

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**C₆₀ FULLERENE’NİN A549 İNSAN AKCİĞER KANSERİ
HÜCRE HATTINDA OTOFAJİK MARKERLAR ÜZERİNE
ETKİSİ**

YÜKSEKLİSANS TEZİ

Mahmut YILDIRIM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Can Ali AĞCA**

BİNGÖL-2018

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesi, çalışmalarımın düzenlenmesi, yürütülmesi ve bütün tez dönemi boyunca bana rehber olan, yardımını ve ilgisini esirgemeyen, öğrencisi olmakla mutluluk ve onur duyduğum saygıdeğer hocam Dr. Öğr. Üyesi Can Ali AĞCA'ya.

Tezimin deneysel kısmında tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Victor S. Nedzvetsky hocama, Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım ve desteklerini gördüğüm herkese.

Tüm bu süreçleri aşmamda bana gönülden destek olan, yoğun iş ortamına ve aile yaşamımıza rağmen her zaman bana sabreden ve yardımcı olan sevgili eşime ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: BAP-FEF.2017.00.019

Mahmut YILDIRIM

Bingöl 2018

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Nanopartiküller.....	5
1.1.1. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları.....	6
1.1.2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması	8
1.1.3. Nanopartiküllerin İlaç Taşıyıcı Olarak Kullanılması.....	10
1.2. C ₆₀ Fullerene.....	12
1.3. C ₆₀ Fullerene ve Kanser.....	16
1.4. C ₆₀ Fullerene'nin Otofajideki Rolü.....	18
1.5. Akciğer Kanseri.....	19
1.6. A549 Hücresi ve Otofaji.....	20
1.6.1. Otofajinin Moleküler Mekanizması.....	21
1.6.2. Otofajik Hücre Ölüm Yolağı Mekanizmaları	26
2. MATERYAL VE YÖNTEM	28
2.1. Hücre Kültürü.....	28
2.2. Hücre Canlılığı Deneyi.....	28
2.3. ROS Deneyi.....	29
2.4. Western Blot.....	29
2.4.1 Hücre Lizatlarının Hazırlanışı	32

2.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	33
2.4.3. Jellerin Hazırlanması [SDS-PAGE].....	33
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
3.1. C ₆₀ Fullurenin A549 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	37
3.2. C ₆₀ Fullurenin A549 Hücre Hattında ROS Düzeyinin Ölçülmesi	38
3.3. C ₆₀ fullurenin A549 Hücre Hattında Bax Proteinleri Üzerine Etkisi	39
3.4. C ₆₀ fullurenin A549 Hücre Hattında p53 Üzerine Etkisi.....	40
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	A549 hücre hattı.....	3
Şekil 1.2.	Nanomateriyal içeren ürünler ve sayıları).....	5
Şekil 1.3.	Nanomateriyallerin kullanıldığı bazı alanlar.....	7
Şekil 1.4.	Çok Fonksiyonlu Nanopartikül Modeli	8
Şekil 1.5.	Nanomateriyal çeşitler	9
Şekil 1.6.	Bazı nanopartiküllerin nanoskaladaki yeri	10
Şekil 1.7.	Nanopartiküller şekilleri	12
Şekil 1.8.	Fulleren C ₆₀	13
Şekil 1.9.	Karbon atomunun allotropları Karbon atomunun allotropları	14
Şekil 1.10.	C ₆₀ 'ın iki boyutlu (solda) ve üç boyutlu (sağda) yapısı	14
Şekil 1.11.	R. B. Fuller'in Montreal fuarında (1967) yaptığı jeodezik kubbe	15
Şekil 1.12.	Şematik otofaji aşamalarının gösterimi.....	22
Şekil 1.13.	Farklı otofaji türleri	23
Şekil 1.14.	Otofajinin Şematik Modeli	25
Şekil 2.1.	Western blot analizi aşamaları	30
Şekil 2.2.	PVDF membrana jel yerleştirme	30
Şekil 2.3.	Jel kaset sisteminin hazırlanışı	35
Şekil 2.4.	Kaset sisteminin elektroforez için hazırlanması	36
Şekil 3.1.	C ₆₀ fullurenin A549 hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkisi	38
Şekil 3.2.	C ₆₀ Fullurenin A549 Hücre Hattında ROS Düzeyi Sonuçları	39
Şekil 3.3.	C ₆₀ fullu ile tedavi edilen A549 hücre hattında Bax protein düzeyleri.....	40
Şekil 3.4.	C ₆₀ fullurenin A549 Hücre Hattında p53 Üzerine Etkisinin sonuçları..	41
Şekil 3.5.	C ₆₀ fullurenin A549 Hücre Hattında TIGAR Üzerine Etkisinin sonuçları	42
Şekil 3.6.	C ₆₀ fullurenin A549 Hücre Hattında Beclin1 Üzerine Etkisinin sonuçları	43

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Separating (ayırma) jel bileşimi	34
Tablo 2.2.	Stacking (yükleme) jel bileşimi	34

C₆₀ FULLERENE’NİN A549 İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA OTOFAJİK MARKERLAR ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Akciğer kanseri dünyada en sık görülen kanser türüdür. A549 akciğer kanseri hücre hattı, biyoaktif bileşiklerin kemoterapi etkisini incelemek için uygun bir modeldir. Nanopartiküller C₆₀ fullerene, güçlü bir antioksidan olarak kabul edilir ve antikanser aktivitesi gösterir. Karbon nanopartikülleri, fullerenlerin küresel simetrik yapıda birleştirilmiş atomlara sahip olmasından dolayı benzersiz özelliklere sahiptir. Nanopartikül moleküllerinin kendine özgü kimyasal ve fiziksel özellikleri, minimal konsantrasyonlarda bile etkin hareket etmelerini sağlar. Pek çok kemoterapi ajanının aksine fulleren, geniş konsantrasyonlarda normal ve malign olmayan hücreler için toksik değildir. C₆₀ fullerenin kanserdeki etkisi kapsamlı bir şekilde araştırılmasına rağmen, A549 hücre hattında otofaji ve apoptozisin potansiyel regülasyonu ele alınmamıştır. Bu çalışmada C₆₀ fullerenin insan A549 akciğer kanseri hücre hattında apoptoz ve otofaji yolu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. A549 hücreleri 24 saat boyunca farklı ve düşük konsantrasyonlarda (100, 250 ve 500 nM) C₆₀ fulleren ile tedavi edildi. Hücre canlılığı MTT testi ile tespit edildi. ROS seviyeleri DCFD-A testi ile ölçüldü. p53, Bax, Beclin1 ve TIGAR protein ekspresyonlarındaki değişiklikler western blot tekniği ile analiz edildi. MTT ve DCFD-A analizinin sonuçları, düşük dozdaki C₆₀ fullerenin, A549 hücre hattında; hücre canlılığı ve ROS seviyesi üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermiştir. C₆₀ fullerene sahip A549 hücreleri, düşük dozlarda p53, Bax ve TIGAR proteinleri ekspresyon seviyelerinde artışa neden olurken, Beclin1 proteinleri ekspresyon seviyesi konsantrasyona bağlı bir şekilde artmıştır. Genel olarak, bulgularımız suda çözünabilir C₆₀ fullerenin A549 hücrelerinde apoptozisi ve otofajiyi indüklediğini göstermektedir. Bulgularımız akciğer kanseri hücrelerinde C₆₀ fullerenin etki mekanizmalarına ışık tuttuğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: C₆₀, A549, apoptozis, otofaji, akciğer kanseri.

THE EFFECT OF C₆₀ FULLERENE ON AUTOPHAGY MARKERS IN A549 HUMAN LUNG CANCER CELL LINE

ABSTRACT

Lung cancer is the most common type of cancer in the world. The A549 lung cancer cell line is suitable model to study chemotherapy effect of various bioactive compounds. Nanoparticles C₆₀ fullerene are recognized as the power antioxidant and demonstrate anticancer activity. Carbon nanoparticles possess unique properties due to the fact that fullerenes have the atoms combined in spherical symmetric structure. Peculiar chemical and physical properties of nanosized molecules enable them to act effectively in minimal concentrations. In contrast to many chemotherapy agents, this fullerene is absolutely non-toxic for a normal non-malignant cell in a wide range of concentrations. Despite the fact that, the effect of C₆₀ fullerene in cancer has been extensively studied, the potential regulation of autophagy and apoptosis has not been addressed in A549 cell line. Therefore, we investigated the effect of C₆₀ fullerene on apoptosis and autophagy pathway on human A549 lung cancer cell line. A549 cells were treated with different low concentrations (100, 250 and 500 nM) C₆₀ fullerene for 24 hours. Cell viability was detected by MTT assay. ROS levels were measured by DCFDA assay. The changes of p53, Bax, Beclin1 and TIGAR protein expressions were analysed by western blotting. The results of MTT and DCFDA assay showed that low dose C₆₀ fullerene has no effect on cell viability and ROS level in A549 cell line respectively. The treatment of A549 cells with C₆₀ fullerene caused p53, Bax, and TIGAR proteins expression level increase in lowest dose, while Beclin1 protein expression level increased in a concentration-dependent manner. Overall, our findings have suggested that water-soluble C₆₀ fullerene induces apoptosis as well as autophagy in A549 cells. Our findings shed light on the mechanisms of C₆₀ fullerene effect in Lung cancer cells.

Keywords: C₆₀, A549, apoptosis, autophagy, lung cancer.

1. GİRİŞ

Nanopartiküller boyutları 1 ile 100 nm arasında değişen, kendine has fiziksel ve kimyasal özellikleri olan maddeleri ifade eder (Ying et al. 2013). Richard Feynman ilk kez 1959 yılında “nanobilim” kavramını ortaya atmıştır. Bu nanopartiküllerin günümüzde üretilen ticari ürünlerden üstün ve kaliteli özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Sıkça dile getirilen nanopartikül yapıların çekiciliğinin günümüzde bilinen özellikleri ise; kuantum boyut yapıları, atomlarının farklı yüzey karakterleri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı ve üstün yüzey/hacim oranı ile ön plana çıkmaktadır (Liveri 2006). Nanopartikül sentezi özellikle bu yapıların ortaya koyduğu üstünlükler sebebiyle ilaç taşıyıcılar, aşınmaya karşı yeni ürünler, özel tanı ve tedavi cihazları gibi birçok teknolojik ve farmakolojik malzemelerin üretilmesinin yolunu açmıştır (Goldstain 1997, Liveri 2006).

Karbon nanopartiküller morfolojide, kimyasal ve fiziksel özelliklerde veya oluşumlarda daha fazla çeşitlilik gösterir. Fiziksel nitelikleri, karbon nanoparçacıkların doku ve hücre ile farklı etkileşimini, kovalent bağ ve kovalent bağ olmayan yapılarıyla kimyasal özelliklerini, yüzeydeki yüklerini değiştirmelerini, floresan odaklama moleküllerini, hastalıkları ve hücrespesifik hedefleme moleküllerini, kontrast ve manyetik ajanlarını tanımasını sağlar (Baldrighi et al. 2016). İnorganik ve organik maddelerden sentezlenen nano materyaller, uygulanan ilaçların etkisini arttırmak, bu ilaçların terapötik etkinliği ve sistemik yan etkisini azaltmak sebebiyle geliştirilmiştir (Panzarini et al. 2013). Fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, nanomateriyaller endüstride ve araştırma alanında daha yaygındır (Ying et al. 2013). Karbon nano malzemeler içi boş, helezon, daire ve daha hassas atom bazlı bileşimlerdir (Baldrighi et al. 2016).

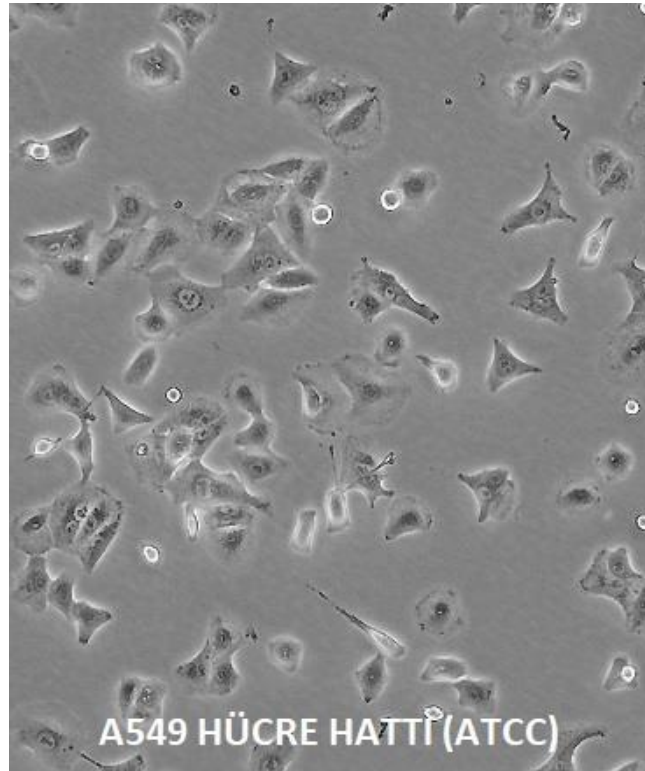
C₆₀ fullerene nanopartikülleri veya diğer adıyla Buckminster fullerene ilk defa 1985 yılında Kroto ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Karbon (C) atomunun doğal üçüncü allotropu olan Buckminster fullerene, 60 karbon atomunun birbirine bağlanarak

meydana getirdiği kafesli bir yapıya sahiptir (Andrievsky et al. 2009). Bugün C_{60} fullerenler birçok alanda, tüketici ürünlerinde ve özellikle tıp alanında yoğun kullanıma sahip olduğu bildirilmiştir (Fujitani et al. 2008). C_{60} fullerenler atıl bir gaz alanında grafitin buharlaştırılıp tekrar soğutulması ile oluşturulmaktadır. Kroto et al. Grafitin lazer ile buharlaşma işlemine tabi tutulması sonucunda C_n kümelerinin meydana geldiğini belirtmektedirler (Kroto et al. 1985). C_{60} molekülü fullerenler arasındaki en kararlı yapıya sahip olanlardan biridir. sp^2 hibritleşmesi ile 12 beşgen ve 20 altıgenden oluşmaktadır. Her bir beşgenin çevresi altıgenler ile her bir altıgenin ise 3 beşgen ve 3 altıgenle sarıldığı bildirilmiştir (Greg 2013).

Akciğer kanseri dünyada halen kanser sebebiyle ölümler arasında ilk sırada bulunmakta ve her sene yaklaşık 1,2 milyon kişiye yeni akciğer kanseri teşhisi konulmaktadır (Öztop 2009). Akciğer kanseri günümüzde prostat kanserinden sonra en çok görülen kanser türüdür. Akciğer kanseri, kansere bağlı ölümlerinin yaklaşık olarak üçte birini oluşturmakla birlikte insidans hızı 75 yaşından sonraki yaşlarda uç noktaya ulaşmakta olan kanser türüdür. Bu vakaların %90'ından fazlası erkek hastalarda görüldüğü rapor edilmiştir (Williams 1992). Akciğer kanserinin oluşumunda %94 oranında sigara sorumludur. Sigara içenlerin akciğer kanseri riskini sigara içmeyen kişilere göre ortalama 30 kat arttırmaktadır. Sigara bırakıldıktan sonrasında ise akciğer kanserinin gelişme riski, 15 yıl sigara kullanmayan bir bireyin seviyesine yakın seviyede bir risk oranına sahip olmaktadır. Sigara pasif içicilerin akciğer kanserine yakalanma riskini ortalama iki kat arttırmaktadır (Aydiner vd. 2010). Sigara içme dışında etkili faktörler olarak belirtilen yaş, cinsiyet, ırk, meslek, diyet, hava kirliliği, radyasyon ve geçirilmiş akciğer hastalığından dolayı doku bozukluğu, viral enfeksiyonlar, immünolojik ve genetik faktörlerin tamamı ancak %6 oranında etkili olduğu gözlenmektedir (Alar et al. 2012). Ülkemizde ilk beş kanser türü ile dünyada ve diğer gelişmiş ülkelerdeki ilk beş kanser türünün benzerlikler gösterdiği görülmektedir. Erkeklerde gırtlak, bronş ve akciğer kanseri (60,4/100000 kişide), kadınlarda ise ilk sırada meme kanseri (46,8/100000 kişide) en sık rastlanılan kanser türleridir (Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2015).

A549 hücresi, insan akciğer alveolar ana hücreleridir. Bu hücre tipi ilk defa 1972'de D. J. Giard ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir (Giard et al. 1973). A549 hücre hattı, hücrelerin alveollerine su, elektrot gibi bazı maddelerin difüzyonunda rol almaktadır.

A549 hücreleri in vitro koşullarda yüzeye yapışarak çoğalmaktadır. Hücreler yüksek seviyede doymuş yağ asidi ve lesitin sentezlediğinden dolayı, hücre membranındaki fosfolipidlerin korunmasını sağlamaktadır. Bu sebeple hücre dirençli bir konum kazanmaktadır. A549 hücre hattı ilaç metabolizması uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (O'Brien et al. 1987). A549 (ATCC) hücre hattı (Şekil 1.1) gösterilmektedir.



Şekil 1.1. A549 hücre hattı (Web 2018 ATCC)

Otofaji, insandan mayalara kadar tüm çekirdekli hücrelerde işlev gösteren ve hücre içi dengenin sağlanmasında kritik öneme sahip olan bir hücresel yıkım yolağıdır. Hücresel yıkım işlevini yapabilmek için 30'dan fazla otofaji ile ilişkili proteininin uyum içerisinde çalışması gerekir (Mizushima et al. 2011). Hücre içi şeker, yağ ve uzun ömürlü proteinler ile hastalık bağlantılı veya yanlış katlanmış bir mutasyon sonucu çökelti oluşturmuş proteinlerin yıkımı da otofajiye bağlıdır. Otofaji, ayrıca hücre içi parazitler, endoplazmik retikulum ve mitokondriler gibi organellerin sindirilmesini ve kalite kontrolünü sağlar (Mizushima et al. 2005, Mizushima et al. 2008, Yang et al. 2010). Bu önemli hücresel yıkım mekanizması basamak basamak gerçekleşir. İlk olarak otofajik keseciğin

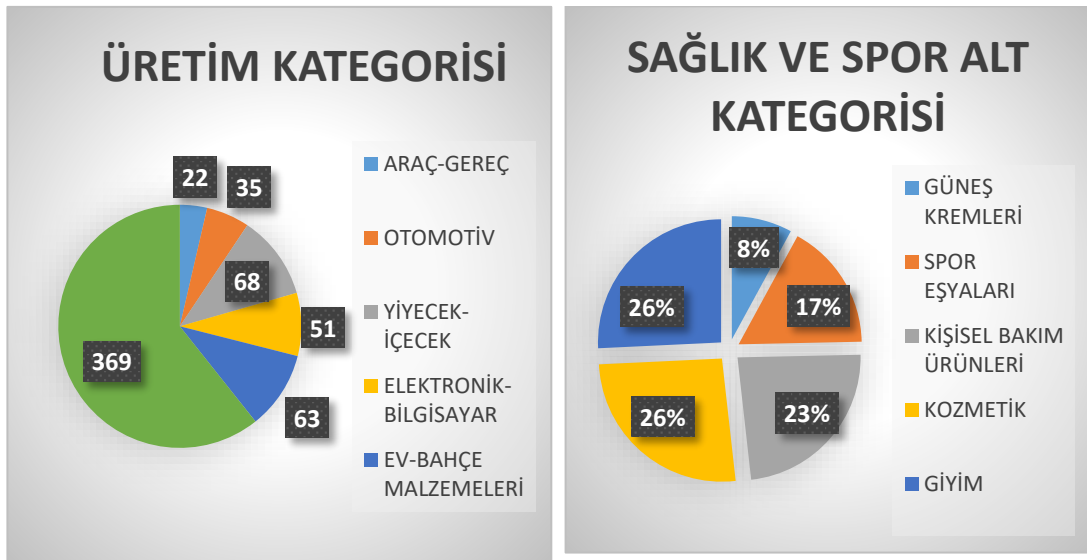
(otofagozom) çekirdeklenmesi, otofajik zarların uzaması ve bu yıkıma uğrayacak hedeflerin zarlar ile çevrenmesi sonucunda, otofagozomlar lizozomlarla birleşerek lizozom enzimleri yardımıyla hücrel yıkım gerçekleşmektedir (Mizushima et al. 2011).

Otofaji, esas olarak hücre içinde atıkların yıkılmasında ve bu atıkların geri çevirimin hücreye katkı sağlanmasında rol alır. Hücrede gerçekleşen bu geri dönüşüm, tüm hücrel homeostazinin devamlılığı için önemlidir. Ancak hasarlı hücrel içerikleri olan hücreler, hücre bölünmesi esnasında bir kısım seyrelebildiklerinden, otofaji örneğin sinir hücreleri gibi tamamen farklılaşmış ve aslında bölünmeyen bu hücrelerde daha büyük bir önem arzeder. Açlık, hipoksi, oksijen stresi, enflamasyon ve endoplazmik retikulum stresi gibi koşullarda hücre için zararlı durumlarda; besinlerin geri dönüşümünü yaparak hücre metabolizmasına yeni yapı taşları ve enerji olanakları sağlar. Böylece hücrelerin zor koşullara uyum sağlamalarını ve hayatta kalmalarında rol almaktadır (Singh et al. 2011). Bütün bu fonksiyonlarından dolayı, normal koşullarda ve stres koşullarında, otofaji mekanizmasının nasıl çalıştığının anlaşılması, hem hücre ve organizmanın fizyolojisi, hem de hastalık biyolojisi bakımından önemlidir. Otofaji mekanizmalarındaki en küçük anormallik, metabolik hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, enfeksiyonlar ve birçok hastalığın gelişimini ve seyrini etkileyebilmektedir (Herskho et al. 1998).

Günümüzde memelilerde üç tür otofaji tipi tanımlanmıştır. Bunlar makrotofaji, şaperon aracılı otofaji ve microtofaji türleridir (Kolionsky et al. 2014). Makrotofaji üzerinde en çok çalışılmış ve günümüzde moleküler ayrıntılarının en fazla aydınlatıldığı otofaji türüdür. Otofaji yolağı, sitoplazmanın yıkıma uğrayacak bölümünün ya da hedeflerin otofagozom veya otofajik kesecikler tarafından çift zarlı yapılarla çevrenmesi ile başlar. Otofajik hedef lizozoma ulaştırılır ve otofagozomun dış zarı lizozom zarı ile birleşerek otolizozomu oluşturur. Lizozom içerisinde var olan hidrolazlar, otolizozom için bu kargoyu yapı taşlarına dönüştürerek sitoplazmaya geri gönderirler (Kolionsky 2007). Otofaji, ayrıca patojen enfeksiyonu, besin azalması, hipoksi ya da reaktif oksijen türleri (ROS) gibi hücrel stres ile uyarılabilir. Hücrenin zor şartlara uyumunu sağlayan bu fonksiyonu ile yaşamsal organları tüketerek ölüme sebep olmaktadır. Kontrolü bozulduğunda ise erken bunama, bazı kalıtsal hastalıklar, Alzheimer, enfeksiyonlar ve kanser oluşumuna neden olmaktadır (Galluzi et al. 2012).

1.1. Nanopartiküller

Nano kelimesi Yunanca'da cüce manasına gelen nanos'tan türemiştir. Nanoteknoloji terim olarak 1-100 nanometre (nm) olan materyallerin tasarımı, işlenmesi, üretimi, montajı ve yapısal özellikleri gibi evreleri ifade etmektedir. Nanoteknoloji, nanomateriyallerden üretilen minyatür ve fonksiyonel sistemlerin uygulamalarını, bilimler arası araştırma ve geliştirme çalışmalarını incelemektedir (Hoyt et al. 2008). Nanoteknoloji dünyası, uzay mühendisliğinden, nanoelektronığa ve medikal malzemeden çevre ıslahına kadar birçok alanda kullanım potansiyeline sahip olup bilim ve teknoloji alanında önemli avantajlar sağlayarak, hızla gelişmeye devam etmektedir. Nanomateriyallerin insanlık için yararlı, kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle yeni mühendislik ürünü nanomateriyallerin ortaya konulması ve geliştirilmesi açısından nanoteknoloji endüstrisinde önemli bir konuma sahip olmuştur. 2009 yılında yapılan araştırmalarda 800'ün üzerinde ürünün nanomateriyal içerdiği ortaya konulmuştur (Singh et al. 2009) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Nanomateriyal içeren ürünler ve sayıları (Singh et al. 2009)

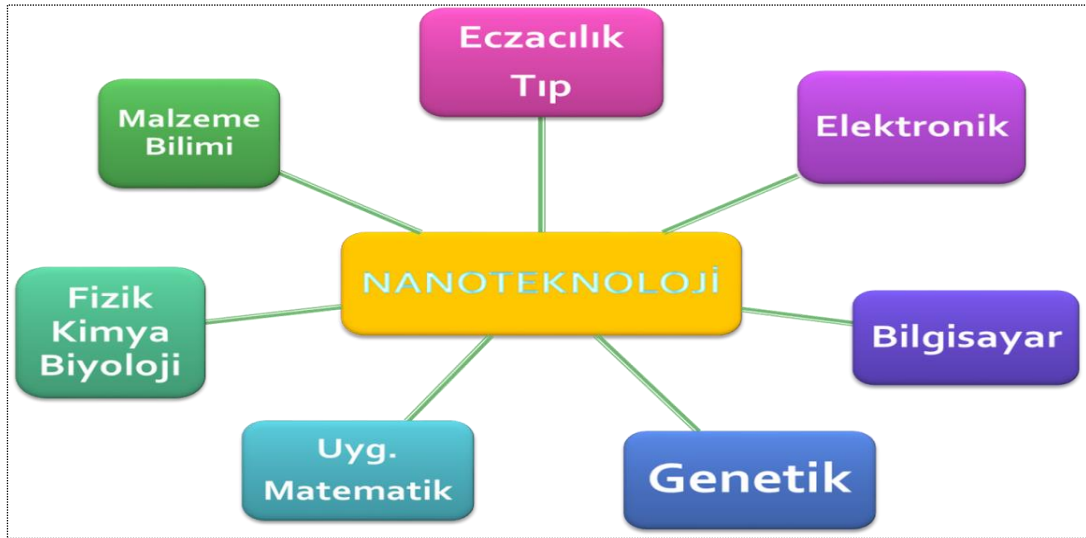
Biyoloji biliminin nanoteknoloji ile geçmişi üç milyar yıldan fazla olduğu düşünülüyor. Çünkü ilk hücresel canlıdan günümüze yaşamsal faaliyetleri yürütme amaçlı nanometre boyutunda türlü hücresel yapıların, hücre içerisinde imal edildiği bilinmektedir. Hücresel yapıları yukarıda yapılan tanımlamalara uyarladığımızda, bu komponentlerin yani

organellerin hücre canlılığını sürdürmek için özel görevleri olduğu anlaşılmaktadır. Doğal ortamda birçok benzer olayla karşılaşmak mümkündür (Goorsell 2000, Yılmaz 2006). Nanomateriyallerin bir çeşidi olan nanopartiküller, genel olarak modern bilimin buluşlarından biri olarak görülse de aslında çok daha fazla bir geçmişe sahiptir. 9. yy'da Mezopotamya'da sanatkarlar çanak ve çömlekleri parlatmak amacıyla nanopartiküllerden yararlanmışlardır. O dönemde bakır ve gümüş tuzlarını oksitlerle birlikte sirke, toprak boyası ve kil karışımına eklemişler ve bu karışımı önceden sırlanmış çömlek yüzeyine uygulamışlardır. Daha sonra bu çömleği 600 °C'de fırınlayarak çömlek yüzeyinde renk veren ve optik özellikler gösteren bu nanopartikülleri elde etmişlerdir (Rawson, 1984). 1970'li ve 1980'li yıllarda, Amerika ve Japonya'da nanopartiküllerle ilgili ilk esaslı çalışmalar yapılırken, nanopartikül terimi yerine daha çok küçük parçacıklar anlamına gelen Ultrafine Particles (UFP) terimi kullanılmıştır. Bununla birlikte 1990'larda, Amerika'da "Ulusal Nanoteknoloji Girişimi Programı" faaliyete geçmeden önce nanopartikül teriminin kullanımı daha fazla rağbet görmüştür (Kiss et al. 1999, Buzea et al. 2007).

1.1.1. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

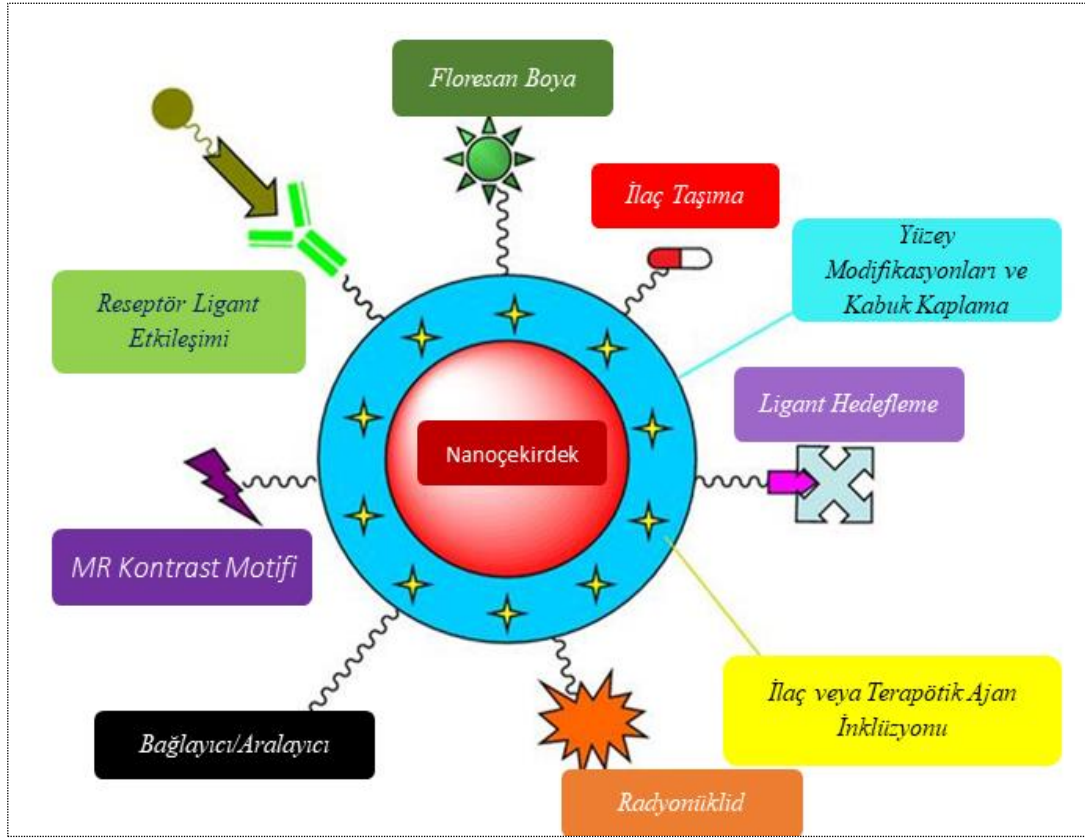
Nanomateriyaller boyutlarından dolayı, elektronik, fotonik, manyetik, yapısal ve mekanik niteliklerinde makroskopik ölçekten farklılık gösterirler. Bu farklılığın nedenleri ise, yüksek yüzey/hacim oranları ve nano boyutlu yapılarında ortaya çıkan kuantum etkileridir. Bu kuantum özelliklerinden dolayı nanoteknoloji, bilimin tüm alanlarında kullanılmaktadır. Arıtma, remediasyon, nanosensörler gibi çeşitli çevre uygulamalarında da nanoteknoloji son yıllarda hızlı ve başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Kaplan et al. 2007). Atmosferde bulunan nanopartiküller doğal ya da insan kaynaklı olarak istenmeden üretilebilmektedir. Yangın, erozyon ve volkanik faaliyetler gibi doğal olaylar nanopartikül oluşumuna yol açabilmektedir. Airborne Particles Expert Group'un United Kingdom'daki 1996 yılı raporuna göre istenmeden üretilen primer nanopartiküllerin %60'ı karayolu taşımacılığı ile %23'ü ise endüstriyel ve ticari üretim, enerji üretimi ve evsel ısınma süreçlerinde yanma ürünü olarak ortaya çıkmıştır. Diğer taraftan onlarca endüstri sektörü ticari amaçla birçok nanopartikül üretmekte ve bunlar pigment, reçine ve kozmetik gibi alanlarda kullanılmaktadır. Gün geçtikçe nanopartiküllere dayalı yeni ürünlerin üretimi artmaktadır. Özellikle imal edilen nanopartiküller ve bunlara dayalı

ürünler risk analizinin öncül hedefleri olmaktadır (Robbins et al. 2006). Nanoteknoloji ürünü olan nanomateriyallerin ve nanopartiküllerin kullanıldığı bazı alanlar Şekil 1.3'te gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Nanomateriyallerin kullanıldığı bazı alanlar

Nanoteknolojinin sağlık alanında kullanımı tanı, tedavi ve teşhis gibi alanlarda faydalı olmuştur. Bu amaçla geliştirilen nanotüpler, nanokablolar, minyatür cihazlar ve diğer malzemeler bir biosensör içerisine yerleştirilebilmektedir. Bu cihazların hücre içi görüntülemeleri teşhis ve tedavi aşamalarındaki faydaları bakımından nanopartiküllerin ve nanoteknolojinin yeni bir alan oluşturduğu söylenebilir. Günümüzde en iyi görüntü potansiyeli olarak kuantum tanecikleri ve manyetik nanopartiküller görülmektedir. Ortaya çıkan sağlık sorunlarının tedavisi bakımından nanoteknolojinin incelenmesi ve bununla birlikte nanoterapi fikrini ortaya çıkarmaktadır. Nanoterapide amaç ilacın dağılımının iyi olması, gen tedavilerinin ve kanser tedavilerinin daha sağlıklı yapılabilmesidir. Şekil 1.4'de etkinlik alanının genişliğini ortaya koyan bir nanopartikül modeli gösterilmektedir (Zhe Liu et al. 2010).



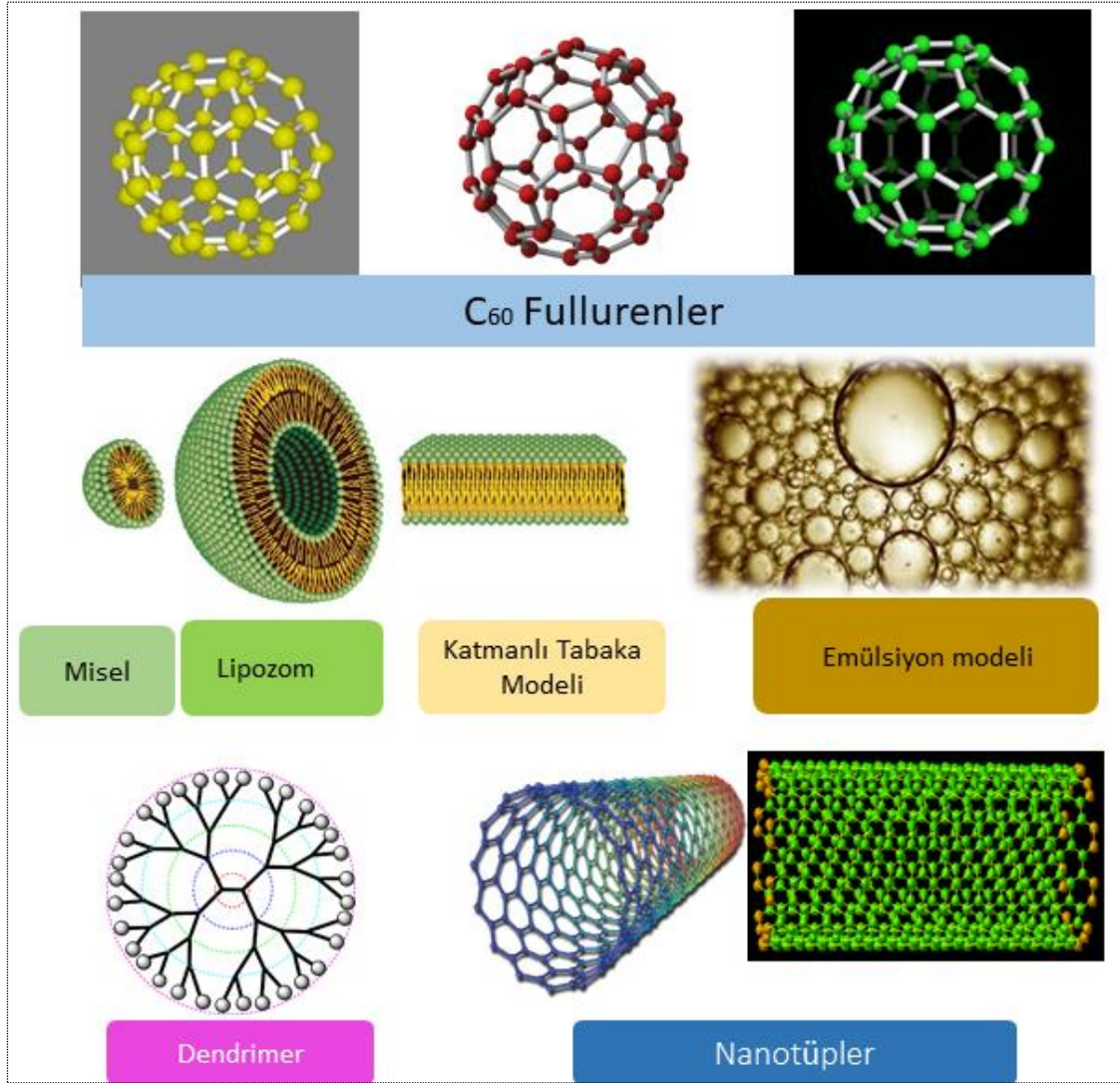
Şekil 1.4. Çok Fonksiyonlu Nanopartikül Modeli (Zhe Liu et al. 2010)

1.1.2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Nanomateriyallerin içerisinde nanopartiküller, nanofiberler, nanotüpler ve nanokompozitler yer almaktadır (JA Borm, Robbins et al. 2006). Amerikan Çevre Koruma Örgütü (USEPA) nanomateriyalleri,

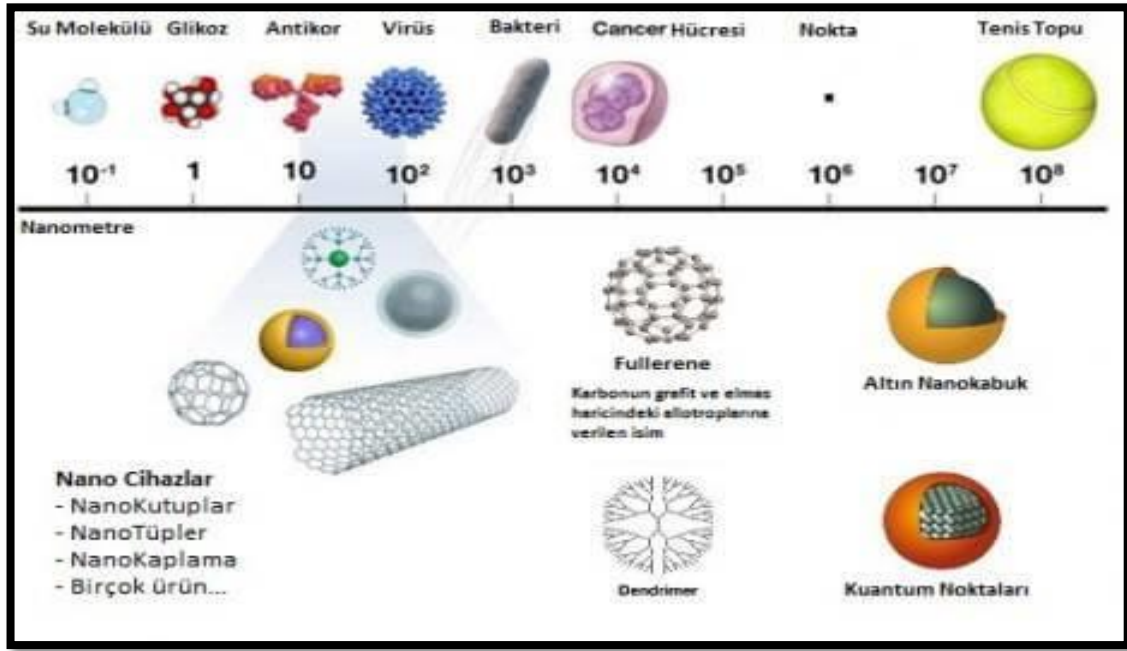
- 1) Karbon bazlı nanomateriyaller (karbon nanotüpler ve fullerenerler),
- 2) Metal bazlı nanomateriyaller (nanogümüş, nanoaltın, TiO₂, metal oksitler),
- 3) Dendrimerler (nano esaslı polimer),
- 4) Nanokompozitler olmak üzere 4 ana kısma ayırmıştır.

Belli başlı bazı nanomateriyaller Şekil 1.5'te gösterilmektedir.



Şekil 1.5. Nanomateriyal çeşitleri (Web 2018)

Nanomateriyallerin önemli bir kısmını oluşturan nanopartiküller 1-100 nm büyüklüğündeki nanomateriyallerdir. Nanopartiküller amorf, kristalin, sferik, iğneli vs. şekillerde olabilirler ve 1-100 atom ya da molekülden oluşurlar (EPA Partikül boyut terminolojisi). Bazı nanopartiküllerin nanoskaladaki yeri ise şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Bazı nanopartiküllerin nanoskaladaki yeri (Web 2018)

1.1.3. Nanopartiküllerin İlaç Taşıyıcı Olarak Kullanılması

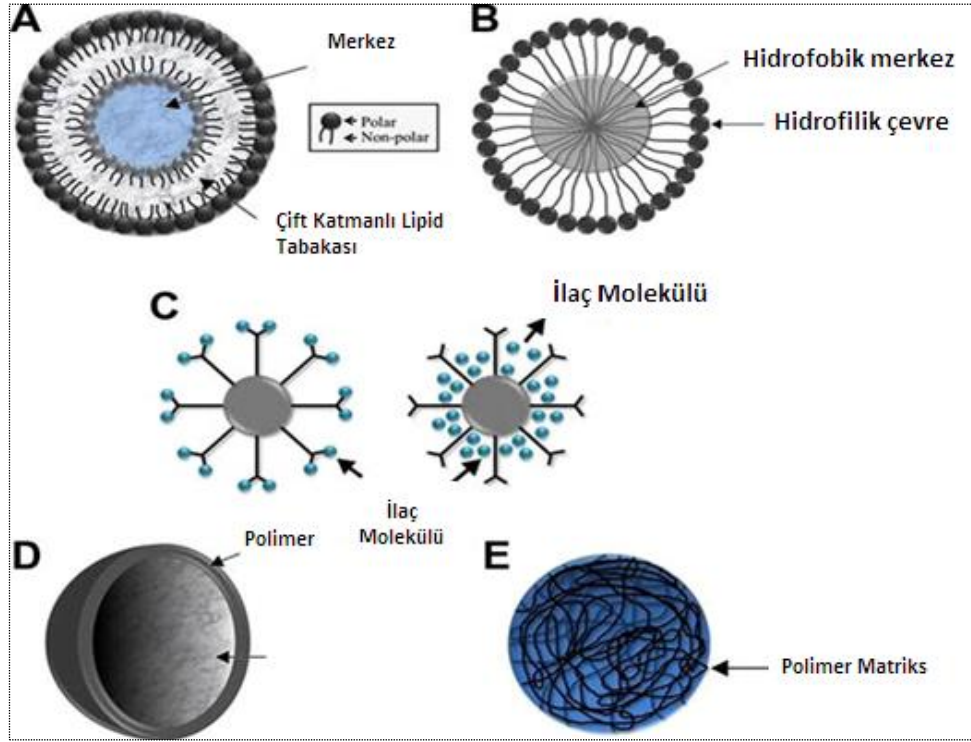
Nanopartiküller boyutları 10-1000 nm arasında olan parçacıkların dağılması veya katı parçacık olarak tanımlanmaktadır. İlaçlar nanopartiküllerin içerisinde çözülebilir, saklanabilir, emdirilebilir veya kapsül formuna konulabildiği rapor edilmiştir (Brigger et al. 2002). Preparatın hazırlama şekline göre nanopartiküller, küre, kapsül formatında nanoilaçlar elde edilebilmektedir. Nanokapsüller içi ilaçla doldurulmuş fincan şekline benzeyen vezikül sistemleridir. Bu sistemde ilaç vezikül içerisinde bir polimer zar ile kaplanır, nanoküre formatında hazırlanan ilaçlar ise yüzey alanında bulunan matriks yapılar olup, ilaçlar hazırlanan nanoküreler içerisine düzgün olarak dağıtıldığı belirlenmiştir (Brigger et al. 2002). Günümüzde artık biyolojik olarak parçalanabilen polimer esaslı nano yapılar ilaçların dolaşımında uzun süre kalmalarını sağlamalarından dolayı polietilen glikol ve suya karşı ilgisi olan polimerlerle yani hidrofilik polimerlerle, gen tedavilerinde DNA taşıyıcısı rolü almaları peptid, protein ve genleri istenilen organa yönlendirmeleri açısından yeni ilaç taşıyıcı sistemler olarak değerlendirilmektedirler (Langer 2000, Lee et al. 2005). Nanopartiküllerin bu sistemler için seçilmesindeki temel amaç; boyutları, yüzey nitelikleri ve etkin ilaç taşıma ve salınımını kontrol ederek tasarlanan organa veya bölgeye en ideal dozda ilacın gönderilmesi ve bu ilaca bağlı

olarak en az yan etkinin oluşmasının sağlanmasıdır. İlaçların zararlı etkilerinden hedeflenen organın ve sistemlerin korunması açısından lipozomlar ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmalarına rağmen, enkapsüle edilmelerinin zorluğu, saklama koşullarının sınırlılığı gibi nedenlerle yararlanımı fazla olmayan sistemlerdir. Bununla beraber nanopartiküller lipozomlarla kıyaslandığında bazı özel avantajlarının olduğu bilinmektedir. İlaçların protein stabilitesinin artışı ve ilacın kontrollü bir şekilde istenilen organa gönderilmelerini sağlamaktadırlar (Vila et al. 2002, Mu et al. 2003).

İlaç taşıyıcı sistemlerde nanopartiküllerin kullanılmasının yararları

1. Nanopartiküllerin parçacık büyüklükleri ve genel yapıları itibariyle ilaç taşıyıcı sistemlerde aktif ve pasif olarak kullanılmaktadır (Gelperina et al. 2005).
2. Hazırlanan ilaçların hedeflenen organa kontrollü salınımı, salınımı sonrasında ilacın organda kalım süresinin uzatılmasını sağlamaktadır (Singh et al. 2009).
3. İlaçların etkinliğinin korunması, ilaçların kimyasal reaksiyonlara maruz kalmadan istenilen organlara gönderilmesi nanopartiküller sayesinde sağlanabilir. Kontrollü ilaç gönderimi ve partikül özelliklerinin ilaç yüzeyinde ayarlanması, ilaçların etkinliğinin korunması açısından önemlidir (Singh et al. 2009).
4. Nanopartiküllerin üzerlerine yeni bileşenler ekleyerek veya manyetik hedefleme yapılarak istenilen bölgeye ilaçların gönderimi sağlanabildiği belirlenmiştir (Singh et al. 2009, Wang et al. 2010).
5. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, ağızdan, burundan veya damar içi uygulamalar için kullanılabileceği rapor edilmiştir (Agnihotri et al. 2004).

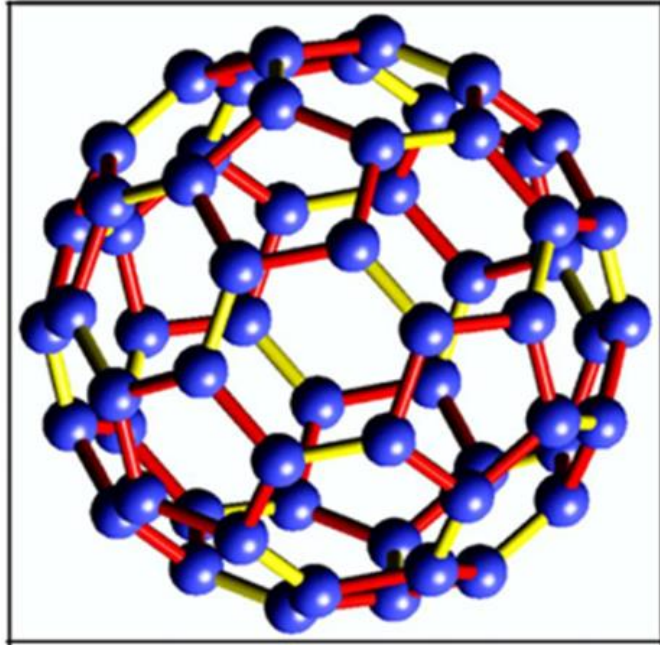
Nanopartiküllerin farklı yapıları ve üstün kimyasal özellikleri sebebiyle ilaçların taşınmasında dikkat çekmektedirler (Liechty et al. 2012). Nanopartikül yapıların farklılığı ve bu yapılarının farklı taşıyıcılarla özel uygulamaları sayesinde ilacın hedefe uygun biçimde ulaşmasına olanak tanımaktadır. Nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemler içerisinde sıklıkla kullanılanlar; miseller, lipozomlar, dendrimerler, nanokapsüller ve nanokürelerdir (Steichen et al. 2012) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Nanopartiküller şekilleri: A- lipozom, B- misel, C- Fonksiyonel hale getirilmiş (solda) ve İlaç yüklenmiş hali (sağda) dendrimerler, D- Nanoküre E- Nanokapsül (Steichen et al. 2012)

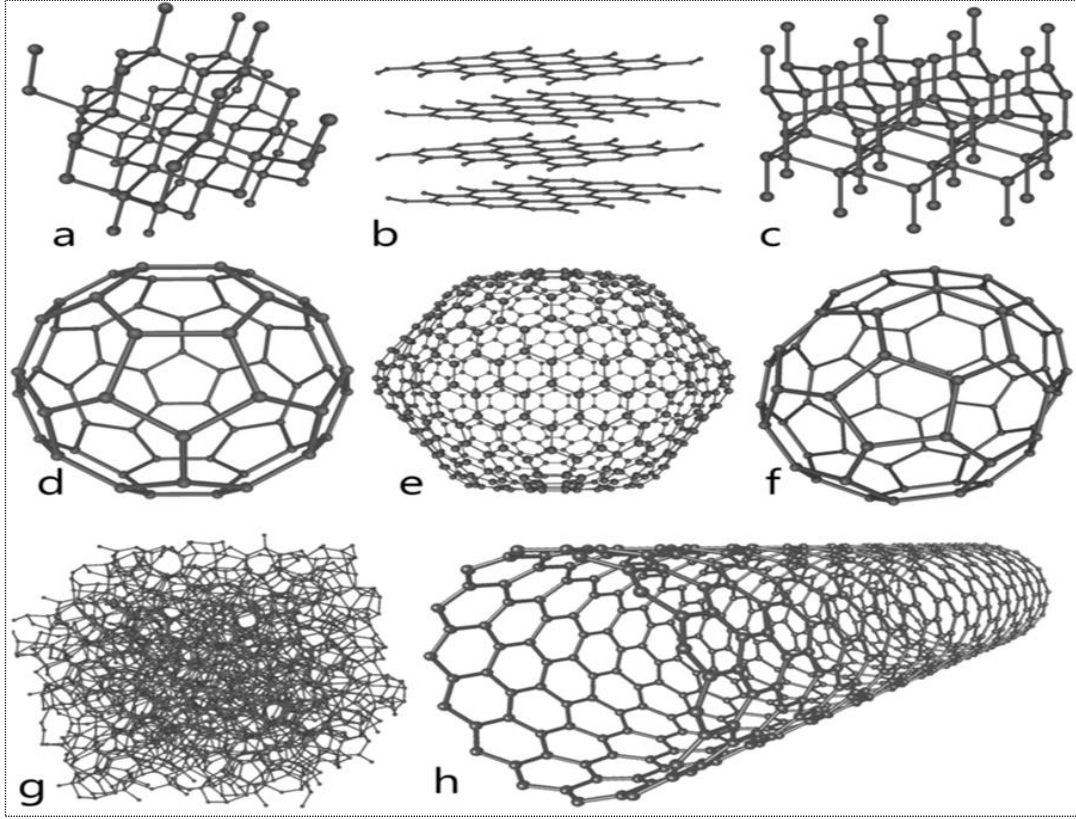
1.2. C₆₀ Fullerene

C₆₀ fulleren çapı 7-100 nm olan içi boş bir kafes olup, yüksek molekül ağırlıklı iki lipid tabakalı bir hücre zarında çözünebilir yapıdaki nanopartikül olarak tanımlanmaktadır (Zhou 2013). Fullerene Eylül 1985'te Huston'da Rice Üniversitesi'nden Richard Smalley, Robert Curl ve Harry Kroto tarafından deneysel olarak keşfedilmiştir (Ulloa 2013). Fulleren ilk karbon nanoparçacıktan izole halde ve daha kararlı bir karbondur. C₆₀ fulleren reaktif oksijen türleri ve reaktif oksijen türlerine karşı indükleyici, bozulmadığı ve koruyucu olduğu belgelenmiştir. Bozulmamış C₆₀'ın toksisitesi organik çözücü ile birlikte veya yüzey aktif madde ile artar. C₆₀'ın kimyasallara karşı olan yüksek afinitesi, biyolojik hücre zarına nüfuz etmesine ve sitosol içindeki metabolik sürece müdahale etmesine izin verir. Ek olarak C₆₀ birçok tip dokuya, nöron hücrelerine nüfuz edebilir ve beyin gibi bazı organlarda birikebilir. Fulleren nanopartiküller nöron koruyucusu ve antioksidan görevi görür (Baldrighi et al. 2016).

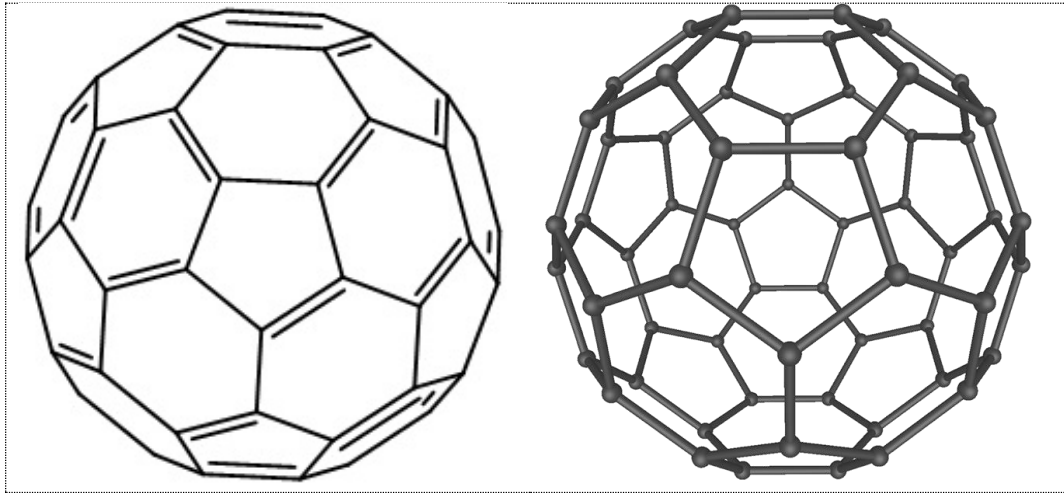


Şekil 1.8. Fulleren C_{60} (Ulloa 2013)

Fullerenler, Karbon (C) atomunun üçüncü doğal allotropları olup kapalı kafes şeklindeki yapılardır. Karbon atomunun allotropları şekil 1,9'da gösterilmiştir. Kroto ve arkadaşları tarafından 1985 yılında keşfedilen fullerenler atıl bir gaz alanında grafitin buharlaştırılıp soğutulması ile oluşturulmuştur. Kroto ve arkadaşları, grafitin lazer ile buharlaştırılması sonucunda C_n kümelerinin oluştuğunu görmüştür (Kroto et al. 1985). Ortaya çıkan karışımdaki karbon birikimlerinin dağılımı kütle spektrometresi ile incelenmiş ve bu inceleme sonucunda C_{60} ile C_{70} oranının fazla olduğu tespit edilmiştir. C_{60} bütün fulleren çeşitleri arasında en fazla görülen türdür. Şekil 1.10'da C_{60} 'ın iki ve üç boyutlu yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Karbon atomunun allotropları Karbon atomunun allotropları a) Diamant, b) Grafit, fulleren, f) C70 fulleren, g) Amorf karbon, h) Tek duvarlı karbon nano c) Lonsdaleite, d) C₆₀ Tek duvarlı karbon nano fulleren, e) C540 fulleren tüp (SWCNT)



Şekil 1.10. C₆₀'ın iki boyutlu (solda) ve üç boyutlu (sağda) yapısı

C_{60} 'ın isminin Buckminster Fullerenol olarak adlandırılması temelinde 1967 yılında Amerikalı Richard Buckminster (mimar) Montreal fuarında jeodezik bir kubbe inşa ederek, kubbenin şekli C_{60} Fullurene benzediği için araştırmacılar bu yeni şekli Buckminster Fulleren olarak adlandırmışlardır (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. R. B. Fuller'in Montreal Fuarı'nda 1967'de yaptığı jeodezik kubbe (Web 2018)

Buckminster fullerenler, 60 karbon atomunun $sp^{2,5}$ bağlarıyla birbirine bağlanarak oluşturduğu, 12 pentagon ve 20 hekzagondan meydana gelen otuziki yüzlü bir yapıya sahip, psuedo aromatik moleküllerdir. Pentagonlar arasında $C5-C5$ tek bağları, hekzagonlar arasında ise $C5 = C6$ çift bağları bulunmaktadır. Buckminster fullerenler yaklaşık olarak 1 nm çapında olup trunkat ikozahedral simetri gösterir ve bu şekliyle bir futbol topuna benzetilir. Buckminster fullerenler futbol topuna benzediği için Buckyballs olarak adlandırılırlar (Andrievsky et al. 2009).

Rusya'daki Shunga Karelia bölgesi civarında fullerenlerin doğal olarak oluştuğu görülmüştür. Shungit denilen son derece mertamorfoza uğramış bir kömürde ve Fulgurit denilen yere yıldırım düştüğünde oluşan camı bir taşta bir miktar fulleren bileşiği tespit edilmiştir (Buseck et al. 1992, Daly et al. 1993). Bunun dışında yaklaşık 65 milyon yıldan 2 milyar yıla kadar uzanan bir süreç içerisinde meteor yağmurları ve kuyruklu yıldız çarpışmaları ile dünya dışı fulleren taşınımının olabileceği ve yine çarpışmanın etkisiyle oluşan ortamda fulleren bileşiklerinin meydana gelebileceği gibi bazı görüşler de ileri sürülmektedir (Becker et al. 1996).

1.3. C₆₀ Fullerene ve Kanser

Nanomalzemeler, bilimsel ve tıbbi araştırmacıların dışsal boyutları, daha büyük kimyasal ve fiziksel aktiviteler göstermeleri nedeniyle geniş bir uygulama alanına sahiptirler (De Stefano et al. 2012). Yüksek oranda yüksek raf ömrü ve sağlıklı olmayan hücreler tarafından hızla alınma oranları ile dikkati çekmektedirler. Fullerene C₆₀'ın güçlü bir antikanser, sitoprotektif ve sitotoksik etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Panzarini et al. 2013). Fullerene C₆₀'ın düşük konsantrasyonda normal hücreler ve doku üzerinde etkisinin olmadığı, serbest radikal temizleyici, antioksidan potansiyeli ve doksorubisinin indüklediği kronik kardiyotoksisite ve hepatotoksisiteye karşı koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür (Prylutska et al. 2014). Özellikle nanokristalin C₆₀'ın oksidatif strese bağlı dirençli gliomaya karşı kemoterapide sitotoksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Panzarini et al. 2013). Fullerenler, küresel şekli ve bir nanometre boyutu nedeniyle ilaç tasarımı için daha önemlidir. Ayrıca, biyolojik olarak fullerenler etkili antioksidandırılar. ROS ve reaktif azot türlerini RNS ile yakalayabilirler (Zhou 2013). Nanomateriyaller fagositik ve fagositik olmayan mekanizmalar yoluyla hücrelere girebilmektedir. Bu olguların her ikisinde de otofaji ve lizozomların disfonksiyonu sebebiyle nanoteknolojide öneminin olduğu bilinmektedir (Stern et al. 2012).

C₆₀ fullerene fare kolorektal kanserine, fare karaciğer kanserine ve akciğer kanserine karşı antikanser aktivitesine sahiptir (Prylutska et al. 2014). Fulleren ve türevleri reaktif oksijen türleri (ROS) için etkili bir temizleyici olarak kullanılmıştır (Wang et al. 2014). C₆₀ kanser proliferasyonunu azaltır, fotodinamik olduğunda ROS üretme sonuçlarını ve in vitro olarak tümör büyümesini oksidatif stresle azaltır. ROS bağımsız olarak hücre içi

otofajik degradasyon etkisiyle kanser hücresi proliferasyonunu yavaşlatır. İlginç bir şekilde nano C₆₀ aracılı ROS bağımsız proliferasyon bloğuna dirençli normal hücreler, nano C₆₀ 1 ug / ml, B16 melanomda hücre içi ROS üretimini arttırır. Nano C₆₀ in vitro koşullarda ve düşük dozlarda hücre döngüsünü bloke ederek melanoma hücrelerini etkiler. Ancak yüksek dozlarda oksidatif stres, apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne neden olur. Diğer taraftan nano C₆₀ ile tedavi edilen hayvanlarda 14 gün sonro melanoma tümörünün zıt etkisine sahip bir tümörü azaltma yerine C₆₀ ile önemli ölçüde arttırmıştır. Ayrıca, dalak melanoma nano C₆₀'da NO üretimine neden olur ve splenosit proliferasyonunu baskılamaktadır (Zogovic et al. 2009). Son bulgular doksorubisin ile C₆₀ fullerenin bir kompleks oluşturarak doksorubisinin anti tümör etkilerini değiştirebilir. Bununla birlikte Doxorubicin C₆₀ ile kanser hücresi büyümesini Dox veya C₆₀'dan daha fazla inhibe eder. Doksorubisinli C₆₀ 2,5 mg / kg bir anti tümör ajanı ve Dox ile indüklenen bir sitotoksiste gibi davranır (Prylutska et al. 2014).

Fullerenlerin kanser hücrelerinin fotodinamik tedavi ile yok edilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Bu terapötik uygulamanın asıl avantajı ise seçiciliktir. Çok iyi odaklanmış bir ışın demetinin vücut yüzeyinden tümör bölgesine ya da optik fiberler yardımıyla dahili tümörlere uygulanması sonucu fotosensitize edici ajanın tümör spesifik aktivasyonunu gerçekleştirmektedir (Brown et al. 2004).

Çeşitli suda çözünebilen C₆₀ türevlerinin serviks, larinks, akciğer ve kolon karsinomu gibi farklı kanserli hücre kültürlerine karşı gösterdikleri etkili fotodinamik aktivite ile yapılan bir çalışma ortaya konmuştur (Mroz et al. 2007).

C₆₀ fullerenlere porfirin gibi diğer bazı fotosensitizerlerin bağlanması ile oluşan ikililerde benzersiz fotofiziksel özellikler ve redox özellikleri ortaya çıkmaktadır. Bu özellikleri barından C₆₀ ve porfirin ikilisi, oksijenin nisbi yokluğunda bile oldukça yüksek bir ROS aracılı sitotoksiste kapasitesine sahiptir (Alvarez et al. 2006).

Görünüşe göre fulleren türevlerinin antikarsinojenik aktivitesi hem singlet oksijen hem de süper oksit anyonunun oluşumuna bağlı olup fulleren kafesinin türevlendirilme genişliği ile ters ilişki göstermektedir (Yang et al. 2002, Alvarez et al. 2006, Mroz et al. 2007). Fulleren kafesine kovalent olarak bağlanan fonksiyonel grup sayısı arttığında fulleren

kafesinin türevlendirilme genişliğine bağlı olarak ROS oluşturma kapasitesi azalmaktadır (Prat et al. 1999, Bensasson et al. 2001, Chin et al. 2008).

Ayrıca yapı ve aktivite ilişkisi ile ilgili yapılan bir araştırmada -OH grubu gibi daha fazla singlet oksijen yakalayan gruplara sahip C₆₀ türevlerinin, aynı sayıda -CH grubu içeren veya daha az singlet oksijen yakalayan gruplara sahip C₆₀ türevlerine kıyasla daha düşük bir fotodinamik aktivite gösterdiği ortaya çıkmıştır (Mroz et al. 2007).

Suda çözünabilir C₆₀ türevlerinin fotodinamik antitümör aktivitesi, programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin başlamasını gerektirmektedir (Alvarez et al. 2006, Mroz et al. 2007). Bu tip hücre ölümü, kaspaz enzim ailesinin aktivasyonu ve DNA'nın fragmentasyonu ile karakterize olup plazma membranı yıkıma uğramadan gerçekleşmektedir. Akabinde bir inflamasyon durumu olmadan apoptotik hücrelerin fagositlerce tanınip ortadan kaldırılması gerçekleşir (Edinger ve Thompson 2004). Bu durum suda çözünabilir C₆₀ türevlerinin seçici mitokondriyal lokalizasyonu ile tutarlılık göstermektedir (Foley et al. 2002, Chirico et al. 2007). ROS ile indüklenen mitokondriyal disfonksiyonun, apoptozisin mitokondriyal yolağındaki başlatıcı adımı teşkil ettiği düşünülmektedir (Edinger ve Thompson 2004).

1.4. C₆₀ Fullerene'nin Otofajideki Rolü

Nano materyaller, otofaji akışının tıkanmasıyla ilişkili otozofon fonksiyon bozukluğuna, lizozomal enzimleri veya lizozomal oksidatif stresi, ozmotik şişliği veya lizozomal membran bozulmasını inhibe ederek ofajiye neden olur (De Stefano et al. 2012). İlginç bir şekilde, otofajik araçlar monitörü olarak önerilen nano materyaller, LC3 punkta formasyonu tespiti ile Glioma hücre hattında C₆₀ nanopartikül kaynaklı otofaji, nano C₆₀ (0,5 ug / ml) GFP-LC3 proteini, nano C₆₀ ve Temozolomid ile tedavi edilen HeLa hücrelerinin ekspresyonu sonucu HeLa hücre hattında otofajiye neden olmuştur (Harhaji et al. 2007). Otofaji hem otofagazom hem de otolizom vakuollerine sahiptir (Zhang et al. 2009). Yüksek veya düşük doza bağlı olarak nano C₆₀'ın insan meme kanseri hücre dizisi olan U-251'de nekroz veya kanser proliferasyonunun kaynağı olabilir. Yüksek dozlar ROS üretimini indükler ve düşük dozlarda proliferasyonu inhibe edebilir. Nano C₆₀ otofajiyi indükleyerek hücre döngüsünü sağlayabilir (Panzarini et al. 2013). HeLa hücre

hattında C₆₀ nanopartikülleri 0,5 ug / ml doz ile ROS ve otofaji Atg-5 geni oluşturur (Zhang et al. 2009). Isakovic ile çalışma arkadaşları 2006'da U-251'de ROS'u görüntülendi. C₆₀ ROS bağımlı nekrozu ve DNA fragmanını artırdı ve oksijen radikalini üretti. Nano materyaller, oksidatif strese yol açan ve hücre hasarı teşvik eden reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırır (De Stefano et al. 2012). Nano materyal C₆₀ yüksek doz ROS aracılı nekroz veya C₆₀ düşük dozda insan Glioma hücre hatlarında ROS bağımsız otofajiye neden olur (De Stefano et al. 2012). Glioma hücrelerinde nano C₆₀ otofajinin aracılık ettiği hücre ölümüne neden olmaktadır (Panzarini et al. 2013). Maksimum konsantrasyonu 2 ug / ml olan nano C₆₀ ve Doxorubicin ile tedavi edilen hücreler, 24 saat sonra yaklaşık olarak %96 oranında HeLa hücrelerini öldürdüğü gözlemlendi. 24 saat sonra ilaca dirençli Glioma hücrelerinde yaklaşık %73 oranında doksorubisin 2 ug / ml doz indüklü otofajik hücre ölümü ile C₆₀ nanopartikül 1 ug / ml dozda ve aynı konsantrasyonda C₆₀ olmasına rağmen yaklaşık %5 HeLa hücrelerini öldürmektedir (Zhang et al. 2009, Wei et al. 2010).

Yüksek dozda C₆₀ nanopartikülü 2 ug / ml'sinin HeLa hücre hattında yaklaşık %70 oranında ve Doxorubicin direnci olan Glioma hücre hattında %90 oranında hücre ölümüne neden olduğunu gösterdi. Bununla birlikte düşük dozda 1 ug / mL nanopartikül C₆₀ aynı toksisiteye sahip, fakat önemli ölçüde hücre ölümüne yol açmaz (Wang et al. 2014). C₆₀ nanopartikülü, HeLa hücre dizilerinde önemli ölçüde azalmış ve hücre canlılığına yol açmamıştır. Ancak ROS üretimine ve doza bağımlı bir şekilde otofajinin arttığını göstermiştir (Wang et al. 2014).

1.5. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri günümüzde bütün dünyada en yüksek ölüm oranına sahip kanser türü olup erken teşhis edilememesi, hastalığın seyrine ve kişinin yaşam süresinin kısılmasına sebep olmaktadır (Monteiro et al. 2014). Akciğer kanseri vücutta metastaz yapmadığı sürece önemli bir belirti vermemektedir. Bu durumda akciğer kanseri olan hastaların yaşam sürelerini arttırmanın yolu, kanseri erken teşhis etmektedir. Akciğer kanserinin oluşum sebepleri arasında sigara ilk sırada olmak üzere, hava kirliliği, ağır metal maruziyeti ve radyasyon önemli etkenlerdir. Akciğer kanseri bayanlara göre erkeklerde daha fazla görülmekte ve bu görülme sıklığının en büyük sebebi yine sigara olduğu

düşünülmektedir. Diğer akciğer kanseri sebepleri arasında gösterilen genetik yatkınlık, zararlı gazlara maruziyet ve ağır metallerin, sigara dışı kanser oluşum etkenleri olarak kabul edilmektedir (Ron et al. 2000, Monteiro et al. 2014). Akciğer kanseri iki kısma ayrılmakta ve bunlar küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) olarak tanımlanmaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), akciğer kanserinin %80'ini oluşturmakta ve adenokarsinoma, skuamöz hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinoma gibi alt birimler olarak değerlendirilmektedir (Monteiro et al. 2014). Akciğer kanserinin tedavi yöntemlerinin başlıcaları; cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyo terapi gibi yöntemlerdir. Küçük hücreli akciğer kanserinin (SCLC) kemoterapi tedavisinde genellikle ya tek başına antrasiklinler, topetekan, doksurobisin, paklitaksel ya da kombine ilaç olarak sisplatin, etoposide ve celecoxib kullanılmaktadır (Puglisi et al. 2010).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) kemoterapi tedavisinde ise sisplatin ve karboplatin ya tek başına veya paklitaksel, etoposid, gempitabin ile kombine kullanılmaktadır (Celegg et al. 2002). Standart uygulanan kemoterapi tedavilerinin ciddi toksik etkilerinden dolayı sağ kalım süresi sınırlı olmaktadır. Bu sebeple son yıllarda kanser tedavisinde daha az toksik etki gösteren bitkisel tedavi ürünleri, doğal ürünler ve fitokimyasalların kullanımı araştırılmaktadır. Bitkisel tedavilerde geleneksel olarak kayısı, beyaz dut, öksürük otu, balon çiçeği gibi meyve ve bitkilerin kanser tedavisinde hastaların hayatta kalma sürelerini uzatması, hastanın yaşam kalitesini iyileştirmesi ve kemoterapinin sebep olduğu yan etkileri azaltması nedeniyle kullanıldığı bilinmektedir (Jeong et al. 2011).

1.6. A549 Hücresi ve Otofaji

A549 Hücresi, İnsan akciğer kanseri hücre hattıdır. Bu hücre tipi İlk kez 1972'de D. J. Giard ve arkadaşları tarafından akciğer dokusunda bulunmuştur. A549 hücre hattı, hücrelerinin alveollerine elektrot, su gibi bazı maddelerin difüzyonunda görev alır.

A549 Hücrelerinin kültürü yapıldığında, hücre tabakaları tek ve yapışarak çoğalmaktadır (O'Brien et al. 1987). A549 hücresi su ve elektrolitlerin akciğer alveollerinden geçişine izin vermektedir. Hücrenin bir diğer karakteristiği, yüksek seviyede lesitin ve doymuş

yağ asidi sentezlediğinden dolayı, membran fosfolipidlerinin korunmasını sağlamaktadır. Böylece hücre dirençli bir hal kazanmaktadır. İlaç metabolizması modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Giard et al. 1973).

1.6.1. Otofajinin Moleküler Mekanizması

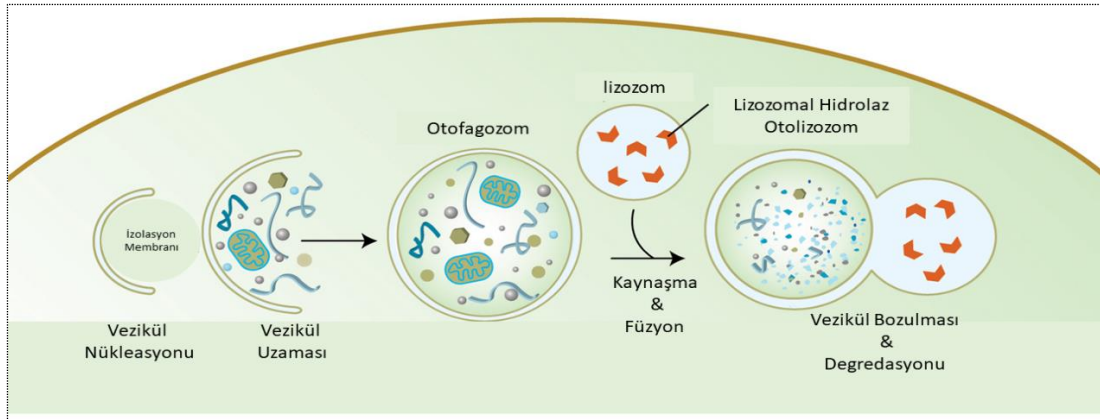
Otofaji evrimsel süreç olarak korunmuş, hücresel içeriği otofagozom olarak isimlendirilen, çift zarlı vezikül ile saklanan, degradasyonu lizozom tarafından yapılan, protein degradasyonu ve organel dönüşümü gibi hücre içi dengeyi sağlayan katabolik olaylar zinciridir. Geleneksel anlamda, otofaji hücresel strese cevap olarak hücrenin kalite kontrolü için, yaşama devam stratejisi olarak düşünülmektedir. Bazal otofaji, hasar görmüş organeller, uzun yaşayan proteinler ve protein kalıntılarını uzaklaştırmak, besin ihtiyacı ve büyüme etkenlerinin azlığı gibi hücresel strese sebep olan durumlarda hızla aktif olmaktadır (Anding et al. 2015). Hücre içi organeller için alternatif kaynak ve hücre canlılığının devamı için substrata enerji sağlamaktır. Hücrenin ihtiyacı olan besini bulunduğu ortamdan alamaması durumunda, kendi kendini içten yiyerek canlılığını sürdürmesidir. Ayrıca otofaji mikrobiyal enfeksiyon, oksijen azlığı, besin eksikliği ya da reaktif oksijen çeşitleri (ROS) gibi hücrenin yaşadığı stres ile tetiklenebilir. Otofaji kontrolü bozulduğunda ise kanser, bazı genetik hastalıklar, erken bunama, Alzheimer ve enfeksiyonların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Galluzzi et al. 2012).

Bilimsel çalışmalar genellikle açlık durumunda tetiklenen, hücrenin canlı kalması ile ilgili otofajinin etkinliği üzerine odaklanmıştır. Bu çalışmalardan farklı olarak otofaji, apoptoz veya diğer hücre ölüm yollarında ve hücrenin bağımsız ölüm aşamaları ile doğrudan bağlantılıdır. Nomenklatür Komitesi (NCCD), tarafından yapılan hücre ölümü üzerine çalışmalarda önde gelen araştırmacıların olduğu bir ekip, otofaji ile alakalı hücre ölümünü, otofajik hücre ölümü diye tanımlamışlar (Galluzzi et al. 2012).

Otofaji, hücre matriksi içerisinde besin ve enerji azlığında hızla aktif edilir. Bu sebeple hücre fazlalığı, oksijen durumu, sıcaklık, hormon seviyeleri ve besin durumu otofaji için önemlidir. Hücre ve dokuların yapısal analizleri birçok canlıda gelişen hücre ölümü esnasında otofajinin arttığını göstermiştir. Böceklerdeki değişim, kuşlardaki kol kanat gelişimi, memelilerdeki damak kapanması süreçlerindeki hücre ölümleri otofaji

örnekleridir. Hücre içerisine giren etkili toksinler de otofajik hücre ölüm yolağının üstün yapısal niteliklerinden dolayı hücre ölümüne sebep olmaktadır. Bugüne kadar otofajik etkinlik ve hücre ölüm arasındaki rastgele ilişkinin tespiti yapılamamış olması ve sadece gözlem seviyesinde olması bu çalışmaların otofajik aktivitenin hücre ölüm yolağındaki etkisini dikkatle araştırılmasına sebep olmuştur (Anding et al. 2015).

Otofaji, Tip II hücre ölümü olarak tanımlanır. Bu hücre ölüm yolağında en büyük morfolojik değişim, mitokondri ve endoplazmik retikulum organelleri ve sitoplazmanın bir bölümünün çift katlı veya çok katlı zarla çevrili vezikül içine alınmasıdır. Veziküller lizozomlarla birleşerek aynı hücrenin lizozom enzimleri vasıtasıyla degradasyonu yapılmaktadır (Şekil 1.12). Yapılan bu işlem Yunanca'da self eating manasına gelen kendi kendini yeme olan otofaji olarak tanımlanmıştır. Hücrenin karşı karşıya kaldığı açlık koşullarında, besin ve enerji üretmek için hücredeki organelleri parçaladığını tanımlaması için kullanılmıştır (Gözüaçık vd. 2007, Mizushima et al. 2008).



Şekil 1.12. Şematik otofaji aşamalarının gösterimi (Mizushima et al. 2008)

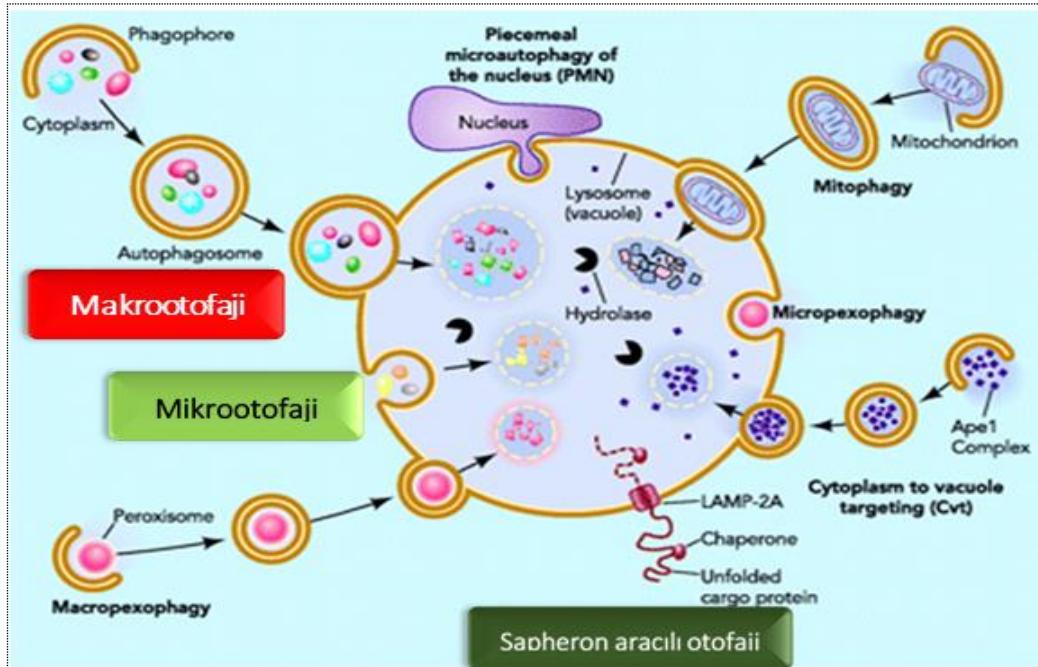
Otofajinin yapısında otofagozom veya otofajik vakuol diye bilinen iki veya daha fazla katlı membran yapıları oluşur. Memelilerde yaşanan otofajide otofagozomun dış zarı lizozomla kaynaşırken, bitki ve mayada ise vakuollerle kaynaşır (Levine et al. 2005, Mehrpour et al. 2010). Yapılan çalışmalarda spesifik koşullarda uyarının durumuna bağlı olarak, miktarın ve zamanın otofajide uzatılması hücreyi öldürebilir. Hücre içerisinde kromatin kondensasyonu gibi nükleer farklılıklar otofajik ölüm yolağında apoptozis olduktan sonra gözlenmekte olup DNA fragmentasyonu ile apoptotik cisimciklerin

oluşumu görülmez. Fagositoz yapıları vasıtasıyla ölü hücrelerin yok edilmesi apoptoziste görülenden daha sonra ve çok düzensiz olarak gerçekleşmektedir (Shintani et al. 2004, Gozuacik vd. 2007). Otofaji kendi içerisinde üç farklı şekilde gerçekleşmektedir.

1) Mikro otofaji: Küçük parçacıkların hücre zarında oluşan girintiyle lizozom içerisine alınması ve degradasyonunun yapılmasıdır.

2) Makro otofaji: Otofajik hücre ölüm yolağını oluşturan ana mekanizmadır. Daha büyük parçaların veya organellerin otofagozom içerisine alınması ve daha sonra lizozomlarla kaynaşarak meydana gelen degradasyondur.

3) Şapheron aracılı otofaji: Belirli peptid yapılı sitozol proteinlerinin moleküler şapheronlarla kompleks oluşturan Hsp73 tarafından algılanması ve lizozomlara taşınması işlemidir (Şekil 1.13). Bu tür protein degradasyon aşamasında vezikül yoğunluğuna gerek yoktur (Majeski et al. 2004, Shintani et al. 2004, Kroemer et al. 2010, Mehrpour et al. 2010).

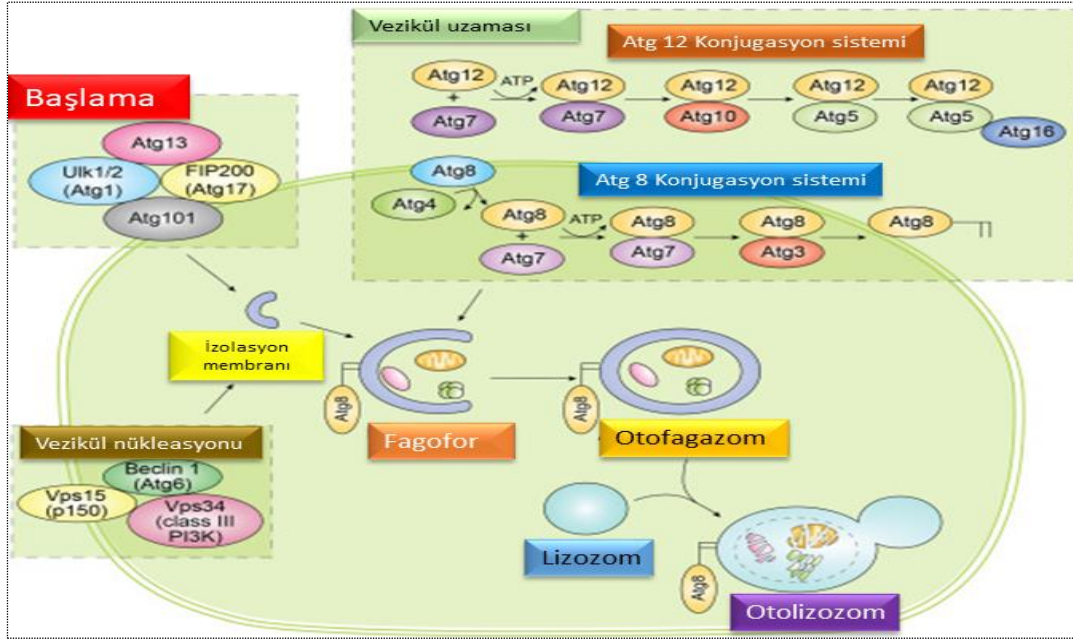


Şekil 1.13. Farklı otofaji türleri (Mizushima et al. 2008)

Yapılan çalışmalarda ana mekanizmayı meydana getiren genler farklı adlar almışlardır. CVT, AUT ve APG genleri olarak bilinen genler, isimlendirme sistemine göre ATG genleri (Autophagy Related Genes) olarak isimlendirilmişlerdir. Otofaji, otofaji döngüsünün farklı aşamalarında, örneğin vezikülün oluşması ve genişlemesi, otofaji veziküllerinin lizozomlarla füzyonu ve degradasyonunda görevli olan yaklaşık 30 proteini içeren bir gen familyasıdır. Otofaji proteinlerini kodlayan maya genlerinin çoğu *C. Elegans* genomu ile ATG2, ATG3, ATG4, ATG5 ve ATG6, ATG7, ATG8, ATG9, ATG10 ile ATG12, ATG16, ATG18 genlerinin ortoloğudur. Otofaji fonksiyonunda, otofajinin başlamasında unc-51/ATG1, vezikül nükleasyonunda Beclin1/ATG6, vps-34/VPS34, protein konjugasyon sisteminde atg-7/M7.5/ATG7, lgg-1/ATG8, lgg-3/ATG12, alım ve vezikül dönüştürmede atg-18/F41E6.13/ATG18 fonksiyon gösteren genler olarak belirlenmiştir (Meléndez et al. 2003, Hars et al. 2007, Hansen et al. 2008). Fosfatidilinositol 3-kinazlar (PI3K) otofajik vezikül oluşumunun kontrolünde temel sinyal molekülleridir. Otofaji, tip I ve tip III PI3K'lar tarafından düzenlenmektedir (Xie et al. 2007, Anding et al. 2015).

Otofaji en az beş adımda gerçekleşmektedir: 1) İndüksiyon, 2) Genişleme, 3) Tamamlama, 4) Yapışma ve füzyon, 5) Degradasyon. Besin azlığında otofajinin uyarılmasıyla tip I PI3K-AKT-mTOR sinyalinin inhibisyonuna ve tip III PI3K hVPS34/Beclin1 *Drosophilada* Atg6 ve Mayada Atg6/Vps30'unda aktivasyonuna neden olur (Juhász et al. 2008). Otofajinin aktivasyonu için öncelikle serine/threonine kinaz Atg1'in Memelilerde Ulk 1 ve 2'nin aktive olması gerekmektedir. Otofajinin aktivasyonu ile beraber Atg1, Atg13 ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin oluşumunun otofagozomal yapının oluşumuyla ilgili olduğu düşünülmektedir (Papinski et al. 2014).

mTOR'un inhibisyonu ULK1/Atg1'i serbest bırakır, ULK1/Atg1 de mAtg9'un golgiden endosome'a yeniden dağılımını uyarır. Yine tip III PI3K hVPS34/Beclin1 (Atg6) aktivasyonu ile da çift tabakalı membran oluşumu başlatılmış olmaktadır. Daha sonra Atg 7'nin aktivasyonu ile Atg 12 aktive olup Atg 5 ile kovalent bağ yapar bu birleşmeyle Atg 16 da bu komplekse karışarak Ag12-Atg5-Atg16 3'lü kompleksi oluşur. Oluşan bu kompleksle vezikülün genişlemesi gerçekleşir (Şekil 1.14) (Xiao 2007, Anding et al. 2015).



Şekil 1.14. Otofajinin şematik modeli (Anding et al. 2015)

Otofajinin temel mekanizması olan genlerin keşfi ilk olarak mayada çalışılmıştır. Daha sonra mayada bulunan bu genlerin homologları Dictyostelium, C. elegans, Drosophila, fare ve insanda da tanımlanmıştır. Genetik yaklaşımlar kullanılarak, otofajik genlerin susturulmasıyla, RNA ve antisens aracılı susturma stratejileriyle hücre ölümünde otofajinin rolünün anlaşılmasında bu genlerin bulunması büyük avantaj sağlamıştır. 3MA (3-methyladenine), wortmannin ve LY294002 gibi bazı kimyasal bileşikler otofajiyi inhibe etmektedir. Birçok bağımsız grup farklı hücre tiplerini ve ölüm uyarılarını kullanarak lizozomal aktivitenin arttığını ve otofajik veziküllerin birikimiyle ilerleyen kaspaz bağımsız hücre ölümünün varlığını ve otofajinin inhibitörleri tarafından bu hücre ölümünün azaltıldığını göstermişlerdir (Mizushima et al. 2008). Meme kanseri hücre serisi MCF7'nin antiöstrojenle ölüme indüklenmesi, lösemi hücrelerinin TNF- α ile ölüme indüklenmesi, gastrik ve glioma hücrelerinin onkogen Ras'la ölüme indüklenmesi veya büyüme faktörünün eksikliğiyle ölüme indüklenen nöronal hücreler bu çalışmalara örnek verilebilir. En yaygın otofaji inhibitörü olarak 3MA (3-methyladenine) kullanılmaktadır ve bu inhibitör JNK ve P38 aktivasyonunu da inhibe etmektedir. Mitokondrial permeabiliteyi azaltırken, lizozomal pH'yı da artırmaktadır (Gözüaçık vd. 2006).

1.6.2. Otofajik Hücre Ölüm Yolağı Mekanizmaları

PI3 kinaz tip I insülin benzeri büyüme faktörleri tarafından aktive edilir ve mTOR'un düzenleyicisi olan PDK 1 ve AKT üzerinden otofajiyi inhibe eder. Otofajiyi nasıl inhibe ettiği bilinmemekle beraber bir serin/treonin kinaz olan Atg 1 ile kompleks oluşturan bir protein olan Atg 13'ün fosforilasyonu ile yaptığı düşünülmektedir (Gözüaçık ve Kimchi, 2006). Tümör hücrelerini ölüme götüren rapamycin, tamoxifen, arsenic trioxide ve radyasyon gibi birçok anti kanser ajanları otofajiyi indükleyebilirler. PTEN, p53 ve p19ARF gibi birçok tümör baskılayıcı gen, otofajiyi aktive ederken AKT, c-Myc, PI3K ve Ras gibi birçok onkoprotein de otofajiyi baskılamaktadır (Xiao 2007). Otofaji tümör baskılama mekanizması; genotoksik stresin azaltılması, hücre ölümünün başlatılması, nekroz ve enflamasyonun durdurulması, degrade ve modüle edici sinyal proteinlerinin düzenlenmesi gibi mekanizmalarda temel rol alır (Xiao 2007). Aminoasit ve büyüme faktörü eksikliğinde otofajiyi düzenleyen p53 ve mTOR işlevi arasında bir bağlantı olduğu ortaya konmuştur. Antiapoptoz sinyal yolunda etkili olan mTOR etkinliğinin inhibe edilmesiyle, p53 yolağı otofajiyi uyarır (Gözüaçık vd. 2006).

Mayada mitokondri dışı membran proteini olan Uth1p mitokondrial otofaji için gereklidir ve bunun genlerinin inaktivasyonu Bax veya rafamisine indüklenen hücre ölümünde direnç meydana getirmektedir. Açlık olmayan koşullar altında mayada mitokondrial bozukluklara neden olan mutasyonlar, mitokondrial membran potansiyelinin kaybı, mitokondrial biyogenezdeki defektler, mitokondrial otofajik hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir. Otofajide mitokondrinin eliminasyonunun artmasıyla hücre içinde ATP konsantrasyonunun da arttığı gözlenmiştir (Gözüaçık vd. 2006, Lee et al. 2012). Memeli hücreleri içerisinde mitokondrinin dışı zarında bulunan Bcl-2 üyeleri otofajiye etki eder. Bcl-2 aşağı regülasyonu, insanın lösemi hücrelerinde kaspazdan bağımsız olarak otofajiyi artırır. Bcl-2, Beclin1 gibi anahtar otofajik proteinlerle direkt ilişkiye girerek otofajinin regülasyonunda rol oynar. Bcl-2, otofajinin bir proteini olan Beclin1 ile doğrudan otofajiyi baskılar. Fakat mitokondri organelinde Bcl-2 proteinlerinin otofajiyi düzenleyici işlevleri henüz net olarak açıklanamamıştır. Bcl-2 ile Bcl-XL gibi anti ölüm üyelerinin fazla ekspresyonu otofajik hücre ölümünden hücreleri korurken, BH3 domaini içeren ölüme indükleyici üyeleri olan Bax ve BNIP3 otofajik hücre ölümüne neden olmaktadır. Bax, reaktif oksijen türlerinin birikmesine, lipid peroksidasyonuna ve plazma membran

değişiklerine neden olarak hücreyi ölüme götürmektedir. Yine BNIP3 ekspresyonunun artmasıyla, BNIP3 ün dimerizasyonla aktif hale geçmesi de seramid ve arsenik trioxidle otofajik hücre ölümünü uyarmaktadır (Gözüaçık vd. 2006, Mizushima et al. 2008).

Apoptoz ve otofaji hücre ölümünde karşılıklı etkileşimler bulunmaktadır. Apoptozun mitokondriyal düzenini sağlayan genler, otofajinin işleyiş biçimiyle birbirini etkileyebilir. Bu sebeple mitokondrinin, apoptoz ve otofajik yollarının birbirini etkilemesine sebep olan bir bağlantı olduğu düşünülmektedir (Levine et al. 2005, Mizushima et al. 2008). Hücrelerin enerji üreten motorlarında (mitokondriler) yaşlanma sürecinde oluşan bozuklukların, kanserde, beyin, sinir sistemi harabiyeti, kas ve güç kaybında rol oynadığı gösterilmektedir. Bozulup hücreye zarar vermeye başlayan mitokondriler otofaji mekanizması sayesinde yok edilir. Yaşlandıkça bu sistem yavaşlamaktadır. Bozuk mitokondri birikimi artmakta, genetik yapısı zedelenen hücreler çeşitli hastalıkları tetikleyebilmektedir. Deneyler, küçük yaştan itibaren çok düşük enerjili besinlerle beslenen fare ve sıçanlarda ömrün uzadığını göstermiştir. Bunun nedenlerinin arasında bu koşullarda artan otofaji aktivitesi gelmektedir. Gelecekte ilaçlarla otofajinin etkin düzeyde sürdürülmesiyle, ileri yaşlarda yaşam kalitesi artırılabilir, hatta ömrün uzamasına yol açılabilir (Lee et al. 2012).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü

Bu projede A549 akciğer kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 64 µg/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ile desteklenen DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) besiyerinde %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkubatöründe çoğaltılmıştır.

2.2. Hücre Canlılığı Deneyi

Hücre proliferasyonu testi üretici firmanın geliştirdiği protokol uyarınca gerçekleştirilmiştir. Deneyin temel prensibi, hücrelerdeki dehidrogenaz etkinliğini ölçen kolorimetrik bir yöntemdir. Mitokondri, canlı hücrelerde sarı renkli MTT boyasındaki tetrazolyum halkasını yine mitokondriyle oluşan reaksiyonla suda çözünmeyen formazana dönüştürür ve ortaya çıkan koyu mavi-mor renk ile formazanın çözünmesiyle ortaya çıkan renk değerlendirilir. Mitokondriyal dehidrogenazların çalışması ile hücre artışı arasında doğrusal bir ilişki vardır. Ortama eklenen kimyasal bileşiğin sitotoksik etki yapması durumunda, hücreler canlılığını kaybedecek, formazan bileşikler azalacak ve verilen absorbans değeri de düşecektir. Bu yöntemle, A549 hücreleri sayılarak 5000 hücre/kuyucuk şeklinde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekimleri yapıldı. 24 saat süre ile 37°C, %5 CO₂'li ortamda tamamen yapışmış hücrelerin besiyeri, tazesini ile değiştirilmiştir. Seçilen homosistein dozları; 100, 250, 500 nM dur. Homosistein uygulamasından sonra hücreler tekrar 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Yapılan işlemden 24 saat sonra MTT reaktifi ile hücre artışı değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonrası her grubun tüm kuyucuklarına MTT çözeltisi, PBS içerisinde (5mg/ml, pH 7,2) 25 µl ekleme yapılarak, karanlık ortamda 37°C'de ve %5 CO₂'li inkubatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde ortaya çıkan formazan bileşiklerini çözmek için her kuyucuğun üzerine 0,01 N HCl içeren %10'luk SDS çözeltisi ilave edildi ve

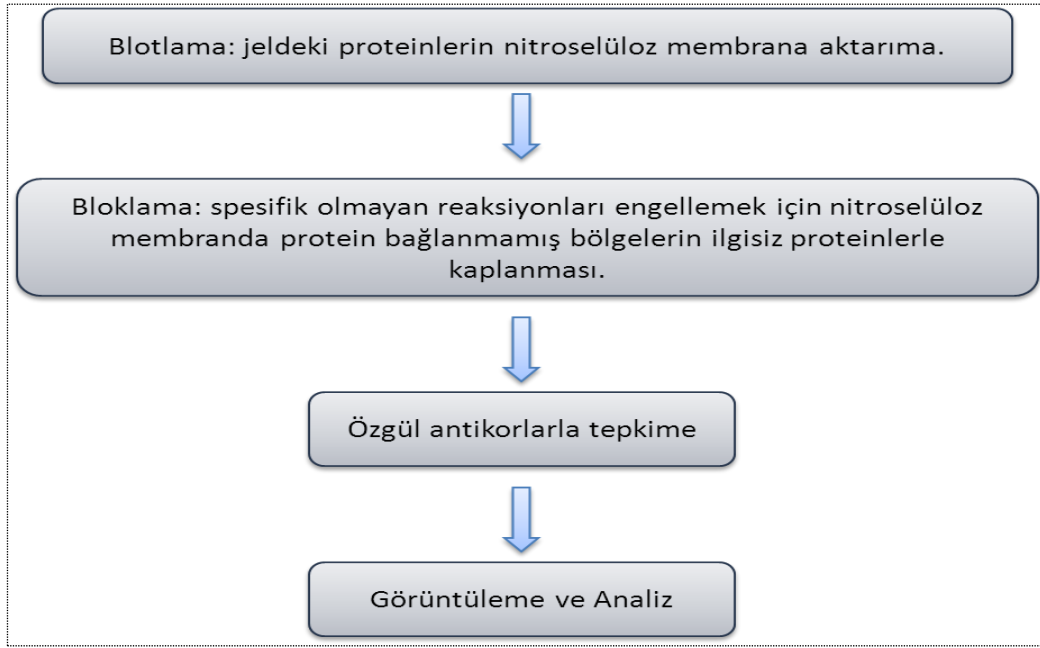
18 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Ortaya çıkan renk şiddeti spektrofotometre ile 580 (660) nm dalga boyunda ölçülmüştür.

2.3. ROS Deneyi

Hücrelerdeki Ros düzeylerini belirlemek amacıyla DCFDA kiti (ABCAM, DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit, ab113851) kullanılmıştır. Hücre içi ROS'un temel kaynağı olan kompleks I (NADH dehydrogenase) ve kompleks III (cytochrome c reductase) mitokondriyal elektron taşıma zincirinin bir üyesidir. Bu iki kompleks, elektron taşımanın mitokondri membran potansiyeli tarafından yavaşlatılması sonucu ROS üretmektedir. Deneyin temel prensibi; hücre içinde oluşan hidroksil ve diğer ROS aktivitesi, florojenik boya olan 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) ile belirlenip ELISA plate reader ile ölçülmesine (Ex485 nm/Em535 nm) dayanmaktadır. Tedarikçi firmanın geliştirmiş olduğu protokol takip edilmiştir. Bu amaçla; 3x10³ sayıda A549 hücresi 96'lı hücre kültür platelerine ekilmiştir. Gece boyunca hücrelerin yapışması için 37°C CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir. Ardından hücreler C₆₀ fullerene (100, 250, 500 nM) uygulamasını takiben hücreler 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücrelerin bulunduğu ortama 25 µM DCFDA solüsyonundan eklenmiş ve 45 dakika boyunca 37°C CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 1X yıkama solüsyonundan eklenmiştir. Ardından ELISA reader ile absorbansı Ex485 nm/Em535 nm'de okutulmuştur.

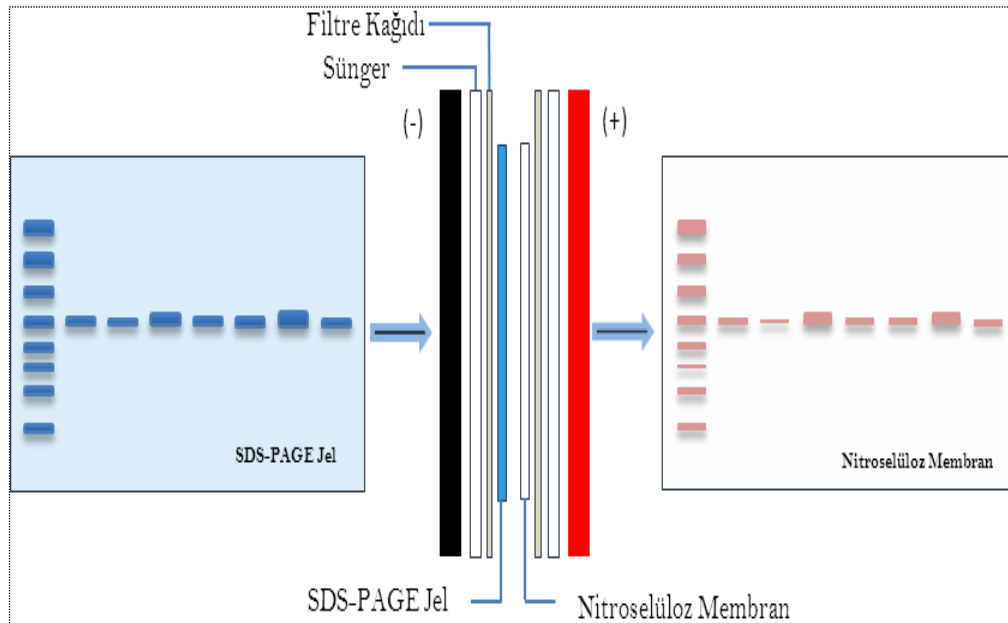
2.4. Western Blotlama

Western blotlama; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, PVDF membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir. Blotlama yapılmadan önce çalışılan örneklerdeki proteinler elektriksel ortamda poliakrilamid jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE'de gerçekleştirilmektedir. Western blotlama tekniği, elektroforez işlemi takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Western blotlama analiz aşamaları

PVDF membrana transfer sırasında jel ile PVDF membran karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kâğıtları arasına yerleştirilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. PVDF membrana jel yerleştirme

Jelin büyüklüğü ile doğru orantılı belli süre ile elektrik akımı verilerek proteinlerin yürütülmesini sağlanmaktadır. Jeldeki proteinlerin PVDF membrana aktarımı (blotlama): SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. PVDF membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile PVDF membran (Schleicher and Schuell, Inc. USA) yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kâğıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek, Blot (Transfer) tamponu ile doyuruldu. Soğutulmuş Blot (Transfer) tamponu ile tanka yerleştirilen düzenek manyetik karıştırıcı üzerinde 60 dakika boyunca 350 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin PVDF membrana transferi sağlanmış oldu.

Spesifik özelliği olmayan reaksiyonların oluşmaması için PVDF membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama): Blotlama işlemi bittikten sonra PVDF mebranların ölçülerine uygun dikdörtgen kapaklı cam kutularına alınan PVDF membranlar 1X PBS tampon solüsyonla çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5'er dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, %5'lik sığır serum albumini ile 37°C' de 90 dakikalık inkübasyonla blokladı. PVDF membranın özgül olmayan proteinlerle bloklanmasında albumin tercih edilmektedir.

Spesifik antikorlar olarak monoklonal ya da poliklonal antikorlar kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanımı, yalnızca tek bir epitopa özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından dolayı avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, monoklonal antikorlar antijene spesifik bir bağlanma gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitop bölgeleri bulunmakta ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Poliklonal antikorların kullanılması durumunda aynı nedenden dolayı şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Western blotta monoklonal antikorların kullanımının en büyük dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptid yapılarıdaki epitopların ortadan kaldırılmasıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun ortadan kaldırılması durumunda ise monoklonal antikor-epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenden dolayı monoklonal antikor kullanıldığında, poliklonal antikorla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır.

Primer antikor olarak anti Beclin1, p53, TIGAR ve Bax kullanıldı. Sekonder antikor olarak poliklonal rabbit anti rat ve monoklonal goat anti mouse kullanıldı. PVDF membranlar primer antikorlar ile +4°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada PVDF membranlar 5 kez 5’er dakika 1X PBS tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra PVDF membranlar %0,05 oranında içinde Tween20 bulunan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat anti rabbit immünoglobulinle 37°C’de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada PVDF membranlar 5 kez 5 dakika 1X PBS tampon solüsyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi için Kemilüminesans görüntüleme işlemi yapıldı. PVDF membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Image analyses system (Image J National Institute of Health Bethesda, USA) programı kullanılarak analiz edildi.

2.4.1 Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Hücre lizatlarının hazırlanmasında kültür kapları içerisinde bulunan hücrelerden besiyeri uzaklaştırılarak oda sıcaklığında iki kez PBS ile yıkandıktan sonra tripnizasyon kademesine geçildi. Hücre sayımları yapılarak hücre kültür kaplarından 6 kuyucuklu olanlara her kuyuya 3×10^5 hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin 24 saat yapışmaları beklendikten sonra, 24 saat süre ile C₆₀ fulleren tedavisi uygulandı. Hücreler daha önceden soğutulmuş olan kazıyıcı yardımı ile kaldırıldı. Lizat hazırlama işleminin bütünü buz üzerinde ve +4°C’de yapıldı. İnkübasyona bırakılan hücrelerin süre bitimiyle +4°C’de 5 dakika bekletildi ve besiyeri uzaklaştırılıp tekrar iki kez PBS ile yıkandı. Her kuyucuğa 150 µl lizis tamponu ilave edildi. Son yoğunluğu 50 mM TRİS-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, %1 Triton X-100, %1 SDS, %0,5 sodyum deoksikolat, 1 mM EGTA, 50 mM NaF olacak şekilde lizis tamponu 0,2 µm’lik filtre ile alındı ve +4°C’de saklandı. Lizat hazırlama aşamasının öncesinde tampon çözeltiye 2 mM İmidazol, 10 mM Na₄P₂O₇, 1,15 mM Na₂MoO₄, 1 mM Na₃VO₄ ve 1 mM PMSF 1:10 dilüsyon oranında proteaz inhibitör karışımı eklendi. -20°C’de soğutulmuş olan 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine numuneler alındı. Alınan numuneler +4°C’lik ısıya ayarlanan santrifüjde 14000

g’de 15 dakika santrifüj edildi. Proteinleri içeren süpernatant kısım kullanılacağı ana kadar -20°C’ye konuldu.

2.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez sisteminde, akrilamid monomerlerinden yararlanılır. Amonyum persülfat (APS) gibi serbest radikal ile TEMED gibi stabilizatörü sağlayıcı olan bir ortamda akrilamid monomerleri uzun zincirler oluşturacak şekilde polimerleşmekte ve daha sonra oluşan bu uzun zincirler arasında yanal bağlantılar oluşarak jel meydana gelmektedir.

SDS-PAGE analizinde jelin yapısında yer alan sodyum dodesilsülfat deterjanının bulunması ile proteinler kendilerini oluşturan monomerlerin alt birimlerine ayrılmaktadır. Böylece protein agregasyonu önlenmektedir. SDS moleküllerine bağlanan denatüre polipeptidler negatif yük kazanırlar. SDS bağlantılı polipeptid kompleksleri, molekül ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde hareket ederler. Hareket eden moleküllerin ağırlıkları; aynı jel üzerinde bulunan bir standartla karşılaştırılarak tespit edilir. Mutasyon geçirmiş veya çeşitli olumsuz çevre faktörleri sonucunda canlı organizmanın bir kısım proteinlerinden normale göre parça kopması veya parça ilavesi ya da bazı proteinlerin yeterince sentezlenmemesi gibi özellikler bu jel sisteminde tespit edilir.

Protein moleküllerinin hareketi güç kaynağından gelen elektrik akımına göre negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutuba doğru olur. İncelenecek protein molekülleri şayet 0–43 kDa aralığına tekabül ediyorsa akrilamidin konsantrasyonu %15, 40 kDa’dan yukarı ise akrilamidin konsantrasyonu %10 veya daha aşağı düşürülür. Diğer bir ifade ile molekülün ağırlığı arttıkça akrilamidin konsantrasyonu düşürülür. Akrilamid konsantrasyonunun artışı, jel içerisindeki ara boşlukların daha sık olmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla protein moleküllerinin hareket hızı da azalmaktadır

2.4.3. Jellerin Hazırlanması [SDS-PAGE]

SDS-PAGE elektroforezi işlemi Bio-Rad Mini Protean Tetra Cell Elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki

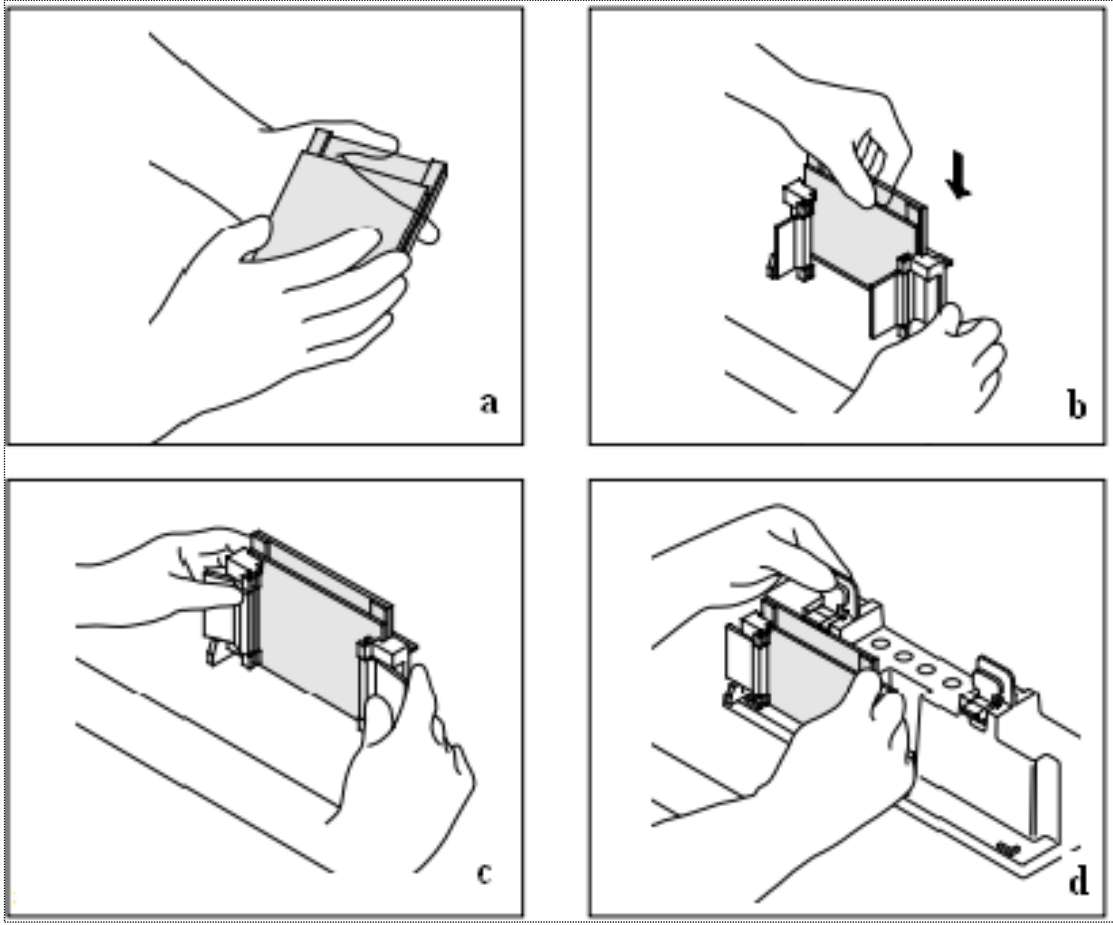
cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml'lik separating jel (Tablo 2.1) solusyonu hazırlandı.

Tablo 2.1. Separating (ayırma) jel bileşimi

Separating (ayırma) jelinin hazırlanması (%12)	Miktar
Distile su	3,35 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
%10 SDS	100 µl
Akrilamid /Bis (%30)	4,0 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	5 µl
Toplam	10,0 ml

Tablo 2.2. Stacking (yükleme) jel bileşimi

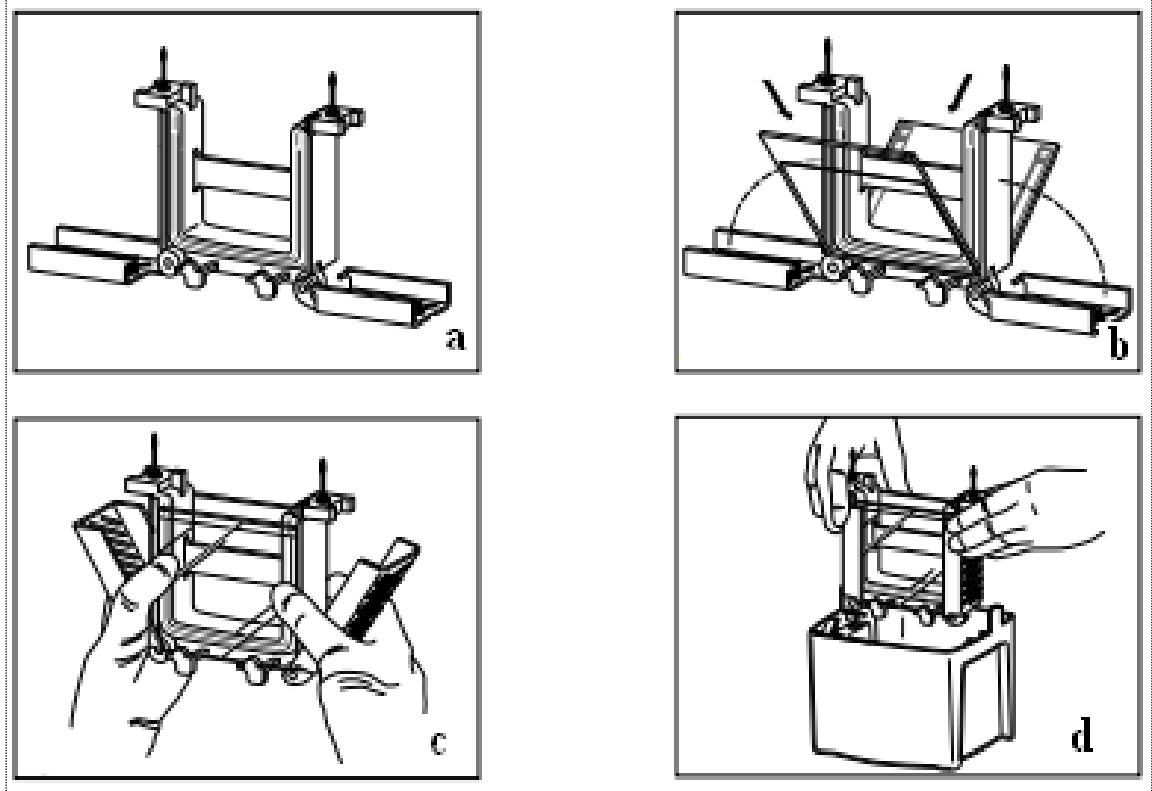
Stacking (yükleme) jelin hazırlanması (%4)	Miktar
Distile su	6,1 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 ml
SDS (%10)	100 µl
Akrilamid-Bis (%30)	1,3 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	10 µl
Toplam	10,0 ml



Şekil 2.3. Jel kaset sisteminin hazırlanışı a-İnce ve kalın camların jel dökülecek alanı (0.75 mm) oluşturmak üzere üst üste getirilmesi. b-Sıkıştırma aparatına camların yerleştirilmesi. c-Sıkıştırma aparatı mandallarının kapatılması. d-Cam kasetlerin jel dökülmek üzere dikey olarak sabitlenmesi

Hazırlanan bu jel solüsyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı (Şekil 2.3). İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar ($\approx 1\text{cm}$) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi. Tarak dişlerinin dolgu maddesi olarak ifade edilen stacking jel (Tablo 2.2), 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solüsyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla, jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu, iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı. Stacking jel çok çabuk polimerize olduğundan

işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25–30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı.



Şekil 2.4. Kaset sisteminin elektroforez için hazırlanması a-Anot-katot haznesi. b-Kasetlerin hazneye yerleştirilmesi. c-Hazne mandallarının kapatılması. d-Haznenin tanka yerleştirilmesi

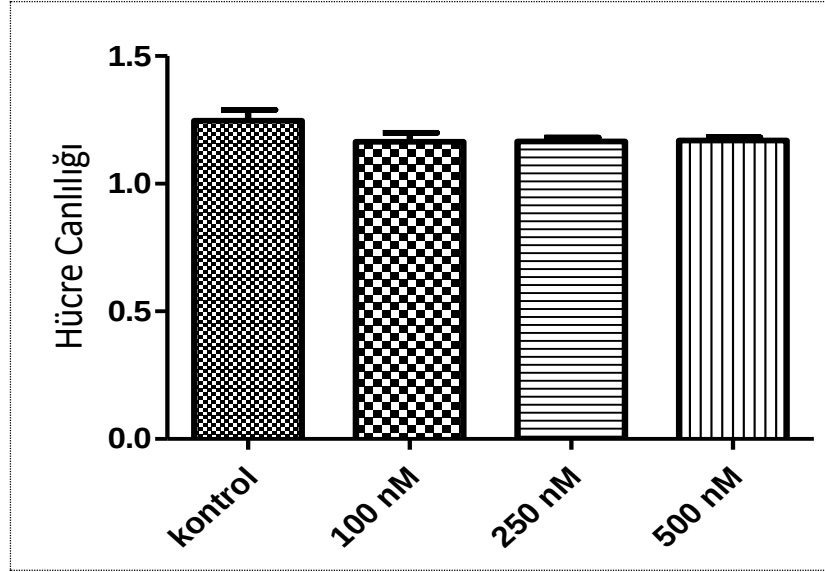
Kaset sistemi elektroforez tankına yerleştirildi (Şekil 2.4). Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jelde örneklerin yükleneceği kuyucukların bozulmamasına dikkat edildi. Ardından, oluşturulan jel planına bağlı olarak, her bir kuyucuğa (markır kuyucuğu hariç) Spektrofotometrik yolla toplam protein miktarlarının belirlenen akciğer dokusuna ait örnekler toplam protein miktarları eşit olacak şekilde yüklendi. Tank içerisine yeterli miktarda yürütme (Running) tamponu ilave edildi. Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. Örnekler Stacking (yükleme) jeli geçince voltaj değeri yükseltildi (180–200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. C₆₀ Fullurenin A549 Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Hücre canlılığı testi üretici firmanın geliştirdiği protokol uyarınca gerçekleştirilmiştir. Deneyin amacı, hücrelerdeki dehidrogenaz etkinliğini belirleyen kolorimetrik bir analiz yöntemidir. Canlı hücre içerisindeki mitokondri, sarı renkte olan MTT boyasında bulunan tetrazolyum alanını mitokondriyle oluşan reaksiyon vasıtasıyla suda çözünmeyen formazana dönüştürür ve oluşan koyu mavi-mor renkteki formazanın da çözünmesi sonucu çıkan renk değerlendirilir. Mitokondriye bağlı dehidrogenazların toplam etkinliği ile hücre çoğalması arasında doğru bir orantı olduğundan, ortama konulan kimyasal bileşiğin hücreye zararlı olması halinde, hücreler canlılığını kaybedecek, formazanı oluşturan bileşikler azalacak ve verilen absorbans değeri de düşecektir. Bu metodla, A549 Akciğer kanseri hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Her kuyucuğa 5000 hücre olacak şekilde ekimleri yapıldı. 24 saat ve 37°C, sabit sıcaklıkta %5 CO₂'li ortamda tamamen yapışmış bulunan hücrelerin besiyerleri taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Seçilen C₆₀ fulluren dozları; 100, 250, 500 nM dur. C₆₀ fulluren tedavisini takiben hücreler 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan 24 saat sonra MTT reaktifi vasıtasıyla hücre canlılığı değerlendirilmiştir.

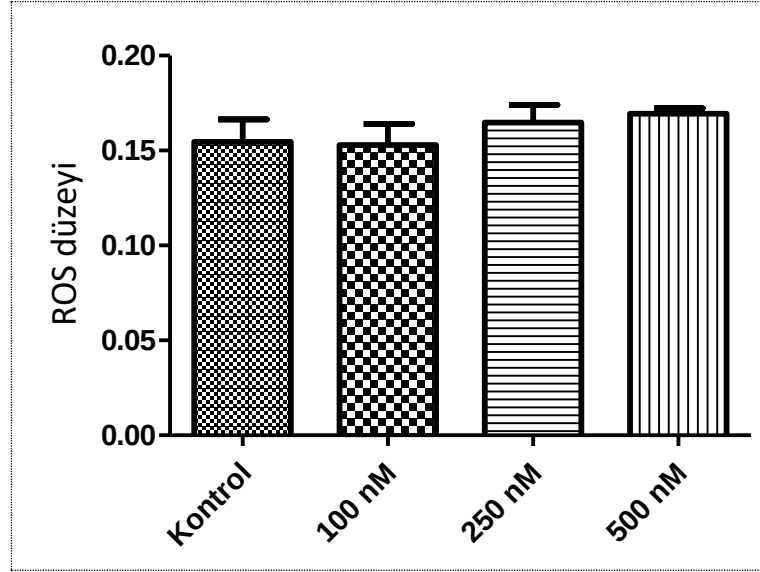
Elde ettiğimiz bulgular, yapılan çalışmanın kontrol grubuyla kıyaslandığında 100 nM C₆₀ verilen grupta önemli bir değişim olmadığını göstermiştir. Ardından 250 nM ile en yüksek doz olan 500 nM verilen grubunda aynı istatistiksel verilere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. C₆₀ fullerenin A549 hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkisi

3.2. C₆₀ Fullerenin A549 Hücre Hattında ROS Düzeyinin Ölçülmesi

Hücrelerdeki Ros düzeylerini belirlemek amacıyla DCFDA kiti (ABCAM, DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit, ab113851) kullanılmıştır. Deneyin temel prensibi, hücre içi ROS'un temel kaynağı olan kompleks I (NADH dehydrogenase) ve kompleks III (cytochrome c reductase) mitokondriyal elektron taşıma zincirinin bir üyesidir. Bu iki kompleks, elektron taşımanın mitokondri membran potansiyeli tarafından yavaşlatılması sonucu ROS üretmektedir. Hücre içinde oluşan hidroksil ve diğer ROS aktivitesi, florojenik boya olan 2,7 dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) ile belirlenip ELISA plate reader ile ölçülmesine (Ex485 nm/Em535 nm) dayanmaktadır. Tedarikçi firmanın geliştirmiş olduğu protokol takip edilmiştir. Bu amaçla; 3x10³ sayıda A549 hücresi 96'lı hücre kültür platelerine ekilmiştir. Gece boyunca hücrelerin yapışması için 37°C CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir. Ardından hücreler C₆₀ fullerene (100, 250, 500 nM) dozlarında tedavi uygulamasından sonra hücreler 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücrelerin bulunduğu ortama 25 nM DCFDA solüsyonundan eklenmiş ve 45 dakika boyunca 37°C CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde besi yeri kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 1X yıkama solüsyonundan eklenmiştir. Ardından ELISA reader ile absorbansı Ex485 nm/Em535 nm de okutulmuştur (Şekil 3.2).

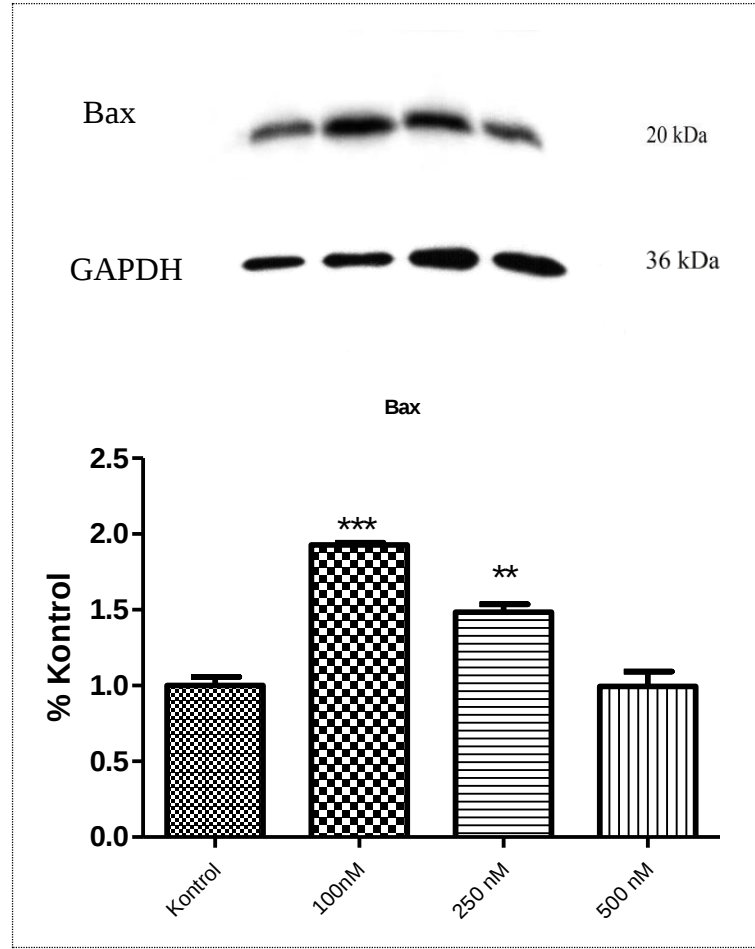


Şekil 3.2. C₆₀ fullürenin A549 hücre hattında ROS düzeyi sonuçları

Kontrol gurubuyla kıyaslandığında, 500 nM C₆₀ verilen grupta ve diğer 100 nM ile 250 nM verilen grupta, ROS düzeyinde elde edilen bulgularda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

3.3. C₆₀ fullürenin A549 Hücre Hattında Bax Proteinleri Üzerine Etkisi

Bax veya Bcl-2, p53 adlı tümör baskılayıcı proteinin kofaktörü olma işlevi gören bir proteindir. Pro apoptatik Bax geni, Bcl-2 gen familyasına aittir. Bcl-2 protein familyasının özelleşmiş olan BH3 domanine sahip olan Beclin1, Bcl-2 haricinde diğer bir aile üyesi olan Bcl-xL proteini ile de çalışmaktadır. Beclin1 proteini, Bcl-2 proteini veya Bcl-xL ile olan ilişkisinin farklı sebeplerden dolayı bozulması, apoptoz ve otofaji gibi ölüm yolları arasında bir seçim yaparak yaşamını devam ettirmekte veya canlılığına son vermektedir. C₆₀ Fullerenin etkisi altındaki Bax proteinlerinin miktarını A549 hücre hattında etkilerini görmek amacıyla C₆₀ ile 100 nM, 250 nM ve 500 nM dozlarda tedavi edilen hücreler 24 saat sonra Western Blotlama yöntemi ile analiz edildi (Şekil 3.3).



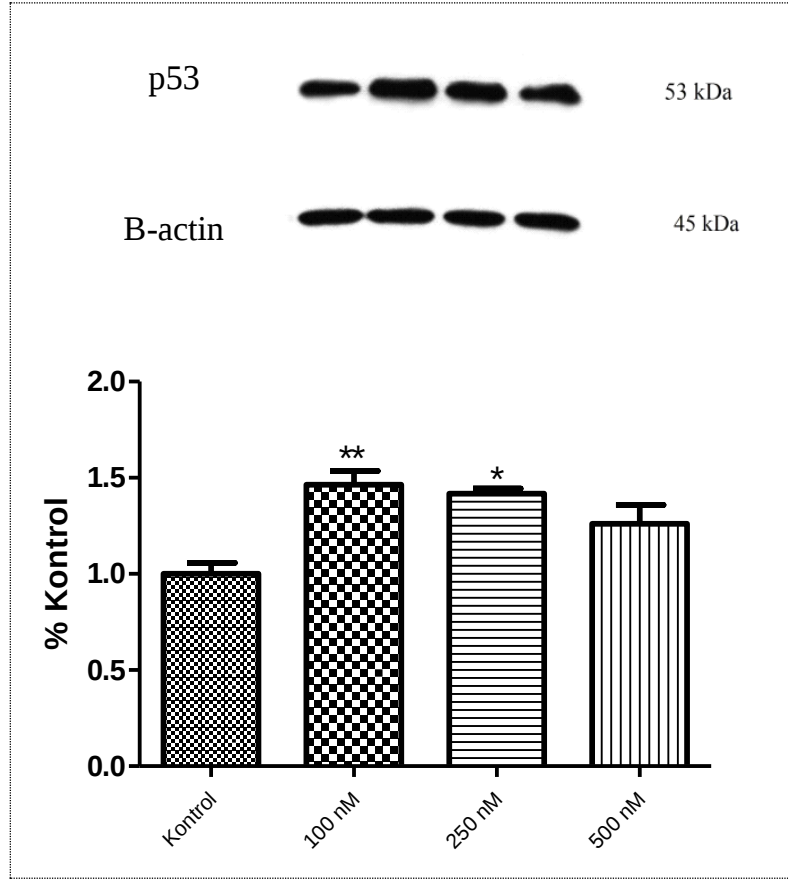
Şekil 3.3. C₆₀ fullüren ile tedavi edilen A549 hücre hattında Bax protein düzeyleri

Elde ettiğimiz bulgular kontrol grubuyla kıyaslandığında 100 nM verilen C₆₀ grubunda anlamlı bir artış gözlenmiş, 250 nM verilen C₆₀ grubunda bu artışın azaldığı ve en yüksek doz olan 500 nM verilen C₆₀ grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı tespit edilmiştir.

3.4. C₆₀ fullürenin A549 Hücre Hattında p53 Üzerine Etkisi

Memeli hücrelerinde en sık görülen mutasyonlardan birisi p53 mutasyonudur. p53 mutasyonu birçok epitelyal ve bazı mezenkimal tümörlerde saptanan bir mutasyondur. Akciğer karsinomlarında ise en sık saptanan mutasyondur. p53 antiproliferatif etkilere sahip 53k-Da nükleer fosfor proteini kodlar. p53 geni kromozom 17p13'te yerleşiktir. Bu protein hücre siklus kontrolü, DNA tamiri, apoptoz, hücre yaşlanması, anjiyogenez gibi çok önemli adımlarda görevlidir. Kanser hücre hatlarında p53 otofajinin artışına sebep

olurken, bazı kanser hücre hatlarında p53 otofaji etkisinin düşmesine sebep olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda C₆₀ ile 100 nM, 250 nM ve 500 nM ile tedavi edilen p53 geninde 24 saat sonra Western Blotlama yöntemiyle sonuçlar analiz edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. C₆₀ fullurenin A549 hücre hattında p53 üzerine etkisinin sonuçları

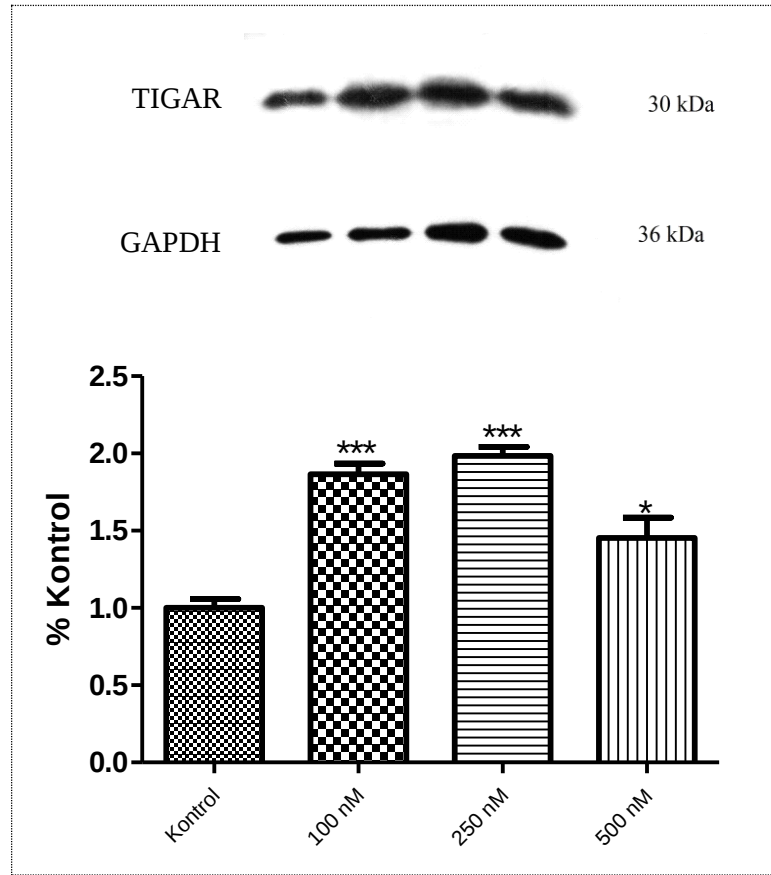
P53 gen tedavisi sonucunda elde edilen bulgular kontrol grubuyla kıyaslandığında 100 nM C₆₀ verilen grupta anlamlı bir yükseliş olduğu ve 250 nM ile 500 nM C₆₀ verilen gruplarda ise etkisinin devam ettiği ancak doz arttıkça bu etkinin azaldığı gözlenmiştir.

3.5. C₆₀ fullurenin A549 Hücre Hattında TIGAR Üzerine Etkisi

DNA hasarı, hücre çoğalmasının işleyişi, genetik yapının oluşturulması, kromozom ayrışmasının düzenlenmesi, gen ekspresyonunun kontrolü, yaşlanma, otofaji ve apoptoz gibi hücre ölümü olayları ile birçok hücrel mekanizmada görevleri olan p53 proteini, ilk olarak 1979'da kanser gelişimi alanında etkinliği olan protein olarak tanımlanmıştır.

1989'a kadar bu fikir kabul görmüş ve bu durum daha önce tanımlanan p53 protein yapısının, mutant p53 proteini ile aynı yapıda olduğunun saptanmasıyla son bulmuştur. p53 proteininin kanserde aktif rol aldığı ortaya çıkmasından sonra ise p53 proteinini kodlayan gen ailesinin TP53 (Tümör Protein 53) ismiyle adlandırılmıştır.

C₆₀ ile 100 nM, 250 nM ve 500 nM dozlarında TIGAR proteini üzerine yapılan tedaviden 24 saat sonra sonuçlar Western Blotlama yöntemiyle analiz edildi (Şekil 3.5).

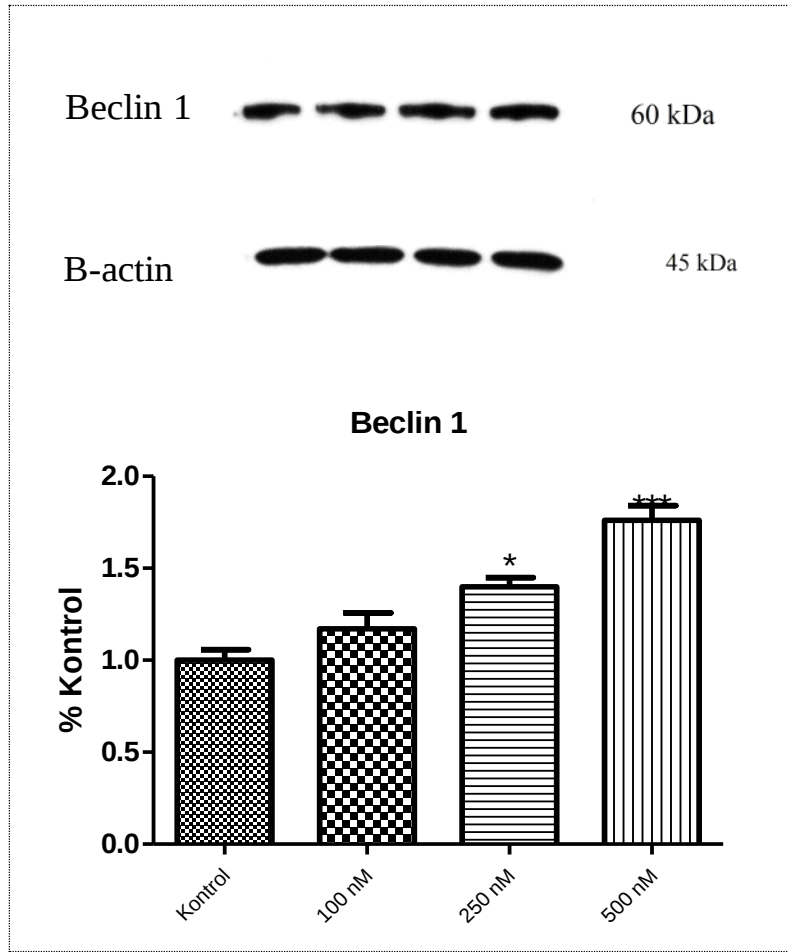


Şekil 3.5. C₆₀ fullerenin A549 hücre hattında TIGAR üzerine etkisinin sonuçları

Elde ettiğimiz bulgular kontrol grubuyla kıyaslandığında 100 nM C₆₀ verilen grupta anlamlı bir artışa neden olduğu ve 250 nM C₆₀ verilen grupta ise kontrole oranla kayda değer oranda artış olduğu ve bu artışın devam ettiği belirlenmiştir. Ancak 500 nM C₆₀ verilen grupta diğer iki doz düzeyine göre ekspresyonun azaldığı tespit edilmiştir.

3.6. C₆₀ Fullürenin A549 Hücre Hattında Beclin1 Üzerine Etkisi

Beclin1 otofaji mekanizmasının başlaması, sürdürülmesi ve sonuçlandırılmasıyla ilgili protein ailesi olup Atg proteini ile işbirliği içerisinde. Beclin1, Bcl-2'nin interaksiyon yardımcısı olarak keşfedilmiş ve tümöröenez başta olmak üzere birçok pozisyonda görev almaktadır. Bcl-2 protein familyasının özelleşmiş olan BH3 domanine sahip olan Beclin1, Bcl-2 haricinde diğer bir aile üyesi olan Bcl-xL proteini ile de çalışmaktadır. Beclin1 proteini, Bcl-2 proteini veya Bcl-xL ile olan ilişkisinin farklı sebeplerden dolayı bozulması, hücrenin apoptoz ve otofaji gibi ölüm yolları arasında bir seçim yaparak yaşamını devam ettirmekte veya canlılığına son vermektedir. C₆₀ ile 100 nM, 250 nM ve 500 nM dozlarında tedavi edilen Beclin1 proteinleri 24 saat sonra Western Blotlama yöntemiyle sonuçları analiz edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. C₆₀ fullürenin A549 hücre hattında Beclin1 üzerine etkisinin sonuçları

Analiz sonuçlarında elde edilen bulgulara 100 nM C₆₀ ile tedavi edilen grupta istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış görülürken, 250 nM C₆₀ ile tedavi edilen grupta sonuçların daha olumlu olduğu ve son olarak 500 nM C₆₀ ile tedavi edilen grupta ise en anlamlı artış gözlemlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kanser, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve tedavi edilmediği takdirde diğer organlara yayılarak canlının ölümüne yol açmasıdır (Santo et al. 2011). Kanser, latince “cancer” kelimesini köken almakta ve karşılığı yengeç anlamına gelmektedir. Hipokrat, bu hastalığın yerleştiği organdan diğer organlara yayılmasını gözlemlemiş ve bu tanıyı yapmıştır (Birol ve Akdemir 2005). Kanser bugün dünyada en çok korkulan bir hastalıktır. Kanser korku salmasının ana nedeni insan yaşamını tehdit etme ve ölümle sonuçlanma riskinin yüksek olmasıdır (Santo et al. 2011).

Akciğer kanseri ise günümüzde bütün dünyada en yüksek ölüm oranına sahip kanser türü olup, erken teşhis edilememesi durumunda hastalığın seyrine ve kişinin yaşam süresinin kısalmasına sebep olmaktadır (Monteiro et al. 2014). Akciğer kanseri kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sıraya yerleşmektedir. Bu bakımdan akciğer kanseri her geçen gün artış gösteren salgın hastalık olarak tanımlanmaktadır (Jemal et al. 2002). Ülkemizde kadınlar arasında da sigara içme oranının artması ile akciğer kanseri vakaları 1980 yılından günümüze kadar önemli oranda artmış ve bu artışını devam ettirmektedir. Bu sebeple akciğer kanseri hastalığının ülkemizde de giderek artacağı düşünülmektedir (Özyardımcı 2001). Akciğer kanseri vakalarının resmi istatistiklerine göre yılda 20,000 ile 25,000 yeni kanser tanısı konulmakta ve bu sayının 30,000-40,000’e kadar artabileceği düşünülmektedir (Haydaroğlu 2000).

Nanoteknoloji son yıllarda nanobilim ve nanoteknolojideki hızlı gelişmelere paralel olarak nanopartiküllerin bu alanda kullanılabilme potansiyellerinin araştırılması ile gündeme gelmiştir (Bosi et al. 2003). Bu gelişmelere bağlı olarak, dokular ve hücreler tarafından kolayca tolere edilebilme, oksidatif stresin yoğun olduğu bölgelere hızlı bir şekilde yayılabilme, düşük konsantrasyonlarda etkili olabilme ve hücre içerisinde uzun süre bozulmadan aktif kalabilme gibi ideal antioksidan özelliklere sahip olan nanopartiküller tasarlananın mümkün olabileceği bildirilmiştir (Hunter ve Preedy 2011).

Buradan hareketle bu tez çalışmasında C₆₀ fullerene'nin suda çözünebilen bir formu olan polihidroksi fullerene C₆₀ (fullerenol) nanopartiküllerinin etki potansiyelinin insan akciğer kanser hücre hattı olan A549 hücrelerinde otofajik markerler üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çünkü fullerene C₆₀'ın güçlü bir antikanser, sitoprotektif ve sitotoksik etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Panzarini et al. 2013). Fullerene C₆₀'ın düşük konsantrasyonda normal hücreler ve doku üzerinde etkisinin olmadığı, serbest radikal temizleyici, antioksidan potansiyeli ve doksorubisinin indüklediği kronik kardiyotoksisite ve hepatotoksisiteye karşı koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür (Prylutska et al. 2014). Özellikle nanokristalin C₆₀'ın oksidatif strese bağlı ve bağımsız olarak, dirençli gliomaya karşı sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Panzarini et al. 2013). Fullerenler, küresel şekli ve bir nanometre boyutu nedeniyle ilaç tasarımı için daha önemlidir. Ayrıca, biyolojik olarak fullerenler etkili antioksidandır (Zhou 2013). ROS ve LC3-II düzeyini artırarak C₆₀ nanopartiküller gelişmiş otofaji, oksidatif stres ve ROS oluşumu yoluyla iç ve dış kaynaklı apoptoz yollarının nano materyal ile tetiklenmesini göstermiştir (Wei et al. 2010, De Stefano et al. 2012).

A549 hücresi ilk olarak 58 yaşındaki bir erkek akciğer kanseri hastasının tümör dokusundan Dr. D. J. Giard tarafından alınarak kültüre edilmiştir. A549 hücreleri in vitro koşullarda yüzeye yapışarak çoğalırlar. Hücrenin bir diğer karakteristiği, yüksek seviyede lesitin ve doymuş yağ asidi sentezlediğinden dolayı, membran fosfolipidlerinin korunmasını sağlamaktadır. Böylece hücre dirençli bir hal kazanmaktadır. İlaç metabolizması modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (O'Brien et al. 1987).

Programlı hücre ölüm mekanizmaları arasında son yıllarda dikkat çekmeye başlayan otofajik hücre ölümü, moleküler safhada elde edilen veriler ile hücrenin ölüm yollarında nasıl kontrol edildiği hakkında yeni bilgiler kazandırmıştır. Otofaji hücrenin strese karşı dayanıklılığını yükseltmekte ve canlılığını devam ettirmesine imkân tanımaktadır. Hücresel yıkım ve geri kazanım mekanizması olarak adlandırılan otofaji bazı durumlarda hücrenin ölümüyle sonuçlanmasına rağmen, otofajinin ilaçlar veya genetik olarak bloke edilmesiyle, hücrenin yaşama şansını da arttırmaktadır (Herskho et al. 1998).

Otofaji mekanizmasının doğru işlememesi durumunda kanser, enfeksiyon hastalıkları, sinir hastalıkları, inme, miyokart enfarktüsü gibi pek çok sistemik hastalıkla olan bağlantısı sebebiyle otofaji ile ilgili araştırmaların insan sağlığı için önemini göstermektedir. Otofajinin hem temel bilimlerde hem de klinik bilimler alanında daha iyi anlaşılması, yeni tedavi, tanı ve ilaç formülasyonlarının hazırlanması, insan sağlığı açısından önemli hastalıklara, yeni ve bilinçli moleküler temelli çözümler üretilmesini sağlayacaktır. Otofaji ile apoptoz gibi programlı hücre ölümlerinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması, hastalıklara uygulanacak ilaç tedavilerin önünü açacaktır (Galluzi et al. 2012).

Karbonun Üçüncü formu olan C_{60} fullerene Buckyball 12 pentagonal ve 20 altıgen halkalarının sferoid bir şekli oluşturan kombinasyonudur. Çok farklı özelliklerden dolayı bilim ve teknolojiye önemli bir molekül haline gelmiştir. C_{60} fullerene antioksidan bir role sahiptir (Ulloa 2013). C_{60} Fullerene, ROS'u arttırmak için reaktif oksijen indükleyicisi olarak kullanılan UV ışığının emilimine dayanan ve C_{60} 'ın ışığa duyarlı hale getirilmesine izin veren kanser tedavisinde spesifik bir ilaç taşıyıcısı olarak kullanılır (Shi et al. 2016). Öte yandan, C_{60} sağlıklı yetişkin hücreleri değil, kanser hücrelerinde ROS'u indükler (Prylutska et al. 2014). Bunun yanında, nano C_{60} ROS, oksidatif stres ve LC3-II oluşumunu artırarak kanser hücrelerinde otofajiyi ve kemoterapötik duyarlılığı artırır (Wei et al. 2010).

C_{60} fullerenin kanserdeki rolünün tanımlanmış olmasına rağmen, A549 hücre hatlarında otofajinin potansiyel regülasyonu ele alınmamıştır. Otofajinin moleküler mekanizması hakkında detaylar hala bilinmemektedir. Bu nedenle, C_{60} fullerenin A549 hücre hatlarında araştırılan p53 / Bax / TIGAR ve otofajik işaretleyici protein olan Beclin1 üzerindeki etkisi programlanmış hücre ölümü, hücre içi bir programın aracılık ettiği biyolojik bir süreçte gerçekleşmektedir. Programlanmış birinci hücre ölüm tipi, morfolojik olarak farklı karakterler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizma ile ayırt edilen apoptozdur. İkinci programlanmış hücre ölümü olan otofajinin, hızlı bir şekilde hücre stres altında düzenlendiği ve sürekli hücrenin hayatta kalmasına izin vermek için enerji üretimi için bir seçenek kaynağı sağladığı gibi protein degradasyonu ve organel dönüşümü gibi homeostatik işlevi desteklemektedir. Şimdiye kadar elde edilen veriler, otofaji mekanizmasının, kaspazdan bağımsız programlanmış hücre ölümü olarak

adlandırılması ve hücreleri öldürmek için de kullanılabileceğinin kanıtıdır (Gozuacik ve Kimchi 2007).

Bozulmamış C₆₀'ın antikanser etkisi, birçok farklı araştırma ve çalışmada gözlenmiştir (Isakovic et al. 2006). Bu çalışmada, C₆₀ fullerene etkisi altında A549 akciğer kanser hücre hattı hücrelerinin proliferasyonu ve yaşayabilirliği araştırılmıştır.

C₆₀ fullerenin nöroprotektif etkisi ve fullerenden türetilen birçok çalışma, molekül başına çoklu radikal yerleştirme yeteneği ile "radikal sünger" olarak işlev gören ve hücrelerdeki oksidatif stresin neden olduğu sitotoksik etkileri azaltabilen birçok çalışmaya odaklanmıştır (Lee et al. 2011).

Bu çalışmada gözlemlenen sonuçlar (Şekil 3.1), A549 hücre hattında C₆₀ fullerenin canlılığı azaltma etkisini, 24 saat maruziyetten sonra doza bağımlı bir şekilde incelenmiştir. C₆₀ fullerene en yüksek doz olan 500 nM kontrol grubuyla kıyaslandığında hücre canlılığında bir değişim olmadığı gözlemlendi. Ayrıca, bu çalışmada C₆₀ fullerene düşük doz olan 100 nM hücre ve 250 nM verilen grubunda hücre canlılığını değiştirmediği elde edilen sonuçlar göstermektedir. Bu çalışmada yer alan veriler son araştırma ile iyi bir uyum içerisinde. C₆₀ fulleren, A549 akciğer kanseri hücre hattında önemli hücre ölümüne yol açmadı (Wang et al. 2014). Bu konuda farklı araştırmalar incelendiğinde Örneğin, Franskevych ve arkadaşları 2016'da C₆₀ ile tedavi edilen lösemik hücrelerin canlılığını kısmen azalttığı gibi, bu çalışmanın sonuçlarının teyit edilmesinde veya hafifletilmesinde bir miktar araştırma yapılmıştır. Bununla birlikte, doksorubisin tedavisi ile C₆₀ fulleren, HCT116 kolon kanseri hücresi ve MCF7 göğüs kanseri hücre hattında sitotoksikite ve hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir (Panchuk et al. 2015).

ROS, çeşitli hücre tiplerinde kaspazdan bağımsız hücre ölümü olan otofajiyi uyarır (Lee et al. 2011). C₆₀, sitotoksik olmayan konsantrasyonda, foto aktivasyon ile ROS üreticisi olarak tanımlanırken, nano C₆₀, hücrelerin kemoterapiye duyarlı hale getirmesi nedeniyle kanser hücrelerinin ölümünü artırmaktadır (Zhang et al. 2009). Eşsiz kimyasal ve fiziksel özelliklerinden dolayı elektronik yapı, doymamış bağ ve üç boyutlu şekil, membran ve kan bariyerini geçmeye olanak tanır, biyokimya ve tıp alanlarında kullanılabilir (Wang et

al. 2014). Ershova ve arkadaşlarının 2016'da açıkladıkları gibi, C₆₀ Fullerene'nin oksidatif stres üretim yeteneği bilimsel literatürde gösterilmiştir (Ershova et al. 2016).

Bizim çalışmalarımızda C₆₀ Fullurenin A549 Hücre Hattında ROS Düzeyinin incelenmesinde de hücreler C₆₀ fulleren ile (100, 250, 500 nM) dozlarda tedavi edilmiş ve tedavi uygulamasından sonra hücreler 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen bulgular kontrol grubuyla kıyaslandığında, 100 nM C₆₀ verilen grupta herhangi bir değişim gözlenmezken ve diğer 250 nM ile 500 nM verilen grupta ise ROS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan kısmi bir artış gözlenmemiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, C₆₀ fullerenin, A549 hücre hatlarında hücre canlılığı ve ROS düzeyinde anlamlı bir değişime neden olmadığını göstermiştir.

Otofaji, son zamanlarda daha fazla dikkat çeken hücresel yollardan biridir (Zhang et al. 2009). Stresli koşullarda hayatta kalma, uzun ömürlü proteinlerin, organellerin bozulması ve hücresel süreç, otofajinin iyi bilinen özellikleridir (Lee et al. 2011). Otofaji ile ilişkili proteinler Beclin1, LC3-I ve LC3-II, otofajik aktiviteyi düzenler. Beclin1 proteini için (Atg6) gereklidir ve otofajinin başlangıç basamaklarında otofajinin yukarı regülatördür (Wang et al. 2014). Otofaji yolunda, Beclin1'in otofatazom membranların kaydedilmesinde kilit bir işlevi vardır (Lee et al. 2011). Nanomateriyallere hücresel cevap otofajiye neden olur ve C₆₀ fullerenin antikanser aktivitesi bir kanser tedavisi olabilir, çünkü C₆₀ kanser hücrelerinde birçok otofaji karakterini tetikler, ancak normal hücrelere karşı fulleren sitotoksiste uygulamalarını geciktirebilir (Zhang et al. 2009). Alzheimer hastalığı olan hastalarda, Beclin1'in, transgenik farelerde çok güçlü bir şekilde azaldığı, Beclin1 eksikliği, nöronal hücrelerde otofajiyi azaltmıştır (Lee et al. 2011).

Bax veya Bcl-2, p53 adlı tümör inhibe edici protein kofaktörü olma görevine sahip, insanda bulunan bir proteindir. Bax geni, Bcl-2 gen familyasına aittir. Bax, p53 yoluyla etkileşime girerek hücrenin otofaji veya apoptoza gidişini hızlandırır. Bu çalışmada, A549 insan akciğer kanseri hücre hatlarında Bax proteininin otofajik çalışmalarımızın bulguları, önceki literatür bulguları ile iyi bir uyum içinde sonuçlanmıştır.

Bu çalışmada, C₆₀ fullerene A549 hücre hattında 100 nM, 250 nM ve 500 nM doz ile muamele edilmiş ve Bax protein hücreleri 24 saat sonra Western Blotlama yöntemi ile analiz edildi. Elde ettiğimiz bulgular kontrol grubuyla kıyaslandığında 100 nM verilen C₆₀ kontrol grubuna göre iki kat arttırdığı gözlenmiş, 250 nM verilen C₆₀ grubunda bu artışın azaldığı ve en yüksek doz olan 500 nM verilen C₆₀ grubunda herhangi bir değişim olmadığı görülmüştür (Şekil 3.3). Bcl-2 protein familyasının özelleşmiş olan BH3 domanine sahip olan Beclin1, Bcl-2 haricinde diğer bir aile üyesi olan Bcl-xL proteini ile de çalışmaktadır. Beclin1 proteini, Bcl-2 proteini veya Bcl-xL ile olan ilişkisinin farklı sebeplerden dolayı bozulması, hücrenin apoptoz ve otofaji gibi ölüm yolları arasında bir seçim yaparak yaşamını devam ettirmekte veya canlılığına son vermektedir (Kang et al. 2011).

Son yıllarda otofajiyle ilgili bir çok literatür ve çalışma mevcutken otofaji ve A549 hücre hatlarında henüz bir çalışma olmadığını gözlemledik. Örneğin, insan malign glioma hücrelerinde, GFP-LC3 punktat oluşumunda ve LC3-II dönüşümünde otofajik hücre ölümünü destekleyen sonuçları ortaya çıkarmaktadır (Pallichankandy et al. 2015). U-87 insan malign gliomda SNG, LC3-II dönüşümüyle otofajiye neden oldu ve Beclin1 düzeyini arttırdı (Pallichankandy et al. 2015). p53 proteini hücre döngüsü tutulmasında, DNA onarımında ve hücre ölümlerinde rol oynar (Nakada et al. 2011). p53'ün üst regülasyonu, hücre ölümlerinde önemli bir rol oynar (Tripathi et al. 2016).

Bizim çalışmamızda C₆₀ ile 100 nM, 250 nM ve 500 nM ile tedavi edilen p53 geninde 24 saat sonra Western Blotlama yöntemiyle sonuçlar analiz edildi. p53 gen tedavisi sonucunda elde edilen bulgular kontrol grubuyla kıyaslandığında 100 nM C₆₀ verilen grupta anlamlı bir yükseliş olduğu ve 250 nM ile 500 nM C₆₀ verilen gruplarda ise etkisinin devam ettiği ancak doz arttıkça bu etkinin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.4).

Diğer bir çalışmamız olan C₆₀ fullurenin A549 Hücre hattında TIGAR protein ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesinde C₆₀ ile 100 nM, 250 nM ve 500 nM dozlarında TIGAR proteini tedavi edildi. Uygulanan tedaviden 24 saat sonra sonuçlar Western Blotlama yöntemiyle analiz edildi. Elde ettiğimiz bulgular kontrol grubuyla kıyaslandığında 100 nM C₆₀ verilen grupta anlamlı bir artış olduğu ve 250 nM C₆₀ verilen grupta ise yüzde yüze yakın bir başarı elde edildiği ve bu tedavi başarısının

devam ettiği görüldü. Ancak 500 nM C₆₀ verilen grupta diğer iki doz düzeyine göre protein ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (Şekil 3.5).

En son bulgumuz olan Beclin1 ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, C₆₀ ile 100 nM, 250 nM ve 500 nM dozlarında 24 saatlik C₆₀ tedavisi sonrasında elde edilen sonra Western Blotlama sonuçlarına göre 100 nM C₆₀ ile tedavi edilen grupta çok az bir yükseliş görülrken, 250 nM C₆₀ ile tedavi edilen orta grupta sonuçların daha olumlu olduğu ve son olarak 500 nM C₆₀ ile tedavi edilen grubun tedaviye en olumlu cevabı verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.6).

Beclin1 otofaji mekanizmasının başlaması, sürdürülmesi ve sonuçlandırılmasıyla ilgili protein ailesi olup Atg proteini ile işbirliği içerisinde. Beclin1, Bcl-2'nin interaksiyon yardımcısı olarak keşfedilmiş ve tümörögenез başta olmak üzere birçok pozisyonda görev almaktadır (Huang et al. 2010). Bcl-2 protein familyasının özelleşmiş olan BH3 domanine sahip olan Beclin1, Bcl-2 haricinde diğer bir aile üyesi olan Bcl-xL proteini ile de çalışmaktadır. Beclin1 proteini, Bcl-2 proteini veya Bcl-xL ile olan ilişkisinin farklı sebeplerden dolayı bozulması, hücrenin apoptoz ve otofaji gibi ölüm yolları arasında bir seçim yaparak yaşamını devam ettirmekte veya canlılığına son vermektedir (Kang et al. 2011).

Bizim “C₆₀ Fulleren’ nin A549 İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattında Otofajik Markerlar Üzerine Etkisi” başlıklı olan tez konumuz, yaptığımız literatür araştırmaları neticesinde bugüne kadar çalışılmadığı ve özgün bir konu olduğu ortaya çıkmaktadır. C₆₀ fulleren hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve doza bağlı bir şekilde A549 hücrelerinde otofajinin uyarılmasına neden olduğu belirlenmiştir. Genel olarak, bizim bulgularımız suda çözünen fulleren C₆₀, Beclin1, Bax, p53 ve TIGAR proteinlerinin sinyal yollarını aktif etmekte, A549 hücrelerinde otofajiye neden olduğu gözlemlendi. Elde edilen bulguların diğer kanser hücrelerinde doğrulanmasına ve yapılacak ileri deneylere ihtiyaç duymaktadır.

Çalışmalarımızın dünyada ve ülkemizde halen insan yaşamını tehdit eden kanser hastalıklarına ve özellikle akciğer kanserinin tedavisinde, yeni ilaç tasarımlarının ve tedavi süreçlerinin belirlenmesinde katkısının olacağına inanıyoruz.

KAYNAKLAR

Anding AL, Baehrecke EH (2015) Autophagy In Cell Life And Cell Death. Apoptosis and Development, Volume 114: 67-91

Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM (2004) Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. J. Cont. Rel 100(1): 5-28

Alar T, Şahin EM (2012) Akciğer kanseri, birinci basamakta tanı, tedavi ve korunma, Lung cancer: Diagnosis, treatment and prevention in primary care, Smyrna Tıp Dergisi p. 68-74

Alvarez RG, Marini A, Schmitt C, Saltzman CL (2006) Stage I and II posterior tibial tendon dysfunction treated by a structured nonoperative management protocol: an orthosis and exercise program. Foot and ankle international 27(1): 2-8

Andrievsky GV, Bruskov VI, Tykhomyrov AA, Gudkov SV (2009) Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C₆₀ fullerene nanostructures in vitro and in vivo. Free Radical Biology & Medicine 47: 786-793

Aydiner A, Can G (2010) Akciğer kanserinde tedavi ve bakım, 1. Baskı: İstanbul, Haziran ISBN: 978-605-125-143-1

Bhadra D (2002) Pegnology, a review of PEG-ylated systems. Pharmazie p. 57(1): 5-29

Baldrighi M, Trusel M, Tonini R, Giordani S (2016) Carbon Nanomaterials Interfacing with Neurons An In vivo Perspective Front. Neurosci 10: 250

Becker L, Poreda RJ, Bada JL (1996) Extraterrestrial helium trapped in fullerenes in the Sudbury impact structure. Science 272(5259): 249-252

Bensasson D, Zhang DX, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses 16(6): 314-321

Birol L, Akdemir N (2005) İç Hastalıkları ve Hemşirelik Bakımı, 2. baskı, Ankara s. 246-304

Brigger IC Dubernet, Couvreur P (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* p. 54(5): 631-51

Brown S, Szapocznik J, Spokane A, Fals D, Gambirazio F, Zarate M, Mason, CA (2004) Prevalence of cognitive impairment in a population-based study of urban Hispanic elders in Miami, Florid *The Gerontologist*, Special Issue I p. 51

Bosi S, Da Ros T, Spalluto G, Prato G (2003) Invited Review: fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38: 1-3

Buseck PR, Tsipursky SJ, Hettich R (1992) Fullerenes from the geological environment. *Science* 257(5067): 215-217

Buzea C, Pacheco I, Robbie K (2007) Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases* 2(4): 17-71

Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, Crowell RE (2008) A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer research* 68(20): 8535-8540

Chirico F, Fumelli C, Marconi A, Tinari A, Straface E, Malorni W, Pincelli C (2007) Carboxyfullerenes localize within mitochondria and prevent the UVB-induced intrinsic apoptotic pathway. *Experimental dermatology* 16(5): 429-436

Clegg A, Scott DA, Hewitson P, Sidhu M, Waugh N (2002) Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: A systematic review. *Thorax* 57: 20-28

Daly TK, Buseck PR, Williams P, Lewis CF (1993) *Science* 259: 1599-1601

De Stefano, D Carnuccio, R Maiuri, MC (2012) Nanomaterials toxicity and cell death modalitie, *Journal of Drug Delivery* 167896

Edinger AL, Thompson CB (2004) Apoptosis necrosis and autophagy. December 16(6): 663-669

Ershova ES, Sergeeva VA, Chausheva AI, Zheglo DG, Nikitina VA, Smirnova TD, Kostyuk SV (2016) Toxic and DNA damaging effects of a functionalized fullerene in human embryonic lung fibroblasts Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 805: 46-57

Fujitani Y, Kobayashi T, Arashidanib K, Kunugitab N, Suemurac K (2008) Measurement of the Physical Properties of Aerosols in a fullerene Factory for Inhalation Exposure Assessment. Journal of Occupational and Environmental Hygiene 5(6): 380-389

Foley S, Colin C, Monique S, Claude B, Bernard F, Erlangerc S, Christian L (2002) Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivativ 294(1): 116-119

Harhaji L, Isakovic A, Raicevic N, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N (2007) Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nano-crystalline fullerene. Eur J Pharmacol 568: 89-98

Haydaroglu A (2000) Akciğer Kanserlerinde radyoterapi İzmir, ISBN No: 975-483375-3

Hansen M, Taubert S, Crawford D, Libina N, Lee SJ, Kenyon C (2007) Lifespan Extension By Conditions That Inhibit Translation In Caenorhabditis Elegans. Aging Cell 6: 95-110

Hars ES, Qi H, Ryazanov AG, Jin S, Cai L, Hu C, Liu LF (2007) Autophagy Regulates Ageing In C. Elegans. Autophagy 3: 93-95

Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. Annu Rev Biochem 67: 425-79

Hoyt VW, Mason E (2008) Nanotechnology: emerging health issues. Journal of Chemical Health and Safety 15(2): 10-15

Huang X, Bai HM, Chen L, Li B, Lu YC (2010) Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumours. Journal of Clinical Neuroscience 12(12): 1515-1519

Huncharek M, Kupelnick B, Geschwind JF, Caubet JF (2000) Prognostic significance of p53 mutations in non-small cell lung cancer a meta-analysis of 829 cases from eight published studies. *Cancer Lett* 153(1-2): 219-26

Hunter RJ, Preedy VR(2011) *Nanomedicine in Health and Disease* 101(103): 214

Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M (2002) Cancer statistics, 2002. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians* 52(1): 23-47

Isakovic A, Markovic Z, Todorovic-Marcovic B, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Mirkovic M, Trajkovic V (2006) Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene *Toxicological Sciences* 91(1): 173-183

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV (2012) Molecular definitions of cell death subroutines recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation* 19(1): 107-120

Gelperina S, Kisich K, Iseman MD, Heifets L (2005) The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 172(12): 1487-1490

Gozuacik D, Kimchi A (2007) Autophagy and Cell Death, current topics in development biology 78(6): 217-245

Gozuacik D ve Kimchi A (2006) DAPk protein family and cancer. *Autophagy AprJun* 2(2): 74-9

Greg T, Hermanson (2013) *Bioconjugate Techniques* (Third edition) Chapter 16- Buckyballs, Fullerenes and Carbon Nanotubes p. 741-755

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP(1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. natn. Cancer Inst.* p. 51: 1417-1423

Goldstain A (1997) *Handbook of Nanophase Materials*, Marcel Dekker Inc, New York

Goorsell D, Çıracı S (2000) *Biomol and Nanotech*, American Scientist 88(3): 230

Ja Borm P, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E (2006) The potential risks of nanomaterials a review carried out for ECETOC. *Particle and fibre toxicology* 3(1): 11

Jeong SJ, Koh W, Kim B, Kim SH (2011) Are there new therapeutic options for treating lung cancer based on herbal medicines and their metabolites? *Journal of Ethnopharmacology* 138: 652-661

Juhasz G, Hill JH, Yan Y, Sass M, Baehrecke EH, Backer JM (2008) The Class Iii Pi(3)K Vps34 Promotes Autophagy And Endocytosis But Not Tor Signaling In *Drosophila*. *The Journal Of Cell Biology* 181(4): 655–666

Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D (2011) The Beclin-1 network regulates autophagy and apoptosis, *Cell Death and Differentiation* 18(4): 571-80

Kaplan ŞŞ, Karanfil T, Kitiş M (2007) Nanomateryallerin Potansiyel Çevresel Etkileri, 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, Yaşam Çevre Teknoloji 7: 24-27

Kiss LB, Söderlund J, Niklasson GA, Granqvist CG (1999) New approach to the origin of lognormal size distributions of nanoparticles. *Nanotechnology* 10: 25-2

Klionsky DJ, Schulman BA (2014) Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nat Struct Mol Biol* 21(4): 336-45

Klionsky DJ (2007) Autophagy from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11): 931-7

Kroemer G, Marino G, Levine B (2010) Autophagy And Integrated Stress Response. *Mol Cell* 40(2): 280-293

Kommareddy S, Tiwari SB, Amiji MM (2005) Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery. *Technol Cancer Res Treat* 4(6): 615-25

Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley REC (1985) Buckminsterfullerene. *Nature* 318: 162-163

Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells, *Nature* 278(2): 261-263

Langer R (2000) Biomaterials in drug delivery and tissue engineering one laboratory's experience. *Acc Chem Res* 33(2): 94-101

Lee M, SW Kim (2005) Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery. *Pharm Res* 22(1): 1-10

Lee CM, Huang ST, Huang SH, Lin HW, Tsai HP, Wu JY, Chen CT (2011) C₆₀ Fullerene-pentoxifylline dyad nanoparticles enhance autophagy to avoid cytotoxic effects caused by the amyloid peptide, *Nanomedicine Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(1): 107-114

Lee J, Giordano S, Zhang J (2012) Autophagy, Mitochondria and Oxidative Stress Cross-Talk And Redox Signalling *Biochem J* 15. 441(2): 523-40

Levine B, Yuan J (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* Oct. 115(10): 2679-88

Liechty WB, NA Peppas (2012) Expert opinion Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 80(2): 241-6

Liveri VT (2006) Nucleation, growth, and arrested growth in confined space. *Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems* 75-90

Markovic Z, Trajkovic V (2008) Review Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀) *Biomaterials* 29: 1-13

Majeski AE, Dice JF (2004) Mechanisms Of Chaperone-Mediated Autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* Dec 36(12): 2435-44

Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P (2010) Overview Of Macroautophagy Regulation In Mammalian Cells. *Cell Research* 20: 748-762

Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH, Levine B. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301(5638): 1387-1391

Meléndez A, Levine B (2009) Autophagy in *C. elegans*. *WormBook* 24: 1-26

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 107-32

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182): 1069-1075

Mizushima N (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* 12(2): 1535-41

Mu L, Feng SS (2003) A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol) PLGA nanoparticles containing vitamin ETPGS. *J Cont Rel* 86(1): 33-48

Monteiro LS, Bastos KX, Barbosa-Filho JM, Athayde-Filho PF, Diniz MFFM, Sobral MV (2014) Medicinal plants and other living organisms with antitumor potential against lung cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014

Mroz W, Jedynski M, Hoffman J, Jelinek M, Major M, Prokopiuk A, Szymanski Z (2007) Effect of reactive atmosphere on pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films To cite this article *J. Phys Conf. Ser* 59: 720

Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, Hamada J (2011) Aberrant signalling pathways in glioma, *Cancers* 3: 3242-3278

Nihat Özyardımcı, Mehmet Karadağ, Bekir Akar, R. Oktay Gözü, Ercüment E (2001) *Türkiye Klinikleri Arch Lung* 2(3): 119-22

Niwa Y, Iwai N (2006) Genotoxicity in cell lines induced by chronic exposure to water-soluble fullerenes using micronucleus test, *Environ. Health Prev. Med.* 11: 292-297

O'Brien KAF, Smith LL, Cohen GM (1987) Inability of A Human Lung Tumour Cell Line to Detect Chemically Induced Organ Toxicity to the Lung. *Toxicology in Vitro* 1(2): 85-90

Öztop İ (2009) *International Journal of Hematology & Oncology / UHOD: Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi* 13(9): 184-194

Pallichankandy S, Rahman A, Thayyullathil F, Galadari S (2015) ROS-dependent activation of autophagy is a critical mechanism for the induction of anti-glioma effect of sanguinarine, *Free Radical Biology and Medicine* 89: 708-720

Panchuk RR, Prylutska SV, Chumak VV, Skorokhyd NR, Lehka LV, Evstigneev MP, Stoika RS (2015) Application of C₆₀ Fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 11(7): 1139- 1152

Panzarini E, Inguscio V, Twnuzzo BA, Carata E, Dini L (2013) Nanomaterials and autophagy new insights in cancer treatment, *Cancers* 5: 296-319

Papinski D, Schuschnig M, Reiter W, Wilhelm L, Barnes CA, Maiolica A (2014) Early Steps In Autophagy Depend On Direct Phosphorylation Of Atg9 By The Atg1 Kinase. *Molecular Cell* 53(3): 471-483

Piao JM, Kim HN, Song HR, Kweon SS, Choi JS, Yun WJ, Kim YC, Oh IJ, Kim KS, Shin MH(2011) p53 codon 72 polymorphism and the risk of lung cancer in a Korean population. *Lung Cancer* 73(3): 264-267

Prat F, Stackow R, Bernstein R, Qian W, Rubin Y, Christopher S (1999) Triplet-State Properties and Singlet Oxygen Generation in a Homologous Series of Functionalized Fullerene Derivatives Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles, California 90095-1569 *103(36): 7230-7235*

Prylutska S, Grynyuk I, Matyshevska O, Prylutsky Y, Evstigneev M, Scharff P, Ritter U (2014) C₆₀ fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment, *Drugs* RD 14: 333-340

Puglisi M, Dolly S, Faria A, Myerson JS, Popat S, O'Brien MER (2010) Treatment options for small cell lung cancer-do we have more choice? *British Journal of Cancer* 102: 629-638

Rawson PS (1984) *Ceramics* University of Pennsylvania Press. ISBN 0-8122-1156-1

Rzigalinski BA(2005) Nanoparticles and cell longevity. *Technol Cancer Res Treat* 4(6) 651-659

Robbins SM, Houghton PE, Woodbury MG, Brown JL (2006) The therapeutic effect of functional and transcutaneous electric stimulation on improving gait speed in stroke patients: a meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* Jun. 87(6): 853-859

Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong K (2000) Molecular and genetic aspects of lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161(4): 1355-1367

Santo E, Gaiva M, Espinosa M, Barbosa D, Belasco A (2011) Taking Care Of Children With Cancer Evaluation Of The Caregivers Burden And Quality Of Life. *Latino-Am. Enfermagem* 19(3): 515-22

Shi J, Wang B, Wang L, Lu T, Fu Y, Zhang H, Zhang Z (2016) Fullerene (C₆₀) based tumor-targeting nanoparticles with off-on state for enhanced treatment of cancer, *Journal of Controlled Release* p. 235-245-258

Shintani T, Klionsky DJ (2004) Autophagy In Health And Disease: A Double-Edged Sword. *Science* 306: 990-5

Singh R (2011) Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab*, 13(5): 495-504

Singh R, Lillard JW (2009) Jr Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology* 86(3): 215-223

Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA (2012) A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci*, 48(3): 416-427

Stern ST, Adisheshaiah PP, Crist RM (2012) Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity, *Particle and Fiber Toxicology* p. 9-20

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Kroemer G (2008) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53, *Nature Cell Biology*, 10 (6): 676-687

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (2015) Türkiye Kanseri İstatistikleri, Ankara

Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Haris CC (2004) World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, France IARC Press p. 146-248

Tripathi VK, Kumar V, Pandey A, Vatsa P, Dhasmana A, Singh RP, Lohani M (2016) Monocrotophos Induces the Expression of Xenobiotic Metabolizing Cytochrome P450s (CYP2C8 and CYP3A4) and Neurotoxicity in Human Brain Cells, Molecular Neurobiology p. 1-19

Türk Nöroşirürji Derneği (2007) Nanoteknoloji ve Nöroşirürji, Ocak sayısı (14): 53

Ulloa E (2013) Fullerenes and their Applications in Science and Technology, Introduction to Nanotechnology Conference p. 1-5

Vila A (2002) Design of biodegradable particles for protein delivery. J Control Release 78(1-3): 15-24

Velculescu VE, El-Deiry WS (1996) Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. Clin Chem 42(6): 858-68

Wang R, Xiao X, Wang PY, Wang L, Guan Q, Du C, Wang XJ (2014) Stimulation of autophagic activity in human glioma cells by anti-proliferative ardisiposide isolated from Ardisia cuneata, Life Sciences 110(1): 15-22

Wang M, Thanou M (2010) Targeting nanoparticles to cancer. Pharmacological Research 62(2): 90-99

Wei P, Zhang L, Lu Y, Man N, Wen L (2010) C₆₀ (Nd) nanoparticles enhance chemotherapeutic susceptibility of cancer cells by modulation of autophagy, Nanotechnology 21(49): 495101

Wei J, Barr J, Kong LY (2010) Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway, Mol Cancer Ther 9: 67-78

Williams GM (1992) DNA reactive and epigenetic carcinogens. Experimental and Toxicologic Pathology 44: 457- 464

Xiao G (2007) Autophagy and Nf-Kb: Fight For Fate. Cytokine Growth Factor Rev. Jun-Aug 18(3-4): 233-43

Xie Z, Klionsky DJ (2007) Autophagosome Formation: Core Machinery And Adaptaion. Nat Cell Biol 9: 1102-9

Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP (2002) BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. Science 297(5588): 1837-48

Yang Z, Klionsky DJ (2010) Eaten alive a history of macroautophagy. Nat Cell Biol, 12(9): 814-22

Yılmaz A (2006) Proteinlerin Yürüdüküklerini Keşfeden Bir Yıldızımız, Bilim ve Teknik 460: 66-69

Ying Zh W, Min L, Yang LL, JinLi S, ZengTao Zh, Yun Zh, HaiYun S (2013) Autophagy as new emerging cellular effect of Nanomaterials, Chin Sci. Bull 58(33): 4031-4038

Zhang Q, Yang W, Man N, Zheng F, Shen Y, Sun K, Wen LP (2009) Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C₆₀ nanocrystal, Autophagy, 5(8): 1107-1117

Liu Z, Kiessling F, Gätjens J (2010) Advanced nanomaterials in multimodal imaging: design, functionalization, and biomedical applications. Journal of Nanomaterials 51

Zhou Zh (2013) Liposome formulation of fullerene-based molecular diagnostic and therapeutic agents, Pharmaceutics 5: 525-541

Zogovic NS, Nikolic NS, Vranjes-Djuric SD, Harhaji LM, Vucicevic LM, Janjetovic KD, Misirkic MS, Todorovic-Markovic BM, Markovic ZM, Milonjic SK, Trajkovic VS (2009) Opposite effects of nanocrystalline fullerene (C₆₀) on tumour cell growth in vitro and in vivo and a possible role of immune supression in the cancer-promoting activity of C₆₀, Biomaterials 30(36): 6940-6946

ÖZGEÇMİŞ

Doğum yeri ve tarihi : Yeşilköy, Ankara, Haymana 01.05.1969

EĞİTİM

1987-1990 : Konya Kulu Lisesi
1990-1992 : Ankara Üniversitesi SHMYO Tıbbi Laboratuvar,
2011-2013 : Anadolu Üniversitesi İşletme Lisans (Dikey geçiş),
2010-2015 : Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Lisans,
2015-2018 : Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Yüksek Lisans,

ÇALIŞMA HAYATI

25.12.1996-18.01.2011 : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
18.01.2011- : Bingöl Üniversitesine naklen atama,
26.04.2011-02.12.2012 : Bingöl Üniversitesi Konukevi Müdürlüğü,
02.12.2012-31.07.2013 : Bingöl Üniversitesi Yemekhane Müdürlüğü,
31.07.2013-13.01.2014 : Bingöl Üniversitesi Konukevi Müdürlüğü,
13.01.2014-22.06.2016 : Bingöl Üniversitesi Termal Tesis Müdürlüğü,
18.03.2015- : Yabancı Diller Yüksekokul Sekreterliği,
30.12.2016- : Bingöl Üniversitesi Basın Yayın ve Halkla İlişkiler
Müdürlüğü görevine atanmış ve halen Yüksekokul Sekreterliği ile birlikte bu görevini
yürütmektedir. Evli ve üç çocuk babasıdır.