirdek süspansiyonuna DNA'ya sitokiyometrik olarak bağlanan floresan boya eklenir. Buradaki temel prensip boyanmış materyalin DNA içeriği ile orantılı bir değerde bulunmasıdır. Boyanmış materyal akım sitometri cihazında ölçülür ve yayılan floresan sinyali, hücreden yayılan toplam floresana orantılı olarak belirli yükseklikte (amplitüt) bir elektronik atım verir. Bu floresan veri, hücresel DNA içeriğinin ölçümü olarak kabul edilmektedir. Akım sitometre cihazında tek ve çift hücre ayırımının elde edilebilmesi için örneklerin saniyede 1000 hücreden az olacak şekilde analiz edilmesi gerekmektedir. Elde edilen veriler, hücresel DNA içeriğinin açık bir ölçümü olmadığından normal diploid DNA içeriğine sahip hücrelerin yerlerini belirlemek üzere çeşitli DNA içeriğine sahip referans hücreleri akım sitometri

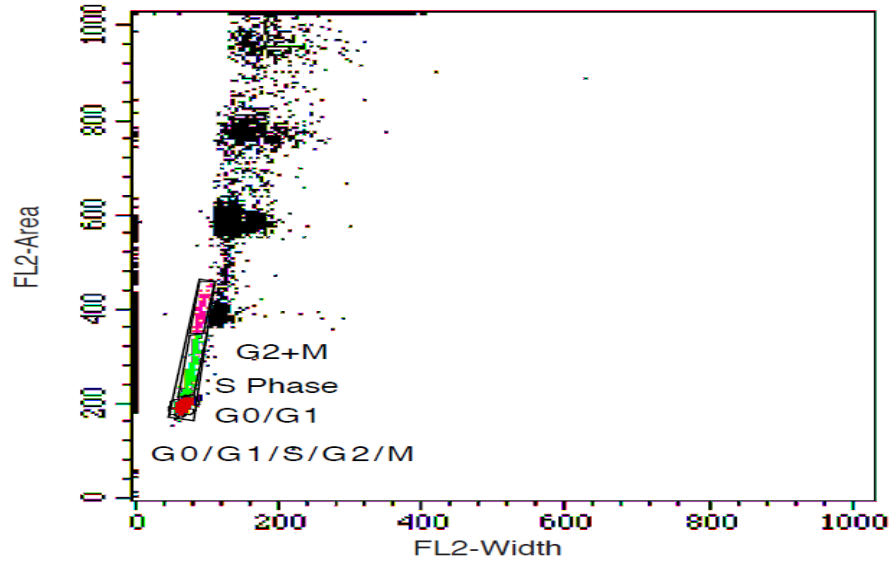
cihazından geçirilmelidir. DNA ölçümleri için yaygın olarak kullanılan referans hücrelerinden bazıları; insan lökositleri veya tavuk ve alabalıktan elde edilmiş kırmızı kan hücreleridir (74).

Sitometri tarafından ölçülen DNA içeriği “DNA indeksi” (DI) veya “DNA kromozom sayısı” olarak tanımlanmaktadır. G_0/G_1 fazındaki normal (öplid) hücreler için $DI = 1,0$ ’dir. G_2/M fazındaki hücrelerin $DI = 2,0$ ve S fazındaki hücrelerin DI ise $1,0 < DI < 2,0$ ’dir (Şekil 2-9). Benzer içeriğe sahip hücre popülasyonlarının DNA içeriğinin ortalama değerinin varyasyon katsayısı (CV), akım sitometri cihazı tarafından yapılan DNA içerik analizlerinin hassaslık belirteci olarak kabul edilmektedir (75).



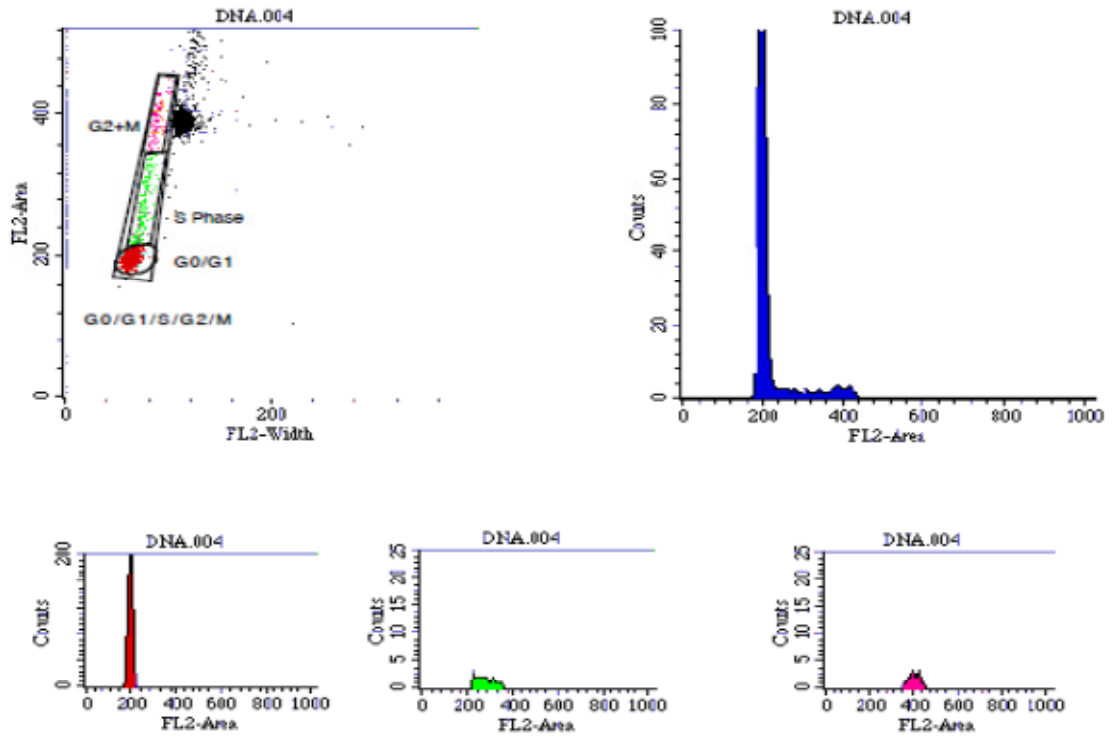
Şekil 2-9. Akım sitometri ile belirlenen DNA içeriği.

Hücresel DNA içeriğinin belirlenmesinin yanı sıra akım sitometri cihazı, hücre döngüsünün farklı fazlarındaki hücre dağılımını da belirlemektedir. Çoğalan hücre popülasyonlarında dört belirgin hücre fazı görülmektedir: G_1 , S (DNA sentez fazı), G_2 ve M fazı (mitoz), ancak G_2 ve M fazlarının ayrımı, aynı DNA içeriğine sahip olmalarından ötürü, DNA içeriklerindeki farklılıklar esas alınarak yapılamamaktadır (Şekil 2-10, 2-11).



Şekil 2-10. DNA içeriği ve ikili ayrımı için FL2W/FL2A' nın noktasal grafiği.

G₀/G₁/S/G₂/M popülasyonu kapılanmıştır.

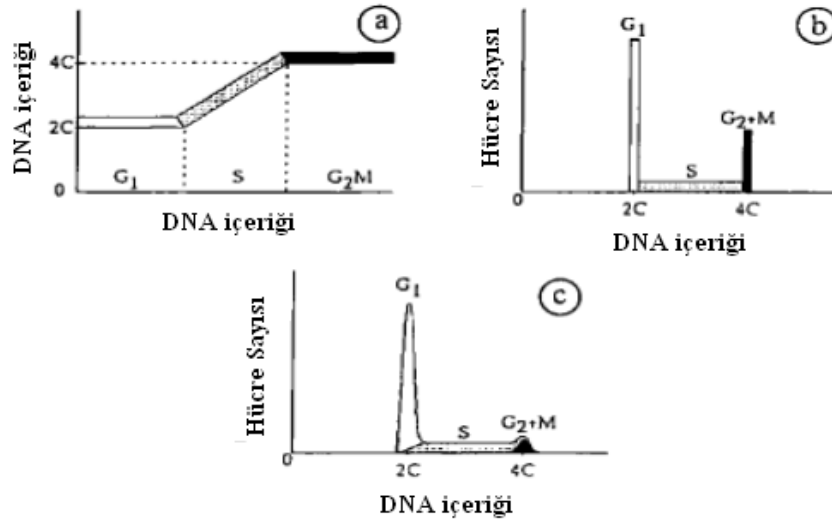


Şekil 2-11. DNA ve hücre döngüsü analizi.

Üst sol panel FL2W/FL2A' nın nokta grafik görüntüsünü göstermektedir. G₀/G₁/S/G₂/M popülasyonu kapılanmıştır. Üst sağ panel kapılanmış G₀/G₁/S/G₂/M hücrelerinin histogramını göstermektedir: G₀/G₁, S (DNA sentez fazı), G₂ ve M fazları (mitoz).

2.6.2. İkili Hücreler veya Hücresel Agregatların Ayırımı

DNA analizleri sırasında hücre süspansiyonu içinde ikili hücrelerin veya hücre agregatlarının bulunması sorun teşkil etmektedir. İkili hücreler, G_1 fazındaki iki hücrenin DNA içeriğinin akım sitometri cihazı tarafından G_2/M fazındaki bir hücrenin DNA içeriğine sahipmiş gibi kaydedilmesine neden olur. Bu hatanın düzeltilmesi için akım sitometri cihazlarında tek hücreleri seçen ikili ayırım “double discrimination” modülü bulunmaktadır. DNA boyasından yayılan floresan ışık (FL2) boyamanın yoğunluğuna göre yüksek sayılabilecek (FL2H) elektronik bir sinyal oluşturmakta ve örneklerin sinyal-alanı (FL2A) ve sinyal-genişliği (FL2W) şeklinde ölçülebilmektedir. G_1 çiftli hücreleri ve G_2/M tek hücreleri aynı FL2A sinyali üretirler. FL2W çiftli partikülün çapına göre artar ve böylece çiftli hücrelerin teklilerden ayırımı kolaylıkla yapılabilmektedir. Nokta-çizim grafiğinde tek bir popülasyon kapılanır. Kapılanmış popülasyonun histogram grafiği, çoğalan bir hücre popülasyonunda ayırt edilebilen dört farklı fazı göstermektedir: G_0/G_1 , S (DNA sentez fazı), G_2 ve M fazı (mitoz) (Şekil 2-12) (76).



Şekil 2-12. Asenkron popülasyon için hücre döngüsündeki DNA içeriği ve hücre pozisyonu arasındaki ilişkinin şematik olarak gösterimi.

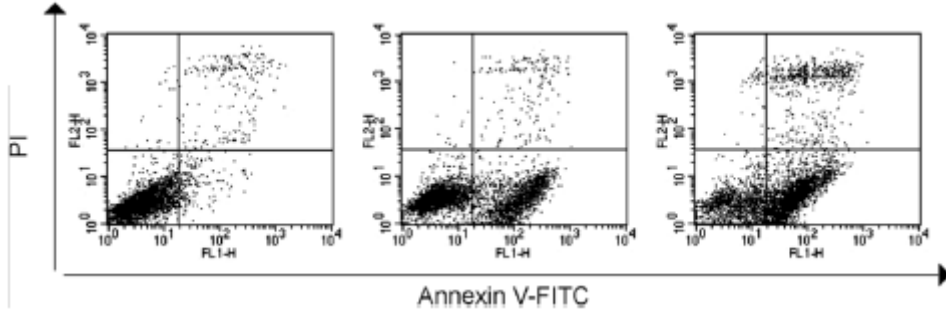
a. Hücre DNA içeriğine göre teorik dağılım histogramı b. Sitometrik analizlerden sonra elde edilmiş dağılım histogramı. c. Sitometrik analizlerden sonra elde edilmiş hücre fazı dağılım histogramı.

2.7. Anneksin V ve Propidium İodid ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi

Anneksin V, yapı ve işleyişte benzer özellikleri paylaşan, fosfolipid-bağlayan anneksin ailesine aittir. Anneksin ailesinin bilinen 12 üyesinden her biri geri dönüşümlü ve Ca^{2+} -bağımlı olarak fosfolipidleri bağlayabilme özelliğine sahiptir. Anneksinler membran fosfolipidleri ile de etkileşimde bulunabildiklerinden, Ca^{2+} düzenlenmiş ekzositoz, endositoz, mitogenik sinyal transdüksiyonu, farklılaşma ve koagülasyon gibi birçok fizyolojik süreçte önemli rol üstlenmişlerdir (77, 78).

Anneksin V en etkili biçimde negatif yüklü fosfolipidlere, fosfatidilserine (PS) bağlanır. PS, plazma membranının iç kesiminde bulunur ancak intraselüler Ca^{2+} artması, hücre hasarı veya apoptoz-indükleyici ajanlara yanıt olarak hızlı bir biçimde plazma membranının dış kesiminde konumlanır (79-81). PS dış konumlanması apoptozun erken olgularından biridir ve plazma membran bütünlüğü bozulmadan gerçekleşir (82). PS, fosfolipit içeren makrofajlar ve lipozomlar tarafından apoptotik hücrelerin tanınmasında tetikleyici bir unsur olarak görev yapar ve apoptotik hücrelerin fagositoz ile yutulmasını sağlar (83). Böylece apoptoz boyunca PS'in membran dışına konumlanması, apoptotik hücrelerin temizlenmesini destekler ve membran bozunumuna, sitoplazmik içeriğin salınımına ve daha ileri hücre hasarına engel olur.

Anneksin V bağlama deneyi, apoptozu akım sitometri veya floresan mikroskobu ile belirlemede kullanılan kesin, hızlı ve güvenilir bir tekniktir. Anneksin V/Propidium İodid (PI) boyalı hücrelerin flow sitometride analizi, anneksin V ve PI negatif (çift negatif), anneksin V pozitif ve PI negatif (tek pozitif) veya anneksin V ve PI pozitif (çift pozitif) kesimlenmiş hücrelerin tayinini sağlar. Örnekler tek parametrelili histogramda veya çift parametrelili noktasal grafikte analiz edilebilir (Şekil 2-13). Apoptozun erken evrelerindeki hücreler, noktasal grafiğin alt sağ köşesinde tek pozitif anneksin V-bağlı hücreler olarak konumlanır ve bu evrede hücre membranları hala bütünlüklerini korudukları için PI hücre içerisine nüfuz edememektedir. Apoptozun sonraki evrelerinde, PI hücre içerisine girerek çift pozitif popülasyonu oluşturmaktadır. Nekrotik hücre ölümüne giden hücreler de ayrıca anneksin V ve PI ile çift boyanmaktadır.



Şekil 2-13. Canlı / apoptotik hücrelerin Anneksin V/ PI boyamasının noktasal grafiği.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kimyasal maddeler

Aprotinin (Sigma)

CAPS (Merck)

DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12) (Gibco)

EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) (Sigma)

FBS (Fetal sığır serumu) (Gibco)

Genistein (Sigma-Aldrich)

Mimozin (Sigma-Aldrich)

NP 40 (Merck)

Penicillin – streptomycin solution (Gibco)

Rhodamin 123 (Santa-Cruz)

Tripan Mavisi (Gibco)

Triton X-100 (Merck)

Tris, metanol, etanol, alkol, HCl, NaCl, KCl, NaHCO₃ ve diğer tüm kimyasal malzemeler Sigma ve Merck firmasından sağlandı.

3.1.2. Kitler

ApopNexin FITC Apoptoz Belirleme Kiti (Millipore)

Cycle Test Plus DNA Reagent kit (Becton Dickinson)

DNA QC Particles (Becton Dickinson)

3.1.3. Cihazlar

Buz Makinası (Hoshizaki)

Derin Dondurucu (-80°C) (NUAIRE)

Distile Su Cihazı (GFL)

Etüv (Sanyo)

FACS Flow Cihazı (Becton Dickinson)

Laminar Hava Akım Cihazı ELB 2472 (Heraus)

Manyetik Çalkalayıcı (BioSan)

Otoklav (HIRAYAMA)

pH metre (Hanna)

Santrifüj (Hettich)

Sıvı Azot Tankı (34 XT Taylor-Wharton)

Ters Mikroskop (Olympus)

Vorteks (Biosan)

3.1.4. Çalışmada kullanılan eriyikler

3.1.4.1. Floresan Boyama İçin Kullanılan Eriyikler

PBS (Tuz İçeren Yıkama Eriyiği)

1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

0,2 g/l KH_2HPO_4

8,0 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

800 ml dH_2O ile çözülerek pH HCl ile 7,4 olacak şekilde ayarlanarak son hacim 1 lt'ye tamamlanır.

Hücre Lizis Eriyiği

150 mM NaCl

5 mM EDTA

50 mM Tris-HCl (pH: 8.0)

% 1 NP 40

% 1 CAPS

% 2 Triton X-100

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1.1. Hücrelerin Çoğaltılması

Çalışmada kullanılan, K562 (İnsan Eritrolösemi Hücresi) hücreleri standart kültür koşullarında, % 10 FBS ve % 1 antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren DMEM F-12 içerisinde kültür şişelerine (flask) ekilerek 37°C’de % 5 CO₂’li inkübatörde çoğaltıldı. Ters mikroskopta 2-3 günde bir kontrol edilen hücreler semikonfluent duruma geldiğinde hücre kazıyıcısı ile yüzeyden kaldırılarak 15 ml’lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. 3000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüjlendikten sonra üst sıvı atıldı ve pelet 1-2 ml taze CDMEM’de çözüldü. Hücreler her yeni pasajda 1-2 x 10⁵ hücre/ml olacak şekilde taze CDMEM içeren kültür şişelerine eklendi ve çoğalmaya bırakıldı. Bu şekilde 2-3 günde bir kontrol edilen hücrelerin, belirli aralıklarla yeni pasajları yapıldı.

3.2.1.2. Hücrelerin Dondurulması

Hücre kazıyıcısı ile kültür şişesi yüzeyinden kazınan hücreler, 15 ml’lik santrifüj tüplerinde 3000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvıları atıldı. Tüp içerisindeki hücre sayısı 5 x 10⁶ olacak şekilde ayarlandı. 1/9 oranında DMSO/FBS içinde soğuğa dayanıklı kriotüplere alınan hücreler 24 saat -80°C’de bekletildikten sonra sıvı azot tankına (-196 °C) aktarıldı.

3.2.1.3. Hücre Sayısı ve Canlılığın Belirlenmesi

Kültürde çoğalan hücreler hücre kazıyıcısı ile yüzeyden kazınarak toplandı ve 15 ml’lik santrifüj tüplerine alındı. 3000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüjlendi ve üst sıvısı atıldı. Pelet C(Complete)-DMEM’de hücre süspansiyonu haline getirildi ve buradan alınan hücreler 1/1 oranında % 4’lük tripan mavisi ile karıştırılarak 5 dakika bekletildi. Sayım işlemi hemositometre ile yapıldı. Boyanmayan hücreler canlı, boyalı hücreler ise ölü olarak kabul edildi.

$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \text{Canlı Hücre Sayısı (x100)} / \text{Toplam Hücre Sayısı}$

3.2.2. Senkronize Hücrelerin Hazırlanması

3.2.2.1. Mimosinin Hücreleri G₁ Fazında Senkronize Edici Derişim ve Süresinin Belirlenmesi

Mimosinin, K562 hücrelerini G₁ fazında senkronize ettiği derişimin belirlenebilmesi için, 6 kuyulu kültür kabına kuyu başına 1 x 10⁶/ml olacak şekilde hücre ekildi. 37°C, % 5 CO₂'li inkübatörde 24 saat bırakılan hücelere 100, 250 ve 500 µM mimosin verildi. 24 saat sonra farklı derişimlerde mimosin ile işlem gören hücreler, yıkama işlemi için FACS tüplerine alınarak 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvıları uzaklaştırıldı ve üzerlerine "Cycle Test Plus DNA Reagent" kit içerisinde bulunan tampon çözeltisinden 1 ml eklendi. Düşük devirde karıştırıcıda hücre süspansiyonu haline getirildi. 3000 devir/dakika'da 5 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra tampon içerisinde 1 x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Tekrar oda sıcaklığında 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edilen örneklerin üst sıvıları atıldı ve üzerlerine "Cycle Test Plus DNA Reagent" kit içerisinde bulunan çözelti A'dan (tripsin tamponu) 250 µl eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 200 µl çözelti B'den (tripsin inhibitörü ve RNaz tamponu) eklenerek karıştırıldı ve 10 dakika daha oda sıcaklığında bekletildi. Boyama işlemi için soğuk çözelti C'den (propidium iodid boyama çözeltisi) 200 µl her bir tüpe eklenerek karanlıkta 10 dakika bekletildi. İnkübasyon süresi bitiminde örnekler akım sitometri cihazından geçirildi ve ModFit programı kullanılarak DNA analizleri yapıldı. Yıkama işlemleri bitiminde hücreler dondurularak saklanabildiğinden, boyama yapılmadan önce aynı hücrelerin bir kısmı -80°C'de dondurularak saklandı. Dondurulmayan hücrelerin analizinden 24 saat sonra çözülerek boyama işleminden geçirilen örnekler akım sitometri cihazından geçirildi ve ModFit programı kullanılarak DNA analizleri yapıldı.

Mimosin ile senkronize edici sürenin belirlenmesi için 6 kuyulu kültür kabının her bir kuyusuna 1 x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde hücre ekildi. 8, 12 ve 16 saat boyunca 200 µM mimosine maruz bırakılan hücreler, kuyulardan toplanarak FACS tüplerine alındı. 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüjlendi ve üst sıvıları atıldı. Pelet üzerine "Cycle Test Plus DNA Reagent" kit içerisinde bulunan tampondan 1 ml eklendi ve düşük devirde karıştırılarak hücre süspansiyonu elde edildi. Bu aşamadan sonraki yıkama ve boyama işlemleri mimosin ile K562 hücrelerini G₁ fazında senkronize edici

derişimin belirlenmesinde açıklandığı şekilde yapıldı. Boyama işlemi bitiminde hücreler akım sitometri cihazından geçirildi ve ModFit programı ile analiz edildi.

3.2.2.2. Mimosinin Etkisinin Geri Dönüşümlü Olup Olmadığının Belirlenmesi

Hücreler mimosin ile işlem gördükten sonra normal CDMEM'e geçirildiklerinde döngüye devam ettiklerinin belirlenebilmesi için, kültür şişelerine 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekildi. 200 μ M mimosin ile 12 ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücre kazıyıcısı ile kültür şişesi yüzeyinden kazınarak toplanan hücreler 50 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüjlendi ve üst sıvıları uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 10 ml CDMEM eklendi ve karıştırılarak hücre süspansiyonu haline getirildi. 3000 devir/dakika'da tekrar 5 dakika santrifüjlendi ve üst sıvıları uzaklaştırıldı. Hücreler 6 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ekildi ve 37°C % 5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu. 12 saat mimosinle muamele görmüş hücreler normal CDMEM'e geçirildikten sonra saat başı, 24 saat mimosinle muamele görmüş hücreler ise normal CDMEM'e geçirildikten sonra 4 saatte bir toplanarak "Cycle Test Plus DNA Reagent" kit protokolündeki yıkama işlemleri uygulandıktan sonra analizleri yapılncaya kadar -80°C'de bekletildi. 3.2.2.1'de anlatılan işlemlerin benzeri analizden önce tekrar edildi. Hücreler akım sitometri cihazından geçirildikten sonra ModFit programı ile analiz edildi.

3.2.2.3. Mimosinin Hücreleri S Fazında Senkronize Edici Süresinin Belirlenmesi

3.2.2.2'de 12 ve 24 saat mimosinle işlem gördükten sonra normal CDMEM'e aktarılan hücrelerin belirli zaman dilimlerinde toplanarak DNA analizlerinin yapılması ile hücre döngüsü fazları arasında geçiş süreleri saptandı. Böylece mimosin ile tutuklandıktan sonra normal CDMEM'e geçirilen hücrelerin S fazına girdikleri süre belirlendi.

3.2.2.4. Genisteinin Hücreleri G₂/M Fazında Senkronize Edici Derişim ve Sürenin Belirlenmesi

K562 hücrelerini genistein ile G₂/M fazında tutuklayabilmek için, 6 kuyulu kültür kabına kuyu başına 1×10^6 /ml olacak şekilde hücre ekildi. 37°C ve % 5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücrelere 25, 50, 100, 120, 150 ve 200 μ M genistein verildi. 24, 48 ve 72 saat boyunca genistein ile inkübe edilen

hücreler inkübasyon süreleri sonunda kuyulardan toplanarak FACS tüplerine alındı. Hücrelerin DNA analiz işlemleri 3.2.2.1’de anlatıldığı şekilde yapıldı. G₂/M fazında tutuklayan genistein derişim ve süreleri belirlendikten sonra, bu şartların hücrelerde oksidatif stres oluşturup oluşturmadığı $\Delta\Psi_m$ değışimler ölçülerek belirlendi. $\Delta\Psi_m$ belirlenmesi 3.2.5’te açıklandığı şekilde yapıldı.

3.2.3. DNA Analizi İçin Akım Sitometri Cihazı Kalibrasyonunda Kullanılacak Hücrelerin Hazırlanması

“DNA QC Particles” kiti içerisindeki CEN “chicken erythrocyte nucleus” (tavuk eritrosit çekirdekleri) tüpü hafifçe karıştırıldı. 1 ml PI içerisine 40 μ l CEN eklendi ve tekrar karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. CTN “calf thymocyte nucleus” (buzağı timosit çekirdekleri) için de aynı işlemler uygulandı. QC boncuklarının hazırlanması için, 1 ml PBS içerisine bir damla QC boncuklarından damlatıldı. Üç örnekte akım sitometri cihazında okutulup kalibrasyon ayarları yapıldı.

3.2.4. K562 Hücrelerinin H₂O₂ İle Muamele Edilmesi

Mimozin veya genistein ile senkron edilmiş hücreler, oksidatif stres çalışmaları için 6 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 25×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekildi. Kontrol hücreleri dışındaki kuyulara 100, 250, 500, 750 ve 1000 μ M derişimlerde H₂O₂ verildi. 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C % 5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. Senkronize edilmeyen K562 hücrelerine de H₂O₂ ile yukarıda belirtilen süre ve derişimlerde işlemler uygulandı.

3.2.5. Mitokondri Membran Potansiyelinin Belirlenmesi

Senkron edildikten sonra oksidatif strese maruz bırakılmış hücrelerin mitokondri membran potansiyellerinin belirlenebilmesi için, inkübasyon süreleri sonunda hücreler kuyulardan toplanarak FACS tüplerine alındı. 3000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüj edilen hücrelerin üst sıvıları uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 2 ml serumsuz DMEM eklendi ve tüpler karıştırıldı. Kontrol hariç diğer tüplere, 1 μ l/ml rhodamin 123 eklendi ve tüpler karıştırıldı. 15 dakika boyunca karanlıkta 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 3000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıları uzaklaştırıldı ve her tüpe 2,5 ml PBS eklendi. 3000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıları uzaklaştırıldı, her tüp üzerine 500 μ l PBS eklendi. Örnekler akım sitometri cihazından geçirildi ve analizleri yapıldı.

3.2.6. Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Belirlenmesi

3.2.6.1. Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Belirlenmesinde Kullanılan Kalibrasyon İşlemleri

Örneklerin analiz edilmesinden önce akım sitometri cihazının kalibrasyonu için canlı, yalnız anneksin V ile boyanmış, yalnız PI ile boyanmış hücreler hazırlandı. Sürekli kültürü devam ettirilen hücre kültür şişesinden alınan canlı hücrelere herhangi bir boyama işlemi yapılmadan sadece yıkama işlemleri uygulandı ve analiz edildi. Yalnız anneksin V ile boyanmış hücreleri elde etmek için, hücreler H_2O_2 ile muamele edilerek apoptoza uğratıldı. Yıkama işlemlerinden sonra bu hücreler, “ApopNexin FITCH” ile boyanarak analiz edildi. Yalnız PI ile boyanmış hücreler elde etmek için canlı hücreler 3000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüj edildi. Pelet, lizis tamponunda çözüldü ve 30 dakika buzda bekletildi. Buzdan alınan hücreler insülin enjektörü ile 10 kez çek-bırak yapılarak patlatıldı ve nekroza uğratıldı. Nekrotik hücreler yıkama işlemlerinden geçirilip PI ile boyanarak analiz edildi.

3.2.6.2. Asenkron Hücrelerde Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi, “ApopNexin FITCH Apoptosis Detection” kiti kullanılarak yapıldı. Hücre kazıyıcısı ile stok hücre kültür şişesinden kazınan hücreler, 50 ml’lik falkon tüpe alındı. 3000 devir/dakika’da 5 dakika santrifüjlendi ve üst sıvısı uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 10 ml CDMEM eklenerek hücre süspansiyonu hazırlandı ve hücreler sayıldı. Daha sonra 6 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 3×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekilen hücreler 24 saat $37^\circ C$ ’de % 5 CO_2 ’li ortamda bekletildi. Bu sürenin sonunda hücrelere 100, 500 ve 1000 μM H_2O_2 verildi ve 48 saat inkübatörde bekletildi. İnkübasyon süresi bitiminde kuyulardan toplanan hücreler FACS tüplerine alındı. Hücreler 3000 devir/dakika’da $+4^\circ C$ ’de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvıları uzaklaştırıldı ve 4 ml soğuk PBS ’de hücre süspansiyonu haline getirildi. Tekrar 3000 devir/dakika’da $+4^\circ C$ ’de 5 dakika santrifüjlendi. Yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi ve üst sıvıları uzaklaştırıldı. Pelet halindeki hücreler “ApopNexin FITCH Apoptosis Detection” kiti içeriğinde bulunan bağlama tamponunda 10^6 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirildi. Her bir tüpteki hücre süspansiyonundan 200 μl alınarak yeni tüplere aktarıldı. Yeni tüplerdeki hücre süspansiyonunun üzerine kit içerisinde bulunan ve anneksin konjugatı olan ApopNexin FITCH’den 3 μl eklendi. Anneksin konjugatı ile işaretlenmiş hücrelerin üzerine 2 ml PI

eklendi. Hafifçe karıştırılıp 15 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda akım sitometri cihazında ölçümler yapıldı.

3.2.6.3. Senkron Hücrelerde Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

Hücre kazıyıcısı ile sürekli kültürü devam ettirilen hücre kültür şişesinden kazınan hücreler, 50 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüjlendi ve üst sıvısı uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 10 ml CDMEM eklenerek hücre süspansiyonu hazırlandı ve hücreler sayıldı. Kültür şişesine 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekilen hücreler 24 saat boyunca 37°C 'de % 5 CO_2 'li ortamda bekletildi. 24 saat sonra hücreleri G_1 fazında tutuklamak için kültür ortamına 200 μM mimosin eklendi ve hücreler mimosin ile 8 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin bitiminde hücreler, hücre kazıyıcısı ile kültür şişesinden toplandı ve 50 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildi. Pelet 10 ml CDMEM ile çözüldükten sonra hücreler 6 kuyulu kültür kaplarına 3×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekildi. 100, 500 ve 1000 μM H_2O_2 verilen hücreler 48 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında uygulanan yıkama ve boyama işlemleri asenkron hücrelere uygulandığı şekildedir. S fazında tutuklama işlemi mimosinle 3.2.2.3'te ve G_2/M fazında tutuklama işlemi genistein ile 3.2.2.4'te açıklandığı şekilde yapıldı.

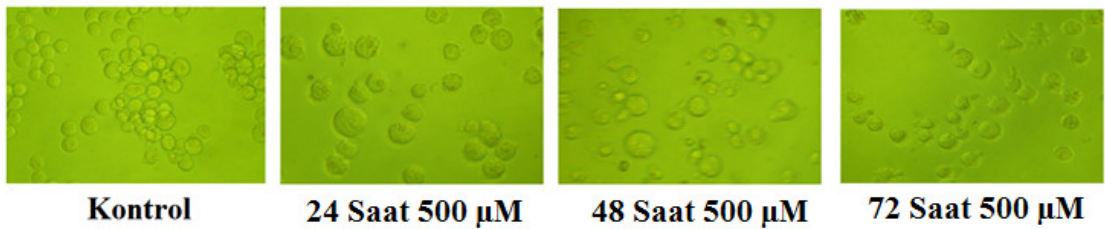
4. BULGULAR

4.1. Oksidatif Stresin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

24, 48 ve 72 saat farklı derişimlerde (100, 250, 500, 750 ve 1000 μM) H_2O_2 ile işlem görmüş asenkron hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi 3.2.1.3'te açıklandığı şekilde yapıldı. Hücre canlılığının, H_2O_2 derişimine ve uygulama süresine bağlı olarak azaldığı belirlendi (Tablo 4-1). Işık mikroskopunda yapılan gözlemlerde, hücrelerin morfolojik yapılarının artan H_2O_2 derişimlerinde değiştiği gözlemlendi (Şekil 4-1).

Tablo 4-1. Farklı derişim ve sürelerde asenkron hücrelerdeki hücre canlılık oranları.

$\text{H}_2\text{O}_2(\mu\text{M})$ Süre(Saat)	Kontrol (0)	100	250	500	750	1000
24	% 99,0	% 98,0	% 98,0	% 90,0	% 64,0	% 23,0
48	% 98,0	% 98,0	% 82,0	% 61,0	% 35,0	% 13,0
72	% 98,0	% 94,0	% 60,0	% 52,0	% 22,0	% 8,0

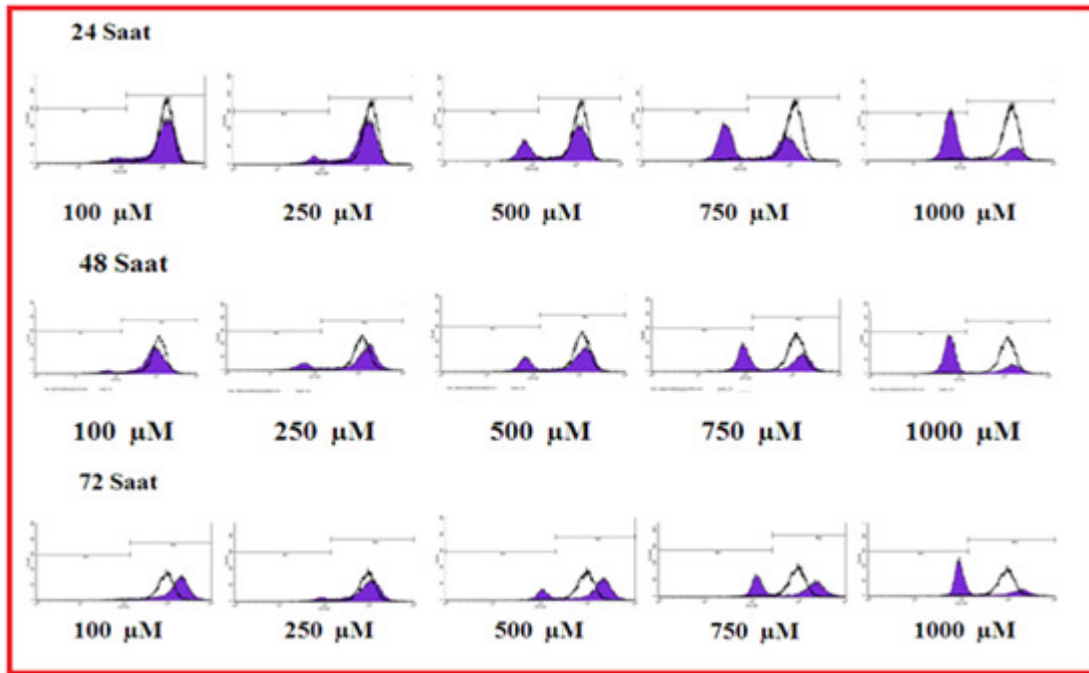


Şekil 4-1. Farklı süre ve derişimlerde H_2O_2 ile işlem görmüş asenkron hücrelerin ışık mikroskobu görüntüsü.

Görüntüler 40 x büyütmede çekilmiştir.

4.2. Oksidatif Stresin Asenkron Hücrelerin Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi

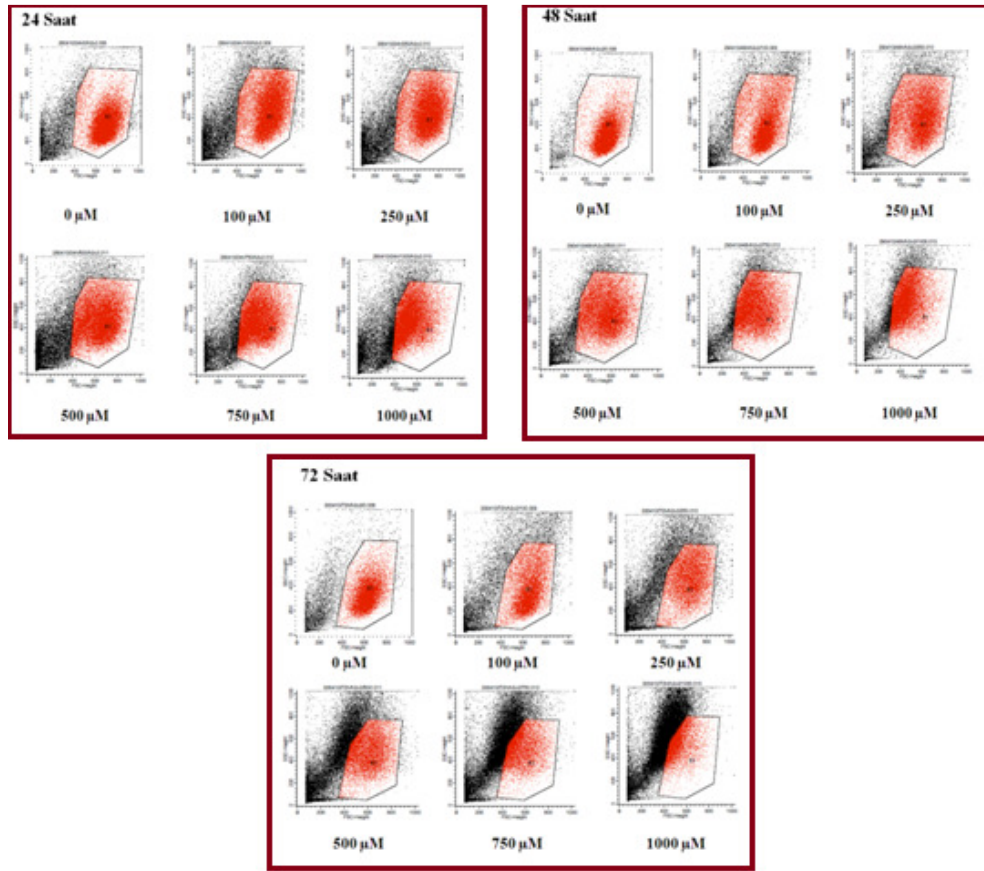
Asenkron hücreler 24, 48 ve 72 saat süreyle 100, 250, 500, 750 ve 1000 μM H_2O_2 ile inkübe edildikten sonra $\Delta\Psi\text{m}$ 'de oluşan değişiklikler, rhodamin 123 kullanılarak belirlendi. Lipofilik katyonik bir boya olan ve membrandan geçebilen rhodamin 123 canlı hücrelerde en negatif yüklü (-170 mV) membrana sahip mitokondride birikir. $\Delta\Psi\text{m}$ depolarizasyonu boyanın mitokondride tutulumu azalır ve bunun sonucu, analizlere ölçülen floresan yoğunluğunun azalması şeklinde yansır. Bu tez çalışmasında H_2O_2 ile işlem gören hücrelerde $\Delta\Psi\text{m}$ 'de oluşan değişiklikler, kontrol hücre grubu ile karşılaştırılarak nispi olarak değerlendirildi. Tüm inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) H_2O_2 ile inkübe edilen hücrelerde, $\Delta\Psi\text{m}$ depolarize olmakta ve depolarizasyondaki artış H_2O_2 derişiminin artışıyla orantılı olarak meydana gelmektedir (Şekil 4-2). Bu bulgu H_2O_2 'nin oluşturduğu oksidatif stresin K562 hücrelerini apoptotik sürece sürüklediği şeklinde yorumlandı.



Şekil 4-2. Oksidatif strese maruz kalmış asenkron hücrelerin histogram grafiği.

24, 48 ve 72 saat boyunca 100, 250, 500, 750 ve 1000 μM H_2O_2 'ye maruz bırakılmış asenkron hücrelerdeki $\Delta\Psi\text{m}$ 'deki değişimler. Siyah çizgi; kontrol hücreleri, mor dolgu; farklı derişimlerde H_2O_2 ile işlem görmüş hücreler.

Aynı deneyin sonuçları ayrıca hücrelerin büyüklük ve granülitesinin belirlenmesi amacıyla da değerlendirildi. “Forward Scatter” (FSC) (Hücre büyüklüğü) / “Side Scatter” (SSC) (Hücre granülitesi) analizlerinde H_2O_2 ile işlem görmüş hücreler, kontrolle kıyaslandığında granülitesinin arttığı ve büzüldükleri gözlemlendi (Şekil 4-3).



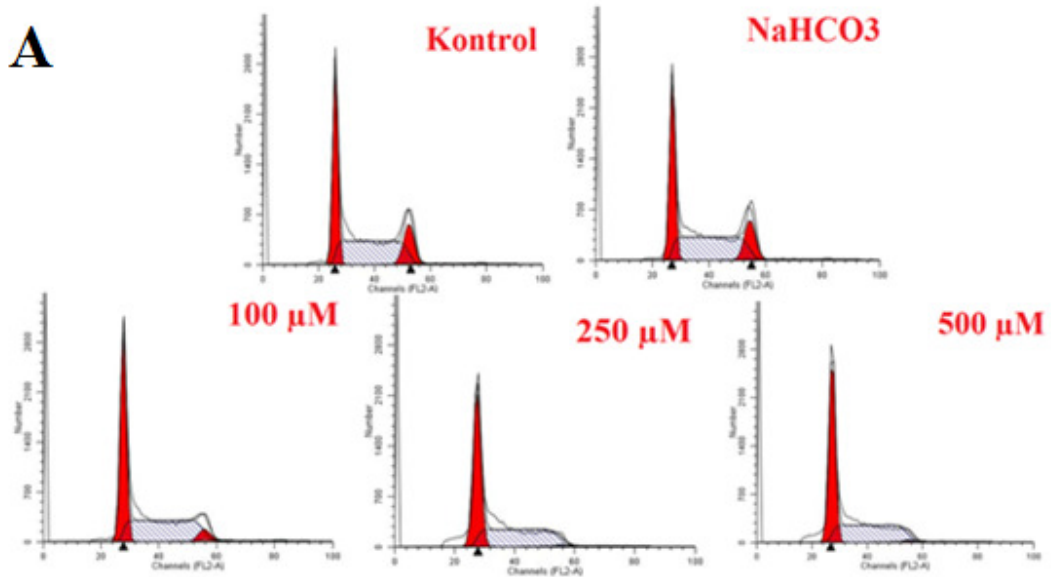
Şekil 4-3. Oksidatif strese maruz bırakılmış asenkron hücrelerin noktasal grafiği.

24, 48 ve 72 saat boyunca 100, 250, 500, 750 ve 1000 μM H_2O_2 'ye maruz bırakılmış hücrelerdeki yapısal değişiklikler.

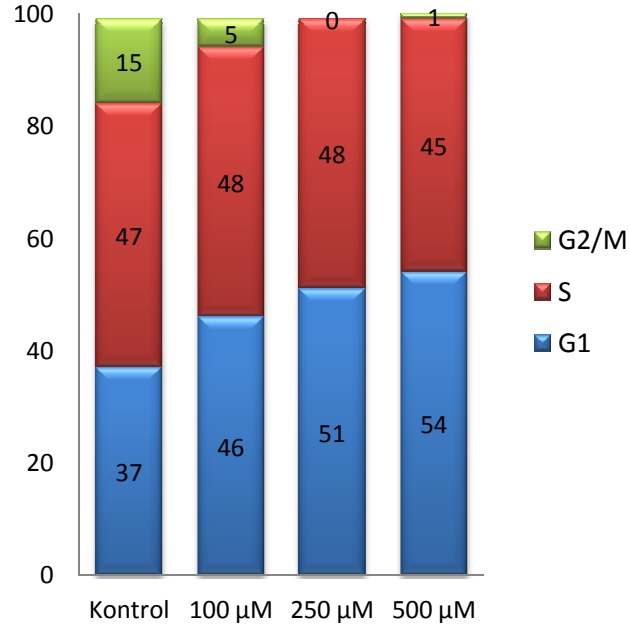
4.3. Mimosinin K562 Hücreleri Üzerine Senkronizasyon Etkisi

24 saat farklı derişimlerde mimosin ile işlem gören hücrelerin DNA analizlerinde, kontrol hücre grubunda G₁ fazındaki hücrelerin oranı % 37,0 iken bu oran 100, 250 ve 500 µM mimosin ile işlem görmüş hücrelerde sırasıyla % 46,0, % 51,0 ve % 54,0 olarak değişmektedir. S fazındaki hücre oranları % 47,0 ± 2 civarında sabit kalırken, G₂/M popülasyonu mimosin derişimindeki artışa bağlı olarak % 1,0'e kadar düşmektedir (Şekil 4-4 A-B). Mimosinin hazırlanmasında kullanılan NaHCO₃'ın tüm hücre fazlarında kontrole kıyasla sadece % 1,0 ± 1'lik bir farklılığa neden olması, bu çözücü ortamın güvenle kullanılabileceği yönünde değerlendirildi (Şekil 4-4 A ve Şekil 4-5).

Ayrıca 3.2.2.2'de açıklandığı şekilde yürütülen dondurulup çözme işleminin de analiz sonuçlarını, hemen çalışılan örneklere göre ancak % 2,0 ±1 oranında değiştirmiştir (Şekil 4-5).

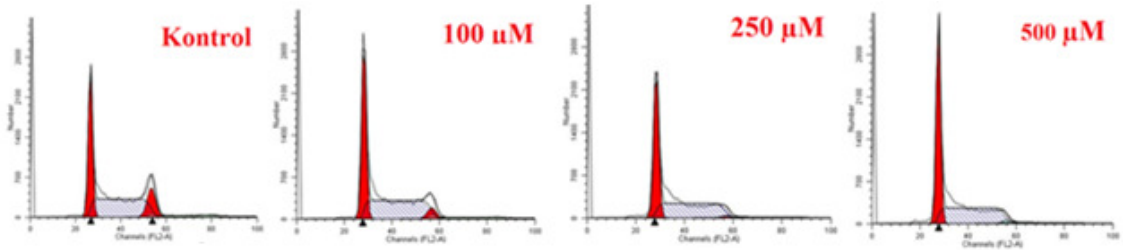


B



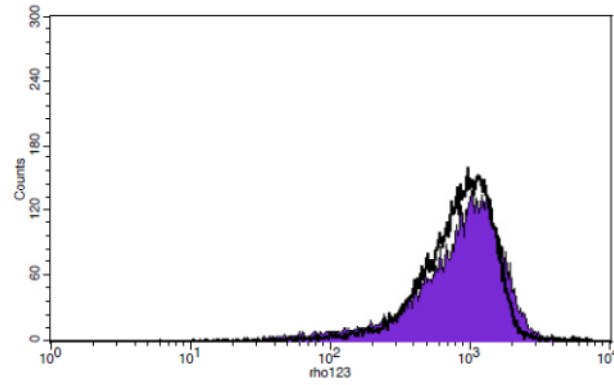
Şekil 4-4. 24 saat farklı derişimlerde mimozin ile muamele görmüş K562 hücrelerinin DNA analizi.

A. 24 saat farklı derişimlerde mimozin ve NaHCO_3 ile işlem görmüş K562 hücrelerinin DNA analiz histogramları. **B.** 24 saat farklı derişimlerde mimozin ile işlem görmüş K562 hücrelerinin DNA analiz sonuç grafikleri.



Şekil 4-5. 24 saat farklı derişimlerde mimozin ile muamele görmüş ve dondurulup çözülmüş K562 hücrelerinin DNA analizi.

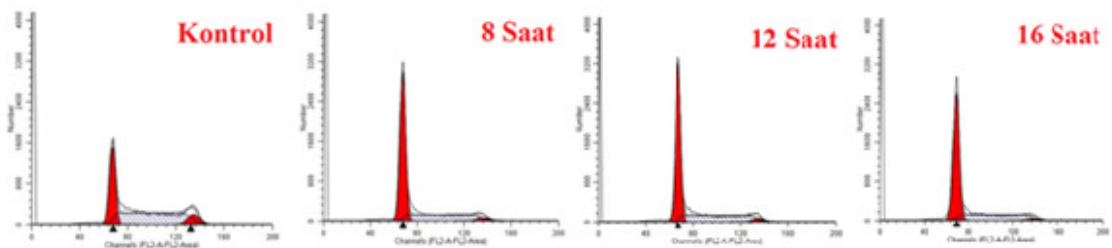
Derişimle ilgili yapılan bu optimizasyon deneylerinden sonra, senkronizasyon için kullanılması öngörülen mimozin derişimi 200 µM olarak seçildi (Şekil 4-6).



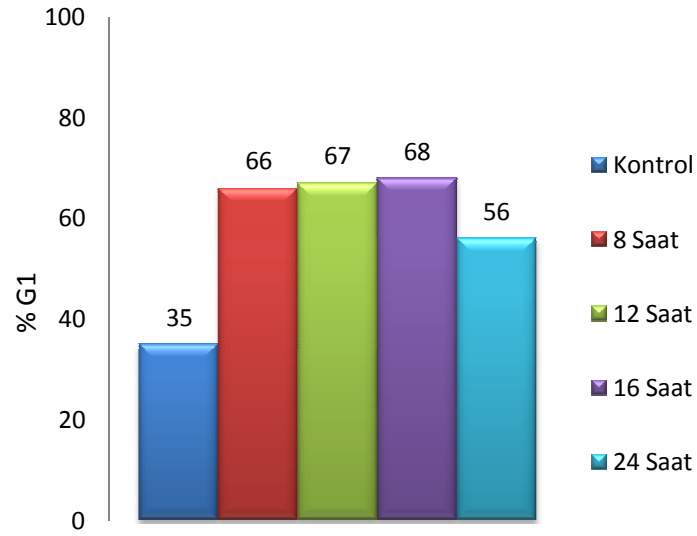
Şekil 4-6. 24 saat 200 μ M mimozin ile muamele görmüş hücrelerin mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi.

Siyah çizgi; kontrol hücreleri, mor dolgu; mimozin ile muamele görmüş hücreler.

Daha sonra mimozinin K562 hücrelerini hücre döngüsünün G_1 fazında tutukladığı sürenin belirlenmesi için hücreler, 6 kuyulu hücre kaplarına kuyu başına 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ekildi. 8, 12 ve 16 saat mimozinle inkübasyona bırakılan hücrelerin ModFit programı kullanılarak yürütülen DNA analiz sonuçları ile G_1 fazındaki hücre oranlarının aynı (% 67,0) olduğu belirlendi (Şekil 4-7, Şekil 4-8). Bu nedenle senkronizasyon süresi keyfi olarak belirlendi ve deneyin kısa sürede bitirilmesi de göz önünde bulundurularak en uygun süre 8 saat olarak seçildi.



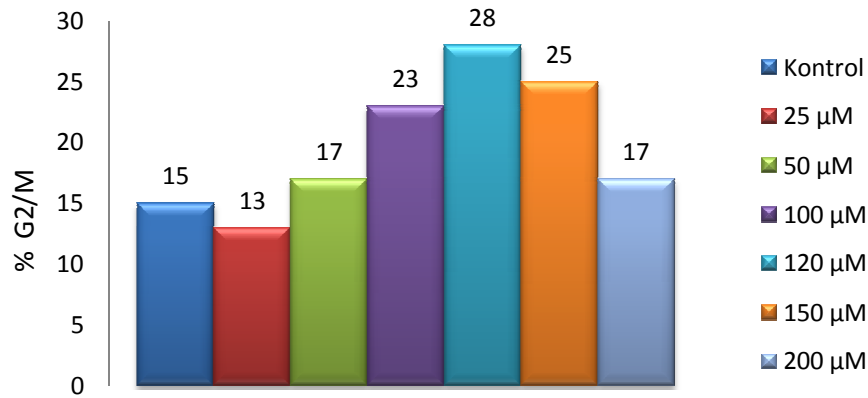
Şekil 4-7. 8, 12 ve 16 saat mimozin ile inkübe edilmiş K562 hücrelerinin DNA analizi.



Şekil 4-8. 8, 12 ve 16 saat mimozin ile işlem görmüş hücrelerin G1 fazındaki oranlarının grafiği.

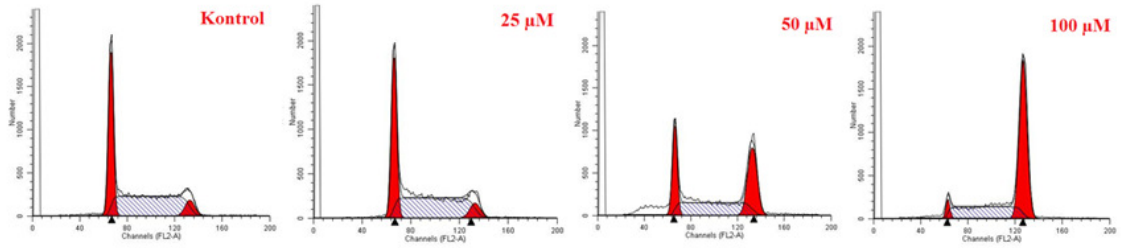
4.4. Genisteinin K562 Hücreleri Üzerine Etkisi

K562 hücrelerini G_2/M fazında tutuklayan genistein derişiminin belirlenmesi için ilk olarak, literatür bilgisinden de yararlanarak, 25-100 μM aralığında çalışıldı. Ancak DNA analiz sonuçları bu derişimlerin senkronizasyon için yeterli olmadığını gösterdi. Elde edilen bu verilerden sonra süre 24 saat kalmak üzere genistein derişimleri 100, 120, 150 ve 200 μM olacak şekilde arttırıldı ve DNA analizlerinde G_2/M oranlarının 120 μM 'a kadar arttığı, daha sonraki derişimlerde ise azaldığı belirlendi (Şekil 4-9).

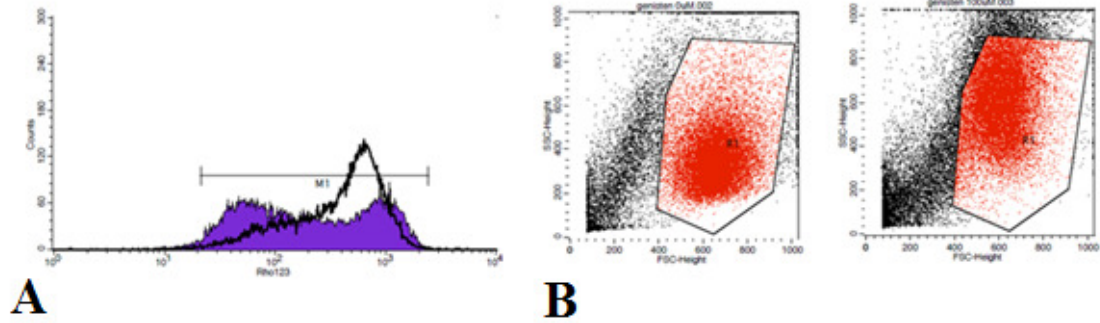


Şekil 4-9. 25-200 μM arasındaki genistein derişimleri ile işlem görmüş K562 hücrelerinin G_2/M popülasyon oranlarının grafiği

Daha sonra genistein derişimleri 25-100 μM arasında kalacak şekilde süre 72 saate çıkarıldı. 100 μM genistein derişiminde G_2/M fazındaki hücrelerin oranı % 61,0 olarak belirlendi (Şekil 4-10). G_2/M tutuklaması için kullanılabileceği düşünülen bu süre ve derişim, $\Delta\Psi_m$ 'de kontrole kıyasla depolarizasyon oluşturduğu için uygun görülmedi (Şekil 4-11 A).



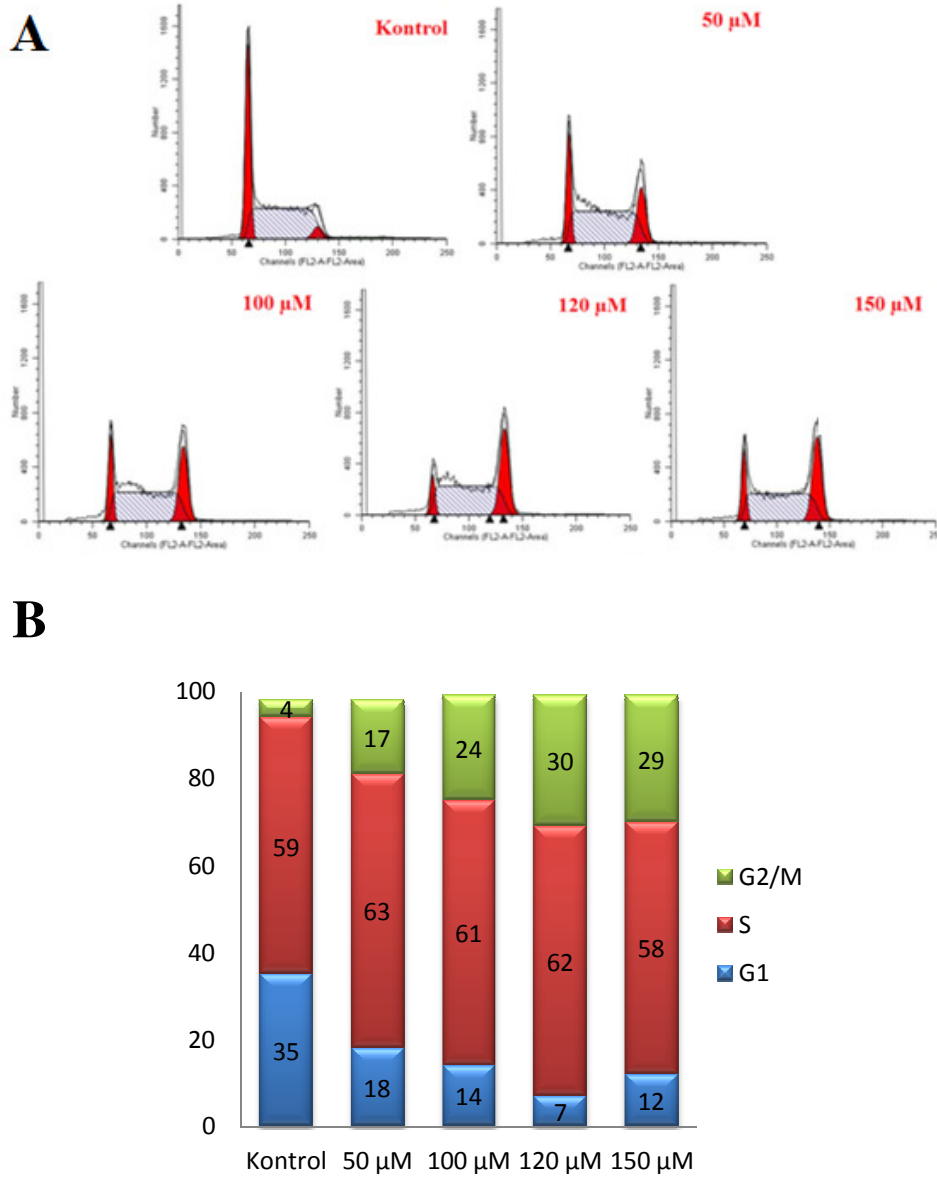
Şekil 4-10. 25, 50 ve 100 μM derişimlerde genistein ile 72 saat inkübe edilmiş K562 hücrelerinin DNA analizi.



Şekil 4-11. 72 saat 100 μM genistein ile muamele görmüş K562 hücrelerinin mitokondri membran potansiteli analizi.

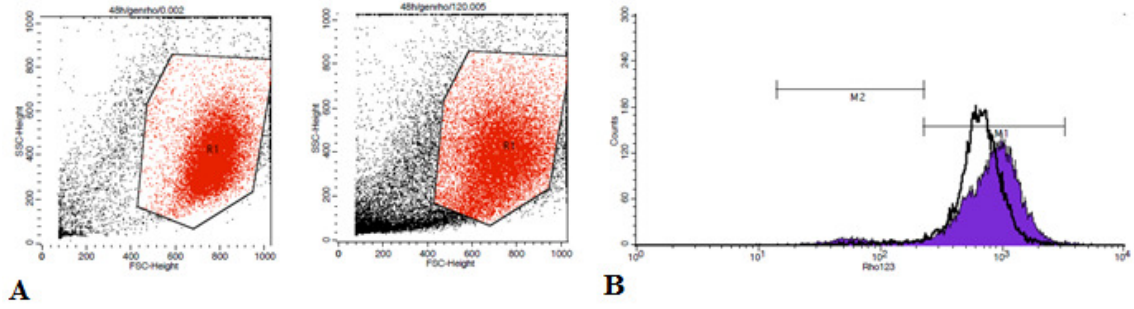
- A.** Hücrelerin histogram analizi. Siyah çizgi; kontrol, mor dolgu; genistein ile muamele görmüş hücreler. **B.** Hücre popülasyonunun nokta-grafik analizi.

Bu nedenle optimizasyon çalışmalarına devam edildi ve 48 saat, 50-150 μM genistein derişimlerinde işlem görmüş hücrelerin DNA analizleri yapıldı. 120 μM genistein derişiminde G_2/M fazındaki hücrelerin oranı % 30,0 olarak belirlendi (Şekil 4-12). Kontrole kıyasla, $\Delta\Psi_m$ 'de değışiklik oluşturmayan bu süre ve derişim (Şekil 4-13-B), G_2/M senkronizasyonu işlemleri için uygun bulundu.



Şekil 4-12. 48 saat farklı derişimlerde genistein ile muamele edilmiş K562 hücrelerinin DNA analizi.

A. 48 saat 50-150 μM derişimlerinde genistein ile işlem görmüş K562 hücrelerinin DNA analiz grafikleri. **B.** 48 saat 50-150 μM derişimlerinde genistein ile işlem görmüş K562 hücrelerinin G_1 , S ve G_2/M fazlarındaki dağılım grafiği.



Şekil 4-13. 48 saat 120 μ M genistein ile muamele görmüş K562 hücrelerinin mitokondri membran potansiyeli analizi.

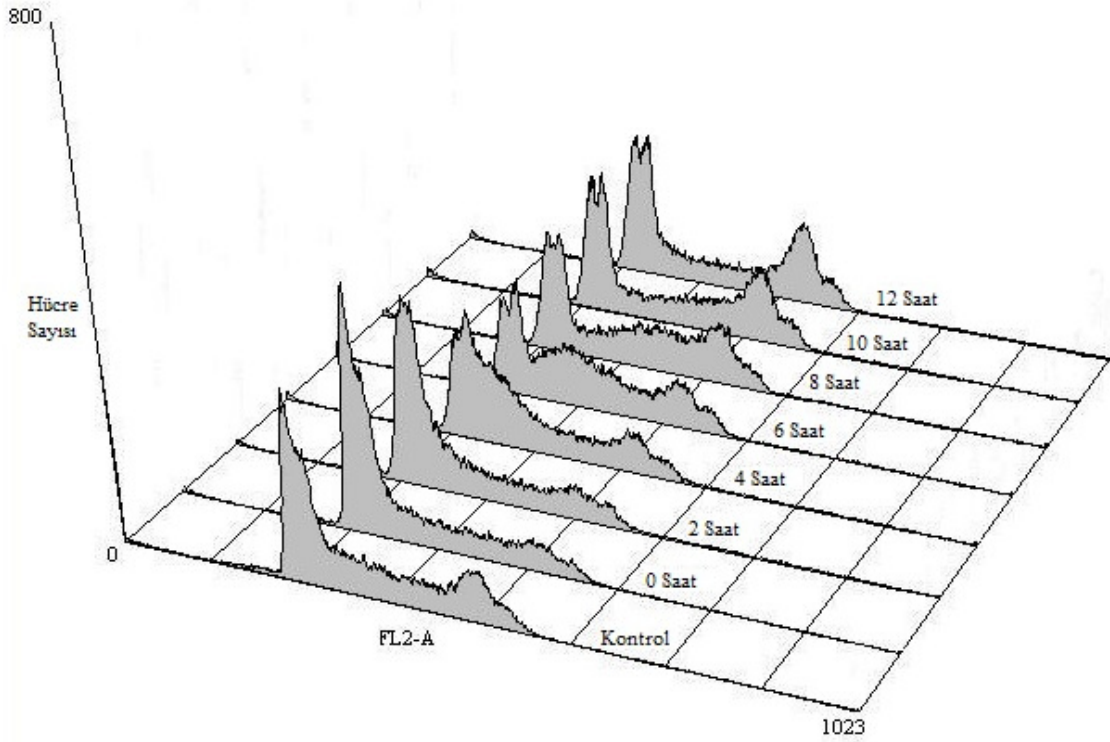
A. Nokta-grafik analizi. **B.** Histogram analizi. Siyah çizgi; kontrol hücreleri, mor dolgu; genistein ile muamele görmüş hücreler.

4.5. K562 Hücrelerinde Mimosinin Geri Dönüşümlü Etkisi

Mimosinin etkisinin geri dönüşümlü olduğunu bildiren literatür bilgisinden yola çıkarak, hücreler 12 saat 200 μ M mimosin ile inkübe edilip CDMEM'e geçirildi. 12 saat süreyle her saat başı toplanan hücre örneklerinin DNA analizleri yapıldı. CDMEM'e geçirildikten 6 saat sonra S fazındaki hücrelerin oranı % 71,0 ve 11 saat sonra G₂/M fazındaki hücrelerin oranı % 19,0 olarak belirlendi. 12. saatteki DNA analizlerinde ise, G₂/M fazındaki hücrelerin oranında düşüş ve G₁ fazındaki hücrelerin oranında artış gözlemlendi (Tablo 4-2 ve Şekil 4-14).

Tablo 4-2. 12 saat 200 μ M mimosin ile işlem görmüş, 12 saat normal CDMEM’de inkübe edilmiş hücrelerin DNA analiz sonuçları.

	G₁	S	G₂/M
Kontrol	% 37,4	% 52,2	% 10,4
0. Saat	% 50,0	% 45,0	% 5,0
1. Saat	% 48,8	% 46,9	% 4,3
2. Saat	% 49,0	% 48,3	% 2,8
3. Saat	% 45,2	% 54,8	% 0,0
4. Saat	% 37,6	% 62,4	% 0,0
5. Saat	% 28,1	% 68,5	% 3,5
6. Saat	% 22,0	% 71,3	% 6,6
7. Saat	% 24,9	% 65,4	% 9,7
8. Saat	% 25,6	% 61,8	% 12,6
9. Saat	% 28,0	% 56,8	% 15,2
10. Saat	% 30,1	% 51,7	% 18,2
11. Saat	% 31,8	% 48,7	% 19,6
12. Saat	% 34,1	% 47,6	% 18,4

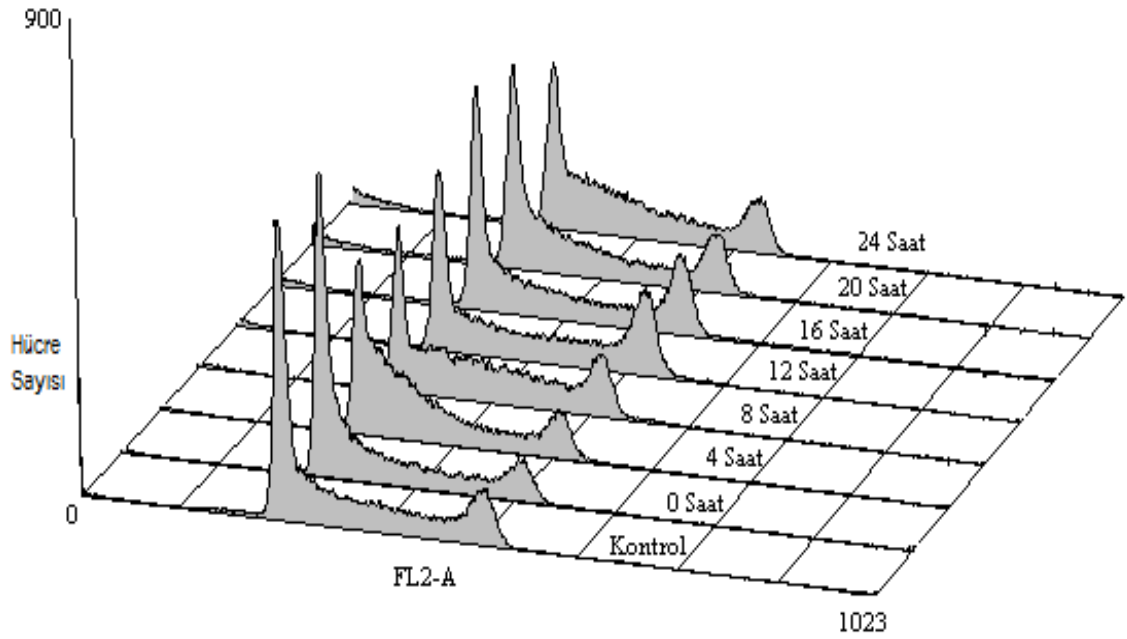


Şekil 4-14. 12 saat mimosin ile muamele gördükten sonra 12 saat normal CDMEM’de bekletilmiş hücrelerin 3 boyutlu DNA analiz histogramı.

Aynı işlemler 24 saat 200 μ M mimosin ile inkübe edilmiş hücrelerde ise, CDMEM’e geçirildikten sonra 24 saat süreyle 4 saat aralıklarla yapıldı. CDMEM’e geçirildikten 8 saat sonra S fazındaki hücrelerin oranı % 69,0, 16 saat sonra G₂/M fazındaki hücrelerin oranı % 18,0 olarak belirlendi (Tablo 4-3 ve Şekil 4-15). Bu bulgular mimosinin etkisinin geri dönüşümlü olduğunu destekler niteliktedir.

Tablo 4-3. 24 saat 200 μ M mimosin ile işlem görmüş, 24 saat normal CDMEM’de inkübe edilmiş hücrelerin DNA analiz sonuçları.

	G₁	S	G₂/M
Kontrol	% 33,8	% 50,4	% 15,8
0. Saat	% 34,1	% 60,2	% 5,7
4. Saat	% 33,8	% 61,2	% 5,0
8. Saat	% 25,8	% 69,3	% 4,8
12. Saat	% 22,7	% 68,3	% 9,0
16. Saat	% 20,3	% 61,6	% 18,2
20. Saat	% 59,9	% 38,7	% 1,4
24. Saat	% 56,7	% 43,3	% 0,0

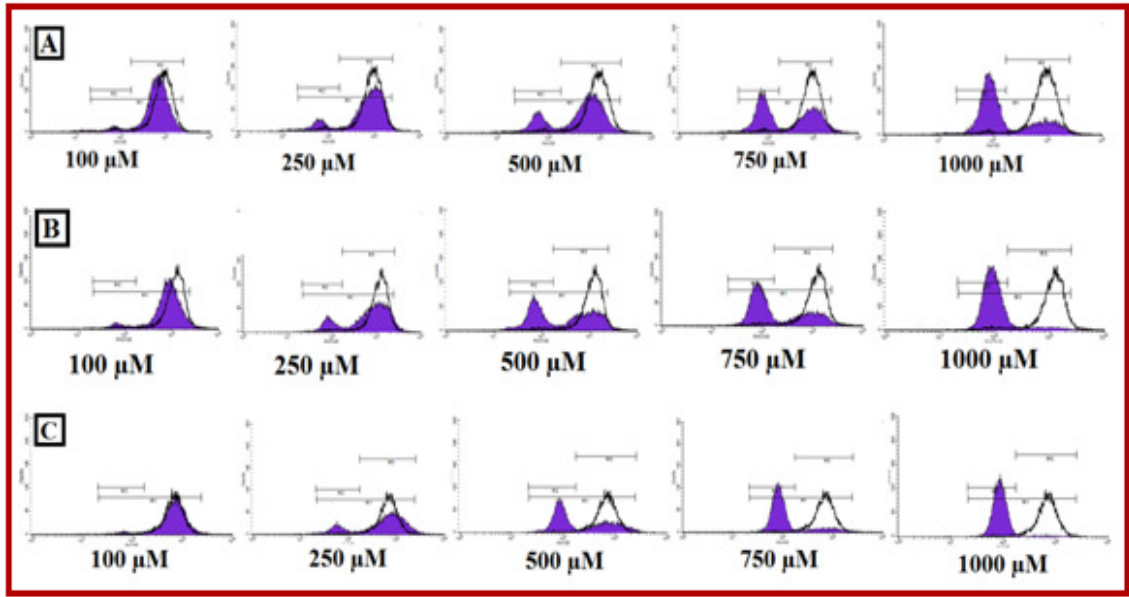


Şekil 4-15. 24 saat mimosin ile muamele gördükten sonra 24 saat normal CDMEM’de bekletilmiş hücrelerin 3 boyutlu DNA analiz histogramı.

4.6. Farklı Fazlarda Senkronize Edilmiş Hücrelere H₂O₂'nin Etkisi

4.6.1. G₁ Fazında Senkronize Edilmiş Hücrelere H₂O₂'nin Etkisi

3.2.2.1'de açıklandığı şekilde senkronize edilen hücrelere farklı derişim (100, 250, 500, 750 ve 1000 μ M) ve sürelerde (24, 48 ve 72 saat) H₂O₂ verildi ve $\Delta\Psi_m$ analiz edildi. Senkron (Şekil 4-16) ve asenkron (Şekil 4-2) hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analiz sonuçları arasında belirgin bir fark görülmedi.

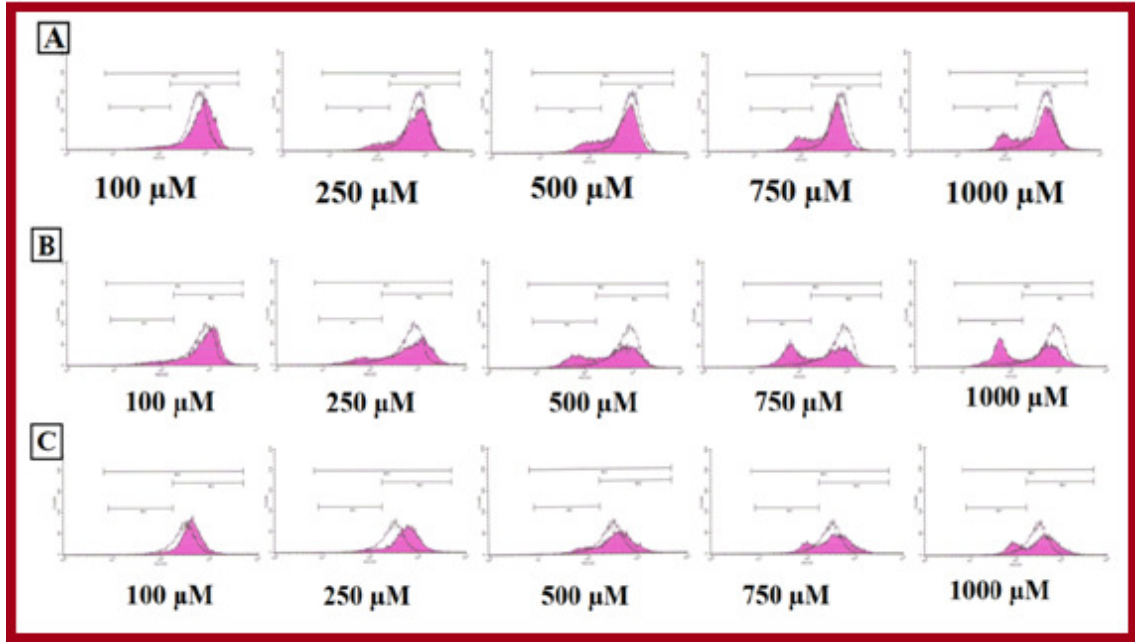


Şekil 4-16. Farklı derişim ve sürelerde G₁ fazında oksidatif strese maruz bırakılan hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi.

A. 24 saat boyunca farklı derişimler H₂O₂ ile inkübe edilmiş hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi. **B.** 48 saat boyunca farklı derişimler H₂O₂ ile inkübe edilmiş hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi. **C.** 72 saat boyunca farklı derişimler H₂O₂ ile inkübe edilmiş hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi. Siyah çizgi; kontrol hücreleri, mor dolgu; G₁ fazında senkronize edildikten sonra oksidatif strese maruz bırakılmış hücreler.

4.6.2. S Fazında Senkronize Edilmiş Hücrelere H₂O₂'nin Etkisi

3.2.2.3'te açıklandığı şekilde senkronize edilen ve H₂O₂ ile işlem gören hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analiz sonuçlarına göre, oksidatif stresin etkilerine, S fazındaki hücrelerin (Şekil 4-17), asenkron hücrelere (Şekil 4-2) göre daha dirençli olduğu belirlendi.

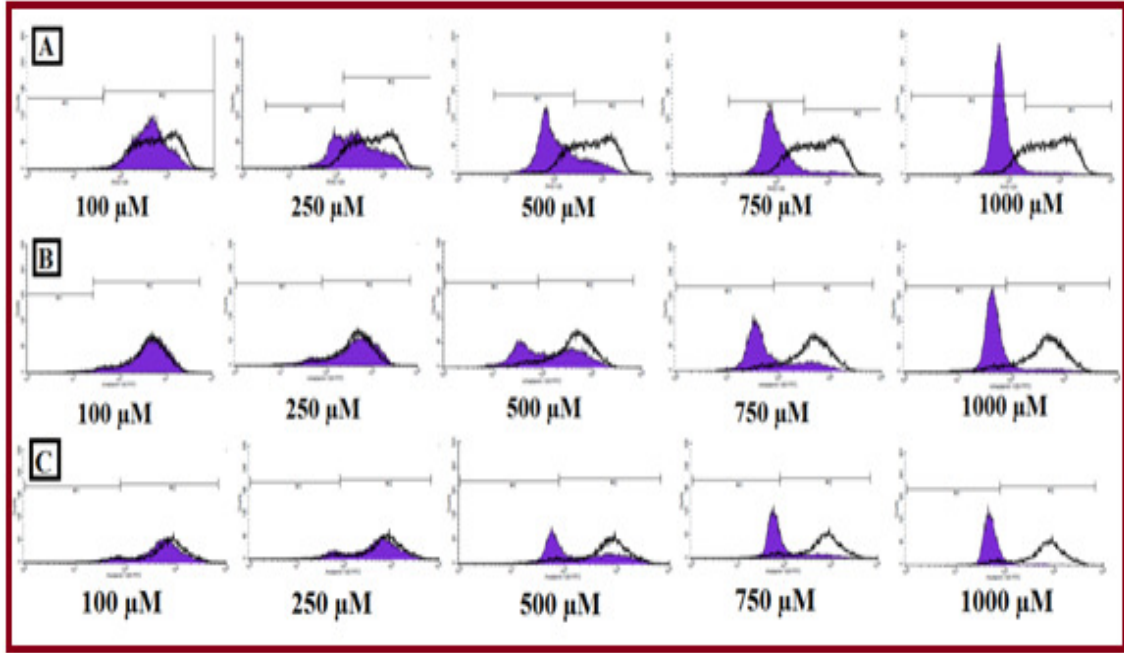


Şekil 4-17. Farklı derişim ve sürelerde S fazında oksidatif strese maruz bırakılan hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi.

A. 24 saat, S fazında, farklı derişimler H₂O₂ ile inkübe edilmiş hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi. **B.** 48 saat, S fazında, farklı derişimlerde H₂O₂ ile inkübe edilmiş hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi. **C.** 72 saat, S fazında, farklı derişimler H₂O₂ ile inkübe edilmiş hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi. Siyah çizgi; kontrol hücreleri, mor dolgu; S fazında senkronize edildikten sonra oksidatif strese maruz bırakılmış hücreler.

4.6.3. G₂/M Fazında Senkronize Edilmiş Hücrelere H₂O₂'nin Etkisi

3.2.2.4'te açıklandığı şekilde senkronize edilen ve farklı derişim ve sürelerde H₂O₂'nin etkisine maruz bırakılan hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizleri yapıldı. Buna göre, senkron hücrelerin, 500 μ M ve üzeri H₂O₂ derişimlerinde (Şekil 4-18), asenkron hücrelere göre (Şekil 4-2), oksidatif stresin etkilerine duyarlılık gösterdiği belirlendi.



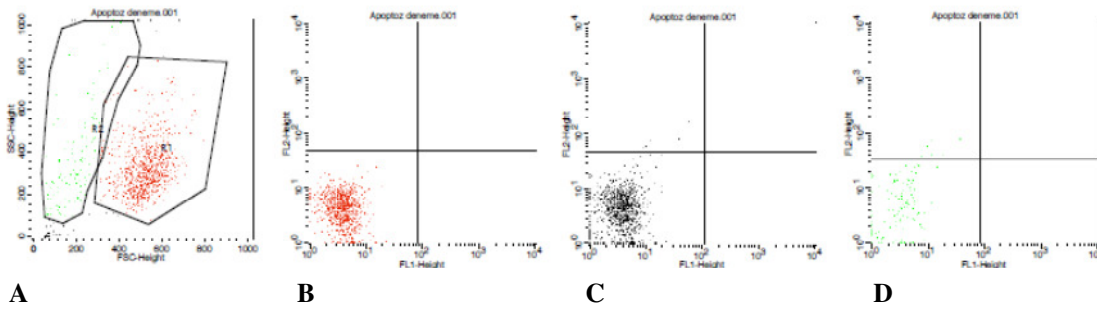
Şekil 4-18. G₂/M fazında senkronize edilmiş ve farklı derişim ve sürelerde oksidatif strese maruz bırakılan hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi.

A. G₂/M fazında 24 saat farklı derişimlerde H₂O₂ ile inkübe edilmiş hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi. **B.** G₂/M fazında 48 saat farklı derişimlerde H₂O₂ ile inkübe edilmiş hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi. **C.** G₂/M fazında 72 saat farklı derişimlerde H₂O₂ ile inkübe edilmiş hücrelerin $\Delta\Psi_m$ analizi. Siyah çizgi; kontrol hücreleri, mor dolgu; G₂/M fazında senkronize edildikten sonra oksidatif strese maruz bırakılmış hücreler.

4.7. Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

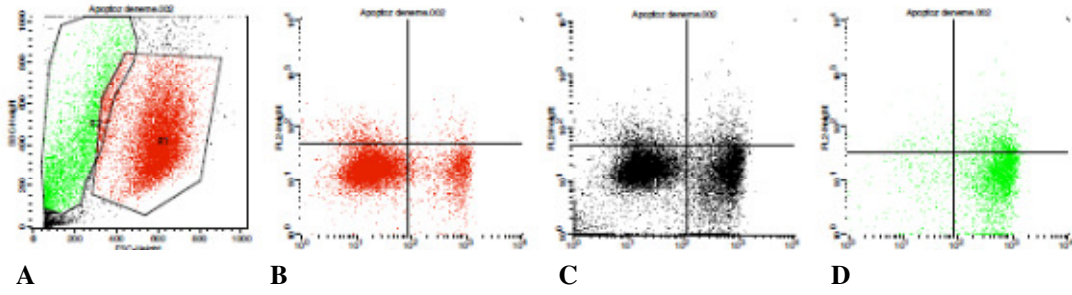
4.7.1. Asenkron Hücre Popülasyonunda Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Belirlenmesi

Akım sitometri cihazında canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin belirtimine yönelik yapılan analizlerin sonuçları, canlı ve ölü hücrelerin ayrı kapılandığı noktasal grafiklerde incelenir. Canlı hücrelerde, dörde ayrılmış nokta grafik histogramında, sağ alt köşede yalnız anneksin V ile boyanmış hücreler, sol üst köşede yalnız PI ile boyanmış hücreler, sağ üst köşede hem anneksin V hem de PI ile boyanmış hücreler ve sol alt köşede boyanmamış hücreler görülür. Bu bilgilerin ışığında yapılan kalibrasyon çalışmaları için, boyasız canlı hücreler (Şekil 4-19), anneksin V ile boyanmış apoptotik hücreler (Şekil 4-20) ve PI ile boyanmış nekrotik hücreler (Şekil 4-21) akım sitometri cihazından geçirildi ve sonuçların beklenen yönde çıkması kalibrasyon işleminin doğru olduğunu gösterdi.



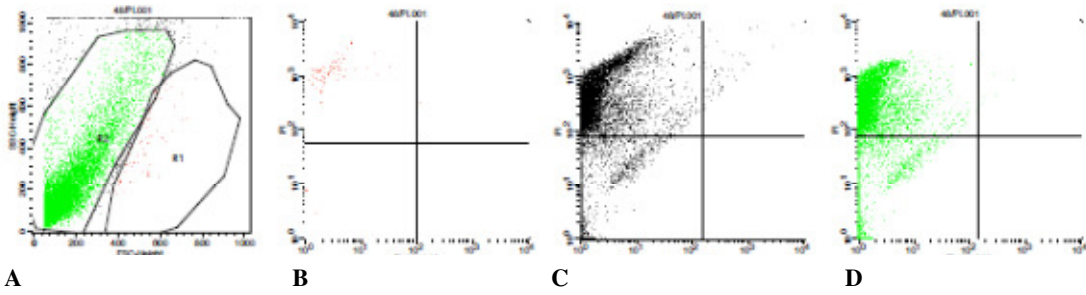
Şekil 4-19. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılan canlı boyasız hücreler.

- A. Hücreler, “Forward Scatter” (FSC) (Hücre büyüklüğü) / “Side Scatter” (SSC) (Hücre granülitesi) parametrelerinde görüntülenerek kapılandı. Kırmızı ile belirtilen kapı canlı hücreleri, yeşil ile belirtilen kapı ölü hücreleri göstermekte.
- B. Yalnız canlı hücrelerin kapılandığı bölgenin noktasal grafiği. C. Kapılanmaksızın tüm hücrelerin noktasal grafiği.
- D. Yalnız ölü hücrelerin kapılandığı bölgenin noktasal grafiği.



Şekil 4-20. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılan apoptoz-indüklenmiş anneksin V boyalı hücreler.

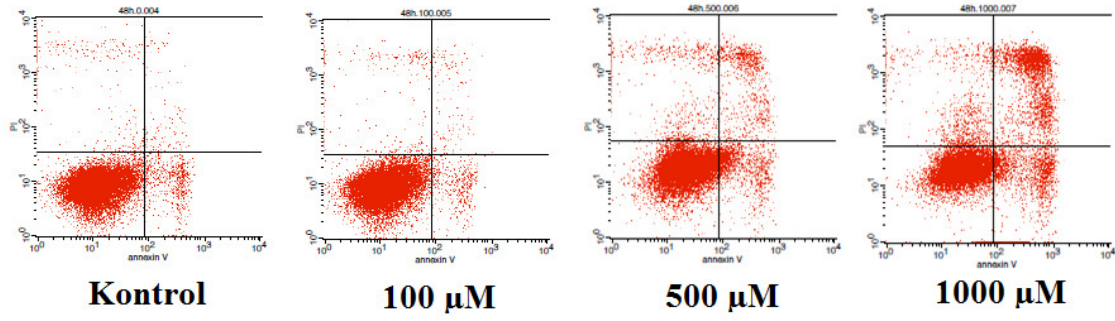
A. Hücreler, FSC / SSC parametrelerinde görüntülenerek kapılandı. Kırmızı ile belirtilen kapı canlı hücreleri, yeşil ile belirtilen kapı ölü hücreleri göstermektedir. B. Yalnız canlı hücrelerin kapılandığı bölgenin noktasal grafiği. C. Tüm hücrelerin noktasal grafiği. D. Yalnız ölü hücrelerin kapılandığı bölgenin noktasal grafiği.



Şekil 4-21. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılan nekroz-indüklenmiş PI boyalı hücreler.

A. Hücreler, FSC/SSC parametrelerinde görüntülenerek kapılandı. Yeşil ile belirtilen kapı ölü hücreleri göstermektedir. B. Yalnız canlı hücrelerin kapılandığı bölgenin noktasal grafiği. C. Tüm hücrelerin noktasal grafiği. D. Yalnız ölü hücrelerin kapılandığı bölgenin noktasal grafiği.

48 saat 100, 500 ve 1000 μM H_2O_2 ile inkübe edilen K562 hücrelerinin apoptoz ve nekroz ayrımı “ApopNexin FITCH” kiti kullanılarak, 3.2.6.2.’de açıklandığı şekilde yapıldı. Analiz sonuçlarına göre, H_2O_2 derişiminin artmasıyla birlikte canlı hücreler olarak kabul edilen boyasız hücrelerin oranının H_2O_2 içermeyen ortamda % 93,0 iken, 1000 μM ’da % 64,0’e düştüğü belirlendi. Buna karşın, yalnız anneksin V, yalnız PI ve anneksin V ve PI ile boyanmış hücrelerin oranında ise bir artış gözlemlendi (Şekil 4-22 ve Tablo 4-4).



Şekil 4-22. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H₂O₂ ile inkübe edilmiş asenkron K562 hücrelerinin noktasal grafiği.

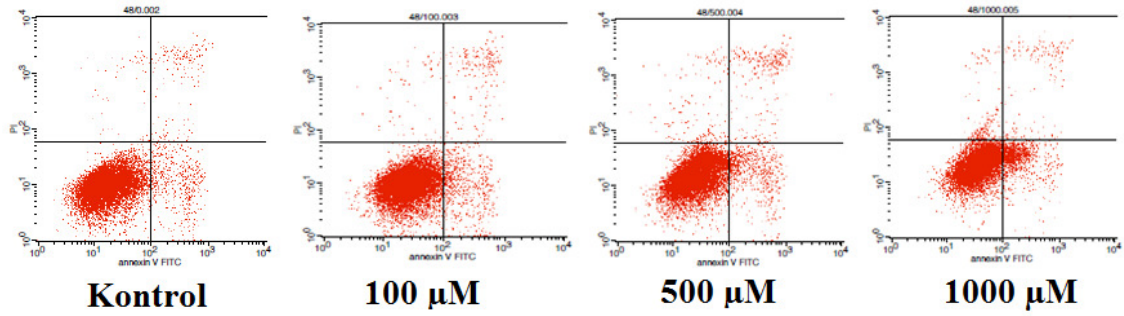
Tablo 4-4. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H₂O₂ ile inkübe edilmiş asenkron K562 hücrelerinin, boyanmamış, yalnız anneksin V, yalnız PI ve anneksin V + PI boyanmış hücre dağılım tablosu.

H₂O₂ (µM)	Boyanmamış Hücreler	Yalnız Anneksin V	Yalnız PI	Anneksin V + PI
0	% 93,0	% 3,5	% 1,9	% 0,6
100	% 95,0	% 2,5	% 1,5	% 0,7
500	% 81,0	% 9,0	% 4,6	% 5,1
1000	% 64,0	% 12,6	% 5,9	% 17,0

4.7.2. Senkron Hücre Popülasyonunda Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Belirlenmesi

4.7.2.1. Apoptoz ve Nekrozun G₁ Fazında Senkronize Hücrelerdeki Dağılımı

200 μ M mimozin ile geç G₁ fazında senkronize edilen K562 hücreleri, 48 saat 100, 500 ve 1000 μ M H₂O₂'ye maruz bırakıldı. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi için hücreler “ApopNexin FITCH” kitindeki anneksin V ve PI ile boyandı. Analizler akım sitometri cihazında yapıldı (Şekil 4-23). Analiz sonuçlarına göre, kontrol grubunda boyanmamış hücre oranı % 95,0 iken, bu oran 100 500 ve 1000 μ M H₂O₂ derişimlerinde sırasıyla, % 93,0, % 90,0 ve % 82,0 olarak ölçüldü. Yalnız PI ve anneksin V ve PI ile boyanmış hücre gruplarının oranlarında belirgin bir fark görülmedi. Ancak yalnız anneksin V ile boyanmış hücre oranları kontrol grubunda % 3,4 iken, bu oran 100, 500 ve 1000 μ M H₂O₂ derişimlerinde sırasıyla, % 5,0, % 6,0 ve % 14,1 olarak ölçüldü (Tablo 4-5).



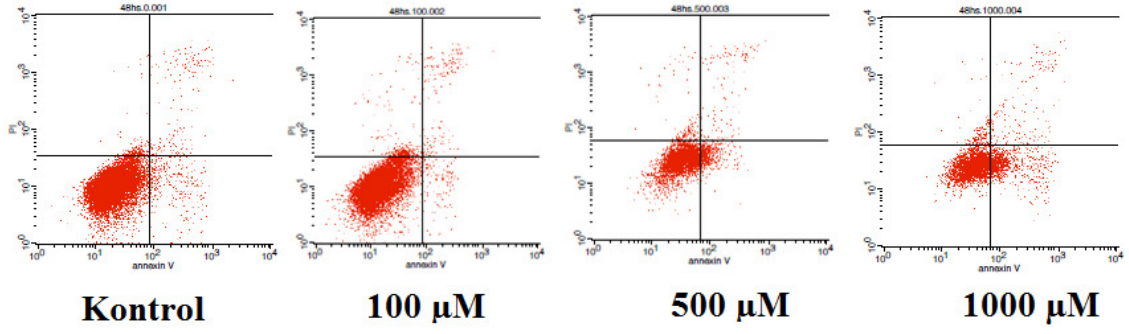
Şekil 4-23. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H₂O₂ ile inkübe edilmiş G₁ fazında senkronize K562 hücrelerinin noktasal grafiği.

Tablo 4-5. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H₂O₂ ile inkübe edilmiş G₁ fazında senkron K562 hücrelerinin, boyanmamış, yalnız anneksin V, yalnız PI ve anneksin V + PI boyanmış hücre dağılım tablosu.

H ₂ O ₂ (μ M)	Boyanmamış Hücreler	Yalnız Anneksin V	Yalnız PI	Anneksin V + PI
0	% 95,0	% 3,4	% 0,3	% 1,1
100	% 93,0	% 5,0	% 0,4	% 1,3
500	% 90,0	% 6,0	% 1,4	% 2,3
1000	% 82,3	% 14,1	% 2,0	% 1,6

4.7.2.2. Apoptoz ve Nekrozun S Fazında Senkronize Hücrelerdeki Dağılımı

3.2.2.3’de açıklandığı şekilde S fazında senkronize edilen hücelere, 48 saat farklı derişimlerde H₂O₂ verildi. İnkübasyon süresi sonunda anneksin V-FITC ve PI ile boyanmış hücrelerin analizleri akım sitometri cihazında, “BD Cell Quest” programı kullanılarak yapıldı (Şekil 4-24). Analiz sonuçlarına göre, kontrol grubunda boyanmamış hücre oranı % 95,0 iken bu oran sırasıyla 100, 500 ve 1000 μ M H₂O₂ derişimlerinde % 95,0, % 82,0 ve % 68,0 olarak ölçüldü. Yalnız PI ile boyanmış kontrol grubundaki hücrelerin oranı % 1 iken bu oran 1000 μ M H₂O₂ derişiminde % 3,0 olarak ölçüldü. Hem anneksin V hem de PI ile boyanmış kontrol grubu hücrelerinin oranı % 1,0, 1000 μ M H₂O₂ derişiminde ise bu oran % 4,1 olarak ölçüldü. Yalnız anneksin V ile boyanmış hücrelerde kontrol grubunda bulunan hücrelerin oranı % 2,2 iken bu oran sırasıyla 100, 500 ve 1000 μ M H₂O₂ derişimlerinde % 0,9, % 13,0 ve % 24 olarak ölçüldü (Tablo 4-6).



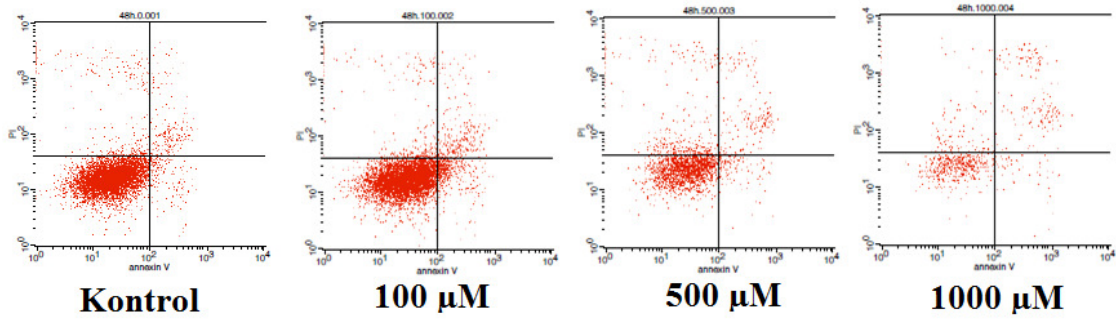
Şekil 4-24. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H₂O₂ ile inkübe edilmiş S fazında senkronize K562 hücrelerinin noktasal grafiği.

Tablo 4-6. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H₂O₂ ile inkübe edilmiş S fazında senkron K562 hücrelerinin boyanmamış, yalnız anneksin V, yalnız PI ve anneksin V + PI boyanmış hücre dağılım tablosu.

H₂O₂(µM)	Boyanmamış Hücreler	Yalnız Anneksin V	Yalnız PI	Anneksin V + PI
0	% 95,0	% 2,2	% 1,0	% 1,0
100	% 95,0	% 0,8	% 2,2	% 1,2
500	% 82,0	% 13,0	% 2,6	% 2,3
1000	% 68,0	% 24,0	% 3,0	% 4,1

4.7.2.3. Apoptoz ve Nekrozun G₂/M Fazında Senkronize Hücrelerdeki Dağılımı

120 μ M genistein ile G₂/M fazında tutuklanmış hücreler, 48 saat farklı derişimlerde (100, 500 ve 1000 μ M) H₂O₂ ile oksidatif strese maruz bırakıldı. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin senkron hücrelerde belirlenmesi 3.2.6.3'te açıklandığı şekilde yapıldı (Şekil 4-25). Analiz sonuçlarına göre, kontrol grubunda boyanmamış hücre oranı % 89,0 iken bu oranın 1000 μ M H₂O₂ derişiminde % 59,0'a düştüğü belirlendi. Yalnız PI ve hem PI hemde anneksin V ile boyanmış kontrol grubu hücrelerinin oranı sırasıyla % 5,1 ve % 2,8 iken bu oranlar 1000 μ M H₂O₂ derişiminde sırasıyla % 14,3 ve % 20,1'e çıkmıştır (Tablo 4-7).



Şekil 4-25. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H₂O₂ ile inkübe edilmiş G₂/M fazında senkronize K562 hücrelerinin noktasal grafiği.

Tablo 4-7. Anneksin V ve PI ile boyanmış, 48 saat H₂O₂ ile inkübe edilmiş G₂/M fazında senkron K562 hücrelerinin, boyanmamış, yalnız anneksin V, yalnız PI ve anneksin V + PI boyanmış hücre dağılım tablosu.

H ₂ O ₂ (μ M)	Boyanmamış Hücreler	Yalnız Anneksin V	Yalnız PI	Anneksin V + PI
0	% 89,0	% 2,7	% 5,1	% 2,8
100	% 85,0	% 7,0	% 4,0	% 3,8
500	% 73,0	% 5,2	% 13,9	% 7,2
1000	% 59,0	% 6,5	% 14,3	% 20,1

5. TARTIŞMA

Hücre kültürü, hücrelerin doğal yaşam ortamlarına en yakın olan şartlarda üretilmesine dayanan bir laboratuvar yöntemidir. Hücrelerin kültür ortamında öze özgü niteliklerini koruyarak üretilmesi ve bu niteliklerini araştırmaya yönelik çalışmaların yapılabilmesinin yanı sıra, kültür ortamının fiziksel ve kimyasal içeriğini değiştirerek onlara yeni özelliklerin kazandırılması ya da var olan özelliklerinin değiştirilmesi de mümkündür. Bununda ötesinde iki farklı hücrenin füzyonuyla hibrit hücreler, ya da hücrenin içine (genomuna) farklı genler sokularak rekombinant hücreler de elde edilebilir. Son yıllarda geliştirilen üç boyutlu hücre kültür teknikleri ise, doku mühendisliğinin önemli araçları olmuştur.

Tüm bu anlatılanlar doğrultusunda hücre kültürünün tıp ve biyolojide kullanılan en önemli araçlardan biri olduğu söylenebilir. Tanı ve tedaviye yönelik *in vivo* çalışmaların hayvan deneylerinden önceki basamağı hücre kültürlerinde yapılmaktadır. Literatürde, moleküler biyoloji alanında hücre kültüründe yapılmış, patolojik ve fizyolojik süreçlerin incelendiği yüzlerce çalışma bulunmaktadır. Bu kadar geniş bir uygulama alanına sahip hücre kültürüyle ilgili olarak son yıllarda ticari bir pazar oluşmuştur. Araştırmacılar hemen hemen istediği her hücreyi, oluşturulan bu hücre bankalarından satın alabilmektedir. Bunun yanında bilim insanları kendi laboratuvarlarında ürettikleri hücreleri birbirleriyle paylaşarak çalışmalarını sürdürmektedir. Ancak hücre döngüsüyle ilgili çalışmalar yapan araştırmacıların böyle bir şansı bulunmamaktadır. Bu tür araştırmalarda, senkronize hücrelerin araştırmacı tarafından hazırlanması gerekmektedir ve bu işlemin her deneyde tekrarlanması zorunludur.

Amacı oksidatif stresin farklı hücre fazlarındaki etkilerini araştırmak olan bu tez çalışmasında G_1 , S ve G_2/M fazlarındaki hücrelerin hazırlanmasına yönelik en uygun şartların belirlenmesi çalışmaları başarıyla yürütülmüştür. DNA sentezinin tersinir inhibitörü olan mimosin, hücre döngüsünü G_1/S geçişine yakın bir noktada, geç G_1 fazında inhibe eder (51-53). Çalışmamızda, K562 hücrelerini G_1 fazında senkronize edebilmek için kullandığımız mimosin, 24 saatlik bir inkübasyondan sonra kullanılan tüm derişimlerde (100, 250, 500 μM) kontrole kıyasla $\% 14 \pm 4$ 'lük bir artışla $\% 50 \pm 4$ civarında bir G_1 popülasyonunun oluşumunu sağlamıştır. G_2/M popülasyonu hemen

hemen tamamen ortadan kalkarken, S popülasyonu kontrol grubuyla aynı oranda kalmıştır. Hücre döngüsünde yer alan fazlar arasındaki geçişin düzenlenmesinde kontrol noktaları görev alırlar (38). Temel kontrol noktalarından ilki, G_1/S geçişinde bulunan DNA hasar sensörüdür. Erken ve orta G_1 fazı arasında hasar gören hücreler G_1 fazında duraksarken, geç G_1 fazında hasar gören hücreler, S fazında devam ederler. Dolayısıyla hücreleri G_1/S geçişinde tutuklayan mimosin senkronizasyonu ile elde ettiğimiz hücre fazlarına ait oranlar bu bilgilerle uyumaktadır.

Oksidatif stres serbest radikaller aracılığıyla hücre alt yapılarında meydana gelen hasar olarak tanımlanmaktadır (12-14). Hücrelerde onarılamayacak kadar büyük bir hasarın oluşumuyla da apoptotik süreç tetiklenir (22). Apoptotik sürecin kontrolünde mitokondri başat rol oynar. Özellikle membran potansiyelinde ($\Delta\Psi_m$) meydana gelen değişikliklerle sitoplazmaya salınan apoptotik proteinlerin tetiklediği tepkimelerle geri dönüşümsüz bir yola girilmiş olur. Biz çalışmamızda H_2O_2 ile oluşturduğumuz oksidatif stresin hücreleri apoptoza yönlendirip yönlendirmediğini $\Delta\Psi_m$ 'deki değişiklikleri analiz ederek belirledik. Öncelikle asenkron K562 hücrelerinde optimize ettiğimiz oksidatif stres koşullarında, artan H_2O_2 derişim ve uygulama süresine bağlı olarak $\Delta\Psi_m$ depolarize olmuş ikinci bir hücre popülasyonunda artış gözlemledik. Rhodamin 123 kullanarak yürüttüğümüz bu deneylerden elde ettiğimiz bulguları, farklı hücre fazlarında senkronize edilmiş hücrelerden elde edilen verilerle birlikte nispi olarak değerlendirerek yorumladık. Bu yüzden senkronize edici olarak kullandığımız kimyasalların $\Delta\Psi_m$ 'ni kontrole göre değiştirmemesi doğru yorumlar yapılması açısından çok önemliydi. Literatür bilgisinden de yararlanarak seçtiğimiz 200 μM 'lık mimosin derişimi hücrelerde kontrole örtüşen bir $\Delta\Psi_m$ profili oluşturdu. Daha sonra K562 hücreleri, 8, 12, 16 saat süreyle 200 μM 'lık mimosinle işlem gördükten sonra DNA analizleri yapılmış ve her üç inkübasyon süresinde de G_1 oranı $\% 67,0 \pm 1$ olarak belirlenmiştir. Bu oranın 24 saatlik inkübasyonda $\% 50,0$ 'ye düşmesi, 16'ncı saatten sonra mimosinin kültür ortamında yarılandığını ya da ortamda biriken metabolitlerden etkilenecek işlevini yitirdiğini düşündürmektedir. Bu deneylerin sonunda mimosinle inkübasyon süresinin 8 saat olması uygun görülmüştür.

G_2/M fazı senkronizasyonu için, yine bir kimyasal ajan kullanılmış ve hücreler genistein ile muamele edilmiştir. Literatür bilgisinden de yola çıkarak (84) 25-200 μM genistein derişimlerinde 24 saat süreyle inkübe edilen hücrelerin DNA analizlerinde,

G_2/M oranının $120 \mu M$ 'lık derişime kadar arttığı ve bu derişimde %28'lik bir oranla pik yaptıktan sonra düştüğü gözlenmiştir. Genisteinin senkronizasyon amacıyla kullanıldığı çalışmalarda çok farklı G_2/M oranları bildirilmiştir. Ismail IA'nın SK-N-MC hücreleriyle yaptığı çalışmada $100 \mu M$ 'lık genistein derişiminde G_2/M popülasyonunun % $50,0 \pm 1,9$, Papazisis KT'nin K562 hücreleriyle yaptığı çalışmada ise $50 \mu M$ 'lık genistein derişiminde G_2/M popülasyonunun oranı % 21,8 olarak verilmiştir (84, 85). Bu bilgilerden yola çıkarak $120 \mu M$ 'lık derişimde elde ettiğimiz % 28,0'lik oranı daha yüksek bir değere ulaştırabilir miyiz sorusunu cevaplamak ve aynı zamanda inkübasyon süresini de optimize etmek için yürüttüğümüz deneylerde, 72 saatlik inkübasyonda $100 \mu M$ 'lık derişimin G_2/M oranını % 61,0'lik bir düzeye ulaştırdığı gözlemlenmiştir. Ancak bu süre ve derişimde işlem görmüş hücrelerin $\Delta\Psi_m$ 'leri kontrol hücreleriyle örtüşmediği için kullanımı uygun görülmemiştir. $\Delta\Psi_m$ 'de bir depolarizasyon oluşturmaması nedeniyle kullanılması uygun görülen 48 saatlik inkübasyon ve $120 \mu M$ 'lık derişimde G_2/M oranı % 30'dur ki bu oran kontrol grubuna göre % 26'lık bir artışa karşılık gelmektedir.

Mimozinin S fazı senkronizasyonu için kullanıldığı deneylerin sonuçları, aynı zamanda bu maddenin etkisinin geri dönüşümlü olduğunda göstermektedir ki bu bulgu literatürle de uyuşmaktadır (56). $200 \mu M$ mimozin ile 12 saat inkübasyonun ardından, CDMEM'e geçirilen hücrelerin S fazı popülasyonu 6. Saatte % 71'lik bir oranla en yüksek değerine ulaşmaktadır.

G_1 , S ve G_2/M fazındaki hücrelerin 100 , 250 , 500 , 750 ve $1000 \mu M$ H_2O_2 ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra yapılan $\Delta\Psi_m$ analizleri, aynı şartlarda işlem gören asenkron hücrelerin analizleriyle karşılaştırıldığında ve bu veri apoptoz belirteci olarak değerlendirildiğinde; S fazındaki hücrelerin oksidatif strese oldukça dirençli olduğu söylenebilir. Asenkron hücrelerde 24, 48 ve 72 saatlik $1000 \mu M$ H_2O_2 ile inkübasyondan sonra düşük floresan yoğunluğuna sahip hücre popülasyonu sırasıyla, % 74,3, % 77,2 ve % 75,2 iken bu oran S fazındaki hücrelerde sırasıyla % 21,4, % 45,3 ve % 29,2'dir. Görüldüğü gibi yüksek derişimde ve uzun süreli H_2O_2 inkübasyonlarından sonra bile S fazındaki apoptotik sürecin geri dönüşümsüz aşamasındaki hücrelerin oranı, asenkron hücrelere göre düşük olarak belirlenmiştir. Ayrıca anneksin V ve PI ile yapılan çalışmalarda, 48 saat inkübasyondan sonra $1000 \mu M$ H_2O_2 derişiminde yalnız anneksin V ile boyanan hücrelerin oranı kontrole göre % 22'lik bir artış göstermiştir. Anneksin V

+ PI ikili boyamasında ise bu oran ancak % 4'lük bir değerde kalmıştır. Bu verilere göre S fazında oksidatif stresin etkilerine maruz bırakılan hücreler, apoptotik sürecin geri dönüşümsüz aşamasına girmiş ancak henüz DNA kırıkları oluşmamıştır.

G₂/M fazında ise, 500 µM ve üzerindeki derişimlerde, tüm sürelerde floresan yoğunluğu düşük popülasyonun oranları asenkron hücrelerinkine göre 2-3 katlık bir artış göstermektedir. Anneksin V ve PI ile yapılan çalışmalarda ise, 48 saat 1000 µM H₂O₂ ile işlem gören ve yalnız PI ile boyanan hücrelerin oranı kontrole göre % 9'luk bir artış gösterirken, anneksin V + PI boyalı hücrelerin oranı % 18'lik bir artış göstermiştir. Yalnız anneksin V ile boyanan hücrelerin oranı ise kontrole göre ancak % 4'lük bir artışta kalmıştır. Oksidatif stresin etkilerine G₂/M fazında maruz bırakılan hücrelerde, doza bağlı olarak geç apoptotik ve nekrotik hücrelerdeki artış, ΔΨ_m analizleri ile tutarlılık göstermektedir.

G₁ fazındaki hücrelerin ΔΨ_m analizleri yine bu hücre popülasyonunun oksidatif strese duyarlı olduğunu göstermektedir. Hücre siklusunun G₁ ve G₂ fazları protein sentezinin, S fazı ise DNA sentezinin yoğun olarak gerçekleştiği süreçlerdir. Elde edilen sonuçlardan, protein sentezinin yoğun olduğu G₁ ve G₂/M fazlarında K562 hücrelerinin oksidatif strese daha duyarlı olduğu ve daha kolay apoptoza yönlendiği söylenebilir. DNA sentezinin yoğun olduğu S fazında ise oksidatif strese karşı gösterilen direnç, H₂O₂'nin DNA molekülüne verdiği hasarın DNA onarım mekanizmalarıyla onarılarak, hücrenin yaşama ölüm arasındaki mücadelesini yaşam yönüne çevirdiği şekilde yorumlanabilir.

Kanser tedavisinde kullanılan doxorubicin, daunorubicin, mitomycin C ve etoposide gibi ilaçların çoğu sitotoksiste için kısmen ya da aşırı miktarda ROT oluşumunu tetikleyerek etkisini göstermektedir (86). Tümör hücrelerinin oksidatif strese ve/veya apoptoza duyarlılığı tedavinin başarısını etkileyen unsurlardandır. Bu tez çalışmasında da farklı hücre fazlarının oksidatif strese duyarlılığı DNA analizleri üzerinden gösterilmiştir. Dolayısıyla tedavi uygulanmadan önce ya da tedaviye duyarsız kalan kanser türlerinde hücre döngüsü fazlarının belirlenmesi ve oksidatif strese duyarlılığının saptanması rutin bir test sistemi olarak uygulanabilir. Oksidatif strese duyarlı ya da dirençli hücre döngüsü fazlarının belirlenmesinden sonra kullanılan ilaçların senkronize edici ajanlarla birlikte kombine edilerek uygulanması etkilerinin

arttırılması açısından önemlidir. Bu tez çalışmasında elde edilen verilerin bu yöndeki araştırmalarda değerlendirilmesi faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Liu SV. Debating cell-synchronization methodologies: further points and alternative answers. *Trends Biotechnol* 2005; **23**: 9-10.
2. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Method Enzymol* 1990; **186**: 1-85.
3. Akkuş İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Konya: Mimoza Yayınları; 1995.
4. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2002.
5. Kelly SA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. Oksidative stres in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ Health Persp* 1998; **106**: 375 – 384.
6. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000; **486**: 10 – 13.
7. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev* 1994; **52**: 253 – 265.
8. Bermek E, Nurten R, Tiryaki D, Gokce S. *Biyofizik Ders Notları Kitabı*. İstanbul: İ.Ü. Basımevi; 1997.
9. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science* 1988; **240**: 640–642.

10. Dizdaroglu M, Rao G, Halliwell B, Gajewski E. Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991; **285**: 317–324.
11. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; **59**: 527-605.
12. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol-Lung C* 2000; **279**: 1005–1028.
13. Haddad JJ. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: Immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *Int Immunopharmacol* 2004; **4**: 475–493.
14. Carmody RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: A radical approach. *Redox Rep* 2001; **6**: 77–90.
15. Benz CC, Yau C. Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 875–879.
16. Nikjoo H, O'Neill P, Terrissol M, Goodhead DT. Modelling of radiation-induced DNA damage: the early physical and chemical event. *Int J Radiat Biol* 1994; **66**: 453–457.
17. Skov KA. The contribution of hydroxyl radical to radiosensitization: a study of DNA damage. *Radiat. Res.* 1984; **99**: 502–510.
18. Teoule R. Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol* 1987; **51**: 573–589.
19. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res* 1988; **35**: 95–125.

20. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L ve ark. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 1237-1243.
21. Melino G, Knight RA, Nicotera P. How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death Differ* 2005; **12**: 1457–1462.
22. Schwartzman RA, Cidlowski LA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 1993; **14**: 133–151.
23. Kerr LFR, Winterford CM, Harmon BN. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; **73**: 2013–2026.
24. Kerr LFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer* 1972; **26**: 239–257.
25. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000; **45**: 528 – 537.
26. Dash P. *Apoptosis* [web page on the internet]. Erişim 09.11.2011, Reproductive and Cardiovascular Disease Research Group: www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash
27. Gewies A. *Introduction to Apoptosis* [web page on the internet]. Erişim 09.11.2011, ApoReview 2003: www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm
28. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999; **264**: 687–701.

29. Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 2000; **256**: 19–26.
30. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; **6**: 513–519.
31. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; **18**: 44–51.
32. Marchetti P, Decaudin D, Macho A, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA ve ark. Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 289–296.
33. Nanji AA, Zakim D. *Alcoholic liver disease*. In: Zakim D and Boyer T ed. Textbook of Hepatology. Orlando, FL: W.B. Saunders; 1996. pp. 891–961.
34. Syntichaki P, Tavernarakis N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci* 2003; **4**: 672–684.
35. Murray A, Hunt T. *The cell cycle: an introduction*. New York: W.H. Freeman and Co; 1993.
36. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; **13**: 261–291.
37. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991; **65**: 701–713.
38. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; **246**: 629–633.

39. Kastan MB. ed. *Checkpoint controls and cancer*. Tooze J. ed. *Cancer surveys* (vol.29). Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
40. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996; **274**: 1664–1672.
41. Planas-Silva MD, Weinberg RA. Estrogen-dependent cyclin E-cdk2 activation through p21 redistribution. *Mol Cell Bio* 1997; **17**: 4059–4069.
42. Garrett MD. Cell cycle control and cancer. *Current Sci* 2001; **81**: 515–522.
43. Merril GF. Cell Synchronization. *Method Cell Biol* 1998; **57**: 229-49.
44. Khammanit R, Chantakru S, Kitiyanant Y, Saikhun J. Effect of serum starvation and chemical inhibitors on cell cycle synchronization of canine dermal fibroblasts. *Theriohenology* 2008; **70**: 27-34.
45. Davis PK, Ho A, Dowdy SF. Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *Biotechniques* 2001; **30**: 1321-30.
46. Cooper S. Is whole-culture synchronization biology's perpetual-motion machine? *Trends Biotechnol* 2004; **6**: 266–269.
47. Helmstetter CE ve ark. Synchrony in human, mouse and bacterial cell cultures. *Cell Cycle* 2003; **2**: 42–45.
48. Thornton M ve ark. Production of minimally disturbed synchronous cultures of hematopoietic cells. *Biotechniques* 2002; **32**: 1098–1105.
49. Spellman PT, Sherlock G. Reply: whole-culture synchronization effective tools for cell cycle studies. *Trends Biotechnol* 2004; **6**: 270–273.

50. Johnson RT, Downes CS, Meyn RE. *The synchronization of mammalian cells*. P.Fantes ve P.Brooks Ed. Oxford: IRL Press at Oxford Uni. Press. 1993. pp.1-24.
51. Lalande M. A reversible arrest point in the late G1 phase of the mammalian cell cycle. *Exp Cell Res* 1990; **186**: 332–339.
52. Hoffman BD, Hanauske-Abel HM, Flint A, and Lalande M. A new class of reversible cell cycle inhibitors. *Cytometry* 1991; **12**: 26–32.
53. Watson PA, Hanauske-Abel HH, Flint A, and Lalande M. Mimosine reversibly arrests cell cycle progression at the G1-S phase border. *Cytometry* 1991; **12**: 242–246.
54. Kalejta RF, Hamlin JL. The dual effect of mimosine on DNA replication. *Exp Cell Res* 1997; **231**: 173–183.
55. Soedarjo M, Borthakur D. Mimosine, a toxin produced by the tree-legume *Leucaena* provides a nodulation competition advantage to mimosine-degrading Rhizobium strains. *Appl Environ Microb* 1998; **30**: 1605–1613.
56. Krude T. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp Cell Res* 1999; **247**: 148–159
57. Dai Y, Gold B, Vishwantha JK, Rhode S. Mimosine inhibits viral DNA synthesis through ribonucleotide reductase. *Virology* 1994; **205**: 210–216
58. Wang Y, Zhao J, Clapper J, Martin LD, Du C, Devore ER ve ark. Mimosine differentially inhibits DNA replication and cell cycle progression in somatic cells compared to embryonic cells of *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* 1995; **217**: 84–91.

59. Gilbert DM, Neilson A, Miyazawa H, DePamphilis ML, Burhans WC. Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxynucleotide metabolism. *J Biol Chem* 1995; **270**: 9597–9606.
60. Gilbert DM, Neilson A, Miyazawa H, DePamphilis ML, Burhans WC. Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxyribonucleotide metabolism. *J Biol Chem* 1995; **270**: 9597–9606.
61. Dixon RA, Ferreira D. Molecules of Interest Genistein. *Phytochemistry* 2002; **60**: 205-211.
62. Bektic J ve ark. Molecular effects of the isoflavonoid genistein in prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 2005; **4**: 124-129.
63. Linford NJ, Dorsa DM. 17 beta-Estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. *Steroids* 2002; **67**: 1029–1040.
64. Ho KP, Li L, Zhao L, Qian ZM. Genistein protects primary cortical neurons from iron-induced lipid peroxidation. *Mol Cell Biochem* 2003; **247**: 219-222.
65. Alhasan SA, Ensley JF, Sarkar FH. Genistein induced molecular changes in a squamous cell carcinoma of the head and neck cell line. *Int J Oncol* 2000; **16**: 333–338.
66. Linford NJ, Yang Y, Cook DG, Dorsa DM. Neuronal apoptosis resulting from high doses of the isoflavone genistein: role for calcium and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **299**: 67-75.
67. Peterson G, Barnes S. Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Cell Growth Diff* 1996; **7**: 1345-1351.

68. Peterson G, Barnes S. Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tryrosine autophosphorylation. *Prostate* 1993; **22**: 335-345.
69. Constantinou A, Kiguchi K, Huberman E. Induction of differentiation and DNA stand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res* 1990; **50**: 2618-2624
70. Pagliacci MC, Smacchia M, Migliorati G, Grignani F, Riccardi C, Nicoletti I. Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur.J.Cancer* 1994; **30A**: 1675-1682.
71. Casagrande F, Darbon JM. p21CIP1 is dispensable for the G2 arrest caused by genistein in human melanoma cells. *Exp Cell Res* 2000; **258**: 101-108.
72. Caspersson T, Schultz J. Ribonucleic acids in both nucleus and cytoplasm and the function of the nucleolus. *PNAS* 1940; **26**: 507-515.
73. Van Dilla MA, Trujilo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Cell microfluorimetry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 1969; **163**: 1213-1214.
74. Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol* 2001; **3**: 67-70.
75. Darzynkiewicz Z. Cytometry of the cell cycle: In search for perfect methodology for DNA content analysis in tissue specimens. *Cell Cycle* 2010; **9**: 3395-3400
76. Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol* 2001; **3**: 67-70.
77. Gerke V. Annexins and membrane organization in the endocytic pathway. *Cell Mol Biol Lett* 2001; **6**: 204.

78. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002; **82**: 331 – 371.
79. Comfurius P, Smeets EF, Willems GM, Bevers EM, Zwaal RFA. Assembly of the prothrombinase complex on lipid vesicles depends on the stereochemical configuration of the polar headgroup of phosphatidylserine. *Biochemistry* 1994; **33**: 10319–10324.
80. Chang CP, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ. Contribution of platelet microparticle formation and granule secretion to the transmembrane migration of phosphatidylserine. *Biol Chem* 1993; **268**: 7171–7178.
81. Zhao J, Zhou Q, Wiedmer T, Sims PJ. Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface. *Biol Chem* 1998; **273**: 6603–6606.
82. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, Van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; **182**: 1545– 1556.
83. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; **148**: 2207–2216.
84. Ismail IA, Kang KS, Lee HA, Kim JW, Sohn YK. Genistein-induced neuronal apoptosis and G2/M cell cycle arrest is associated with MDC1 up-regulation and PLK1 down-regulation. *Eur J Pharmacol* 2007; **575**: 12-20.

85. Papazisis KT, Zambouli D, Kimoundri OT, Papadakis ES, Vala V, Geromichalos GD ve ark. Protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, enhances apoptosis and cell cycle arrest in K562 cells treated with gamma-irradiation. *Cancer Lett* 2000; **160**: 107-113.
86. Davis W Jr, Ronai Z, Tew KD. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **296**: 1-6.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fulya	Soyadı	Dal
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	23.03.1986
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	63085026358
Email	fulyadal@hotmail.com	Tel	05445729560

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	Ege Üniversitesi – Biyoloji (İzmir)	2009
Lise	Beyoğlu Anadolu Lisesi (İstanbul)	2004

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	90	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75.177	73.878	63.028
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office 97,07	İyi
ModFit	Orta
Image J	İyi
WinMDI	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Poster Bildirileri

1. H.Akçakaya, S.Tok, **F.Dal**, S.Adın Çınar, R.Nurten. K562 Hücrelerinde H₂O₂ 'nin Oksidatif Etkisinin Belirlenmesi. 22.Ulusal Biyofizik Kongresi. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, Cilt 11, Özel Sayı. P-30. Aydın, 28 Eylül – 1 Ekim, 2010.
2. S.Tok, **F.Dal**, H.Akçakaya, S.Adın Çınar, R.Nurten.β-Karotenin K562 Hücrelerindeki Antioksidan Etkisi. 22.Ulusal Biyofizik Kongresi. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, Cilt 11, Özel Sayı. P-53. Aydın, 28 Eylül – 1 Ekim, 2010.
3. **F.Dal**, H.Akçakaya, S.Tok, S.Adın Çınar, R.Nurten. Eşfazlı K562 Hücrelerinin Elde Edilmesinde Genistein ve Mimozinin Etkisi. 23.Ulusal Biyofizik Kongresi. Trakya Üniversitesi Kongre Özet Kitapçığı P-28. Edirne, 13-16 Eylül, 2011.

Sözlü Sunum

1. S.Tok, H.Akçakaya, **F.Dal**, S.Adın Çınar, R.Nurten. Antioksidan ve Oksidan Etkileşimlerinin K562 Hücrelerinde Farklı Ölüm Süreçlerine Etkisi. 23.Ulusal Biyofizik Kongresi. Trakya Üniversitesi Kongre Özet Kitapçığı P-28. Edirne, 13-16 Eylül, 2011.

Sertifikaları

1. İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, 24 Mayıs – 04 Haziran 2010.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Yüzmek, gitar çalmak, tüplü dalış, kitap okumak, bilgisayar oyunları, teknoloji, mitoloji.