

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOKİMYA (VETERİNER) DOKTORA PROGRAMI**

**ZOLEDRONİK ASİDİN D-17 KÖPEK OSTEOSARKOMA**  
**HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK**  
**ETKİLERİ**

**Gamze Sevri EKREN AŞICI**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Funda KIRAL**

**AYDIN-2019**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Gamze Sevri EKREN AŞICI tarafından hazırlanan “Zoledronik Asidin D-17 Köpek Osteosarkoma Hücre Hattında Sitotoksik ve Apoptotik Etkileri” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03/05/2019

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Funda KIRAL	ADÜ	.....
Üye : Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK	ADÜ	.....
Üye : Prof. Dr. Ferda BELGE	ADÜ	.....
Üye : Prof. Dr. Tevhide SEL	AÜ	.....
Üye : Prof. Dr. Abdullah YALÇIN	UÜ	.....

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün .....tarih ve .....sayılı oturumunda alınan .....nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Cavit KUM**

**Enstitü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince; tez çalışmamın seçiminde, planlanmasında ve yürütülmesinde bana her konuda yardımcı olan, çalışmalarım süresince benden her türlüdeğerli bilgi ve anlayışı esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Funda KIRAL'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bugüne gelmemde emeği geçen, her zaman bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, kendileri ile çalışmaktan mutluluk duyduğum Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK, Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ ve Doç. Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK'a desteklerinden dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında tecrübelerini benimle paylaşan ve teknik destek sağlayan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Levent KARAGENÇ'eyardımları için teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince "2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı" kapsamında sağladığı destekten ötürü TÜBİTAK Bilim İnsani Destekleme Daire Başkanlığı birimine teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen, ilgi ve sevgisinden güç aldığım sevgili eşim Oktay AŞICI'ya tez çalışmam süresince gösterdiği sabır ve anlayış için sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca annem Raziye EKREN, babam Yılmaz EKREN ve kardeşim Hande EKREN ALTUNBAŞ'a gösterdikleri destek için teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
RESİMLER DİZİNİ .....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ÖZET .....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanser.....	4
2.2. Hücre Ölümü .....	4
2.3. Programlanmış Hücre Ölümü ve Tipleri .....	5
2.4. Apoptoz .....	7
2.5. Apoptozun Keşfi ve Tarihçesi .....	9
2.6. Apoptoz ve Nekroz.....	11
2.7. Apoptotik Süreç.....	15
2.8. Apoptozun Biyokimyası .....	16
2.9. Apoptozun Uyarılması.....	18
2.10. Apoptozun Etki Mekanizması .....	19
2.10.1. Ekstrinsik Yolak .....	19
2.10.1.1. Fas-Fas ligand aracılı apoptoz (CD95 Yolu).....	21
2.10.1.2. Tümör nekroz faktör aracılı apoptoz .....	22
2.10.2. İntrensik Yolak.....	23



2.10.3. Sitotoksik T Lenfosit Aracılı Apoptoz (Perforin/Granzim Yolu) .....	24
2.10.4. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz .....	26
2.10.5. Kaspaz Bağımsız Apoptoz.....	28
2.11. Kaspazlar .....	29
2.11.1. Kaspazların Yapısı.....	32
2.11.2. Kaspaz 3 .....	34
2.11.3. Kaspaz 8 .....	35
2.11.4. Kaspaz 9 .....	36
2.12. Bcl-2 Gen Ailesi .....	36
2.13. Survivin (BIRC5) .....	39
2.14. Köpek Osteosarkoma.....	42
2.15. Bisfosfonatlar .....	46
2.15.1. Bisfosfonatların Tarihçesi.....	46
2.15.2. Bisfosfonatların Yapısı .....	47
2.15.3. Bisfosfonatların Metabolik Etkileri .....	49
2.16. Zoledronik Asit.....	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
3.1. Gereç.....	57
3.1.1. Hücre Hattı .....	57
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	57
3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	57
3.1.4. Kullanılan Cihazlar.....	58
3.1.5. Kullanılan Kitler .....	58
3.1.6. Primerler .....	58
3.1.7. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı.....	61
3.2. Yöntem .....	62

3.2.1. Sterilizasyon .....	62
3.2.2. D-17 (CCL-183) Köpek Osteosarkoma Hücre Hattının Kültüre Edilmesi .....	63
3.2.3. Hücrelerin Dondurulması ve Açma İşlemi .....	64
3.2.4. Hücrelerin Kaplama Yoğunluğunun Belirlenmesi .....	65
3.2.5. Zoledronik Asidin Doz ve Zamana Bağlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi .....	65
3.2.6. WST-1 (Water Soluble Tetrazolium tuzu) Canlılık Testi .....	66
3.2.7. IC <sub>50</sub> Değerinin Hesaplanması .....	67
3.2.8. Koloni Oluşturabilme Yeteneklerinin İncelenmesi .....	67
3.2.9. Zoledronik Asidin Mineralizasyona Etkisi.....	68
3.2.10. Zoledronik Asidin Alkalin Fosfataz (ALP) Aktivitesine Olan Etkisi.....	68
3.2.11. Zoledronik Asidin Hücrelerin Migrasyonuna Olan Etkileri.....	69
3.2.12. Zoledronik Asidin D-17 (CCL-183) Köpek Osteosarkoma Hücreleri Üzerinde Apoptotik Etkileri .....	70
3.2.12.1. Apoptotik DNA fragmentlerinin ELİSA yöntemi ile kantitatif analizi.....	70
3.2.12.2. Apoptotik DNA fragmentasyonunun ekstraksiyonu ve agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.....	71
3.2.13. Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9'nun ELİSA ile Belirlenerek Apoptozun Değerlendirilmesi.....	71
3.2.14. RT-PCR ile Gen İfadelerinin Belirlenmesi .....	73
3.2.14.1. Total RNA izolasyonu.....	73
3.2.14.2. cDNA sentezi.....	74
3.2.14.3. Primerlerin hazırlanışı .....	74
3.2.14.4. mRNA ekspresyon düzeylerinin qRT-PCR yöntemi ile analizi.....	75
3.2.14.5. Ekspresyonun değerlendirilmesi .....	76
3.2.14.6. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi .....	77
3.2.15. İstatistiksel Analiz .....	77
4. BULGULAR .....	78

4.1. Hücrelerin Kaplama Yoğunluğunun Belirlenmesi .....	78
4.2. Zoledronik Asidin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi .....	79
4.3. Zoledronik Asidin D-17 Köpek Osteosarkoma Hücre Hattı Üzerine Koloni Oluşturabilme Yeteneklerine Etkisi .....	83
4.4. Zoledronik Asidin Mineralizasyona Etkisi .....	85
4.5. Zoledronik Asidin Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesine Olan Etkisi.....	85
4.6. Zoledronik Asidin Hücrelerin Migrasyonuna Olan Etkisi .....	88
4.7. Zoledronik Asidin D-17 (CCL-183) Köpek Osteosarkoma Hücreleri Üzerinde Apoptotik Etkileri .....	91
4.7.1. Apoptotik DNA Fragmentlerinin ELİSA Yöntemi ile Kantitatif Analizi .....	91
4.7.2. Apoptotik DNA Fragmentasyonun Ekstraksiyonu ve Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi .....	93
4.7.3. D-17 (CCL-183) Köpek Osteosarkoma Hücre Hattında Zoledronik Asidin Kaspaz 3, 8, 9 Aktivitesine Olan Etkileri .....	94
4.7.4. Genlerin Kantitatif Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi .....	97
4.7.4.1. Melting point analizi.....	100
4.7.4.2. PCR ürününün agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi .....	102
5. TARTIŞMA.....	103
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	113
KAYNAKLAR.....	115
ÖZGEÇMİŞ.....	151

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AIF</b>	: Apoptoz indükleyici faktör
<b>APAF-1</b>	: Apoptotik proteaz aktifleştirici faktör-1
<b>Bcl-2</b>	: B hücreli lenfoma-2
<b>BP</b>	: Bisfosfonat
<b>CAD</b>	: Kaspaz yolu ile aktifleşen DNAz
<b>CARD</b>	: Kaspaz toplama bölgesi
<b>cIAP1/2</b>	: Hücreyel apoptoz inhibitör proteini 1/2
<b>CSF</b>	: Koloni uyarıcı faktörler
<b>CTL</b>	: Sitotoksik T lenfositler
<b>DD</b>	: Ölüm bölgesi
<b>DED</b>	: Ölüm efektör domaini
<b>DISC</b>	: Ölüm-indükleyici sinyal kompleksi
<b>DR</b>	: Ölüm reseptörleri
<b>DR5</b>	: TRAIL reseptör 5
<b>ECM</b>	: Ekstraselüler matriks
<b>EndoG</b>	: Endonükleaz G
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>FADD</b>	: Fas-bağlı ölüm bölgesi
<b>Fas L</b>	: Fas ligand
<b>FAS</b>	: Ölüm reseptörü
<b>GrB</b>	: Granzim B
<b>IAP</b>	: Apoptozu inhibe eden protein
<b>ICAD</b>	: Kaspaz yolu ile aktifleşen DNAz inhibitörü
<b>IGF</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
<b>JNK</b>	: c-JUN N-terminal kinaz

<b>MOMP</b>	: Mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu
<b>N-BP</b>	: Nitrojen içeren bisfosfonatlar
<b>NCCD</b>	: Hücre Ölüm Terminoloji Komitesi
<b>NGF</b>	: Nöron büyüme faktörü
<b>NK</b>	: Doğal (Natural) öldürücü
<b>Omi</b>	: Olgun serin proteaz HtrA2
<b>Omi/HtrA2</b>	: HtrA serin peptidaz-2
<b>PARP-1</b>	: Poli (ADP-riboz) polimeraz-1
<b>PCD</b>	: Programlanmış hücre ölümü
<b>PS</b>	: Fosfotidil serin
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SMAC</b>	: Sekonder Mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü
<b>Smac/DIABLO</b>	: Sekonder Mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü/kaspaz bağlayan proteinin direkt inhibitörü
<b>tBid</b>	: Kesilmiş, kısaltılmış Bid
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>TNFR</b>	: Tümör nekrozis faktör reseptör
<b>TNFR1</b>	: Tümör nekroz faktör reseptörü-1
<b>TNFR2</b>	: Tümör nekroz faktör reseptörü-2
<b>TRADD</b>	: TNF ilişkili ölüm bölgesi
<b>TRAF2</b>	: TNF reseptör ile ilişkili faktör 2
<b>TRAIL-R1</b>	: TNF ile ilişkili apoptoza indükleyici ligand reseptörleri-1
<b>TRAIL-R2</b>	: TNF ile ilişkili apoptoza indükleyici ligand reseptörleri-2
<b>UPR</b>	: Katlanmamış protein yanıtı
<b>VEGF-A</b>	: Vasküler endotel büyüme faktörü-A

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Apoptotik sürecin aşamaları.....	15
Şekil 2. Ekstrinsik apoptotik yolakların temel olaylarının şematik gösterimi .....	21
Şekil 3. Fas-Fas ligand aracılı apoptoz.....	22
Şekil 4. İntrinsik apoptotik yolakların temel olaylarının şematik gösterimi .....	24
Şekil 5. Kanser hücrelerinde Granzim B-kaynaklı ölüm yolları .....	26
Şekil 6. Endoplazmik retikulum aracılı apoptoz .....	27
Şekil 7. Kaspaz bağımsız apoptoz yolağı şematik gösterimi .....	29
Şekil 8. Kaspazların sınıflandırılması .....	31
Şekil 9. Kaspazların yapısal özelliklerinin şematik gösterimi .....	33
Şekil 10. Bcl-2 ailesi üyelerinin alternatif fonksiyonları .....	39
Şekil 11. Apoptotik yolak üzerinde survivinin etkileri .....	40
Şekil 12. Köpeklerde OSA'nın geliştiğı bölgeler.....	43
Şekil 13. Bisfosfonatların yapısı .....	48
Şekil 14. Bisfosfonatların biyomedikal alanında uygulamaları .....	50
Şekil 15. Zoledronik asit, farnesil difosfat (FPP) sentaz enzimini inhibe eder ve küçük GTPazlar Ras ve Rho'nun prenilasyonunu engeller.....	53
Şekil 16. ZA'nın olası antitümör etkileri .....	54
Şekil 17. D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde kaplama yoğunluğunun belirlenmesi .....	79
Şekil 18. D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinin ZA ile belirtilen dozlarda 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda hücre canlılık yüzdeleri .....	80
Şekil 19. Zoledronik asit dozlarına bağı D-17 köpek osteosarkoma hücresinin canlılık grafikleri .....	83
Şekil 20. Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında 48 saat inkübasyon süresinde hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneğı üzerine etkisi.....	84
Şekil 21. Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında 72 saat inkübasyon süresinde hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneğı üzerine etkisi.....	84

<b>Şekil 22.</b> D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında 48 saat inkübasyon süresince zoledronik asidin hücrelerin mineralizasyona etkisi.....	85
<b>Şekil 23.</b> D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında 72 saat inkübasyon süresince zoledronik asidin hücrelerin mineralizasyona etkisi.....	85
<b>Şekil 24.</b> D-17 köpek osteosarkoma hücrelerine uygulanan ZA'nın konsantrasyonuna bağlı 48. ve 72. saatte ekstraselüler ALP aktivitesine olan etkisi.....	86
<b>Şekil 25.</b> D-17 köpek osteosarkoma hücrelerine uygulanan ZA'nın konsantrasyonuna bağlı 48. ve 72. saatte intraselüler ALP aktivitesine olan etkisi.....	87
<b>Şekil 26.</b> Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattına doz ve zamana bağlı olarak hücrelerin göç etme potansiyeline etkisi.....	89
<b>Şekil 27.</b> Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattına doz ve zamana bağlı olarak hücrelerde oluşturulan yaraların mesafeleri.....	91
<b>Şekil 28.</b> D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde zoledronik asidin apoptotik etkisinin DNA fragmentasyonu analizi .....	92
<b>Şekil 29.</b> D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinin zoledronik asit ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonrasında görülen DNA fragmentasyonunun %1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. ....	93
<b>Şekil 30.</b> Zoledronik asidin farklı doz ve inkübasyon süresine bağlı D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde kaspaz 3 düzeyleri üzerine etkisi .....	94
<b>Şekil 31.</b> Zoledronik asit dozlarına bağlı kaspaz 3 düzeylerinin değişim grafikleri .....	94
<b>Şekil 32.</b> Zoledronik asidin farklı doz ve inkübasyon süresine bağlı D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde kaspaz 8 düzeyleri üzerine etkisi .....	96
<b>Şekil 33.</b> Zoledronik asidin farklı doz ve inkübasyon süresine bağlı D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde kaspaz 9 düzeyleri üzerine etkisi .....	97
<b>Şekil 34.</b> Zoledronik asit dozlarına bağlı kaspaz 9 düzeylerinin değişim grafikleri .....	97
<b>Şekil 35.</b> Genlerin kantitatif RT-PCR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri ....	98
<b>Şekil 36.</b> RT-PCR sonuçlarına göre zoledronik asit uygulamasının doz ve süresiye bağlı olarak Bax/Bcl-2 oranındaki değişimi .....	99

<b>Şekil 37.</b> RT-PCR sonuçlarına göre zoledronik asit uygulamasının doz ve süresiye bağlı olarak Bid geninin ifadesindeki değişim .....	99
<b>Şekil 38.</b> RT-PCR sonuçlarına göre zoledronik asit uygulamasının doz ve süresiye bağlı olarak survivin geninin ifadesindeki değişim .....	100
<b>Şekil 39.</b> qRT-PCR analizi sonrası mRNA ekspresyonlarının saflığının belirlenmesinde melting point (T <sub>m</sub> ) grafikleri.....	101
<b>Şekil 40.</b> PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntüsü.....	102



## RESİMLER DİZİNİ

**Resim 1.** D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinin morfolojik görüntüsü ..... 78

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması .....	14
<b>Tablo 2.</b> qRT-PCR için kullanılan primer dizileri .....	60
<b>Tablo 3.</b> Bid ve survivin genleri için RT-PCR reaksiyon koşulları.....	76
<b>Tablo 4.</b> Bax ve Bcl-2 genleri için RT-PCR reaksiyon koşulları .....	76
<b>Tablo 5.</b> Zoledronik asidin doz ve süreye bağlı olarak D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinin canlılığına etkisi .....	82
<b>Tablo 6.</b> D-17 köpek osteosarkoma hücrelerine uygulanan ZA'nın konsantrasyona bağlı 48. ve 72. saatte ekstraselüler ALP aktivitesine olan etkisi.....	86
<b>Tablo 7.</b> D-17 köpek osteosarkoma hücrelerine uygulanan ZA'nın konsantrasyona bağlı 48. ve 72. saatte intraselüler ALP aktivitesine olan etkisi.....	87
<b>Tablo 8.</b> Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattına doz ve zamana bağlı olarak hücrelerin göç etme potansiyeline etkisi.....	90

## ÖZET

### ZOLEDRONİK ASİDİN D-17 KÖPEK OSTEOSARKOMA HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİ

AŞICI EKREN G. S. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Programı Doktora Tezi, Aydın, 2019.

Çalışmamızda; *in vitro* olarak zoledronik asidin (ZA) D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma (OSA) hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkisinin olup olmadığı ve olası hücre ölüm tipinin (apoptoz/nekroz) belirlenmesi amaçlandı. D-17 köpek osteosarkoma hücre hattına uygulanan zoledronik asidin (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM) hücre canlılığına etkisi ve IC<sub>50</sub> değeri WST-1 canlılık testi ile 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sürelerince tespit edildi. WST-1 canlılık analizleri sonuçlarına göre 24 saatte anlamlı bir sitotoksik etki görülmezken (p≥0,05), ZA'nın IC<sub>50</sub> değerleri 48. saat, 72. saat ve 96. saat için sırası ile 82,5 µM, 26,0 µM ve 17,6 µM olarak hesaplandı. ZA'nın hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerine etkisi kristal violet, mineral içeriği üzerine etkisi alizarin kırmızısı boyaması ile gösterilirken, ZA'nın ekstraselüler ve intraselüler alkalen fosfataz aktivitesine olan etkisi ise spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. ZA'nın hücrelerin koloni oluşturma, mineral içeriği ve alkalen fosfataz üzerine etkisi incelendiğinde hücrede doz ve zamana bağlı olarak azalmaya neden olduğu belirlendi (p<0,05). Hücrelerin göç etme potansiyellerine olan etkisi ucuz ve basit bir yöntem olan yara iyileştirme yöntemi ile belirlendi ve ZA'nın köpek OSA hücre hattı üzerine 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 15 µM konsantrasyonları uygulandığında hücrenin göç etme potansiyelini anlamlı ölçüde azalttığı görüldü. Zoledronik asidin hücredeki apoptotik etkileri ise elektroforetik ve ELİSA yöntemleri ile DNA kırıklarının analizi yapılarak gösterildi. Kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 düzeyleri ELİSA yöntemi ile belirlenerek apoptotik yollardaki kaspaz-kaskat sistemi üzerine etkisi saptandı. Ayrıca apoptotik yollar üzerinde yer alan Bcl-2, Bax ve Bid genleri, hücrelerinin çoğaltılması ve sağkalımı ile ilişkili gen olarak kabul edilen survivin genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemleri kullanılarak belirlendi. Apoptotik etkilerinin saptanmasında WST-1 canlılık testi sonucu bulunan IC<sub>50</sub> değerinin altındaki 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 15 µM konsantrasyonları kullanıldı. D-17 köpek OSA hücreleri üzerine seçilen dozlarda ZA uygulandığında doz ve zamana bağlı olarak apoptotik DNA kırıklarında, kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeyinde, Bax/Bcl-2 oranında anlamlı artış (p<0,05)

gözlenirken, kaspaz 8 düzeyinde ve Bid ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik bulunmadı ( $p \geq 0,05$ ). Hücre sağkalımını belirleyen survivinin ekspresyon düzeylerinde ise doz ve zamana bağlı olarak anlamlı bir azalma ( $p < 0,05$ ) saptandı.

Çalışmanın sonuçları ZA'nın D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde tek başına uygulanmasının in vitro olarak antikanserojenik etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu konudaki araştırmaların kapsamı genişletilmeli ve daha ileri moleküler çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Ayrıca *in vivo* hayvan modelleri üzerinde denenerek doğrulukları kanıtlanmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, bisfosfonatlar, köpek osteosarkoma, zoledronik asit.

## ABSTRACT

### CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF ZOLEDRONIC ACID IN D-17 CANINE OSTEOSARCOMA CELL LINE

AŞICI EKREN G. S. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute  
Veterinary Biochemistry Program PhD Thesis, Aydın, 2019.

The aim of our study was to determine whether zoledronic acid (ZA) has antiproliferative effect on D-17 (CCL-183) canine osteosarcoma (OSA) cell line *in vitro* and to determine possible cell death type (apoptosis/necrosis). The effect of zoledronic acid (1 µM, 5µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM) on cell viability of the D-17 canine osteosarcoma cell line and the IC<sub>50</sub> value were determined during 24, 48, 72 and 96 hours incubation time with the WST-1 viability test. According to the results of WST-1 vitality analysis, no significant cytotoxic effect was observed in 24 hours ( $p \geq 0,05$ ), the IC<sub>50</sub> values of ZA were calculated as 82,5 µM, 26,0 µM and 17,6 µM respectively for 48 th hour, 72 th and 96 th hours. The effect of zoledronic acid on the colony forming ability of the cells was shown by crystal violet, on mineral content with alizarin red staining while the effect of ZA on extracellular and intracellular alkaline phosphatase activity was measured by spectrophotometric method. When the effect of ZA on colony formation, mineral content and alkaline phosphatase was investigated, it was determined decreased on cell dependent on dose and time ( $p < 0,05$ ). The effect of cells on migration potentials was determined by a cheap and simple method is wound healing and ZA significantly decreased cell migration potential when the concentrations of 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 15 µM were applied to on the canine OSA cell line. Apoptotic effects of zoledronic acid in the cell were showed analysis by electrophoretic and ELISA methods. The effect on caspase-cascade system in the apoptotic pathways was detected by determining the caspase 3, caspase 8 and caspase 9 activities with ELISA method. Moreover, expression levels of survivin, regarded as genes related to proliferation and survival of Bcl-2, Bax and Bid genes and cells in the apoptotic pathways, were determined using RT-PCR methods. Below the IC<sub>50</sub> value that found by the WST-1 viability test 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 15 µM concentrations were used to determine the apoptotic effects. When the selected doses of ZA were applied on D-17 canine osteosarcoma cells was significantly increased apoptotic DNA fragments, level of caspase 3 and caspase 9, Bax/Bcl-2 ratio ( $p < 0,05$ ) while there was no significant change in caspase 8 level and Bid

expression ( $p \geq 0,05$ ) depending on dose and time. There was a significant decrease ( $p < 0,05$ ) in the expression levels of the survivin which determined cell survival.

The result of this study has been shown that the treatment of ZA alone in D-17 canine osteosarcoma cells shows an anticarcinogenic effect *in vitro*. The scope of research on this subject should be expanded and proven by testing on more advanced molecular studies and *in vivo* animal models.

**Keywords:** Apoptosis, bisphosphonates, canine osteosarcoma, zoledronic acid.

# 1. GİRİŞ

Çağımızın önemli sağlık problemlerinden biri olan kanser, apoptotik ve antiapoptotik mekanizmalar arasındaki dengenin bozulması sonucu hücrelerin kontrolsüz farklılaşması ve çoğalması ile karakterizedir. Bu dengenin bozulmasında anormal hücre büyümesine neden olan hücre gelişimi, çoğalması ve farklılaşmasında rol alan proto-onkogenlerde, tümör gelişimine neden olan tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar rol oynar.

Kansere çözüm olarak uygulanan birçok tedaviye rağmen beklenen sonucun alınamaması hala açığa kavuşturulamayan mekanizmalar ya da hücrel etkileşimlerin olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle kanserin nedenleri, kanser oluşumu, tedavi süresince kanser hücrelerinin fizyolojik davranışı gibi her aşaması moleküler düzeyde incelenmektedir. Son yıllarda tümör hücrelerinde moleküler düzeyde neoplazinin nedenleri ve hücrel sinyal yollarındaki değişimler hakkında artan bilgiler, kanser hücrelerinde daha spesifik bir yolu hedefleyen yeni tedavilerin geliştirilmesini sağlamıştır (Wolfesberger ve ark, 2010). Yeni ve üstün kanser tedavilerinin geliştirilmesi tıp alanının öncelik konusudur. Evcil hayvanlarda da kanseri tedavi etmek ve yönetmek için yeni yaklaşımların gelişimi devam etmektedir (Simpson ve ark, 2017).

Evcil hayvanlarda kanser insidansı, insanlarda elde edilen verilere paralellik göstermektedir. Yaşam alanımızı paylaştığımız bu hayvanlar modern yaşam içerisinde insanlar kadar mutasyona neden olan ultraviyole ışınları, X ışınları, besinlerle alınan katkı maddeleri, evimizde ve hayvanlar üzerinde kullanılan yapay kozmetik ve temizlik malzemeleri, bazı kimyasal ve radyoaktif maddeler gibi pek çok faktöre maruz kalmaktadır (Baek ve ark, 2009). Köpek ölümlerinin yaklaşık %30'una kedilerde ise %26'sına kanserin neden olduğu bilinmektedir (Brønden ve ark, 2007).

Köpeklerde görülen kanser türlerinin insanlara göre daha sık ve daha çeşitli olduğu bildirilmektedir. Ayrıca yoğun terapötik müdahalelere rağmen, ölüm oranları her iki türde kabul edilemez düzeyde yüksektir (Baek ve ark, 2009). Belirli kanser türleri bazı köpek ırklarında daha yüksek oranda görülmektedir. Ayrıca köpek ırklarının çoğunda kansere yakalanma ihtimalinin yaşla birlikte arttığı bilinmektedir. Bu nedenle köpeklerde artan kanser insidansı köpek sahipleri için endişe kaynağı haline gelmektedir (Simpson ve ark, 2017).

Osteosarkoma (OSA) insanlarda, köpeklerde ve kedilerde yaygın görülen kemik tümörüdür özellikle köpek ve kedi gibi küçük evcil hayvanlarda sık rastlanmaktadır (Vanel ve ark, 2013; Meyer ve Walter, 2016). Köpek OSA'sı, yaşlı ve büyük cins köpeklerde daha

agresif seyrederek ve kemikten kaynaklanan tümörlerin %90'ını oluşturur (Wilson ve ark, 2008).

Köpeklerde OSA insidans oranı insanlardan 27 kat daha fazladır (Simpson ve ark, 2017). ABD'de her yıl insanlar için 1000 osteosarkoma vakası bildirilirken, köpeklerde 8000 vaka bildirilmiştir. Bu rakamın bildirilmeyen vakalar dikkate alındığında muhtemelen daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Vanel ve ark, 2013).

OSA'nın tedavisi hem insanlarda hem de köpeklerde oldukça zordur. Gelişen kanser tedavi yöntemlerine rağmen son on yılda OSA'lı insanlarda sağkalım oranı değişmezken, köpeklerde ise yıllık sağkalım oranı %45 civarındadır (Simpson ve ark, 2017). OSA'lı köpeklerde düşük sağkalım oranı, yeni terapötik yaklaşımlara duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır (Wolfesberger ve ark, 2010; Szweczyk ve ark, 2015).

Veteriner hekimlikte köpek osteosarkoma için çeşitli kombinasyonların uygulanması ve antiretroviral terapi gibi güncel tedavi yöntemlerinin kullanılması yerine amputasyon veya ekstremitte koruyucu cerrahi yöntemler, koruyucu kemoterapi ve palyatif radyoterapi gibi standart tedaviler uygulanmaktadır (Selvarajah ve Kirpensteijn, 2010; Wolfesberger ve ark, 2010; Szweczyk ve ark, 2015). Çeşitli tedavi yöntemlerinde gelişmeler olmasına rağmen, tanıdan sonra köpeklerin %80'inin en fazla 2 yıl hayatta kaldığı bildirilmiştir (Selvarajah ve Kirpensteijn, 2010). Cerrahi yöntemler ile tedavi edildiğinde OSA'lı köpeklerin %70'inden fazlası, hastalığa yenik düşmektedir (Ong ve ark, 2016).

Son yıllarda karboplatin, doksorubisin ile adjuvan kemoterapinin tedaviye dahil edildiği yeni kanser tedavi yöntemleri geliştirilmesine rağmen hala uygulanan etkin kemoterapi yöntemi elde edilememiş, iyi bir prognoz ve uzun süreli sağkalım sağlanamamıştır (Wolfesberger ve ark, 2010; Ong ve ark, 2016). Ayrıca bu uygulanan standart tedaviler ile sağaltım sağlansa bile uygulanan tedaviler tümörün tekrarlamasını ve metastatik yayılımını engelleyememektedir, neredeyse %90'ın da pulmoner metastaz gelişmektedir (Selvarajah ve Kirpensteijn, 2010; Zhang ve ark, 2015).

Veteriner hekimlikte kemoterapötik ajanların kullanımını çoğunlukla beşeri hekimlikte elde edilen bilgilerden yararlanarak protokollerin doğrudan yada çıkarımlar ile bir takım değişimler yapılarak gerçekleştirilmektedir. Bu uygulama farmakokinetik parametrelerdeki türler arası farklılıklar ve tümör hücrelerinin kanser terapötik bileşiklerine duyarlılığı nedeniyle tartışmalıdır (Ong ve ark, 2017).

İnsanlarda ve köpeklerde görülen OSA erkeklerde görülme insidansının ve akciğere metastaz yapma eğiliminin yüksek olması açısından benzerlik göstermektedir. Fakat iki türün osteosarkomaları arasında benzerlikler yanında farklılıklar da söz konusudur.



İnsanlarda her ne kadar insidansı altmış yaş üzerinde artsa da genel olarak başlangıç yaşı ergenlik dönemidir. Köpeklerde ise orta yaşın üzerindeki insidans daha yüksektir. OSA'nın yaşlı köpeklerde görülmesi kırık gibi mekanik kuvvetler tarafından indüklenmesinden, insanlarda ise ergenlik çağında büyüme ve gelişmenin kontrolsüz gerçekleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Meyer ve Walter, 2016). Bu nedenle veteriner onkoloji çalışmalarıyla evcil hayvan türlerinde meydana gelen tümörlerin arasındaki farklılıklar göz önünde bulundurularak, köpeklerde sağkalım süresini uzatacak, özellikle akciğere metastazı önleyen sistemik bir tedaviye acil ihtiyaç vardır (Wolfesberger ve ark, 2010). Bunun için antineoplastik ilaçların geliştirilmesi, mekanizmalarının aydınlatılması ve etkilerinin belirlenmesi gereklidir. Dolayısıyla köpeklerdeki bu kanser vakaları için spesifik tedavi gerekmektedir (Ong ve ark, 2017).

Osteoklast aracılı kemik resorpsiyon inhibitörlerinin en önemli sınıfı olan bisfosfonatlar (BP), osteoporoz ve diğer osteoklast aracılı kemik hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, BP'ların prostat, meme, akciğer, multiple miyelom gibi birçok kanser hücre hattında antitümöral etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Fakat BP'lerin osteosarkomaya karşı etkinlikleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Corso ve ark, 2005; Murayama ve ark, 2008; Koto ve ark, 2010; Almubarak ve ark, 2011; Zhao ve Hu, 2015). Bisfosfonatlar grubundan olan zoledronik asit (ZA) ise kemik kaybını önlemedeki etkinliğinden dolayı çeşitli metabolik kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılır (Patntirapong ve ark, 2012).

Zoledronik asit, osteoklastın proliferasyonunu azaltarak ve apoptozunu indükleyen kemik rezorpsiyonunu inhibe eden, azot içeren bir bisfosfonattır. Zoledronik asidin, hücre adezyon moleküllerini inhibe ettiği ve doğrudan antitümör etki gösterdiği, prostat ve meme kanseri hücrelerinin kemiğe metastazını önlediği ve anjiogenezi azalttığı bildirilmiştir (Ryu ve ark, 2010; Zekri ve ark, 2014; Zhao ve Hu, 2015)

Bu çalışmada beşeri hekimlikte klinik olarak yaygın kullanılan zoledronik asidin köpeklerdeki antiosteosarkoma aktivitesi ve etki mekanizması, D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında etkilediği moleküler substratların belirlenmesi amaçlandı. Elde edilen verilerimizin kanser hücre biyolojisindeki artan bilgiler ışığında, hastalığın daha etkin tedavisine yol açacağından klinisyenlere farklı tedavi seçenekleri sunması ve literatüre katkı sağlayacağı beklenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin ve dokuların düzensiz ve kontrolsüz çoğalmasına yol açan patolojik bir süreçtir (Cooper, 2000). Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur (Cabadak, 2008).

Kanser hücreleri kontrolsüz çoğalan ve hücre ölümüne dirençli malign hücrelerdir (Cooper, 2000). Apoptoz, otofaji ve nekroz gibi hücre yıkımının çeşitli mekanizmaları, kanser hücrelerinde bloke edilir ve bu durum tümörün hayatta kalmasını kolaylaştırır (Hanahan ve Weinberg, 2000; Pattingre ve Levine, 2006; Elmore, 2007; Ouyang ve ark, 2012).

Ayrıca kanser hücreleri bağışıklık sisteminden kaçabilmek için hayatta kalma aracı olarak çeşitli biyolojik stratejilerden yararlanırlar (Mapara ve Sykes, 2004; Critchley-Thorne ve ark, 2009). Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçınma ve çoğalmaya devam etme kabiliyeti kanserin temel özelliklerinden biridir ve kanser tedavisine yönelik gelişmeler için önemli bir hedeftir (Xu ve ark, 2016). Bu nedenle antikanser terapilerde DNA tamir mekanizmalarında, apoptotik noktalardaki ve hücre döngüsündeki kontrol noktalarında kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırt edici özelliklerinden yararlanılmaktadır.

### 2.2. Hücre Ölümü

Çok hücreli organizmalarda, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi sağlamak için hücrelerin sayısı sabit olacak şekilde düzenlenir (Xu ve ark, 2016). Hücrelerin fonksiyonlarını düzgün bir şekilde yerine getirebilmesi için homeostazın korunması gereklidir (DeLong, 1998). Bu dengenin korunması aynı zamanda normal gelişim ve doku büyüklüğünün homeostazı için çok önemlidir (Xu ve ark, 2016).

Hücresel homeostazın uygun regülasyonu ve kontrolü, hücreleri sabit bir durumda tutarken hücrenin sağkalımını ve hücre ölümünü dengeler. Bu süreç içerisinde aşırı sentezlenmiş veya hatalı işlev gören proteinler degrade edilir ya da hücre bütünlüğünü korumak için geri dönüştürülür. Bunun yanında, stres, hipoksi, işgalci patojenler gibi çeşitli hücre içi ve hücre dışı faktörler dengeyi hücre ölümü yönünde değiştiren hücresel sinyal oluştururlar (Fulda ve ark, 2010). Hücrenin aldığı sinyale bağlı olarak, apoptoz, otofaji,

kazaranekroz, düzenlenmiş nekroz, nekrotoz, ozmotik liziz, nekroptoz ve diğer ölüm biçimlerinin dahil olduğu farklı formlarda hücre yıkımı gerçekleşebilir (Vanden Berghe ve ark, 2013).

Hücre ölümü, normal fizyolojik gelişim mekanizması ve morfogenez, hücre sayısının kontrolü, doku dengesinin düzenlenmesi gibi homeostatik bir mekanizma olmasının yanı sıra enfekte olmuş, mutasyona uğramış veya hasar görmüş hücrelerin uzaklaştırılması ve kanser gibi hastalıklarda savunma mekanizması olarak işlev gören temel bir süreçtir (Vaux ve Korsmeyer, 1999; Norbury ve Hickson, 2001; Xu ve ark, 2016). Hücre ölümü tümörigenez, büyüme ve ilerlemede önemli bir rol oynar ve kemoterapinin etkinliğini büyük ölçüde etkiler (Xu ve ark, 2016).

### **2.3. Programlanmış Hücre Ölümü ve Tipleri**

Son yıllarda, hücre ölümü ve düzen mekanizmaları hakkındaki veriler çarpıcı bir biçimde artmaktadır. Programlanmış hücre ölümü (PCD) tümör supresyonunun temel bir mekanizmasıdır ve malign olmayan gereksiz, yaşlanan ve vücuda zarar verebilecek zarar görmüş hücrelerin ortadan kaldırılması için tetiklenir (Xu ve ark, 2016).

Nekroz, 1970'li yıllara kadar bilinen tek hücre ölümüdür (Tomatır, 2003). Daha sonraki yıllarda hücre ölümü morfolojik özelliklerine göre ayırt edilebilen apoptoz, otofaji ve nekroz olarak üç ana forma ayrılmıştır (Xu ve ark, 2016).

Swhweichel ve Merker (1973) hücre ölümünün morfolojisini inceleyen ilk çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmanın ardından Clarke (1990) doğal süreçte ve toksin uygulamasının ardından oluşan hücre ölümlerinde hücrede gerçekleşen üç farklı morfolojiden bahsetmiştir. Bu farklı morfolojiler Apoptoz tip I, otofaji tip II, lizozomal olmayan hücre ölüm ise tip III programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Galluzzi ve ark (2007) ise hücre ölümünü gerçekleştirdiği mekanizmalara dayanarak apoptoz (Tip 1), otofaji (Tip 2), nekroz (onkoz, Tip 3) ve mitotik katastrof olacak şekilde dört farklı tipte sınıflandırmıştır (Taates ve ark, 2008).

Apoptoz tip I, genellikle kemoterapi ile uyarılan hücre ölümünün ana mekanizması olarak görülmektedir. Ancak birçok kanser türünde görülen apoptotik mekanizmadaki düzensizlik kemoterapi tedavisinin etkinliğini düşürür ve hücrelerin hayatta kalmasına izin verir (Xu ve ark, 2016).

Yunancada kendini ("auto") yeme ("phagy") anlamına gelen otofaji tip II terimi, ilk kez hücrelerin kendi bileşenlerini sindirebildiğini gözlemleyen Belçikalı bir biyokimyager

olan Christian de Duve tarafından 1963’de tanımlanmıştır. Yoşinori Ohsumi, 1993 yılında maya ile yaptığı çalışmasında otofaji ile ilgili olan genleri keşfetmiş ve bu çalışması ile 2016 Nobel Tıp Ödülüne layık görülmüştür (Glick ve ark, 2010; Xu ve ark, 2016).

Otofaji, ökaryotlarda uzun ömürlü proteinleri dönüştüren ve degrade eden, hücrenel agregat ve hasar görmüş organelleri hücrenel homeostazı korumak için kendi kendini sindiren hücrenel bir süreç olarak tanımlanır. Bugüne kadar sindirimi gerçekleştirilecek bu yükün lizozoma gönderilme şekilllerinde ve işlevlerindeki farklılık birbirinden ayırt edilebilen makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç çeşit otofaji tanımlamıştır (Xu ve ark, 2016).

Otofaji, besin sıkıntısı, hipoksi, hipertermi ve oksidatif stres gibi fizyolojik ve patolojik koşullar altında ilaç ve radyasyona yanıt olarak aktif hale geçer (Xu ve ark, 2016). Otofaji sürecindeki defektler hasarlı proteinlerin ve/veya genomik hasarın birikmesine yol açar ve nörodejenerasyon, enfeksiyöz hastalıklar, kalp hastalıkları ve kanser gibi hastalıklara neden olabilir. Otofaji tümör büyümesini baskılayabilmesine rağmen, stres altında tümör hücrelerinin hayatta kalmasını teşvik edici rol oynar. Otofaji baskılanması kanser hücrelerini kanser tedavisine karşı duyarlı hale getirebilir fakat apoptozun yetersiz kaldığı koşulda, “otofajik hücre ölümü” olarak adlandırılan bir süreç ile hücre ölümüne neden olabilir (Glick ve ark, 2010). Bu karmaşık süreç, otofaji ile ilişkili genlerce kodlanan moleküller tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir ve nükleasyon, uzama, olgunlaşma, füzyon ve degradasyon olmak üzere beş ana aşamaya bölünebilir (Xu ve ark, 2016).

Otofaji, en belirgin morfolojik değişimi olan genelde endoplazmik retikulumun (ER) katkıda bulunduğu iki lipit katmanından türetilen fagofor olarak da bilinen bir izolasyon membranı ile başlar. Memeli hücrelerinde fagofor membranının kesin kaynağı tartışmalı olsada yapılan çalışmalar ER’nin yanı sıra, plazma membranı ve mitokondri, trans golgi ve endozomların membranlarında fagofor oluşumunda rol oynadığını göstermiştir. Daha sonra fagofor protein agregatları, organeller ve ribozomlar gibi intraselüler yükleri yutmak için genişler ve böylece yıkılacak hedef otofagozom (otofajik kesecik) olarak bilinen karakteristik çift membranlı kesecikler tarafından çevrelenir. Yıkıma uğrayacak otofajik hedefi lizozoma taşıyan olgun otofagozomun dış membranı ardından otolizozom adlı yapıyı oluşturmak için lizozom zarı ile birleşir. Otofagozom zarı ve otofajik hedef lizozomun içerisinde bulunan asidik hidrolazların aktivitesi ile bozular. Lizozomal permeazlar ve taşıyıcılar, aminoasitleri ve diğer katabolik ürünleri, farklı metabolik yollarda, makromolekül yapımında ve enerji elde etmek amacıyla daha fazla bozulmaya uğraması için yeniden sitoplazmaya geri verir (Glick ve ark, 2010; Xu ve ark, 2016). Bu hücre ölüm

şekli kaspazların etkinliğinden bağımsız gerçekleştiği için apoptozda görülen DNA'nın merdiven görünümündeki kırıkları ya da apoptotik cisimcikler gözlenmemektedir. Otofaji mekanizmasını kullanarak ölen hücrelerin fagositler tarafından yok edilmesi apoptoza göre daha geç ve rastgele gerçekleşmektedir (Yonekawa ve Thorburn, 2013).

Clarke'nın tanımına göre Tip III lizozomal olmayan hücre ölümünde ise, organeller ve boşluklar belirgin bir şekilde genişler, hücrel dejenerasyon lizozomların herhangi bir etkisi olmadan ilerler (Ziegler ve Groscurth, 2004).

Belirli koşullarda yada bazı organlarda hücre ölümü tiplerinden birkaçı aynı hücrede görülebilmektedir. Bu durum aynı hücrede aynı uyaran tarafından birden fazla ölüm mekanizmasının etkinleştirilebileceğini göstermektedir (Fadeel ve ark, 1999).

## 2.4. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk kez 1972'de Kerr ve arkadaşları tarafından, embriyonik gelişim sırasında hücrelerin ortadan kaldırılması, sağlıklı yetişkin dokularda normal hücre dönüşümü ve hormon bağımlı atrofi sırasında gözlenen belirli bir morfolojiye sahip hücre ölümünü tarif etmek üzere önerilmiştir.

Apoptoz alanındaki gelişmeler, çok basit yapıya ve birçok hücreli olan *Caenorhabditis elegans* nematodunda "programlanmış hücre ölümü ve organ gelişiminin genetik olarak düzenlenmesi" başlıklı çalışma ile önem kazanmıştır. Bu çalışmayı gerçekleştiren Sydney Brenner, Robert Horvitz ve John E. Sulston adlı bilim adamlarının 7 Ekim 2002'de Tıpta Nobel Ödülüne layık görülmesinin ardından bu alana ilgi artmış ve günümüze kadar devam etmektedir (Schultz ve Harrington, 2003).

Apoptoz çoğunlukla tip I programlı hücre ölümü (PCD) olarak adlandırılan aktif hücrel yıkımın önemli bir şeklidir (Nguyen ve Blaho, 2009). Her hücre yaşam ve ölüm için genetik olarak programlanmıştır. Apoptoz hücre içi intihar programlarından biri olsa da aslında canlıların gelişimi ve homeostazı için gerekli hücrel bir davranıştır. Geleneksel olarak, apoptoz (hücre-otonom) bir fenomen olarak kabul edilmiştir (Kawamoto ve ark, 2016).

Apoptozun, fizyolojik programlanmış hücre ölümüyle ilişkili olduğu, embriyonik gelişim temelini oluşturduğu ve histogenetik sürecin sonunda doku homeostazisini iyi muhafaza ettiği bilinmektedir (Bottone ve ark, 2013). Bu nedenle apoptoz, bütün gelişmiş canlılarda bazı hücre popülasyonlarının ortadan kaldırılması (Gerschenson ve Rotello, 1992) ile embriyo döneminden başlayarak, yaşlanmaya kadar (Doonan ve Cotter, 2008) tüm

yaşam boyunca gerçekleşmektedir (Arends ve ark, 1990; Elmore, 2007; Martinezve ark, 2010).

Apoptoz bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve düzgün gelişimi, kimyasal uyarımlı hücre ölümü, hormon bağımlı atrofi, embriyonik ve beyin gelişimi sırasında vazgeçilmez olan evrimsel ve genetik olarak korunmuş, özenle regüle edilen bir biyolojik işlemdir (Arends ve ark, 1990; Johnson ve ark, 2000; Elmore, 2007; Martinez ve ark, 2010). Deri, gastrointestinal sistem ve immun sistem gibi hücre yapım-yıkımının hızlı olduğu pek çok dokuda devamlılığın sağlanması için yaşanan hücrelerin ortadan kaldırılarak yeni hücelere yer açılması apoptozla gerçekleşir (Cohen, 1998). Böylece apoptozun, dokunun yeniden biçimlenmesi, rejenerasyonu ve morfojenezi sırasında fizyolojik süreçlere katkıda bulunduğu açıktır (Kawamoto ve ark, 2016).

Apoptoz, normal fizyolojik gelişme, doku bütünlüğü ve homeostazın yanı sıra çevresel streslere yanıtta, gereksiz veya potansiyel zararlı hücreleri yok etmek için izlenen bir mekanizma olarak hastalıklara karşı savunmada da önemli bir rol oynamaktadır (Danial ve Korsmeyer, 2004; Cotter, 2009; Long ve Ryan, 2012; Dabrowska ve ark, 2016; Kawamoto ve ark, 2016).

Fizyolojik büyüme kontrolü ve doku homeostazı, proliferasyon ve hücre ölümü arasında bir denge söz konusudur (Fulda ve Debatin, 2006). Apoptoz mekanizması yaşanan, işlevlerini yitiren, gelişmesi bozulan, fazla üretilen ve DNA'sında hasar taşıyan hücrelerin güvenli bir şekilde yok edilmesini sağlar (Kerr ve ark, 1972; Vaux ve Korsmeyer, 1999). Bu nedenle çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda ortaya çıkan hücrenin içsel ölüm programı (Fulda ve Debatin, 2006) olduğu için çeşitli hastalıkların ve anormalliklerin patogenezi ile yakın ilişkilidir (Cryns ve Yuan, 1998; Diamantis ve ark, 2008). Bu dengenin bozulması, kontrolsüz hücre çoğalması ve aşırı hücre kaybına neden olduğu için birçok hastalığın moleküler temelidir (Fulda ve Debatin, 2006).

İskemik hastalıklarda doku hasarı veya nörodejeneratif bozukluklarda doku kaybı dahil olmak üzere birçok hastalık, aşırı apoptoz ile ilişkilendirilmiştir. Aynı şekilde, hiperproliferasyon veya yetersiz apoptoz, kardiyovasküler veya otoimmün hastalıklarda ve ayrıca tümör oluşumunda da önemli bir rol oynamaktadır (Crawford ve ark, 2011). Ayrıca, disregüle apoptoz sinyalleri, osteoporoz ve ateroskleroz gibi yaşla ilişkili diğer rahatsızlıklara ve belki de yaşlanma sürecine etki edebilir (Fadeel ve ark, 1999). Çeşitli hastalıkların ve anormalliklerin patogenezinde programlanmış hücre ölümü arasındaki ilişki günümüzde, kanser, Alzheimer hastalığı ve AIDS gibi hastalıkların tedavisinde tüm proses üzerinde etkili etkenleri spesifik bir şekilde hedefleyerek, hücre ölümünün yeniden kontrol

altına alma ihtimalinin olması apoptotik mekanizmaları aydınlatacak çalışmaların artmasına neden olmuştur (Diamantis ve ark, 2008).

Apoptoz normal gelişim sırasında ve hücrel strese bir yanıt olarak tetiklenir (Nguyen ve Blaho, 2009). Fizyolojik süreçte büyüme faktörlerinin hücreye ulaşamaması, oksidatif stres, UV, hipoksi ve enfeksiyonun etkisi sonucu oluşan hasarlı hücreler apoptotik mekanizmanın indüklenmesi ile yok edilir (Cryns ve Yuan, 1998). Ayrıca ısı şoku, radyasyon, ozmotik stres, sitotoksik ilaçlar, enfeksiyon ve kanserojen transformasyon gibi çeşitli iç ve dış sinyaller tarafından apoptoz indüksiyonu tetiklenir. Bu nedenle antikanser ilaçları, g-ışınlama, intihar genleri yada immunoterapi gibi çeşitli sitotoksik yaklaşımlarla tümör hücrelerinin ölümü, genelde apoptozun indüksiyonu aracılığı ile gerçekleşir (Fulda ve Debatin, 2006).

Apoptoz programlarındaki defekt veya hayatta kalma sinyallerinin baskınlığı nedeniyle apoptozun aktivasyonundaki yetersizlik kansere dirençle sonuçlanabilir. Agresif tedavilere rağmen, birçok tümörün mevcut tedavi protokollerine direnci hala kanser tedavisinde büyük bir problem oluşturmaktadır. Bu nedenle, kanser sağkalımını iyileştirmeye yönelik güncel girişimler, özellikle tümör hücre direncini hedefleyen stratejileri içermelidir (Fulda ve Debatin, 2006).

## **2.5. Apoptozun Keşfi ve Tarihçesi**

Hücre ölümü, uzun yıllar hücrenin morfolojik değişimlerinden yararlanılarak tanımlanmıştır. Hücre ölümü hakkında ilk veriler 1842 yılında Carl Vogt tarafından kurbağanın embriyo gelişimini araştırırken elde edilmiştir. Fakat veriler “doğal hücre ölümü” ilkesine ait olsa da o zamanlarda hücre ölümü olarak değerlendirilmemiştir (Clarke ve Clarke, 1996; Cotter, 2009). Bu keşiften itibaren, yapılan diğer çalışmalarla birlikte hücre ölümü alanındaki gelişmeler hızla artmıştır.

Hücre ölümü, canlı bir hücrenin normal formu anlaşılınca, yani 19. yüzyılın ortalarında anlam kazanmaya başlamıştır. Hücre ölümü kavramı, 1859 yılında Rudolph Virchow tarafından hücre ölümü tanımından başlayarak, 1885 yılında kromotoliziz diye tanımlanan nekrozdan farklı bir hücre ölüm şeklinin tanımlanması ile devam etmiştir (Formigli ve ark, 2004).

Embriyonik gelişim süresince hem gelişim hem de homeostazın normal bir parçası olarak ortaya çıkan hücre ölümü fenomeni 1951’de Glucksmann tarafından tekrar gözden geçirilmiş ve hücre nükleusunda meydana gelen morfolojik değişimlere bağlı olarak hücre

ölümü 3 sınıfa ayrılmıştır. Kerr tarafından 1965 yılında karaciğer hücrelerinde portal ven ligasyonundan sonra çeşitli ölüm tipleri tanımlanırken Saunders tarafından 1966 yılında çalışmalara devam edilmiştir (Glucksmann, 1951; Saunders, 1966; Diamantis ve ark, 2008).

20. yüzyılda yapılan önemli çalışmaların bulguları kilometre taşı gibi apoptotik mekanizmaların keşfedilmesini sağlamıştır. Aberdeen Üniversitesi'nde çalışan üç patoloğ John Foxton Ross Kerr, Andrew H. Wyllie ve Sir Alastair Robert Currie 1970'lerde, tümörlerdeki hücre ölüm olaylarını ve organ atrofisini araştırırken Glucksmann'ın "Hücre Ölümleri" tanımını yeniden şekillendirmişlerdir (Diamantis ve ark, 2008). Kerr, Wyllie ve Currie hücrelerin genellikle travma sonucu oluşan nekrotik doku hasarı ile daha uzun süren ve morfolojik olarak hücre ölümünden farklı olan iki farklı ölüm şekline sahip olduğunu bildirmişlerdir (Anjum ve Khar, 2002). Böylece apoptoz hakkındaki ilk bilgiler Journal of Pathology dergisinde 1971'de yayımlanan Shrinkage Necrosis başlıklı makalesi Kerr tarafından literatüre kazandırılmıştır. Kerr, Wyllie ve Currie Yunanca'da düşen yapraklar anlamına gelen apoptoz terimini, hücre ölümünün ardından apoptotik hücrelerin doğal çevrelerinden adherans kapasitesinin azalmasına dikkat çekmek için kullanmışlardır (Kerr, 1971).

Kerr (1971) tarafından büzüşme nekrozu olarak tanımladığı bu ölüm şeklinde, hücrelerin kendilerini membran ile çevrelenmiş apoptotik cisimlere parçalayarak intihar ettiğini belirterek bunun mitozun tersi rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (Kerr ve Searle, 1972; Fadeel ve ark, 1999; Formigli ve ark, 2004). Hücre ölümü esnasında hücrelerin nükleuslarında kromatin kondenzasyonunun meydana geldiği ve organel yapılarının iyi korunduğu, nükleer yapıların membrana ilişik olduğu rapor edilmiştir (Kerr, 1971).

Wyllie (1980), programlanmış hücre ölümü üzerine yaptığı bir çalışmada olgunlaşmamış timüs hücrelerinin glukokortikoidlere maruz bırakıldıktan sonra apoptotik hale geldiklerini göstermiştir. Ayrıca nükleer kromatinlerden nükleozom zincirlerinin eksizyonu ile meydana gelen DNA fragmentlerinin oluşumuna morfolojik değişimlerin eşlik ettiğini ve bu fragmentlerin hücre içi lizozomal olmayan endonükleazın aktivasyonu yoluyla gerçekleştiğini göstermiştir. Duke ve ark (1983) yaptıkları çalışmada Wyllie'nin (1980) hipotezini glukokortikoid ile apoptozu indükledikleri timüs hücrelerinde endonükleazların aktive olarak 180 baz çiftinden oluşan DNA fragmentlerinin oluştuğunu elektroforetik jel ayırımı yaparak doğrulamıştır. Böylece apoptozda DNA bütünlüğünün bozunmasının ilk kanıtı olan karakteristik merdiven şeklinde DNA bantlarının oluştuğu ilk kez gösterilmiştir. Elde edilen bu verilerin ardından apoptoz konusunda çalışmalar hızla artmıştır. Omurgalılarda, hücre ölümü Hamburger ve Oppenheim (1982) tarafından gelişmekte olan



sinir sistemi ve Duvall ve Wyllie (1986) tarafından bağışıklık sisteminde daha kapsamlı incelenmiştir.

Cohen (1993) timüs hücreleri üzerine yüksek dozda steroid uygulamış, çalışmanın sonucunda hücrelerin direkt apoptoza yönlendirilmediğini önce hücrenin apoptoza yönelmesini sağlayan genlerin aktive edildiğini göstermiştir. Böylece apoptozun genetik mekanizmalar tarafından düzenlenen kontrollü bir hücre ölümü olduğunu ifade etmiştir.

Apoptoz, uzun yıllar embriyolojik gelişimin bir süreci olarak değerlendirilmiş, fakat 1990'lı yılların başında apoptozun gelişimini tamamlanmış hayvan hücrelerinde tanımlanmasıyla konu daha ilgi çekici hale gelmiştir (Kidd, 1998; Kroemer ve ark, 1998).

## 2.6. Apoptoz ve Nekroz

Nekroz, bir veya daha fazla sayıda hücrenin, dokunun ya da organın aktif olarak başka bir uyarı almadan geri dönüşümsüz şekilde hasar görmesi sonucu görülen hücre ölümünün patolojik veya tesadüfi bir şeklidir (Fadeel ve ark, 1999; Elmore, 2007). Nekroz, nonapoptotik, kaza sonucu ölüm için kullanılan bir terimdir ve hücrenin çevreden bağımsız içeriğini artık izole bir yapı içinde tutamayacağı ortak nihai son noktayı temsil eder (Fink ve Cookson, 2005). Yaygın biyokimyasal belirteçlerin yokluğunda, erken plazma membran permeabilizasyonu ve plazma zarının yapısal bütünlüğünün kaybı nekrozun ayırt edici özelliği olarak kabul edilir (Fink ve Cookson, 2005; Jiménez-Ruiz ve ark, 2010). Zar bütünlüğünün kaybolması ile hücre parçalanır ve sonuç olarak zararlı hücre bileşenlerin salınması ile bir dizi bitişik hücre etkilenir ve çevre dokuda eksüdatif inflamasyon gelişir. (Fadeel ve ark, 1999). Bu nedenle nekroz, birlikte gruplanmış olan ve bir inflamatuvar reaksiyon ile ilişkili olan çok sayıda hücreyi içerecek şekilde meydana gelir (Lossi ve Merighi, 2003).

Nekroz, mitokondri de dahil olmak üzere organellerin ve sitoplazmanın geri dönüşümsüz şişmesi ile karakterizedir ve bu nedenle de sıklıkla onkosis olarak adlandırılır (Fadeel ve ark, 1999; Vanden Berghe ve ark, 2013). Plazma membranının iyon transport sistemi bozulduğu için hücre içine su ve kalsiyum girişi gözlenir. Hücre içerisinde kalsiyum girişinin artması endonükleazları aktiveleştirir ve DNA'da kırıklar meydana gelirken nükleus zarı parçalanır. Hücrelerin bütünlüğünün bozulması ile hücre içi lizozomal enzimler ve diğer bileşenler hücre dışı ortama salınır (Lossi ve Merighi, 2003).

Hücreler nekroz ile öldüğünde, iki ana tip mikroskopik veya makroskopik görünüm sergilerler. Birincisi, kollektif nekroz olarak da bilinen erime nekrozu (kollikasyon

nekrozu, likefaksiyon nekrozu), ölü dokunun kısmen veya tamamen çözünmesi sıvı, viskoz bir kütleyle dönüşmesidir. Doku ve hücre kaybı, erime nekrozunda saatler içinde gerçekleşir. Erime nekrozu geçiren dokularda yapışkan, sıvı benzeri yapı meydana gelir. Bu morfolojik görünüşünde, nekrotik hücrelerde hücresel organellerin bozulmasına neden olan hidrolitik enzim aktivitelerinin payı vardır. Erimedenden sorumlu enzimler, ya bakteriyel hidrolitik enzimler ya da lizozomal hidrolitik enzimlerdir. Erime nekrozunun tersine diğer bir model olan koagülasyon nekrozu hücre ölümünden birkaç gün sonra nekrotik dokunun normal yapısına dönüşümü ile karakterizedir (Alvarez ve ark, 2010).

Nekroz ile ölmekte olan hücrelerin morfolojisi oldukça çeşitlidir. Ölüm sürecinde olan hücrede çekirdek geç dağılır ve bazen kromatin yoğunlaşması oluşur, hücre zarı erken geçirgen hale gelir. Organeller dilate olabilir ve ribozomlar endoplazmik retikulumdan ayrılabilir. Ancak nekrotik hücre ölümünde piknotik ve parçalanmış çekirdekleri ortak bir özellik değildir (Fadeel ve ark, 1999; Vanden Berghe ve ark, 2013).

Nekrotik hücreler laktat dehidrojenaz da dahil olmak üzere sitozolik enzimlerin salınımı ile biyokimyasal ve tripan mavisi, propidyum iyodür ve 7-aminoaktinomisin D gibi membran-geçirgen boyalar ile morfolojik olarak tanımlanır (Fink ve Cookson, 2005).

Apoptoz ise diğer hücre ölümü kategorilerinden farklı ayırıcı morfolojik ve biyokimyasal özellikler ile karakterize edilen oldukça iyi düzenlenmiş hücre intiharıdır (Kerr ve ark, 1972; Kroemer ve ark, 2005). Apoptoz ile ilişkili morfolojik değişiklikler ilk kez 1885 yılında Walther Fleming tarafından tanımlanmıştır (Cotter, 2009). Apoptozda, morfolojik olaylar iyi bir koreografik düzen içinde meydana gelir (Fadeel ve ark, 1999). Hücre Ölüm Terminoloji Komitesi (NCCD)'ne göre hücre ölümünün spesifik morfolojik görünümü ile apoptoz terimini tanımlamıştır (Jiménez-Ruiz ve ark, 2010). Bu tanıma göre morfolojik değişiklikler apoptotik hücrelerin hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında yoğunlaşma ile meydana gelir (Kerr ve ark, 1972; Fadeel ve ark, 1999; Kroemer ve ark, 2005). Böylece nükleer otoliz ve hücre parçalanması ile karakterize olan apoptoz, nekroz veya kazara hücre ölümünden ayırt edilir (Formigli ve ark, 2004). Apoptozun morfolojik özellikleri, doku içinde stabil hücre popülasyonlarının korunmasında mitoz ve sitokineze tamamlayıcı bir rol oynadığından kontrollü hücre delesyon mekanizmasından kaynaklanmaktadır (Fink ve Cookson, 2005).

Apoptoz genelde etrafındaki hücrelerin hücre ölümünü indüklemediğinden, tek başına bir hücreyi etkileyen aktif enerjiye ihtiyaç duyan bir ölüm şeklidir. Bu nedenle inflamasyon veya doku yaralanmasına neden olmadığından, embriyogenez sırasında ve yetişkin dokularda normal hücre döngüsündeki rolü için uygundur (Fadeel ve ark, 1999; Elmore,

2007). Bu tür özellikler apoptozun, çeşitli noktalarda potansiyel olarak manipüle edilebilen veya kontrol edilebilen düzenli bir genetik program olduğunu gösterirken, nekroz bu kontrol noktalarından yoksun bir hücre ölüm formudur. Bu ayırt edici morfolojik farklılıklar, apoptozun tanımlanması ve ölçülmesi için en yaygın olarak kullanılan bazı tekniklerin temelini oluşturur ve böylece ışık veya elektron mikroskobu kullanılarak yapılan morfolojik tanımlama, apoptozu tanımlamak ve nekroz ile karşılaştırmak için en iyi yollardan biridir (Doonan ve Cotter, 2008).

Apoptoza ve nekroza neden olan histolojik ve fizyolojik etkiler farklıdır (Wyllie, 1980; Walker ve ark, 1988) (Tablo1). Hücrenin nekroz veya apoptoz ile ölme kararının büyük ölçüde maruz kaldığı hasarın düzeyine bağlı olduğu düşünülmektedir (Fadeel ve ark, 1999). Genellikle aynı uyarının yüksek ve düşük dozlarına yanıt olarak apoptoz veya nekroz meydana gelir (Doonan ve Cotter, 2008). Radyasyon, sıcaklık, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi uyarılar düşük dozlarda apoptozu indükler. Fakat yüksek dozlardaki bu uyarılar hücrede çeşitli travmalar oluşturduğu için nekroza neden olabilir (Elmore, 2007). Ayrıca, bazı patolojik koşullar altında her iki hücre ölümü, yani nekroz ve apoptoz aynı anda oluşabilir (Fadeel ve ark, 1999).

Nekroz, hücrelerde uzun bir süre hipertermi, ozmotik şok, mekanik stres, donma-çözülme ve yüksek konsantrasyonlarda hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi aşırı fizikokimyasal stresin sonucunda meydana gelir (Vanden Berghe ve ark, 2013). Bunun yanında hipoksi, iskemi, kompleman atağı, arsenik, siyanid, insektisitler gibi metabolik zehirler, ağır metallerin yüksek konsantrasyonları, şiddetli oksidatif stres, litik viral infeksiyonlar ve doğrudan hücre travması, gibi toksik uyarılara maruz kaldığında ve radyasyon veya UV ışınlamaya maruz kalma gibi aşırı çevresel koşullarda ortaya çıkar (Schwartzman ve Cidlowski, 1993; Fadeel ve ark, 1999; Vanden Berghe ve ark, 2013). Bu koşullarda, hücre üzerindeki stresin geri dönüşümsüz yaralanmaya neden olmasının ardından, hücre ölümü hızla gerçekleşir ve bu nedenle bu hücre ölüm süreci tesadüfi ve kontrolsüz olarak tanımlanmıştır (Vanden Berghe ve ark, 2013).

**Tablo 1.** Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması (Bjelaković ve ark, 2005; Elmore, 2007).

Nekroz	Apoptoz
<b>Morfolojik özellikler</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Membran bütünlüğü kaybolur.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Membran yüzeyinde tomurcuklanma olur ancak bütünlüğünü kaybetmez.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sitoplazma ve mitokondrinin şişmesi ile başlar.</li><li>• Toplam hücre lizisi ile biter.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nükleer membranda kromatin toplanır.</li><li>• Sitoplazmanın küçülmesi ve nükleusun yoğunlaşması ile başlar.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Vezikül oluşumu yok, tam liziz gerçekleşir.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hücrenin parçalanmasıyla daha küçük yapılara ayrılır.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Organeller parçalanır. (şişmesi)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Membran bağlı vesiküller oluşur (apoptotik cisimler).</li></ul>
<b>Biyokimyasal özellikler</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• İyon homeostazının regülasyonu kaybolur.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aktivasyon ve enzimatik adımları içeren sıkı bir şekilde düzenlenmiş süreçtir.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Enerjiye gerek yoktur. (pasif süreç, ayrıca 4°C'de gerçekleşir.)</li><li>• DNA'nın fragmentlere ayrımı rastgele oluşur (agaroz jel elektroforezinde DNA'nın smear görüntüsü elde edilir)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Enerji (ATP) bağımlı (aktif süreç, 4°C'de gerçekleşmez)</li><li>• DNA'nın rastlantısal olmayan mono ve oligonükleozomal uzunlukta fragmentasyonu gerçekleşir. (agaroz jel elektroforezinden merdiven deseni=ladder pattern görüntüsü elde edilir)</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Postlitik DNA fragmentasyonu gerçekleşir. (=ölümün son olayı)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prelitik DNA fragmentasyonu gerçekleşir.</li><li>• Mitokondri tarafından sitoplazmaya çeşitli faktörler (sitokrom C, AIF (Apoptoz indükleyici faktör)) salınır.</li><li>• Kaspaz kaskadının aktivasyonu meydana gelir.</li><li>• Membran asimetrisinde değişiklikler meydana gelir. (diğer bir deyişle, membranın sitoplazmaya bakan kısmından membranın hücre dışı tarafına fosfatidilserin translokasyonu gerçekleşir.)</li></ul>
<b>Fizyolojik önemi</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Komşu hücre gruplarını etkiler.</li><li>• Fizyolojik olmayan bozukluklar (litik virüsler, hipotermi, hipoksi, iskemi, metabolik zehirler) ile uyarılır.</li><li>• Makrofajlar tarafından fagositoz gerçekleşir.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tek tek hücreleri etkiler.</li><li>• Fizyolojik uyarılara (büyüme faktörlerinin eksikliği, hormonal ortamdaki değişiklikler) bağlı olarak uyarılır.</li><li>• Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagositoz gerçekleşir.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Önemli inflamatuvar yanıt oluşur.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• İnflamatuvar yanıt oluşmaz.</li></ul>

Hücresel apoptoz ile ölümüne sebep olan etmenler koloni uyarıcı faktörler (CSF), IL-2, nöron büyüme faktör (NGF), tümör nekroz faktör (TNF), insülin benzeri büyüme faktör (IGF), gibi hücre dışı uyarıların ortamda azalması, yüksek doz glukokortikoid, hücre yaşlanma, sitotoksik T lenfositler, Fas (ölüm reseptörü) veya TNFR-1 (Tümör nekroz faktör reseptörü-1) reseptörlerinin aktivasyonu, kanser ilaçları, radyasyon, virüsler, (HIV gp120 proteini gibi) büyüme faktörü eksikliği, çeşitli antijenler ve çok şiddetli olmayan oksidatif stres gibi pozitif uyarılardır (Carson ve Ribeiro, 1993; Proskuryakov ve ark, 2003; Arslanyüreği, 2009).

## 2.7. Apoptotik Süreç

Apoptotik süreç, hücrenin ölümüne neden olan sinyal ile indüklenmesiyle başlar ve bu sinyalin transfer edilmesinin ardından etkisine bağlı olarak efektör sistemi uyarır. Böylece sinyal enerji bağımlı kaskad sistemine iletilir ve son bulur.

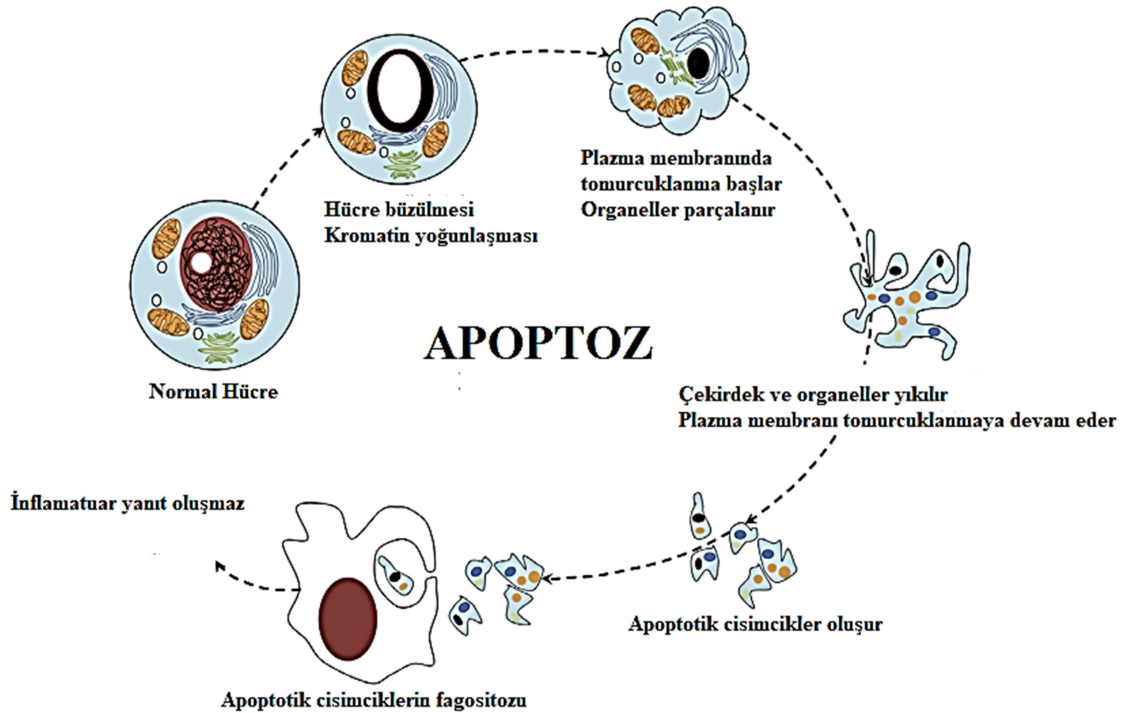
Bu süreci 4 ayrı aşamada özetleyebiliriz (Şekil 1):

1. Erken veya başlangıç aşaması: Apoptoz, apoptotik cevaba sebep olacak çeşitli hücre içi veya hücre dışı bir sinyalin hücre yüzey reseptörlerini uyarması sonucu başlar.

2. Sinyal transfer aşaması: Sinyalin veya metabolik durumun algılanması ve bu algılanan durumun hücre ölüm efektör sistemine ulaştırılması ile devam eder.

3. Efektör aşaması: Efektör kaspazların aktifleşmesi ile apoptotik sinyal kaspaz kaskad sistemi boyunca ilerler.

4. Hücre ölümünden sonraki aşama: Hücrenin plazma membranının ve hücre organellerinin bütünlüğünün korunduğu apoptotik cisimler oluşur. Ardından hızlı bir şekilde fagositik hücreler tarafından tanınır ve çevredeki hücrelere zarar vermeden sonlanır (Faddeel ve ark, 1999).



Şekil 1. Apoptotik sürecin aşamaları (Abou-ghali ve Stiban, 2015).

## 2.8. Apoptozun Biyokimyası

Apoptozun erken safhalarında, morfolojik olarak görülen ilk değişiklik kromatinin nükleus zarının altında yoğunlaşmış kondanse olmasıdır. Bunun yanı sıra DNA parçalanır, nükleer piknozis ve karyoreksis (çekirdeğin küçük parçalara ayrılması) meydana gelir (Sınkovic, 1991). Apoptoz sırasında nükleer morfolojik değişiklikler çok farklıdır ve efektör kaspazlar bu süreçlerde merkezi bir rol oynar (Johnson ve ark, 2000).

Hücre büzülmesi, neredeyse tüm uyarılardan bağımsız meydana gelen apoptoz ile hücre ölümünün en yaygın özelliklerinden biridir. Hücre hacminin birincil belirleyicisi sudur ve bu da  $K^+$ ,  $Na^+$  ve  $Cl^-$  iyonları gibi ozmotik olarak aktif partiküllerdeki değişikliklerle kontrol edilir. Bu durum fizyolojik koşullar altında iyon gradientleri, çeşitli iyon kanalları ve pompalar tarafından korunur. Apoptoz başlangıcında hücre içi  $Na^+$  miktarında artış gözlenir ve sinyal olaylarını kontrol ettiği görülür. Hücrede büzülme ilerledikçe, hem  $Na^+$  hem de  $K^+$  iyonlarının kaybı olur ve  $Na^+/K^+$ -ATPaz ve  $Ca^{+2}$  bağımlı potasyum kanallarının inhibisyonu bu büzülme olayını azaltır. Özellikle, bu iyonların hareketinin, sadece büzülme olayında değil, apoptotik sürecin ilerlemesinin düzenlenmesinde de rol oynadığı düşünülmektedir. Hücreler küçüldükçe, komşu hücrelerden veya ekstraselüler matriksden (ECM) ayrılırlar. Hücreler ECM bağlantılarından serbest kaldığında, odak adhezyonlar organize olur ve kaspazların proteolitik aktivitesi hücre şeklini sürdürmeyen sitoskeletonu bozar ve homojen ozmotik basıncın bir sonucu olarak yuvarlaklaşır (Doonan ve Cotter, 2008; Jiménez-Ruiz ve ark, 2010). Bunu, plazma membranının hücre iskeletinden ayrılmasından dolayı hücre yüzeyinde geri çekilmeyen kabarcıkların oluşumu izler. Bu olayın aslında, kaspazlar gibi proteazlar tarafından hücre-hücre temas faktörlerinin ayrılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Doonan ve Cotter, 2008).

Çalışmalar membran kabarcıklanmasının fosforilasyon ile miyozin hafif zincirlerinin aktivasyonunu gerektirdiği ve aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlendiği yönündedir. Bununla birlikte, membran kabarcıkları içermeyen apoptotik hücrelerin makrofajlar tarafından fagositozdan kolayca geçebilmesi, diğer hücre yüzeyi değişikliklerinden farklı olarak, kabarcıkların tanıma ve yutulmaya katkıda bulunmadığını gösterir. Hücrelerde kabarcık oluşumu, karakteristik apoptotik cisimlerin oluşmasına kadar devam eder. Bu apoptotik cisimlerin makrofajlar veya *in vivo* olarak fagositler tarafından hızla uzaklaştırılması, birçok kültür sisteminde gördüğümüz geç dönem apoptotik hücre lizisi olayını önler. Böylece, apoptoz, 'temiz' bir süreç olarak tanımlanır, çünkü inflamasyona yol

açabilecek potansiyel toksik veya immünojenik hücrel içeriklerin sızması önlenir. Sitoplazmik büzölmeye genellikle nükleer kondenzasyon/piyoz ve DNA fragmentasyonu gibi nükleer olaylar eşlik eder (Doonan ve Cotter, 2008).

Nükleer kromatin, çöktükten sonra nükleer membrana karşı hilal ya da “yarım ay” şeklindeki bir morfolojiyi benimser. Çekirdeğe lokalize olan bir faktör olan Acinus’un (Apoptotik kromatin kondenzasyonunu indükleyen protein, kaspaz 3 substratı) aktivasyonu da kromatin yoğunlaşmasına neden olabilir. Kromatin yoğunlaşması ilerledikçe, çekirdeğin tamamı nükleer zarfla çevrili bir veya daha fazla parçaya ya da yoğun bir granüler küreye parçalanır. Kromatin kondensasyonu sırasında nükleer kılıf morfolojik olarak bozulmadan kalır, ancak nükleer matriks ve lamina bileşenleri bozulur ve kromatinin toplanmasını sağlayan yapısal bütünlüğün kaybolmasına neden olur (Doonan ve Cotter, 2008). Böylece hücrelerin sitoplazması yoğunlaşır, organelleri daha sıkı paketlenmiş hale gelir (Sinkovics, 1991; Fadeel ve ark, 1999).

Apoptoz sırasında sitoplazmik organellerde ya hiç yada çok küçük modifikasyonlar gözlenir (Jiménez-Ruiz ve ark, 2010). Daha sonraki aşamalarda, önce hücre membranında bleb (hücre yüzeyi kabarcıkları) oluşur ardından, yapısal olarak sağlam organelleri ve çekirdeğin kısımlarını içeren apoptotik cisimler olarak adlandırılan zara bağlı parçalara ayrılır (Sinkovics, 1991; Fadeel ve ark, 1999).

Apoptozun en karakteristik özelliği, DNA’nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti (bç) uzunluğundaki nükleozom fragmentlerine, spesifik sistein proteazlar yoluyla aktiveleştirilen nükleus endonükleotik kesimi ile karakterizedir (Elmore, 2007). Bu fragmentler ultraviyole ışığı altında merdiven tarzında görünümü ile agaroz jel elektroforezinde görüntülenebilir (Bortner ve ark, 1995). Daha sonra, apoptotik cisimler hızla *in vivo* olarak fagositler tarafından alınır, yutulur ve bozulur (Fadeel ve ark, 1999).

Apoptotik hücrelerde meydana gelen bir diğer değişimde plazma zarında oluşur (Cohen, 1998). Normal fizyolojik koşullar altında, fosfotidil serin (PS) ağırlıklı olarak iç tabakada veya plazma membranının sitozole bakan kısmında bulunur (Jiménez-Ruiz ve ark, 2010). Apoptozun erken evresinde fosfolipit tabaka asimetrik dağılımını kaybeder ve iç tabakada bulunan PS’nin aminofosfolipid transferaz enzimi ile plazma membranının dış yüzeyine translokasyonu gerçekleşir (Cohen, 1998; Jiménez-Ruiz ve ark, 2010). Fosfolipit asimetrisinin kaybı, PS’ye spesifik olarak bağlanan ve fluoresan özellikteki annexin V ile konjuge olduğunda akış sitometrisi ile deneysel olarak tespit edilebilir (Fink ve Cookson, 2005). PS’nin plazma membranının dış yüzeyine translokasyonu, ölmekte olan hücrelerin fagositozu için bir tanıma sinyali olarak hizmet eder (Jiménez-Ruiz ve ark, 2010). Fagositik

hücrelerde bulunan vitronektin ve lektin özelliğindeki reseptörler PS ile bağlanır ve fagositozu uyarır (Cohen, 1998). Bununla birlikte apoptotik hücrelerde görülen bir başka biyokimyasal özellik ise komşu hücreler tarafından apoptotik hücrenin fagositozuna yol açan hücre yüzey belirteçlerinin eksprese olmasıdır (Bratton ve ark, 1997). Böylece apoptotik hücreler dokularda inflamasyon oluşumu gözlenmeden temizlenir (Chang ve Yang, 2000). Bununla birlikte son zamanlarda yapılan *in vivo* genetik çalışmalar, apoptotik hücrelerin yutulma, proliferasyon, ve mekanik kuvvet dahil olmak üzere aktif bir şekilde çevrelerindeki hücrelerin davranışlarını etkilediklerini ortaya çıkarmıştır (Kawamoto ve ark, 2016).

## 2.9. Apoptozun Uyarılması

Antikanser ilaçlar, metabolik mekanizmalar ve hücre siklus bozuklukları, ısı, pH azalışı, hipoksi, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler DNA hasarı oluşturarak, dış etkenler yolu ile ayrıca hücrelere çevresindeki hücrelerden ve hücre dışı matriksden gelen ihtiyaç duyduğu çevresel yaşam sinyalleri ve büyüme faktörleri düzenli ve yeterli miktarda ulaşamadıkları takdirde hücreler apoptoza giderler (Hirose ve ark, 1997; Mountz ve Zhou, 2001).

Hücrede apoptozu indükleyen mekanizmalardan birinin de ROT (Reaktif oksijen türleri) üretiminin artışı olduğu ileri sürülmektedir. ROT, bir tür toksik bileşiktir ve genellikle oksidatif stres oluştuğunda, hücrede bulunan glutatyon (GSH) tarafından detoksifiye edilir. GSH düzeyi azaldığında, ROT detoksifikasyonu başarısız olur ve ROT, redoks-duyarlı ölüm yolu aracılığıyla apoptoza neden olur (Circu ve Aw, 2010; Hongmei, 2012). Ayrıca ROT seramid üzerinden veya doğrudan mitokondriyi uyararak sitokrom-c salınımına yol açar ve böylece kaspazların aktivasyonuna neden olarak apoptozu indükler (Portt ve ark, 2011). Mitokondriyal ROT ile mitokondriyal apoptotik yolak arasındaki etkileşimi kanıtlayan birçok çalışma mevcuttur (Shidoji ve ark, 1999, Simon ve ark, 2000; Circu ve Aw, 2010). Bunun dışında hücre içi  $Ca^{++}$  seviyesindeki artış ve hücre içi pH'sında düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları gibi hücre içinden gelen sinyaller de hücreyi apoptoza götüren merkezi ölüm sinyallerini oluşturabilir (Circu ve Aw, 2010). Apoptoz ayrıca DNA hasarına yanıt olarak, DNA tamir mekanizmalarının aktivasyonu ile indüklenebilir. Böylece potansiyel olarak zararlı, DNA hasarlı hücrelerin uzaklaştırılmasına ve kanser gelişiminin engellenmesine hizmet edebilir (Plati ve ark, 2011).



## 2.10. Apoptozun Etki Mekanizması

Apoptozun çeşitli seviyelerde regülasyonu, hastalığın önlenmesinde gerekli olan hücreyel sağkalım ve ölüm sinyali arasındaki hassas dengeyi korumak için gereklidir. Kompleks sinyal yolları, çeşitli etkilere yanıt olarak apoptozu teşvik etmek veya inhibe etmek üzere hareket eder (Plati ve ark, 2011).

Apoptozun mekanizması tam olarak aydınlatılamasa da, apoptotik hücre ölümünün gerçekleşebilmesi için hücrede ilgili genetik mekanizmayı tetikleyebilecek bir sinyal ile karşılaşması gerekir (Thompson, 1995; Mountz ve Zhou, 2001). Hücreye ulaşan pozitif ve negatif sinyaller arasındaki dengenin bozulması hücrenin apoptotik yolu tercih etmesine neden olur. Hücrelerin gelişimi ve normal hücre siklusu için gerekli olan büyüme faktörleri, sitokinler gibi pozitif sinyallerin kesilmesi hücrede apoptotik mekanizmaları aktifleştirir. Bunun yanında kimyasal ve fiziksel etkilere dolayı TNF, Fas-Ligand ve limfotoksin gibi negatif sinyallerin alınması da apoptozu tetikler (Yehielly ve Deiss, 2000; Başaran, 2005). Bu nedenle apoptoz hücre yüzey reseptörlerinin ligasyonu, sitotoksik ilaçlar veya ışınlama ile tedavi sonucu oluşan DNA hasarı, hayatta kalma sinyallerinin eksikliği, genotoksik stres veya gelişimsel ölüm sinyalleri ile aktifleşen, pek çok protein tarafından regüle edilen hücre-içi (mitokondri) ve hücre-dışı (ölüm reseptörü) 4 farklı yolak üzerinden tetiklenebilir (Raff, 1998; Vermeulen ve ark, 2005; Plati ve ark, 2011; Xu ve ark, 2016). Bu yollardan ikisi kaspaz bağımlı olarak gerçekleşir ve hücre zarındaki ölüm reseptörleri aracılı olan “ekstrinsik yolak”, diğeri ise mitokondri tarafından salınan kaspaz aktivatör proteinlerinin ve sitokrom c'nin tetiklediği kaspaz aktivasyon yolağı olan “intrinsik yolak” olarak bilinir (Kaufmann ve Gores, 2000; Reed, 2000; Vermeulen ve ark, 2005). Belirtilen iki yoldan ayrı olarak, endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptoz daha az bilinen bir üçüncü yoldur (Xu ve ark, 2016). Apoptotik yollardan dördüncüsü ise kaspazdan bağımsız meydana gelir (Vermeulen ve ark, 2005).

### 2.10.1. Ekstrinsik Yolak

Apoptozu uyaran sinyallerin ekstrinsik yolak ile iletilmesinde, hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerini (DR) aktive eden ligandlar aracılık eder (Şekil 2). Ölüm reseptörleri, içinde en önemli grup en az 19 üyesi olan ve tüm üyeleri protein yapılı tümör nekrozis faktör reseptör (TNFR) ailesidir. TNFR'ler C terminal uca yakın bulunan yaklaşık 80 aminoasitten oluşan, apoptik sinyalin iletiminden sorumlu ölüm bölgeleri (DD) içerirler (Nagata, 1999).

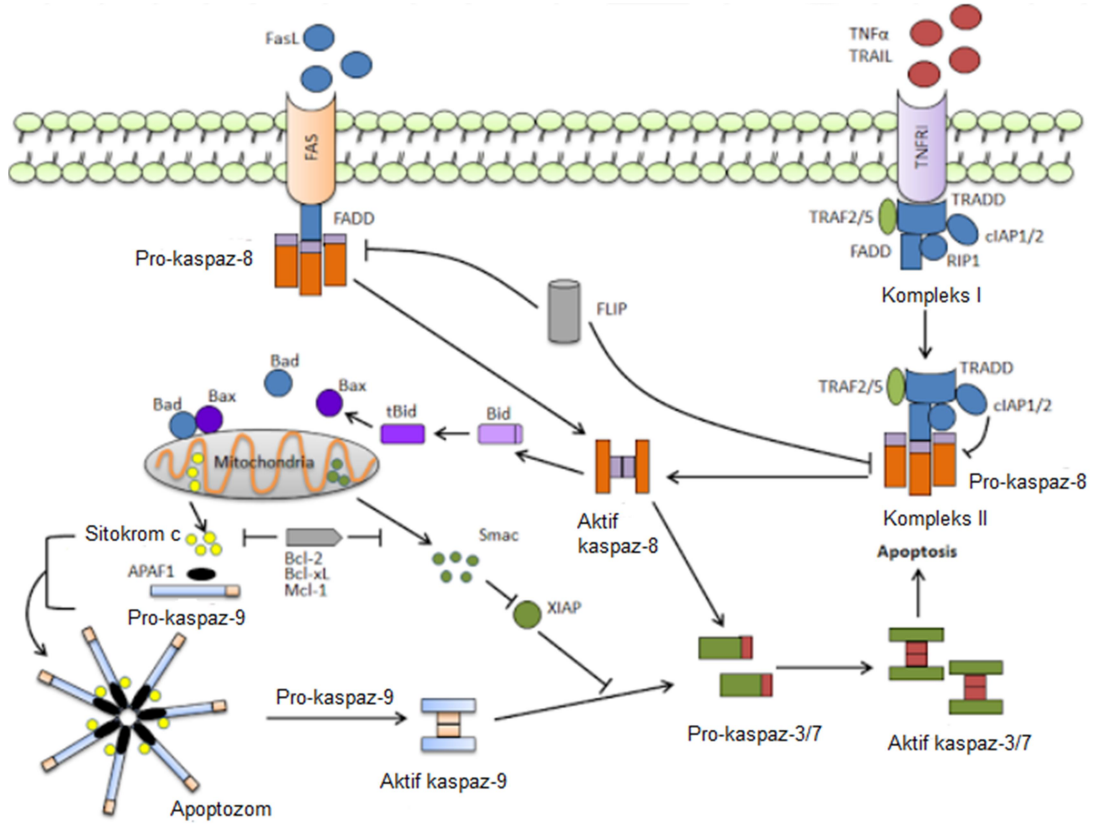
Reseptör ailesi TNF-R1, Fas/APO1, DR3, TNF ile ilişkili apoptoza indükleyici ligand reseptörleri TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), ve DR6'yı içerir. TNF- $\alpha$ 'nın içerdiği diğer reseptörler (FasL/APO1/CD95 reseptörü ve TRAIL/APO2L reseptörü) proliferasyon ve sitokin üretimi dahil olmak üzere diğer biyolojik fonksiyonları düzenler. APO2L/TRAIL (DR4 ve DR5), FasL (Fas/APO1/CD95), ve TNF (TNF-R1) içeren pro-apoptotik ligandlar reseptör spesifiktir. Ligandların bağlanması reseptörleri bir araya getirerek trimerizasyonuna neden olur. Böylece adaptör protein için bir bağlanma bölgesi meydana gelir ve adaptör proteinlerinde dahil olduğu reseptörlerin kümeleşmesi gerçekleşir. Bu adaptör protein, reseptörlere özgüdür. Bunlar, Fas için; Fas ilişkili ölüm bölgesi (FADD) ve TNFR1 ve TNFR2 için ise TNF ilişkili ölüm bölgesidir (TRADD) (Plati ve ark, 2011).

Fas ligandı (Fas L), sitotoksik T lenfositlerde ve doğal öldürücü (natural killer) hücrelerde bulunur. TNF-R1'in ligasyonu, TNF-R1'e TNF'nin bağlanması ile gerçekleşir. Daha sonra, Fas reseptörü kendisinin intrasitoplazmik ölüm bölgesi olan FADD ile TNF-R1 ise kendi intrasitoplazmik ölüm bölgesi olan TRADD ile etkileşime girer (Hung ve Chow, 2004). Adaptör protein olan FADD ve başlatıcı kaspaz 8 ve 10 daha sonra ölüm-indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşturmak üzere reseptörün intrasitoplazmik bölgesine eklenir (Khan ve ark, 2014). Bu komplekslerin oluşumu ölüm indükleyici sinyal başlatıcı kaspaz 8'i aktive eder (Tilly, 2001; Nguyen ve Blaho, 2009; Plati ve ark, 2011). Başlatıcı kaspazların aktivasyonu hücre tipine göre DISC'de sinyal oluşumu mitokondri aracılı olan ve olmayan hücre ölümüne neden olur (Ashkenazi ve Dixit, 1998). Başlatıcı kaspazların aktifleşmesi efektör kaspazların otokatalitik aktivasyonunu veya Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'in c-terminal bölgesini keserek aktif formu olan tBid'in oluşmasını sağlar (Tilly, 2001; Hung ve Chow, 2004; Ashkenazi, 2008).

Aktif kaspaz 8'in, kaspaz 3'ü aktive etmesiyle çok sayıda hücre iskeleti proteini ve ICAD (Kaspaz yolu ile aktifleşen DNaz inhibitörü) parçalanır. Kaspaz 3 tarafından parçalanan ICAD'ın, CAD (Kaspaz yolu ile aktifleşen DNaz) üzerinde inhibe edici etkisi önlenir. CAD ise DNA'yı 180 - 200 bp uzunluğunda fragmentlere ayırır ve hücrede apoptoz meydana gelir (Schultz ve Harrington, 2003).

Aktif kaspaz 8 ayrıca sadece bir BH-3 bölgesi içeren Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan pro-apoptotik Bid proteinini keser ve tBid (kesilmiş, kısaltılmış Bid, truncated Bid) yapısını oluşturur. Oluşan tBid mitokondri membranında bulunan Bcl-2 proteinini inhibe eder, böylece Bcl-2'nin Bax proteini üzerindeki inhibe edici etkisi kaybolur. Bax proteinleri oligomerize olur ve sitokrom c'nin mitokondri membranından geçişine imkan veren porları meydana getirir. Bu oluşan porlar aracılığıyla sitokrom c mitokondriden sitoplazmaya geçer

(Kaufmann ve Earnshaw, 2000; Bratton ve Cohen, 2001). Sitoplazmaya geçen sitokrom c, önce Apaf-1'e bağlanır daha sonra yapıya prokaspaz 9'un bağlanması ile apoptozom adı verilen kompleksi oluşturur. İnaktif formda olan prokaspaz 9 aktive olur. Böylece ekstrinsik yolaktaki sinyalin ve intraselüler sinyallerin başlatıcı kaspazlar grubunda yer alan kaspaz 9'a iletilmesi ile intrinsik yolak aktifleştirilir. Aktif kaspaz 9, kaspaz 3'ü aktifleştirerek, apoptotik yol kaspaz 3 üzerinden ilerler (Bratton ve Cohen, 2001).



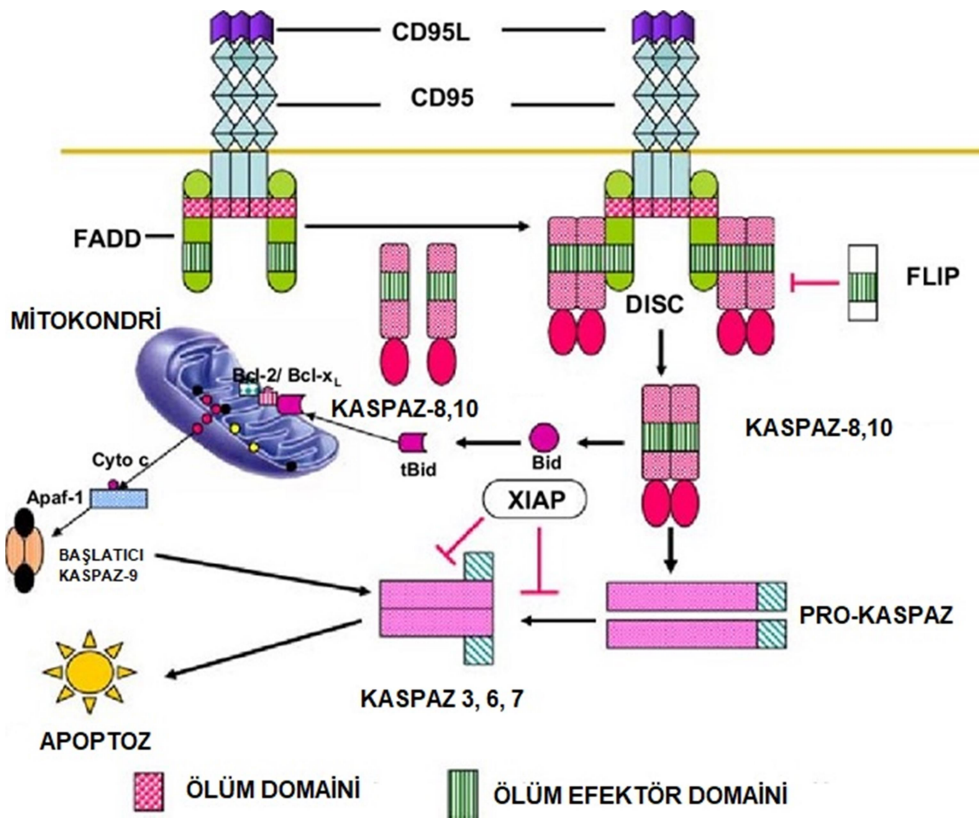
**Şekil 2.** Ekstrinsik apoptotik yolların temel olaylarının şematik gösterimi (Xu ve ark, 2016).

### 2.10.1.1. Fas-Fas ligand aracılı apoptoz (CD95 Yolu)

En iyi karakterize edilen yüzey reseptörlerinden biri olan Fas (CD95, APO-1), hem lenfoid hem de lenfoid olmayan hücreler üzerinde geniş dağılım gösteren 319 aminoasit tip 1 transmembran glikoproteinidir. Fas, doğal ligandı FasL veya agonistik antikorlar ile birleştiğinde hedef hücrelerde apoptotik bir sinyal başlatılır. Bir trimerik tip 2 transmembran proteini olan FasL, aktif CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri tarafından ekspre edilir. Fas ligand membrana bağlı veya solubl olabilir ve Fas hücre yüzey reseptörüne bağlanmadan önce

metalloproteinazlarla membran bölgesinden ayrıldıktan sonra çözünür formda serbest kalır. Fas-FasL etkileşimi, reseptör oligomerizasyonuna neden olur (Schultz ve Harrington, 2003). FasL'nin Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün intraselüler kısmında bulunan bölgesi, FADD birleşimi ile DISC'i oluşturur. Böylece kaspaz 8 ve kaspaz 10 aktifleşir. Bu kaspazlar prokaspaz 3'ü proteolitik olarak aktive eder (Şekil 3).

FasL'nin T hücreleri membranında bulunan Fas reseptörüne bağlanmasıyla immün reaksiyonla aktive olmuş ve görevlerini tamamlamış olan lenfositler apoptoz ile ortadan kaldırılmış olur (Kaufmann ve Gores, 2000; Mountz ve Zhou, 2001).



Şekil 3. Fas-Fas ligand aracılı apoptoz (CD95 Yolu) (Oliveira ve Gupta, 2008).

### 2.10.1.2. Tümör nekroz faktör aracılı apoptoz

Bir sitokin olan TNF- $\alpha$  tarafından TNFR1 ölüm reseptörü aktive edilir. TNFR1 ölüm reseptörü farklı biyolojik proseslerde çeşitli sinyal kompleksi oluşumunda rol oynayan intraselüler bölgesi olan TNFR adaptör proteininin (TRADD) etkileşmesini sağlar. TRADD bölgesi, FADD ile birleşerek kaspaz 8'i aktiveleştirir ve ekstrinsik yolak boyunca apoptoza neden olur (Mountz ve Zhou, 2001; Deng ve ark, 2003). Fas reseptörünün aksine, TNFR1'in

TRADD'la etkileşimi sonucunda her zaman apoptoz meydana gelmez. Bunun yanında, TNF- $\alpha$  çoğu hücre için sitotoksik değildir, çünkü TRADD, TRAF2 (TNF- $\alpha$  ile ilişkili faktör 2) ve RIP ile birleşerek, bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ve JNK aktivasyonuna yol açan farklı kompleksler oluşturur. NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonunun, hücreleri TNF gibi apoptotik uyarılara karşı korumak için birincil bir mekanizma olarak hizmet ettiği bilinmektedir (Deng ve ark, 2003). Böylece hücrenin canlılığı devam eder (Mountz ve Zhou, 2001). Bu nedenle TNF- $\alpha$  aracılı apoptoz için NF- $\kappa$ B'nin inhibisyonu gereklidir (Deng ve ark, 2003).

### 2.10.2. İntersik Yolak

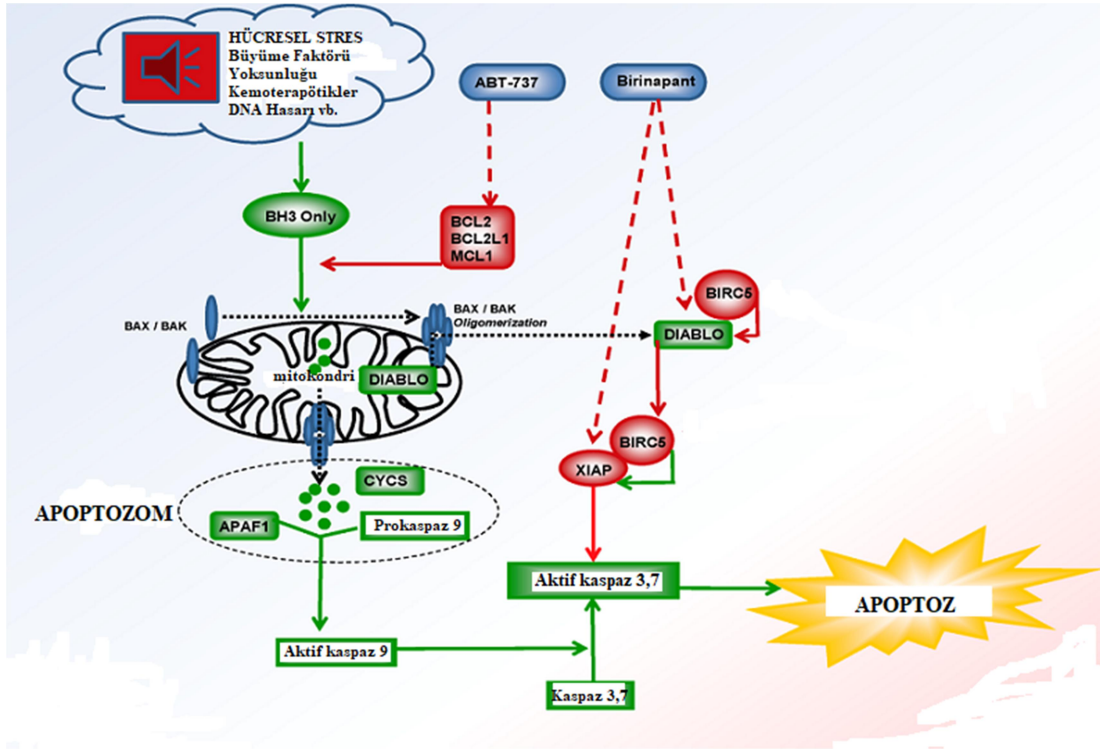
Apoptoza yol açan diğer önemli sinyal yolu, intrinsik yoldur. İntersik apoptotik yolak bir dizi stres uyarıcısı ile aktive edilebilir (Nguyen ve Blaho, 2009; Plati ve ark, 2011; Xu ve ark, 2016). Bu farklı stres faktörleri, sinyali mitokondriye ileten çok sayıda hücre içi bileşen tarafından tanınır (Plati ve ark, 2011) ve buna yanıt olarak, mitokondriyal membran içerisindeki pro-ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin oranının değişmesine neden olur (Nguyen ve Blaho, 2009).

Sağlıklı hücrelerde Bcl-2 proteini mitokondrinin dış zarında bulunur ve Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktifleştirici faktör-1) molekülüne bağlıdır. Hücrede intrinsik yolu tetikleyen sinyal oluştuğunda Bcl-2 proteini bağlı bulunan Apaf-1 molekülünü serbest bırakır. Bcl-2 protein ailesinin Bax ve bad gibi üyeleri, mitokondri membranından girer ve mitokondrinin dış yüzeyinde geniş bir por oluşumu meydana getirir. Bunun sonucunda mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunda (MOMP) artış meydana gelir (Ricci ve ark, 2003; Green ve Kromer, 2004; Nguyen ve Blaho, 2009; Plati ve ark, 2011). MOMP, normalde mitokondriyal intermembran boşluğunda bulunan başta sitokrom c olmak üzere diğer apoptotik faktör olan AIF, EndoG (Endonükleaz G), Smac/DIABLO (Sekonder Mitokondri Kaynaklı Kaspaz Aktivatörü/Kaspaz Bağlayan Proteinin Direkt İnhibitörü) ve Omi/HtrA2 (HtrA serin peptidaz-2) gibi çeşitli proteinleri uyararak mitokondriden sitoplazmaya difüzyonuna yol açar (Plati ve ark, 2011; Zhivotovsky ve Orrenius, 2011).

Mitokondriyal intermembran boşluğundan kaçan proteinler arasında, apoptojenik faktörler olarak bilinen bir dizi protein, hücre ölümünü indükleyici kaspaz kaskadının mitokondriye bağımlı olarak başlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Sitozol içindeki apoptojenik faktör sitokrom c, ATP yada dATP varlığında oluşan apoptozom olarak bilinen multiprotein kompleksini oluşturmak için Apaf-1'e ve kaspaz ailesinden olan prokaspaz 9'a

bağlanır. Bu kompleks kaspaz 9'un oligomerizasyonunu sağlayarak aktifleştirir (Plati ve ark, 2011; Xu ve ark, 2016).

Aktif kaspaz 9, proteolitik aktivite göstererek efektör kaspazları aktifleştirir (Nguyen ve Blaho, 2009; Plati ve ark, 2011). Kaspazların aktive olmasıyla kaspaz kaskadı başlar ve diğer proteolitik enzimlerde aktive olur. Proteolitik enzimlerin aktivasyonu ile sitoplazmik proteinler ve kromozomal DNA yıkıma uğrar. Böylece apoptotik cisimler oluşur. Oluşan apoptotik hücreler fagositozla uzaklaştırılır. AIF ise DNA kondenzasyonuna neden olurken, Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 IAP'lerin inhibitör etkilerini nötralize ederek kaspaz aktivasyonunu destekler (Xu ve ark, 2016) (Şekil 4).



**Şekil 4.** İntrinsik apoptotik yolakların temel olaylarının şematik gösterimi (Lamers ve Narendran, 2013).

### 2.10.3. Sitotoksik T Lenfosit Aracılı Apoptoz (Perforin/Granzim Yolu)

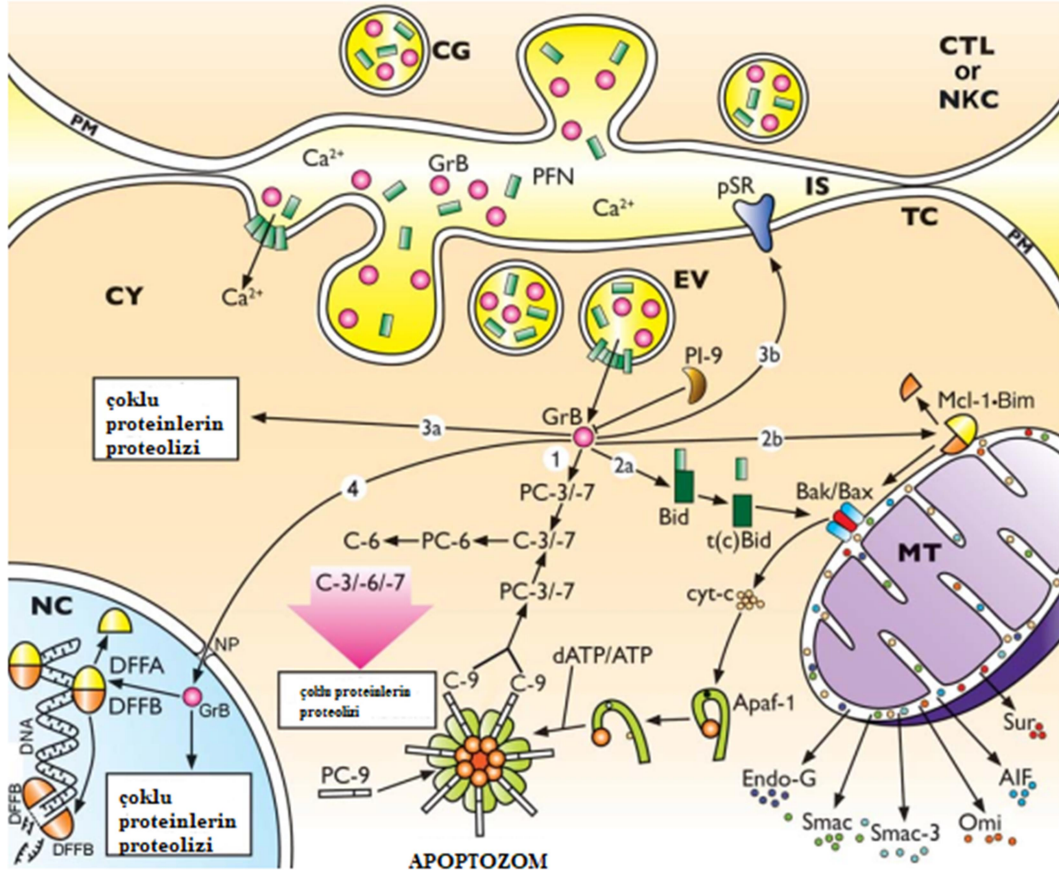
Apoptoz indüksiyonu için üçüncü bir yol Granzim-Perforin sistemidir (Şekil 5). Bu yol ile gerçekleşen apoptoz Granzim B (GrB)'yi hedef hücelere salgılayan sitotoksik T lenfositler (CTL) ve NK hücrelerine özgü olduğundan sitotoksik T lenfosit aracılı apoptoz olarak da adlandırılmaktadır (Motyka ve ark, 2000; Mountz ve Zhou, 2001). Granzim-

Perforin yolu aracılı apoptoz sisteminin allojenik hücreler, tümör hücreleri ve hücre içi patojenler ile enfekte olmuş hücrelerin temizlenmesi için en önemli mekanizma olduğu düşünülmektedir. GrB primer insan meme, akciğer, ürotelyal karsinomlarda ve nazal tip NK/T hücreli lenfoma kanser hücrelerinde saptanmıştır (Rousalova ve Krepela, 2010).

GrB, NK hücreleri tarafından hedef hücreyi öldürmenin majör bir efektörü olarak kabul edilir. GrB immünolojik sinapstan hedef hücrenin sitoplazmasına translokeze edilir. GrB'nin hedef hücre içine translokasyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Her ne kadar GrB translokasyon mekanizmasını açıklamak için birkaç model önerilmişse de, bu süreç kesin olarak anlaşılamamıştır (Rousalova ve Krepela, 2010). Fakat yapılan bazı çalışmalarda GrB'nin mannoz-6-fosfat reseptörleri (IGFR2) aracılığıyla hücreye taşındığı bildirilmiştir (Motyka ve ark, 2000).

Hücre tanıma temelli CTL'ler ve NK hücreler hedef hücrenin yüzeyindeki antijenleri tanırlar ve yüzeylerinde oluşturdukları Fas ligand aracılığıyla hedef hücrenin Fas reseptörleri ile konjuge olurlar. Konjugasyondan sonra CTL'lerin sitotoksik salgı granülleri immünolojik sinaps olarak adlandırılan bir mikroskopik interselüler yarık içine serbest bırakılır (Budd, 2002; Rousalova ve Krepela, 2010). CTL ve NK hücrelerin sitoplazmik salgı granüllerinde en çok bulunan bileşen bir serin proteaz olan granzim B (Andrade ve ark, 1998) ve transmembran por oluşturucu bir protein olan perforindir (PFN). Perforinler, hedef hücrelerin membranlarında dairesel porlar oluşturarak, GrB'nin hedef hücrelerin sitoplazmasına girerek kaspazları aktive etmesini sağlar (Motyka ve ark, 2000; Mountz ve Zhou, 2001). Bu yol kaspaz 3'ün parçalanması ile başlatılabilir ve bunu DNA'nın fragmentasyonu, hücre iskeleti ve çekirdek proteinlerinin parçalanması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik yapıların oluşumu izler. Apoptotik hücrelerde fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu artar. Sonuç olarak apoptotik hücreler fagositik hücreler tarafından yutulur (Martinvalet ve ark, 2005).





Şekil 5. Kanser hücrelerinde Granzim B-kaynaklı ölüm yolları (Rousalova ve Krepela, 2010).

#### 2.10.4. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz

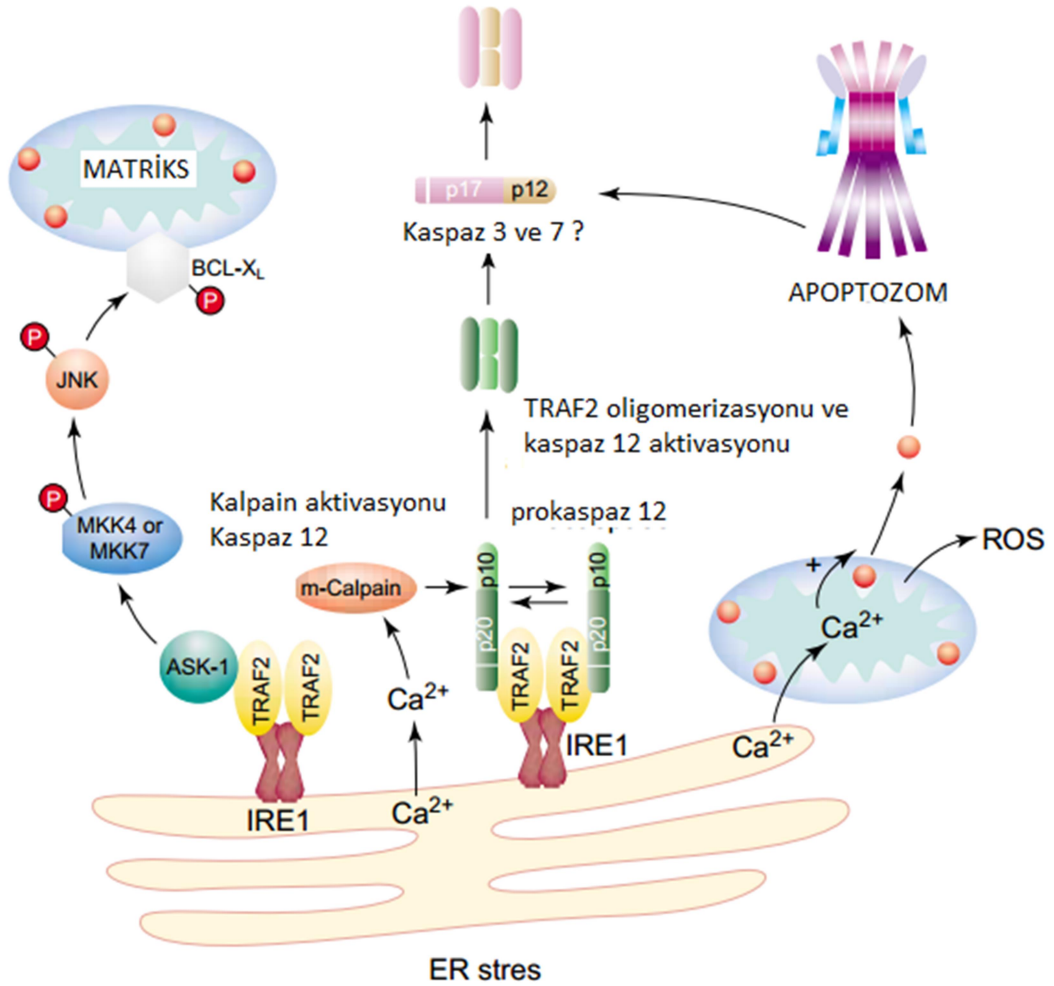
Apoptozun indüksiyonu için dördüncü bir yol olarak, hakkında detaylı bilgiye sahip olunmasa da endoplazmik retikulum (ER)/Golgi stresine bağlı kaspaz aktivasyon yolu önerilmiştir (Cryns ve Yuan, 1999) (Şekil 6). ER aracılı apoptoz stres, patojenik enfeksiyon, kimyasal hasar, genetik mutasyon veya besin yoksunluğu gibi ER stresine yanıt oluşturan durumlarda gerçekleşir. Son zamanlarda ER stresine yanıt olarak oluşan ER aracılı apoptozdaki fonksiyonu üzerinde çok fazla araştırma yapılmıştır (Ruthowski ve Kaufman, 2004).

Apoptoza neden olan bu yol intrinsik ve ekstrinsik yoldan farklı bir şekilde gerçekleşir ve sitokrom-c salınımına ihtiyaç duymadan kaspaz 9'u aktive edebilen bir yoldur (Nakamura ve ark, 2000; Morishima ve ark, 2002).

ER stresi protein katlama sürecini etkiler ve ER'de katlanmamış proteinlerin birikmesine yol açar (Ruthowski ve Kaufman, 2004). Eğer ER'deki hasar çok büyük ise,



katlanmamış proteinlere yanıt olarak ya da kalsiyumun sitoplazmaya salınması ile programlanmış hücre ölümü başlayabilir. Mekanizması tam olarak bilinmese de muhtemelen Bcl-2 protein ailesinden Bim'in ER'ye translokasyonu aracılığıyla kaspaz aktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Bcl-2 protein ailesinin üyeleri aynı zamanda sitoplazmadaki kalsiyum değişimlerinde mitokondri ve ER arasındaki etkileşimleri yönlendirir. ER'nin sitosolik yüzünde inaktif formda bulunan kaspaz 12'nin aktif hale gelmesiyle kaspaz kaskatının uyarılması apoptozu tetikler. Ek olarak kaspaz 12 aktivasyonundan bağımsız olarak ER stresi, mitokondriyal membranın permeabilizasyonunu indükleyebildiği için mitokondriyal ölüm yollarının yanı sıra klasik apoptotik yolağı harekete geçirebilmektedir (Ghatage ve ark, 2012).



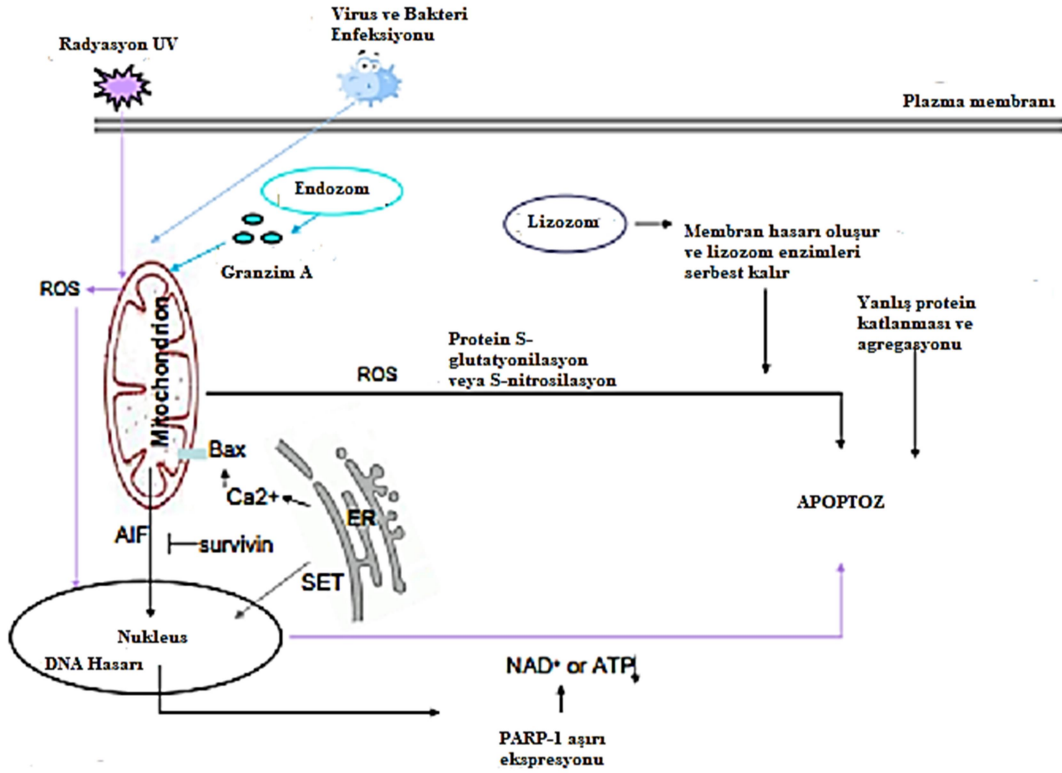
Şekil 6. Endoplazmik retikulum aracılı apoptoz (Bratton ve Cohen, 2001).

### 2.10.5. Kaspaz Bağımsız Apoptoz

Kaspaz bağımsız apoptoz mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Fakat çoğu araştırmacı; doğrudan nükleusa gidip kromatin yoğunlaşmasını başlatan apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G'nin kaspaz aktivasyonundan bağımsız bir şekilde nükleustaki parçalanmaya indüklediğini belirlemiştir. Ayrıca ROT ve programlanmış hücre ölümünü stimüle eden diğer ligandlarında bu mekanizmayı aktive edebileceği bildirilmiştir (Hongmei, 2012).

Hücrede birçok ligand mitokondriyal membran potansiyeli değişikliğine yol açabilir. Mitokondri hasarı apoptozun ilk adımıdır, ROT üretimi artar ve böylece ROT kaspazdan bağımsız apoptoza neden olur. Martinvalet ve ark (2005) ROT artışının ve kaspaz bağımsız mitokondri hasarının doğrudan granzim A'yı indüklediğini bildirmiştir. Granzim A, ER ile ilgili bir kompleksle nükleusa taşınır ve apoptozu tetikler (Şekil 7) (Martinvalet ve ark, 2005; Hongmei, 2012).

AIF, mitokondriden serbest kalır ve DNA'yı parçalamak için nükleusa taşınır sonuç olarak eğer oluşan DNA hasarı hücreler tarafından tamir edilmezse apoptoz meydana gelir (Ricci ve ark, 2003; Green ve Kromer, 2004). Bu nedenle AIF, kaspaz bağımsız pro-apoptoz faktörü olarak değerlendirilir. Son zamanlarda birçok araştırmacı simvastatin, staurosporin, kadmiyum ile AIF üretiminin PCD'yi indüklediğini bulmuşlardır. Sonuç olarak bu faktörlerin kaspazdan bağımsız PCD'yi tetiklediği kanıtlanmıştır. Kaspaz bağımsız hücre ölümünü AIF'nin yanı sıra ROT'un de kaspaz bağımsız hücre ölümünü indüklediği bildirilmiştir. ROT, mitokondriden AIF salınımı için gerekli poli(ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1)'nin aktivasyonuna aracılık ederek kaspaz bağımsız hücre ölümü mekanizmasına dahil olur (Kang ve ark, 2004; Hongmei, 2012).



Şekil 7. Kaspaz bağımsız apoptoz yolağı şematik gösterimi (Hongmei, 2012).

## 2.11. Kaspazlar

Kaspazlar, aspartat spesifik sistein proteaz grubu enzimler olup, apoptozisin başlatılmasında ve yürütülmesinde rol alan hücre içi protein ailesidir (Walker ve ark, 1994). Kelime olarak “Cysteine Aspartate Specific ProteASEs- CASPASE” (c: sistein proteaz mekanizması, aspase: aspartik asitten sonra kesme kabiliyeti), olarak türetilmiştir (Nicholson, 1999).

Substratlarının aspartik asit (ASP) içeren bölgelerinden karboksil gruplarındaki peptit bağlarını koparır. Kaspazlar hücrede prokaspazlar olarak adlandırılan inaktif (zimojen) formda sentezlenirler ve birbirlerini seri bir şekilde aktive ederler (Gewies, 2003). Kaspaz aktivitesi ile apoptoz kavramı, ilk olarak 1998’de, L929 fare fibrosarkom hücrelerinde kaspaz aktivitesinin farmakolojik inhibisyonunun TNF aracılı nekrotik hücre ölümünü duyarlı hale getirdiği buluşuyla keşfedilmiştir (Xu ve ark, 2016).

Kaspazlar hücre morfolojisi (Takahashi ve ark, 1996; Kothakota ve ark, 1997; Sahara ve ark, 1999), hücre ölümü (Cheng ve ark, 1997; Clem ve ark, 1998), DNA metabolizması (Lazebnik ve ark, 1994; Enari ve ark, 1998; Sakahira ve ark, 1998), hücre döngüsü regülasyonu (Levkau ve ark, 1998; Zhou ve ark, 1998) ve sinyal iletiminde (Cardone ve ark,

1997; Rudel ve Bokoch, 1997; Widmann ve ark, 1998) rol oynayan proteinleri inhibe eder. Böylece hasarlı veya istenmeyen hücreler kontrollü ve etkili bir şekilde uzaklaştırılır (Ashe ve Berry, 2003).

Hücredeki kaskat sisteminin bileşenleri aktive edildiğinde genetik olarak programlanmış hücre ölümünün gerçekleşmesi ile ilgili hipotez apoptoz üzerine yapılan çalışmalar sonucu öne sürülmüştür. Son yıllarda, proteazların bu sürecin başlatılması ve uygulanması için gerekli olan korunmuş bir enzim ailesi olduğu ve apoptoz sürecinde kritik rol oynadığı kanıtlanmıştır (Earnshaw ve ark, 1999; Fink ve Cookson, 2005; Ghatage ve ark, 2012). Kaspazlar, intrinsik veya mitokondriyal yol, ekstrinsik veya ölüm reseptör yolu ve yakın zamanda tanımlanan fakat tam anlamıyla aydınlatılamayan intrinsik endoplazmik retikulum (ER) yolu olmak üzere üç yolak ile aktive olur (Rastogi ve ark, 2009; Ahmed ve ark, 2015) ve kaspaz aktivasyonunun regülasyonu birçok molekül tarafından kontrol edilmektedir (Plati ve ark, 2011).

Kaspazlar, inflamasyonun başlaması ve devam etmesinde önemli bir rol oynarken eksikliği ise tümör gelişmesine ve birkaç otoimmün hastalığa neden olabilir (Rastogi ve ark, 2009). Kaspazların apoptotik süreçte fonksiyonlarının yanı sıra uygun organizma gelişiminde, doku homeostazında ve yaralanma sonrası iyileşmede de önemli rol oynadığını destekleyen çok sayıda kanıt mevcuttur. Özellikle, stresle indüklenen ölmekte olan hücrelerdeki apoptotik kaspazlar, komşu hücrelerin proliferasyonuna yol açan mitojenik sinyalleri aktive edebilir ve bu durum, apoptoza bağlı bir proliferasyon olarak adlandırılır. Kanser hücreleri şaşırtıcı bir şekilde kaspazların bu fonksiyonlarını büyüme ve gelişme, hayatta kalma, çoğalma ve metastaz amacıyla kullanmaktadır (Dabrowska ve ark, 2016).

Bugüne kadar memelilerde en az 14 kaspaz tanımlanmış (Ashe ve Berry, 2003) ve kaspaz -2, -8, -9, -10, -3, 6 ve -7 olmak üzere 7 tanesi apoptotik süreçte rol almaktadır (Earnshaw ve ark, 1999). Ancak tüm aile üyelerinin insanlardaki aktif homologları henüz tanımlanmamış (Ashe ve Berry, 2003), bunlardan sadece 12 tanesi insanda tespit edilebilmiştir. Bu enzimlerin hepsi bütün hücrelerde ifadenmemektedir (Coultas ve Strasser, 2000). Ayrıca, tüm bu aile üyeleri, fizyolojik rolleri ve hedefleri bakımından iyi karakterize edilmemiştir. Bununla birlikte, bazı belirgin kaspazların apoptoz ve inflamasyonda rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle efektör kaspazların aktivasyonu sıklıkla hücre ölüm sinyallerinin aktarıldığı bağlantı noktası olarak değerlendirilir (Ashe ve Berry, 2003).

Kaspaz ailesinin tüm üyelerinin aminoasit dizisinde ve yapısında benzerlikler olsa da, fizyolojik rolleri önemli ölçüde farklılık gösterir. Kaspaz ailesi üyeleri, fizyolojik rollerine

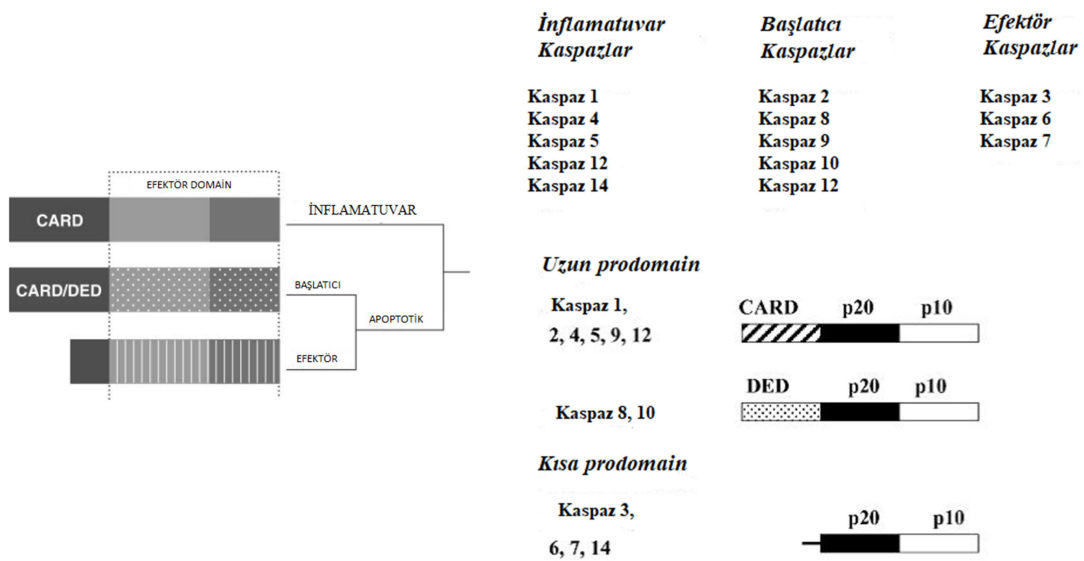
ve substrat özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Kaspazlar apoptozda rol oynayanlar (kaspaz -2, -3, -6, -7, -8, -9, ve -10) ve inflamatuvar yanıt sürecinde ve sitokin prosesinde primer rol oynayan inflamatuvar kaspazlar (kaspaz -1, -4, -5, -13, ve -14) olacak şekilde iki ana gruba ayrılabilir (Fink ve Cookson, 2005).

İnflamatuvar yanıtta rol alan kaspaz 1, kaspaz 4, kaspaz 5 ve kaspaz 12 inflamatuvar kaspazlar olarak adlandırılır ve uzun prodomainlere sahiptirler (Krajewska ve ark, 2005; Chowdhury ve ark, 2008). Kaspaz 12 genellikle inflamatuvar kaspaz olarak kategorize edilmesine rağmen endoplazmik retikulum stres kaynaklı apoptozda da rol oynar (Nakagawa ve ark, 2000).

Apoptotik süreçte rol oynayan kaspazlar hücre ölümü sırasında aktifleşme zamanları ve N terminal prodomainlerinin uzunluğuna göre başlatıcı kaspazlar ve efektör kaspazlar olarak iki alt gruba ayrılabilir (Şekil 8) (Villa ve ark, 1997; Fink ve Cookson, 2005). N terminal prodomainlerinin uzunluklarındaki farklılıklar fonksiyonel olarak önemlidir (Villa ve ark, 1997).

Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) uzun prodomainlere (>90 aminoasit) sahiptir ve kaspaz aktivasyon kaskadlarının başlatılmasından sorumludur. Başlatıcı kaspazlardan kaspaz 8 ve kaspaz 10 DED, kaspaz 2 ve kaspaz 9 CARD motiflerini içermektedir (Cohen, 1997; Chang ve Yang, 2000; Chowdhury ve ark, 2008).

Efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6 ve 7) genellikle 20-30 aminoasit uzunluğunda olan sadece küçük bir prodomain içerir ve hücrenin substratlarını parçalayarak hücrenin yapısının bozulmasından sorumludur (Fink ve Cookson, 2005; Chowdhury ve ark, 2008).



Şekil 8. Kaspazların sınıflandırılması (Fischer ve ark, 2003).

Başlatıcı ve efektör kaspazlar dışında Kaspaz 11 apoptotik sürecin düzenlenmesinde ve sepsiste sitokinlerin olgunlaşmasında rol alır. Kaspaz 12, amiloid- $\beta$  tarafından sitotoksisite aracısı olarak rol oynamaktadır. Kaspaz 13'ün bir bovin gen olduğu bildirilmiştir. Kaspaz 14 ise embriyonik dokularda yüksek miktarda eksprese olurken, erişkin dokularda eksprese olmadığı bulunmuştur (Hu ve ark, 1998; Kang ve ark, 2002).

### 2.11.1. Kaspazların Yapısı

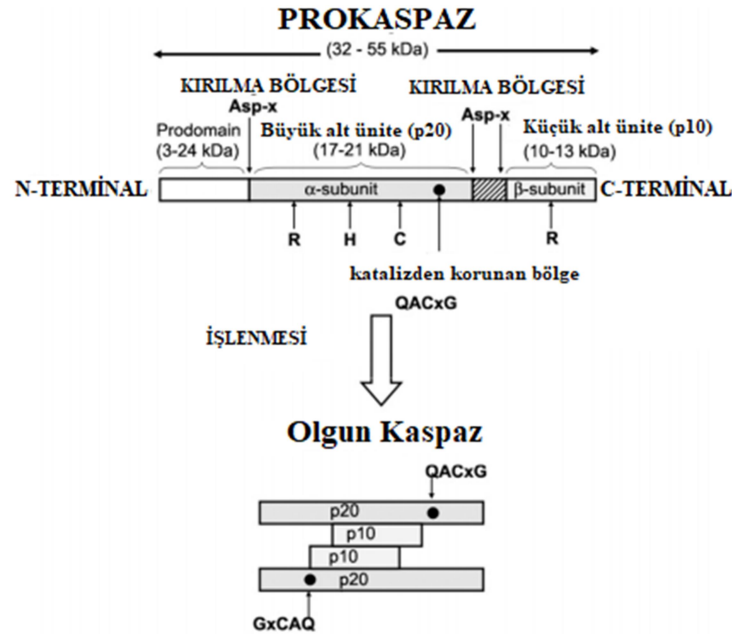
Kaspazlar aspartat rezidülerinde proteolitik hidroliz sonucu aktifleşen prokaspaz olarak zimojen formda sentezlenirler ve aktif bölgelerinde "QACXG" (X; R, Q veya D olabilir) korunmuş pentapeptid içerirler (Walker ve ark, 1994; Chowdhury ve ark, 2008). Kaspazların yapı analizlerine yönelik yapılan çalışmalar, zimojen formda sentezlenen prokaspazların katalitik olarak dayanıklı, 32-55 kDa ağırlığında 3 bölge içeren, tek zincirli bir polipeptit olarak sentezlendiğini göstermiştir (Chowdhury ve ark, 2008).

Proteazlar arasında en yüksek özgüllüğü gösteren kaspaz enzimleri, aspartik kesim alanının N-terminalinde bulunan dört aminoasitlik bir motiften oluşan optimum kesme bölgesine sahiptir. Bu bölge kaspazın hedef proteinin seçimini belirlemede görevlidir. Kaspazların sahip olduğu bu dört aminoasitlik motifler ayrıca peptid inhibitörler tarafından inaktive olmasında rol oynar Kaspazların substratlarını tanımasında diğer bir etken ise üçüncül protein yapılarıdır (Thornberry ve Lazebnik, 1998; Wellington, 2000).

Kaspazlar, NH<sub>2</sub> terminal bölge, büyük alt ünite (20 kDa; p20), küçük alt ünite (10 kDa; p10) ve katalitik alt üniteleri birbirine bağlayan bağlayıcı bölgelerden oluşmaktadır. Tüm prokaspazlar, NH<sub>2</sub> terminalinde yüksek oranda homoloji gösteren proteaz domaini içermektedir (Walker ve ark, 1994; Fink ve Cookson, 2005). X ışını kristal yapı ve peptid dizileme çalışmalarında büyük katalitik alt ünitenin (p20) 17-21 kDa ağırlığında, küçük C terminal domain olarakta adlandırılan küçük katalitik alt ünitenin (p10) 10-13 kDa ağırlığında olduğu belirlenmiştir. Kaspazlar ölüm domaini (DD) olarak adlandırılan 3-24 kDa ağırlığında N-terminal prodomaine sahiptir. p10 ve p20 alt ünitelerinin arasında bazı prokaspazlarda 10 aminoasit büyüklüğünde kısa bağlayıcı bir bölge mevcuttur (Chowdhury ve ark, 2008; Plati ve ark, 2011). Bu alt üniteler proteolitik işlemin ardından birbirleri ile etkileşime girerek heterodimer yapısını oluşturur. Bu heterodimer yapıları bir araya gelerek tetramer düzenini oluşturur ve böylece kaspazın aktif formunu meydana getirir (Walker ve ark, 1994) (Şekil 9).

Apoptoz sürecinde önemli olan kaspazların aktivasyonu ve aktivitesinin düzenlenmesi, birkaç farklı seviyede meydana gelmektedir. Bu kontrol mekanizmalarından biri kaspazların zimojen formda sentezlenmesidir. Diğer bir kontrol noktası ise Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri ve diğer hücre polipeptidleri bazı prokaspazların aktivasyonunu bloke eder. Ayrıca apoptoz proteinlerinin bazı hücre inhibitörleri (cIAPs) aktif kaspazlara bağlanabilir ve bunları inhibe edebilir (Earnshaw ve ark, 1999).

Prokaspazların düzenleyici olarak görev yapan prodomain uzunlukları değişiklik gösterir. Uzun prodomainler kaspaz aktivitesi için gerekli protein-protein etkileşiminde görevli CARD ve DED spesifik motifleri içerir. Bu motifler, kaspaz 8 ve 10'daki gibi ölüm efektör alanları (DED'ler) veya kaspazlar 1, 2, 4, 5, 9, 11, 12, 13 ve 14'te olduğu gibi CARD olabilir (Cohen, 1997; Chang ve Yang, 2000). Başlatıcı kaspazların bu prodomainlerinin birbirleriyle yapışarak etkileşmesi kaspaz aktivasyonu için gereklidir (Kanno ve Nishizaki, 2011). Ayrıca bu alanlar, kaspazlar ve hücre sinyallemede yer alan çeşitli adaptör molekülleri arasındaki etkileşimlere aracılık eder. DED içeren kaspazlar, başlatıcı kaspazlar iken, CARD içeren kaspazlar, başlatıcı kaspazlar (kaspazlar 2 ve 9) veya inflamatuvar kaspazlar (1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) olabilir (Cohen, 1997; Chang ve Yang, 2000).



Şekil 9. Kaspazların yapısal özelliklerinin şematik gösterimi (Chowdhury ve ark, 2008).

Protein-protein etkileşiminde DED-DED prodomainleri arasında hidrofobik, CARD-CARD prodomainlerinin arasında ise yük etkileşimi gözlenmektedir. Bu bölgeler kaspazların aktivasyonunu yönlendiren diğer moleküller ile birlikte kaspazların harekete geçmesini kolaylaştırır. DED'lerin, MORT1/FADD ve TRADD gibi adaptör proteinler ile etkileşimi tespit edilmiştir (Hsu ve ark, 1995; Boldin ve ark, 1996; Rastogi ve ark, 2009). CARD protein etkileşim motifleri ise adaptör molekül RAIDD ve Apaf-1, apoptoz inhibitörü c-IAP-1 ve c-IAP-2 çoklu anahtar apoptotik düzenleyiciler arasında korunmuştur (Rastogi ve ark, 2009).

### 2.11.2. Kaspaz 3

Apoptotik süreçte en önemli enzimler arasında kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 bulunmaktadır (Chowdhury ve ark, 2008). Kaspaz ailesi içerisinde hücrelerde en çok bulunan kaspaz 3 enzimin kaspaz 6 ve kaspaz 7 tarafından desteklenen aktif formunun ekspresyon düzeyi genellikle apoptozu belirlemek için kullanılmaktadır (Forest ve ark, 2005).

Apoptozun efektör kaspazlarından biri olan kaspaz 3, apoptoz sürecinde PARP'dakine benzer olarak yaygın bir şekilde Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) motiflerini içeren çok sayıda substratın tamamen veya kısmen proteolitik kırılmasından sorumludur (Chowdhury ve ark, 2008).

Tamir mekanizmasını ve normal hücre fonksiyonunu sürdüren birçok protein, apoptoz sürecinde kırılmaya uğrar. PARP ve DNA-bağımlı protein kinazın katalitik alt ünitesi (DNA-PKcs) DNA tamir mekanizması ile ilgilidir. Apoptoz sürecinde kırılan yapısal proteinler fodrin, aktin ve Gas2 gibi hücre iskeleti proteinleri ile NuMa ve lamin A gibi çekirdek yapısının oluşmasına katkıda bulunan proteinleri içerir. Bu proteinlerin veya henüz tam olarak tanımlanmayan diğer proteinlerin kırılması apoptotik hücre için karakteristik olan, çekirdek yoğunlaşması ve çekirdek zarını tomurcuklanması gibi gözlemlenmiş birçok biyokimyasal ve morfolojik özellikten sorumludur (Yuan ve Ding, 2002).

Sonlandırıcı kaspazlar (Kaspaz 3, 6 ve 7) efektör grubu oluşturup başlatıcı kaspazlardan 8 veya 9 tarafından "downstream" yolu ile aktive olurlar ve fonksiyonları hücrelerdeki hedef proteinleri (non-kaspaz) özel yerlerinden kesmektedir. Bu hedefler arasında klasik bir örnek PARP-1 enziminin kaspaz 3 veya 7 tarafından kesilmesidir ya da Lamin-A'nın kaspaz 6 tarafından koparılmasıdır. Kaspazların kesme işlemi tek bir noktada hedefe çeşitli yollarla direk veya indirekt etki ederek olmaktadır. Örneğin endonükleaz



CAD inhibitörü olan ICAD kesildiği zaman aktive olmaktadır ve kesilen aktif fragment şeklinde ortama salınmaktadır. Öte yandan PARP'ın elimine edilmesi DNA tamirinde bozukluğa yol açmaktadır. Tüm bu kesilme işlemleri sonuç olarak fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler yaparak apoptotik hücrelerin oluşumuna yol açar (Yang ve Liu, 2002; Kim ve ark, 2012).

### 2.11.3. Kaspaz 8

Kaspaz 8, birçok ölüm reseptörü tarafından aktive olan bir proteaz olup, apoptotik süreçte oldukça önemlidir (Grenet ve ark, 1999). Kaspaz 3 ve 8 katalitik bölgelerinin uzunlukları, aktif bölgelerinde sistein yer alması ve aktivasyonları için gerekli formun şekillenmesi bakımından yakın benzerlik gösterir. Bu iki kaspaz arasındaki dikkat çekici farklılık ise, kaspaz 8'deki 2 DED içeren N terminal bölgenin uzunluğudur. Fas veya TNF reseptörlerinin FasL veya TNF- $\alpha$  ile aktivasyonu prokaspaz 8'in otokatalitik aktivasyonu sonucu oluşur. Aktive kaspaz 8 daha sonra aktivasyonları ve otokatalitik işlevleri için yeterli desteğe sahip olmayan intraselüler konsantrasyonlu kısa prodomainleri içeren kaspaz 3 gibi diğer kaspazların downstream'ine neden olur. Bu nedenle kaspaz 8'in Fas veya TNF aracılı apoptotik kaskatta ilk sırada bulunduğu belirtilmiştir ve upstream kaspaz olarak tanımlanmıştır (Watt ve ark, 1999).

Başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 8 birçok ölüm ligand reseptörüne sinyal komplekslerinin bağlanması yolu ile aktive olmaktadır. Bu reseptörler, sinir büyüme faktörü (NGF) ve TNF ailesindedir. TNF- $\alpha$ , FasL ve TRAIL içerirler. Prokaspaz 8'in N-terminal prodomain kısmında iki DED homoloğu bulunmaktadır. Prokaspaz 8 reseptöre bağlı adaptöre (Mort 1) bağlanır. Bu yolla DED kısımlarının homofilik etkileşimlerine neden olur. Proenzimin bağlanması kendisinde de proteolitik sürece ve aktivasyona yol açar, böylece otokataliz veya ilgili kaspazlar (örneğin kaspaz 10) ile etkileşim açığa çıkar.

Aktivasyondan sonra, kaspaz 8 apoptotik sinyali artırmaktadır, artan sinyal sonucunda kaspaz 3 aktivasyonu proteolitik yolla ya da indirekt olarak kesme/aktivasyon yoluyla Bid üzerinden sağlanmaktadır. Bid de mitokondriyal Sitokrom c salınımına ve kaspaz 9 aktivasyonuna yol açar (Meller ve ark, 2002; Kim ve ark, 2012).

Başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazlar arasındaki farklılıklar oldukça karışıktır. Kaspaz 8 ölüm-reseptör komplekse (DRC) bağlanıp sonra prokaspaz 3'ü keserek sistemi aktive ettiği için başlatıcı kaspaz olarak sınıflandırılır. Fakat aynı zamanda Bid, Bcl-2/Bax ailesi

üyelerini keserek de apoptotik aktivite de belirgin artışa neden olmaktadır (Yang ve Liu, 2002).

#### 2.11.4. Kaspaz 9

Ced-3 alt ailesinin bir üyesidir ve kaspaz 3 ile yüksek benzerlik gösterir. Kaspaz 9 ve ailenin diğer üyeleri arasındaki temel fark, aktif bölgede bulunan pentapeptittir (QACGG). Kaspaz 9'da Arg'nin yerine Gly bulunur. Prokaspaz 9 küçük ve büyük alt birimleri, P312 EPD↓A ve D327QLD↓A arasında iki potansiyel işlem bölgesi içerir. D327QLD↓A motifi, PARP'daki DEVD↓G bölgesi ile benzerlik gösterirken bu da kaspaz 9'un kaspaz-3 ile aktive edildiğini gösterir (Sawada ve ark, 2000).

DNA hasarı gibi hücresel bir stres olduğu zaman sitozolde bulunan proapoptotik proteinler aktive olur ve mitokondrinin geçirgenliğini bozarak MPT por oluşumuna neden olur. Bunun üzerine mitokondrinin içinde bulunan sitokrom c sitozole salınır. Apoptozun başlamasına sebep olan dış faktörlerin etkisi ile mitokondriyal hasara bağlı sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı kaspaz 9'u aktive eder. Memelilerde CED-4 homologu olan Apaf-1 sitokrom c bağlar, bu da dATP (veya ATP) bağlanmasını uyarılmaktadır. Apaf-1/Sitokrom c/dATP kompleksi "Apoptozom" adını almaktadır. Apoptozomun merkezi bileşeni olan Apaf-1; N ucunda CARD, daha sonra geniş nükleotit bağlayan bir bölge ve C ucunda ise 12-13 WD40 tekrarını içeren 3 bölgeden oluşur. CARD kaspaz 9'un prodomaini ile etkileşimi için gereklidir (Shi, 2005). Prokaspaz 9 bu kompleksi CARD ile Apaf-1 arasındaki homofilik iç etkileşimler yolu ile bağlar. Otoproses sonucu 35 kDa geniş alt ünite ve bunun N-terminal prodomain kısmına 12 kDa küçük alt ünite eklenmesi ile aktif kaspaz 9 oluşur. Bu apoptozom ile bağlı kaspaz 9, prokaspaz 3 gibi kaspaz zimojenlerinin aktivasyon sürecini başlatır (Salvesen ve Dixit, 1999; Day ve ark, 2009).

#### 2.12. Bcl-2 Gen Ailesi

Fizyolojik hücre ölümü için genetik bir programın var olduğunun ilk kanıtı, *C. elegans*'ın gelişimini inceleyen çalışmalarda elde edilmiştir (Horvitz ve ark, 1982; Ellis ve Horvitz, 1986). Hücre ölüm mekanizmasının tanımlanan ilk bileşeni olan memeli Bcl-2 (B-cell lenfoma-2) geni (Vaux ve ark, 1988), ilk kez *C. Elegans* ile yapılan çalışmalarda programlanmış hücre ölümünü engelleyen molekül olarak keşfedilmiş ve Ced-9 adı verilmiştir (Cooper, 1994; Thompson, 1995). Memelilerde ise ilk olarak Bcl-2 geninin

varlığı bu keşfi izleyen yıllarda B hücreli foliküler lenfomada gösterilmiştir (Tsujimoto, 1998). Yapılan birçok çalışma memeli hücrelerinin Bcl-2 ailesi tüm üyelerine sahip olduğunu bildirmektedir. Bcl-2'nin programlanmış hücre ölümünü engelleme kabiliyetinin memelilerde ve nematodda benzerliği, büyük ölçüde korunmuş bir süreç olduğunu göstermektedir (Vaux ve ark, 1992; Vaux ve Korsmeyer, 1999).

Apoptoz, dokuların hem gelişimi hem de korunması için kritik öneme sahiptir ve Bcl-2 ailesi proteinleri apoptotik sürecin başlıca düzenleyicileridir (Gross ve Katz, 2017). Yapılan araştırmalardan elde edilen veriler ışığında Bcl-2 gen ekspresyon düzeyi arttığında hücrelerin yaşam sürelerinin uzadığı saptanmış ve hücrelerin yaşam sürelerindeki bu artışın kanseri indüklediği bildirilmiştir (Tsujimoto, 1998).

Bcl-2, mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleus membranlarında bulunan 26 kDa büyüklüğünde apoptozun regülasyonunda kilit rolü olan protein ailesidir (Tsujimoto, 1998; Petros ve ark, 2004). Bu ailenin üyelerinin çoğu mitokondrinin dış membranında lokalizedir ve iyon değişimini düzenlemektedirler (Tsujimoto, 1998; Frenzel ve ark, 2009; Nguyen ve Blaho, 2009). Bcl-2 aile proteinlerinin hücre ölümünü düzenlediği mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir, ancak bunların işlevlerinin, çoğunlukla, proteinlerin mitokondrilerin intermembran alanından salınmasını modüle etme yeteneklerine bağlı olduğu düşünülmektedir (Gross ve Katz, 2017).

Bcl-2 protein ailesi apoptozun kontrol noktası olarak rol oynamaktadır. Bcl-2 protein ailesinin üyeleri farklı görevler üstlense de yüksek oranda yapısal homoloji göstermektedir (Petros ve ark, 2004) (Şekil 10). Bcl-2 ailesi, hepsi Bcl-2 homoloji (BH) alanları olarak bilinen korunmuş protein motiflerini paylaşan pro-ve antiapoptotik proteinlerden oluşur (Nguyen ve Blaho, 2009)

Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-w, AI, NR13, Boo/Diva gibi Bcl-2 protein ailesi üyeleri apoptozu inhibe eden, kanserojeniz sürecini hızlandıran antiapoptotik özellik göstermektedir. Antiapoptotik özelliklerini mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımını baskılayarak sergilerler Antiapoptotik özellik gösteren Bcl-2 ve Bcl-XL sadece mitokondrinin dış membranında bulunur (Petros ve ark, 2004).

Bcl-2 protein ailesinin Bax, Bak, Bok, Bad, Bim, Bik, Noxa gibi üyeleri ise apoptotik süreci uyan pro-apoptotik proteinler olarak rol oynamaktadır (Fennell ve ark, 2008; Brunelle ve Leatai, 2009). Bunlar mitokondriden sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımını indüklerler Proapoptotik üyeler sitozolde ya da membranda bulunabilirler (Petros ve ark, 2004).

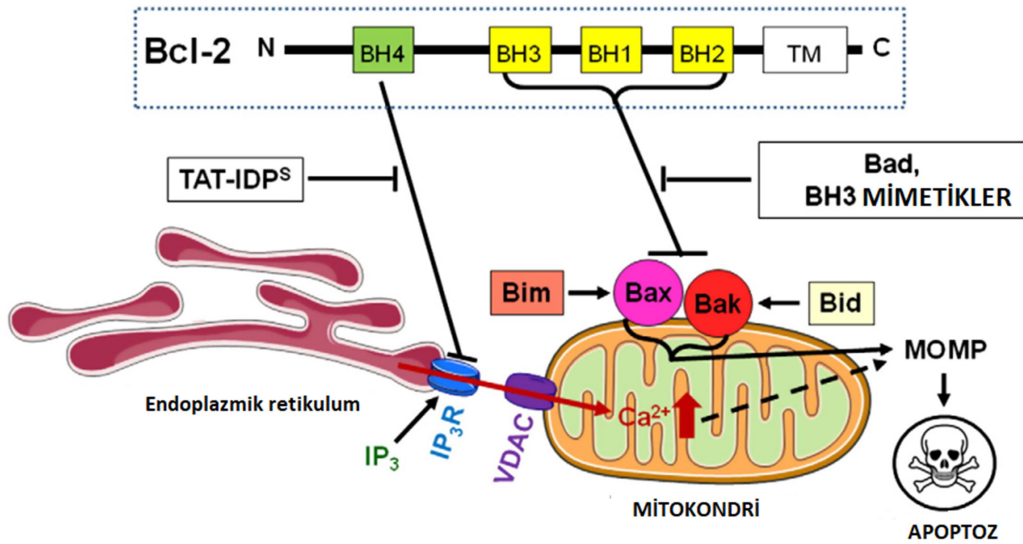
Bu bölgedeki pro ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin oranı ve aktiviteleri, sitokrom c'nin mitokondriden salınımını ve daha sonra intrinsik apoptotik yolun başlatılmasını belirler (Nguyen ve Blaho, 2009).

Protein ailesinin yapısı incelediğinde farklı üyeleri arasında Bcl-2 homoloji domainleri içerdiği bulunmuştur. Bu domainler BH1, BH2, BH3 ve BH4'tür. Bcl-2 ailesinin üyelerinin bu domainlerden bir veya daha fazlasını içerdiği belirlenmiştir. Antiapoptotik üyeler tüm domainlere, proapoptotik üyeler ise BH1, BH2 ve BH3 domainlerine sahiptir. Proapoptotik üyeler sahip oldukları domainlere göre iki grupta sınıflandırılır. Proapoptotik üyelerden Bax, Bak, Bok gibi proteinler BH1, BH2 ve BH3 domainlere sahipken, Bid, Bad, Bim, Bik, Bnk, Hrk gibi BH3-only olarak adlandırılan proapoptotikler ise sadece BH3 domainine sahiptir (Fennell ve ark, 2008; Brunelle ve Leatai, 2009). Bu nedenle Bcl-2 proteinleri yapılarına ve fonksiyonlarına göre antiapoptotik proteinler, proapoptotik proteinler ve sadece BH3 içeren proteinler olarak üç grupta da sınıflandırılabilir (Cory ve Adams, 2002).

Bcl-2 ailesinin proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin apoptotik süreç üzerindeki zıt etkileşimleri yapılarında bulunan hidrofobik cep ve amfipatik  $\alpha$ -heliks yapıları iki bölgesine bağlıdır. Hidrofobik cep yapılarında bulunan BH1, BH2 ve BH3 domainleri oluşturur. Amfipatik  $\alpha$ -heliks yapısı ise BH3 domaininde yer alır (Petros ve ark, 2004).

Epstein-Barr Virüsünün Burkitt lenfoma ve mononükleozis de Bcl-2'ye benzer bir protein salgıladığı ya da salgıladığı bir proteinin hücrede Bcl-2 protein üretimini arttırmasını indüklediği bildirilmiştir. Böylece hücrenin apoptoza karşı daha dirençli bir hale gelmesi bu şekilde apoptozdan kaçarak sürekli çoğalma özelliği kazanan kanser hücrelerine dönüşmesi ve kanser hücrelerinin meydana gelmesinde Bcl-2 proteinlerinin rolü hakkında bilgi edinilmiştir.

Bcl-2 proteininin farklı tümör hücrelerinde (B-hücre lösemi, lenfomaların bazı tipleri, prostat tümörleri ve nöroblastomlar gibi) yüksek düzeyde eksprese edildiği ve böylece iletilmesi gereken ölüm sinyallerini önleyerek apoptozu bloke ettiği bulunmuştur (Lowe ve Lin, 2000).



**Şekil 10.** Bcl-2 ailesi üyelerinin alternatif fonksiyonları (Akl ve ark, 2014).

### 2.13. Survivin (BIRC5)

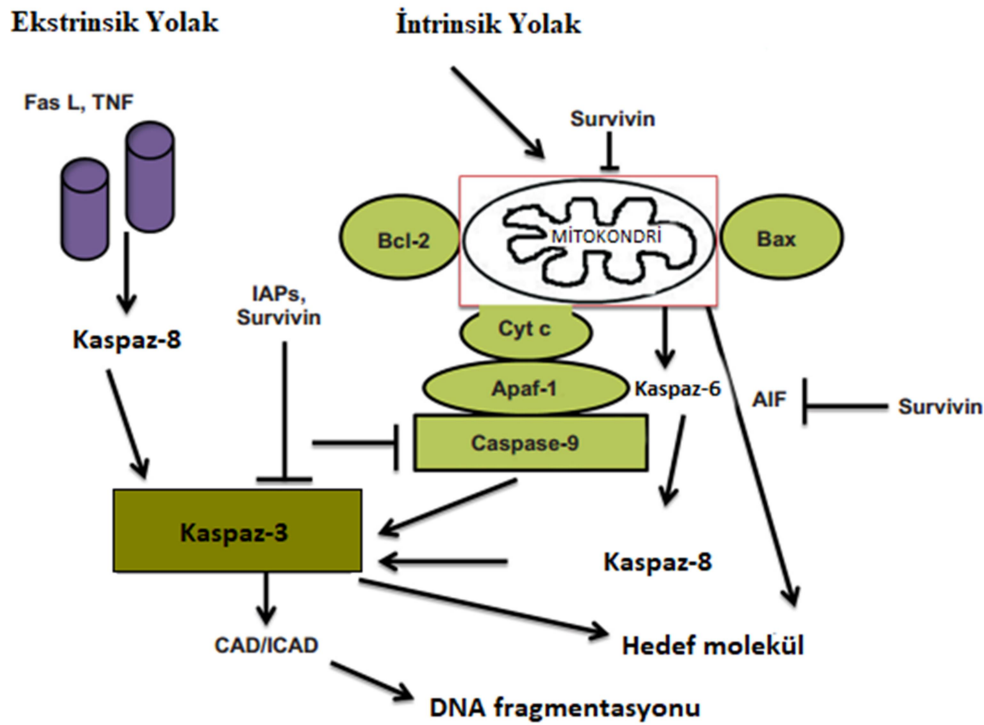
Survivin, kaspazları inhibe eden ve hücre ölümünü bloke eden IAP protein ailesinin bir üyesidir (Allewa ve ark, 2006; Jaiswal ve ark, 2015; Kavya ve ark, 2017). Survivin, birçok kritik hücrel mekanizmada yer alan ve çok çeşitli proteinleri bağlayabilen karmaşık bir etkileşim ağı oluşturan bir proteini olup mitoz ve programlanmış hücre ölümünün kilit bir düzenleyicisi olarak işlev görür (Mita ve ark, 2008, Pavlyuko ve ark, 2011).

İnsanlarda survivini kodlayan gen bölgesi, 1997 yılında Ambrosini ve arkadaşları tarafından klonlanmıştır (Ambrosini ve ark, 1997). Kromozom 17'nin telomer ucunda 14,7 kb uzunluğundaki gen bölgesinin kodladığı protein, 142 aminoasitten oluşur ve 16,5 kDa ağırlığındadır (Jaiswal ve ark, 2015). Yapısında BIR (Bakülovirüs IAP tekrarı) domaininin sadece bir tekrarını, karboksil ucunda ise  $\alpha$ -helix yapısını içermektedir (Altieri, 2015). Ayrıca antiapoptotik proteinlerin kaspazlara bağlanmasını sağlayan RING domainine sahip olmadığı için diğerlerinden farklıdır (Jang ve ark, 2008).

Survivin hücrede bulunduğu yere göre farklı fonksiyonlara sahiptir. İnter mitokondriyel membran boşluğunda bulunan survivin, hücreyi apoptozdan korurken (Dohi ve ark, 2007); sitoplazmik survivin, hücre döngüsü düzenlemesinde (Suzuki ve ark, 2000) önemli bir rol oynar ve interfaz sırasında mikrotübül stabilitesini etkiler. Survivin strese hücrel yanıt, anjiyogenezis ve metastaz süreçlerinde de rol oynadığı bildirilmiştir (O'Connor ve ark, 2000; Mehrotra ve ark, 2010, Pavlyuko ve ark, 2011). Yapılan çalışmalarda survivinin telomeraz aktivitesi üzerine de etkilerinin olduğu, telomeraz

aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir (Mehrotra ve ark, 2010). Ayrıca interleokin-3 (IL-3), Fas (CD95), tümör nekroz faktörü, Bax gibi apoptozu indükleyen moleküller ile antikanser ilaçlarının etkisini azalttığı belirlenmiştir (Han ve ark, 2009).

Survivin'in, antiapoptotik etkisine dair birkaç hipotez vardır. En çok çalışılan antiapoptotik mekanizma, survivin'in proapoptotik protein Smac/DIABLO'yu bloke etme kabiliyetidir (Pavlyuko ve ark, 2011). Smac/DIABLO'ya bağlanarak, diğer IAP moleküllerin bağlanmasını engelleyerek apoptozu dolaylı olarak inhibe edebileceği ileri sürülmüştür (Liu ve ark, 2004). Diğer mekanizma ise XIAP ile etkileşime girme kabiliyetine dayanır. XIAP'yi ubiquitinasyondan korur ve stabilitesini artırarak kaspazların inhibisyonunu teşvik eder (Pavlyuko ve ark, 2011). Ayrıca başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9 ve efektör kaspaz olan kaspaz 3 ve kaspaz 7'nin aktif formlarına bağlanarak, apoptotik yolları bloklar ve böylece apoptozu inhibe eder (Şekil 11) (Nicholson ve Thornberry, 1997; LaCasse ve ark, 1998; Andric ve ark, 2012). Çalışmalar survivin'in sadece kaspaz bağımlı apoptozu inhibe etmediğini aynı zamanda kaspazdan bağımsız apoptotik yollarında inhibe ettiğini göstermiştir (Shankar ve ark, 2001).



Şekil 11. Apoptotik yolak üzerinde survivin'in etkileri (Jaiswal ve ark, 2015).

Survivin'in apoptoz ile ilişkisini araştıran pek çok çalışmada apoptotik genleri düzenleyerek apoptozu indüklediği bilinen p53 proteininin kaybının survivin ekspresyonunu

etkilediği belirlenmiştir (Mirza ve ark, 2002; Nakano ve ark, 2005). p53, survivinin antiapoptotik aktivitesini antagonize ederek apoptozu başlatabilir (Mirza ve ark, 2002).

Survivin transkripsiyonu promotör bölgesindeki spesifik sekanslarla kontrol edilir, hücre döngüsünün G1 fazı sırasında artar ve G2-M'de zirveye ulaşır (Olie ve ark, 2000; Mita ve ark, 2008). Mitoz sırasında metafaz ve anafazda kısa bir zaman aralığında işlev görür (Mita ve ark, 2008).

Survivin, embriyonik dokularda bolca eksprese edilir, ancak çoğu farklılaşmış yetişkin dokularında saptanamaz (Johnson ve Howerth, 2004). Artan kanıtlar, aynı zamanda birçok insan organında/hücrelerinde karsinogenez de rol oynadığını ve çoğu kanserde yüksek oranda eksprese edildiğini göstermektedir (Jaiswal ve ark, 2015). Survivin geninin ekspresyon seviyesi, tümörün farklılaşma derecesi, histolojik derece, mitotik indeks ve tümör tipi gibi çeşitli değişkenlere bağlıdır (Altieri, 2008; Jaiswal ve ark, 2015). Hemen hemen insanlarda görülen tüm kanser türlerinde farklı oranlarda da olsa eksprese edildiği bildirilmiştir (Altieri, 2003). Meme (Bongiovanni ve ark, 2014), özafagus (Upadhyay ve ark, 2011), mide (Borges ve ark, 2011), kolon (Dimitrakopoulos ve ark, 2011), pankreas (Theodoropoulos ve ark, 2010), mesane (Kawata ve ark, 2011), böbrek hücresi (Qin ve ark, 2012), baş ve boyun (Kostić ve ark, 2013), oral (Lauxen ve ark, 2014) ve lösemi (Brundage ve ark, 2002) gibi çeşitli insan neoplazmlarında yüksek düzeyde ifade edildiği belirlenmiştir (Kavya ve ark, 2017). Bu nedenle survivin insan genomunda birçok tümör spesifik genden biridir (Pavlyuko ve ark, 2011). Survivin tümör hücrelerinde eksprese edilmesinin tümör oluşumu ve gelişiminde tümör hücrelerinin hayatta kalması için avantaj sağladığı belirlenmiştir (Altieri, 2008). Bu nedenle kanser teşhisinde marker olarak kullanımı ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur (Altieri, 2003).

Survivin yüksek ekspresyon düzeyi zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Altieri, 2003). Ayrıca kanser evresi, sağkalım süresi, kanserin nüksetmesi ve tedavinin etkinliği hakkında da bilgi vermektedir (Curtin ve Cotter, 2003; Jaattela, 2004; Jaiswal ve ark, 2015). Çünkü yüksek survivin ekspresyonu, agresif davranış, kemoterapötik ajanlara azalmış yanıt ve survivin negatif olan kanserler ile karşılaştırıldığında hayatta kalma süresinin kısalması ile korelasyon gösterir (Sarela ve ark, 2002; Li ve ark, 2003).

Son yapılan çalışmalarda endotel hücreleri, hematopoietik progenitör hücreler, timositler, kolon mukozası, T hücreleri ve uterin serviks epitel hücrelerinde hücre proliferasyonu için düşük seviyelerde survivinin ifade edildiği bildirilmiştir (Altieri, 2002; Frost ve ark, 2002; Fukuda ve Pelus, 2002; Song ve ark, 2003; Okada ve ark, 2004).

## 2.14. Köpek Osteosarkoma

Kanser, evcil köpeklerde büyük bir sağlık sorunudur (Gustafson ve ark, 2018). Köpeklerde görülen kanser türleri arasında melanom, Non-Hodgkin lenfoma, osteosarkoma, yumuşak doku sarkomları ve prostat, meme, akciğer, kolorektal karsinomlarıdır (Fan ve ark, 2008; Baek ve ark, 2009). Yaşamı süresince her 3 köpekten 1'irine kanser teşhisi konulmaktadır. Son yıllarda 10 yaşından büyük tüm köpek ölümlerinin yaklaşık yarısının nedeni kanserdir (Baek ve ark, 2009).

Kuzey Amerika'da kanser üzerine yapılan çalışmada 81 köpek ırkının 70'inde ve karma cins köpeklerin ölümünden sorumlu patofizyolojik sürecin kanser olduğu rapor edilmiştir. Kanser görüldüğü köpek ırkları ve kansere yakalanma oranları Bernese dağ köpeği (%55), Golden Retriever (%50), İskoç Terrier (%48), Bouvier des Flandres (%47), Boxer (%44), Bullmastiff (%44), İrlanda av köpeği (%41) ve Airedale Terrier (%40) olacak şekilde bildirilmiştir. Kanser prevalansı düşük ırklar ise Malta köpeği (%9), Dachsund av köpeği (%9), Pekingese (%8), Pomeranian (%8), Chihuahua (%8), Miniature Dachsund (%6) ve Miniature Pinscher (%4)'dür (Gustafson ve ark, 2018).

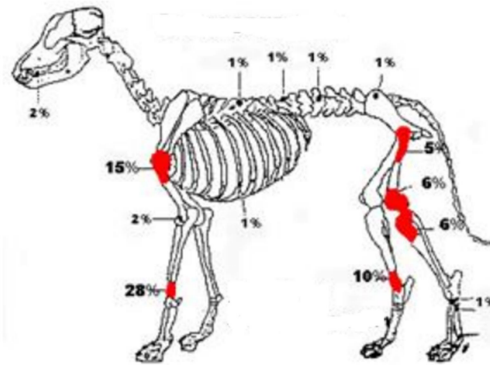
Osteosarkoma (OSA) mezenkimal bir tümör olup en yaygın primer kemik tümörüdür ve uzun kemiklerin metafiz bölgesinde ağırlıklı olarak meydana gelir. Yüksek derecede malignite gösterir, hızlı büyüme oranına ve metastaz yapma eğilimine sahiptir (Evdokiou ve ark, 2003; Benassi ve ark, 2007; Fu ve ark, 2011). Genellikle akciğere yerleşme eğiliminde olan ve diğer organlarda metastaz yapan kötü huylu bir tümördür (Sharili ve ark, 2011; Gill ve ark, 2013). OSA, insanlarda ağırlıklı olarak ergenlerde ve genç yetişkinlerde görülürken en sık insidans 15-19 yaşları arasındadır. İnsan OSA'nın aksine, köpek OSA daha fazla yaşlı köpeklerde görülür (Spodnick ve ark, 1992).

Evcil köpeklerde en sık görülen malign kemik dokudan kaynaklanan birincil kemik tümörlerinden biridir (Priester ve Mc Kay, 1980; Quigley ve Leedale, 1983; Mantovani ve ark, 2016; Hlavaty ve ark, 2017). Köpeklerde görülen tüm malignitelerin %4'ünü oluştururken, iskelet tümörlerinin %85'ini oluşturur (Curtis ve ark, 2011; Millanta ve ark, 2012; Mantovani ve ark, 2016). Primer kemik tümörlerinin görülme sıklığının köpeklerde 7.9/100.000, kedilerde 3.1-4.9/100.000 olduğu bildirilmektedir (Vanel ve ark, 2013). Osteosarkoma gelişme riski yüksek olduğu bildirilen cinsler arasında Doberman Pinscher, German Shepherd, golden retriever, Great Dane, Irish setter, golden rottweiler ve Saint Bernard bulunmaktadır (Gustafson ve ark, 2018).



Osteosarkoma görülmesinde temel etkenin cins ve ailesel insidans olduğu düşünülmektedir. Ana predispozan faktör ise köpeğin ağırlığından daha çok boyudur (Ehrhart ve ark, 2013; Gustafson ve ark, 2018). Kısırlaştırılmış köpekler daha fazla risk altındadır. Dişi veya erkek köpeklerin OSA'ya olan yatkınlığı tümörün lokasyonuna ve köpeğin cinsine bağlı olarak değişmektedir (Vanel ve ark, 2013). En sık 7-9 yaşlı köpeklerde görülürken, nadirde olsa 1-2 yaşlı köpeklerde de rastlanmaktadır (Krajarng ve ark, 2012). Kaburga osteosarkomaları ise ortalama 5,4 yaşlarında görülür (Vanel ve ark, 2013).

Histopatolojik olarak OSA, tümör hücreleri tarafından bir osteoid matrisin üretilmesiyle karakterize edilen malign hücre tümörü olarak tanımlanmaktadır (Thompson ve Pool, 2002; Barger ve ark, 2005). Hem apendiküler (~%75) hem de aksiyal (~%25) iskelette meydana gelen ilkel kemik hücrelerinden türemektedir (Brodey ve Riser, 1969; Heyman ve ark, 1992; Gustafson ve ark, 2018). OSA hem aksiyal hem de apendiküler iskelette görünse de, distal radius yada proksimal humerusdan kaynaklanan apendiküler OSA, aksiyal OSA'dan ~3-4 kat daha sık görülmektedir (Wolke ve Nielsen, 1966; Dernell ve ark, 2001; Barger ve ark, 2005). Apendiküler OSA, uzun kemiklerin metafizyel kısmının medüler boşluğunda ortaya çıkan malign osteoblastların bir tümörüdür (Misdorp ve Hart, 1979; Thompson ve Pool, 2008).



**Şekil 12.** Köpeklerde OSA'nın geliştiği bölgeler (Weisbrode, 2006).

Osteosarkoma proksimal humerus, distal femur, proksimal ve distal tibiada görülse de Distal radius ve proksimal humerus, en sık etkilenen metafizer kemik bölgeleridir. Proksimal, distal femur ve tibialarda daha az rastlanır (Şekil 12). Ancak bu kanser türü herhangi bir kemikte de gelişebilir (Dernell ve ark, 2001; Liptak ve ark, 2004; Biller ve ark, 2016). Ön bacaklar arka bacaklardan iki kat daha fazla etkilenir (Morello ve ark, 2011).

Genel olarak büyük köpeklerde görülür (Mantovani ve ark, 2016) bu nedenle sadece %5'i 15 kg'dan küçük köpeklerde görülürken dev köpek ırkları osteosarkoma gelişimi için risk altındadır (Baek ve ark, 2009; Morello ve ark, 2011). Bununla birlikte, küçük cins köpekler nadiren etkilenmiş olsalar bile, bunlarda daha çok aksiyal osteosarkoma gözlenir (Vanel ve ark, 2013).

Kemiklerde meydana gelen lokal tümörlerin büyümesi lizize, şiddetli ağrıya, topallıklara, fonksiyon kaybına neden olur (Mueller ve ark, 2007; Mantovani ve ark, 2016). OSA'lı köpeklerde görülen en yaygın belirti topallıktır. Topallık aniden (örneğin, şiddetli faaliyetlerden sonra) veya daha yavaş gelişebilir. Osteosarkoma kemik içinde derinlerde gelişir, dışa doğru büyüdükçe ve kemik içten dışa doğru yok edildikçe giderek daha acı verici hale gelir (Krajaarnig ve ark, 2012). Kemik ağrısı, bu hastalarda tipik olarak hastalığın ilk belirtisidir. Lokalize periost inflamasyonu nedeniyle alan dokunulduğunda sıcaktır. İlerleyen evrelerde spontan kırılmalar ile sonuçlanan önemli sağlık problemleri meydana gelmektedir (Mueller ve ark, 2007). OSA'da ikincil kırıklar osteoklastların aracılık ettiği tümör kaynaklı osteolizin bir sonucu olarak gelişir (Brodey ve Riser 1969; Tomlin ve ark, 2000; Liptak ve ark, 2004).

Osteosarkoma, yüksek derecede metastatiktir (Spodnick ve ark, 1992; Porrello ve ark, 2006). Genellikle akciğerlere kadar yüksek oranda metastaz gösteren, lokal agresif bir tümördür (Curtis ve ark, 2011; Zhang ve ark, 2015). Bir diğer yaygın metastatik bölge ise diğer kemiklerdir. Vakaların sadece %4,4-9'unda lenf nodlarına yayılır (Hillers ve ark, 2005; Morello ve ark, 2011). Vakalarda iç organlar, beyin, deri altı doku ve cilt gibi diğer lokasyonlara metastaz da meydana gelebilmektedir (Morello ve ark, 2011; Mantovani ve ark, 2016). Köpeklerin sadece %10'unda, metastaz tanı anında tespit edilebilecek kadar büyüktür. Metastaz evcil hayvanlardan kedilerde az sayıda da olsa uzak metastaz gelişirken bunun aksine köpeklerin çoğunun metastaz sonucu öldüğü gözlenmiştir (Brodey ve Riser, 1969; Dimopoulou ve ark, 2008; Hlavaty ve ark, 2017).

Anamnez öyküsünün değerlendirilmesinin ardından ve lezyonun radyografik görünümüne göre klinik tanı konulur. Bu kanser tipinin kesin teşhisi tümörün cerrahi olarak çıkarılması sırasında veya cerrahi amputasyondan önce doku biyopsisi ile konur. Alternatif olarak ince iğne aspirasyonu gerçekleştirilebilir. Fakat bu yöntemde mevcut olan az sayıdaki hücre nedeniyle, bir kemik biyopsisi kadar bilgilendirici olmayabilir. OSA için güncel tanısal "altın standart", osteoid matriks, osteoblastik, fibroblastik, kondroblastik ve telanjektik alt tiplerin oluşmasına dayanarak tümör sınıflandırması ile yapılan histopatolojik incelemedir (Kirpensteijn ve ark, 2002; Loukopoulos ve Robinson, 2007). Kirpensteijn ve

ark (2002) tarafından kullanılan histopatolojik derecelendirme sistemi, olguların %75'ini oluşturan grade III tümörlerin, grade I ve II neoplazmalardan anlamlı olarak daha kötü prognoza sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, bu derecelendirme sistemi, apandiküler olmayan bölgelerdeki tümörler için önemli ölçüde prognostik değildir. Etkilenen bacakların radyografileri tanı için kullanılan ileri düzey tekniklerdir ve radyografilerle uyumlu lezyonları olan tüm köpekler için biyopsi gerekli olmayabilir (Kirpensteijn ve ark, 2002; Liptak ve ark, 2004; Loukopoulos ve Robinson, 2007). Tedavi seçenekleri belirlenmeden önce, hastalığın derecesini anlamak için onkolojik evreleme gereklidir. OSA'lı köpeklerin %95'i pulmoner mikrometastazlara sahip olduğundan hastalığın evrenmesinde akciğer grafilerinin görüntülenmesi gereklidir. Bunun yanında OSA'nın evrelendirilmesinde imkanlara ve isteğe bağlı olarak kemik sintigrafisi veya radyografik kemik taraması da yapılabilir (Biller ve ark, 2016).

Köpek kanserlerinde genellikle palyatif tedavi uygulanmaktadır (Baek ve ark, 2009). Kemoterapi bu kanserin seyrini değiştirmenin tek anlamlı yoludur. Amaç mikrometastazları hedef almak ve lokal nüksü kontrol etmektir. Bu amaçla Aktinomisin D (ActD), doksorubisin (DXR), Nutlin-3 ve etoposid (Eto) da dahil olmak üzere çeşitli kemoterapi ilaçları OSA tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçlar arasında, ActD, DXR ve Eto, DNA üzerine doğrudan etkiler gösterir, transkripsiyonu inhibe eder ve apoptozu uyarır. Bunlar, tekli ve çok ajanlar şeklinde ve değişen dozaj ve tedavi aralığında kullanılmaktadır (Berg ve ark, 1995; Bacon ve ark, 2008; Bender ve ark, 2008).

Köpeklerde uygulanan kanser tedavi seçenekleri arasında primer tümörün cerrahi olarak çıkarılması, etkilenen uzuvun amputasyonu da vardır. Ayrıca ekstremitte koruyucu cerrahi müdahaleyi takiben adjuvan kemoterapinin uygulanması da son zamanlarda tercih edilen tedavi yöntemidir (Bitetto ve ark, 1987; Baek ve ark, 2009; Mauchle ve ark, 2015; Mantovani ve ark, 2016; Hlavaty ve ark, 2017). Ameliyat sonrası osteosarkomanın prognozu zayıftır, ek olarak, pahalı kemoterapötikler uzak metastazların büyümesini kontrol ederek hayatta kalma oranlarını esas olarak uzatmaktadır. Bununla birlikte, kullanımları ciddi toksisite nedeniyle sınırlıdır. Bu nedenle, nihai amaç, uygun ve minimal toksisiteye sahip olan etkili kemoterapötiklerin keşfedilmesidir.

Son yıllarda OSA teşhisinde ve tedavisindeki gelişmelere rağmen OSA'lı köpeklerin prognozu ve sağkalım oranlarında değişme sağlanamamıştır (Mauchle ve ark, 2015). Osteosarkomalı köpeklerin %45'inin tanı ve tedaviyi takiben 1 yıl sağkalım oranına, %54'ünde ise metastaz geliştiği için ortalama 243 günlük hayatta kalma süresine sahip olduğu bildirilmiştir. Tanı anında metastaz bulguları olan köpeklerin ortalama sağkalım

süreleri ise 76 gündür (Simpson ve ark, 2017). OSA'lı köpeklerin ancak %20'sinden daha azı 2 yıldan daha fazla yaşabilmektedir (Wilson ve ark, 2008). Hastaların hala %20'sinden fazlası tümör metastazı ve rezeke edilemeyen tümör nedeniyle ölmektedir (Ryu ve ark, 2010; Zhang ve ark, 2015). Yaşam sürelerinde köpeklerin ağırlıkları ve tümörün yerleşimi de önemli bir faktördür. Düşük vücut ağırlığına sahip köpekler daha uzun ve proksimal humeral tümörleri olan köpekler ise daha kısa yaşam sürelerine sahiptir (Simpson ve ark, 2017).

Hem klinik hem de moleküler kanıtlar, insan ve köpek OSA'nın, erken metastaz, kemoterapi direnci, bazı proteinlerin (örn., Ezrin, Met, PTEN) değiştirilmiş ekspresyonu ve p53 mutasyonu gibi bazı temel özelliklerinin ortak olduğunu göstermektedir. Bu benzerlikler göz önüne alındığında, köpek OSA, bu hastalık için yeni terapötik hedeflerin potansiyel klinik yararını değerlendirmek için uygun bir model görevi yapar (Poradowski ve ark, 2016).

Köpeklerin büyüklüğü, yetiştirilme tarzları ve bağışıklıkları yeterlilik model potansiyellerini artırır. Dahası, spontan tümörleri olan köpekler doğal olarak terapi direnci ve metastaz geliştirirler. Buna ek olarak, kendiliğinden ortaya çıkan köpek kanserlerindeki tümör yükleri, hipoksi ve klonal varyasyon gibi biyolojik faktörler açısından, fare modellerinde deneysel olarak indüklenen tümörlere kıyasla insanlara daha fazla benzemektedir. Köpek tümörlerinin boyutu da seri görüntüleme ve zamanla doku toplanmasına izin verir (Schmidt ve ark, 2016).

## **2.15. Bisfosfonatlar**

### **2.15.1. Bisfosfonatların Tarihçesi**

Bisfosfonatlar (BP), eczacı Theodor Salzer tarafından 1894'te keşfedilmiş ve sadece tekstil ve petrol endüstrilerinde korozyon inhibitörleri, kompleks oluşturucu maddeler ve deterjan endüstrisinde demineralize edici ajanlar olarak kullanılmıştır (Fan ve ark, 2007; Ebetino ve ark, 2011).

Fleisch ve arkadaşları 1960'larda birkaç fizyolojik süreçte (örneğin Aminoasil-tRNA sentezi gibi) bir yan ürün olan inorganik pirofosfatın, hidroksiapatite bağlanıp çözünmesini inhibe ederek kireçlenmeyi önleyebildiğini bulmuşlardır. Aynı zaman aralığında Francis ve arkadaşları Procter & Gamble'da bisfosfonatların özelliklerini Fleisch ile birlikte araştırmaya başlamış ve myositis ossifikans tanısı konulan bir çocuğun tedavisinde bisfosfonat olan etidronatı kullandıklarını bildirmişlerdir (Bassett ve ark, 1969; Francis ve

Valent, 2007). Bu gelişmenin ardından 1970 ve 1980'lerde anormal kalsiyum metabolizması ile karakterize edilen hastalıkların tedavisi için etidronat, klodronat ve pamidronat kullanılmaya başlanmıştır. İzleyen yıllarda neridronat, risedronat, zoledronat, minodronat, alendronat ve ibandronat gibi bisfosfonatlar geliştirilip, klinik potansiyelleri araştırılmaya devam edilmiştir (Ebetino ve ark, 2011).

Bisfosfonatların osteoklastlar üzerindeki etkisi moleküler düzeyde 1989 yılında yapılan çalışmalar ile ortaya çıkmıştır (Rogers ve ark, 2011). Bu gelişmenin ardından, hidroksiapatite yüksek affiniteye sahip olması nedeni ile kemik erimesini (Ebetino ve ark, 2011), ve kalsiyum metabolizması bozukluklarını tedavi etmek amacıyla da kullanılmaya başlanılmışlardır (Graham ve Russell, 2011). Ayrıca kemik hastalıklarının tedavisinde, kolloidler ve ilaçlar için hedefleyici ajan olarak ve kemik matriksine adsorbe olma kabiliyetlerine dayanarak teşhis amaçlı kemik taramasında da bisfosfonatlardan yararlanılmaktadır (Fleisch, 2002; Fan ve ark, 2007; Petroianu, 2011; Giger ve ark, 2013).

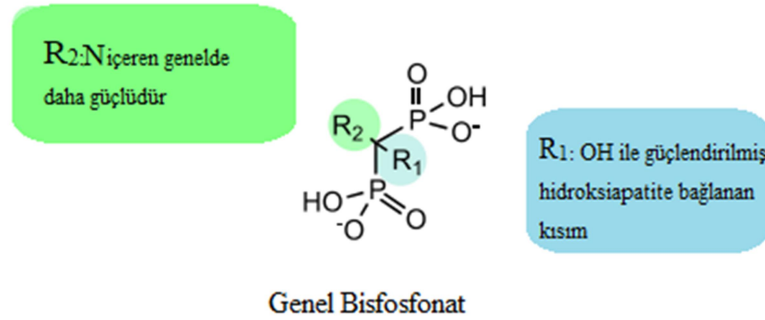
Bisfosfonatların kansere özgü sağkalım üzerine etkileri kanıtlanmasa da, kemiğe metastaz yapmış ileri evre kanser hastalarının yaşam kalitesi üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Kemiğe metastaz yapan insan kanser tedavisinde ABD'de onaylanan pamidronat (Aredia®) kullanırken, 2002 yılında FDA tarafından zoledronik asidin (Zometa®) kullanımını onaylanmıştır (Berenson ve ark, 2002). Bisfosfonatlar uzun yıllar çeşitli tedavilerde kullanılmalarına rağmen son yıllarda moleküler mekanizmaları hakkında bilgilerin ancak netleştiği söylenebilir (Rogers ve ark, 2011).

### 2.15.2. Bisfosfonatların Yapısı

Bisfosfonatlar stabil inorganik pirofosfonat analoglarıdır (Giger ve ark, 2013). BP'ler, tek bir karbon yoluyla bağlanmış iki P-C bağına ve P-C-P çekirdek yapısına sahiptir (Graham ve Russell, 2011). Endojen kemik mineralizasyonunda rol oynayan pirofosfonatlarda iki fosfatı bağlayan ajan oksijen atomu iken BP'de karbon atomudur. Kimyasal yapılarındaki bu farktan dolayı asidik ortamda pirofosfonatlara göre BP'ler daha dirençli yapıya sahiptir (Giger ve ark, 2013). P-C-P yapısındaki oksijen atomları kalsiyum iyonlarını şelatlama yetenekleri sayesinde, hızlı bir şekilde kemik mineralini hedef alırlar (Rogers ve ark, 2011).

Bisfosfonatların yapısı Şekil 13'de gösterildiği gibi, iki grup ( $R_1$  ve  $R_2$ ) halinde, bisfosfonatların merkezi karbon atomuna bağlanır. BP'lerin hidroksiapatite olan afinitesi, etidronat ve alendronatta olduğu gibi  $R_1$ 'in bir hidroksil grubu (-OH) içermesi ile

arttırılabilir. R<sub>1</sub>'in kemik rezorpsiyon mekanizmasında etkisi çok az iken, asıl rol oynayan birimi içeren R<sub>2</sub>'dir (Giger ve ark, 2013).



**Şekil 13.** Bisfosfonatların yapısı (Giger ve ark, 2013).

Tüm BP'ler aynı fosfor-karbon-fosfor çekirdeğini paylaşmasına rağmen, farklı bifosfonatların hidroksiapatit bağlanma affinitelerinde belirgin farklılıklar olduğu ve bunun etki sürelerinin belirlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Idris ve ark, 2008). BP'lerin R<sub>1</sub> ve R<sub>2</sub> gruplarının farklı olması farmakokinetik ve farmakolojik davranışlarını etkiler. Hedef enzimleri de hidroksiapatit yapılarına bağlanma ve asidik ortamda hidroksiapatitden ayrılma açısından önemli ölçüde farklılık gösterir (Ebert ve ark, 2009).

Bisfosfonatların osteoklastlar ve diğer hücreler tarafından hücreye alınımının fagositoz ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Spesifik pompalar ve kanallar tarafından hücreye alımı hakkında araştırmalar yapılmış ancak kanıtlanamamıştır. Fagositoz ile BP alımı yapmayan hücrelerde ise hücre içine girişinin pinositoz yoluyla da gerçekleştiği tahmin edilmektedir (Ebert ve ark, 2009).

Bisfosfonatlar, moleküler mekanizmalarına dayanarak R<sub>2</sub> grubuna göre azot içeren ve içermeyenler olarak iki ayrı farmakolojik sınıfa ayrılabilir. Klodronat ve etidronat gibi nitrojen içermeyen BP'ler, aynı zamanda birinci jenerasyon BP olarak adlandırılmaktadır. Bunlar osteoklast aktivitesini inhibe eden ATP'nin hidrolize olmayan sitotoksik analoglarına intraselüler olarak metabolize edilir (Evdokiou ve ark, 2003; Heyman ve ark, 2005; Ryu ve ark, 2010). Alendronat, risedronat, pamidronat ve zoledronat gibi nitrojen içeren BP'ler (N-BP), ikinci ve üçüncü jenerasyon BP'ler olarak da adlandırılmaktadır (Evdokiou ve ark, 2003; Ryu ve ark, 2010). N-BP'ler kolesterol ve izoprenoid lipitlerin, özellikle farnesil ve geranil-pirofosfatların üretiminden sorumlu bir biyosentetik yol olan mevalonat yoluna etki ederler (Evdokiou ve ark, 2003). Başlıca hedefleri mevalonat

yolunun bir parçası olan farnesil ve geranilgeranil difosfat sentaz enzimleridir (Goldsby ve ark, 2013). Bu enzimlerin inhibisyonu kemik resorpsiyonunu engeller (Heyman ve ark, 2005). Mevalonat biyosentetik yolunun bozulmasıyla antineoplastik özellikler göstererek (Goldsby ve ark, 2013), osteoklastlarda apoptozu indüklerler (Evdokiu ve ark, 2003). BP'ler, preosteoklastların alınmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını inhibe ederek veya matür osteoklastların resorptif aktivitesini engelleyerek etki gösterirler (Heyman ve ark, 2005). Günümüzde azot içermeyen bisfosfonatların yerini kimyasal yapılarından dolayı daha güçlü yapıya sahip azot içeren bisfosfonatlar almıştır (Epstein, 2006).

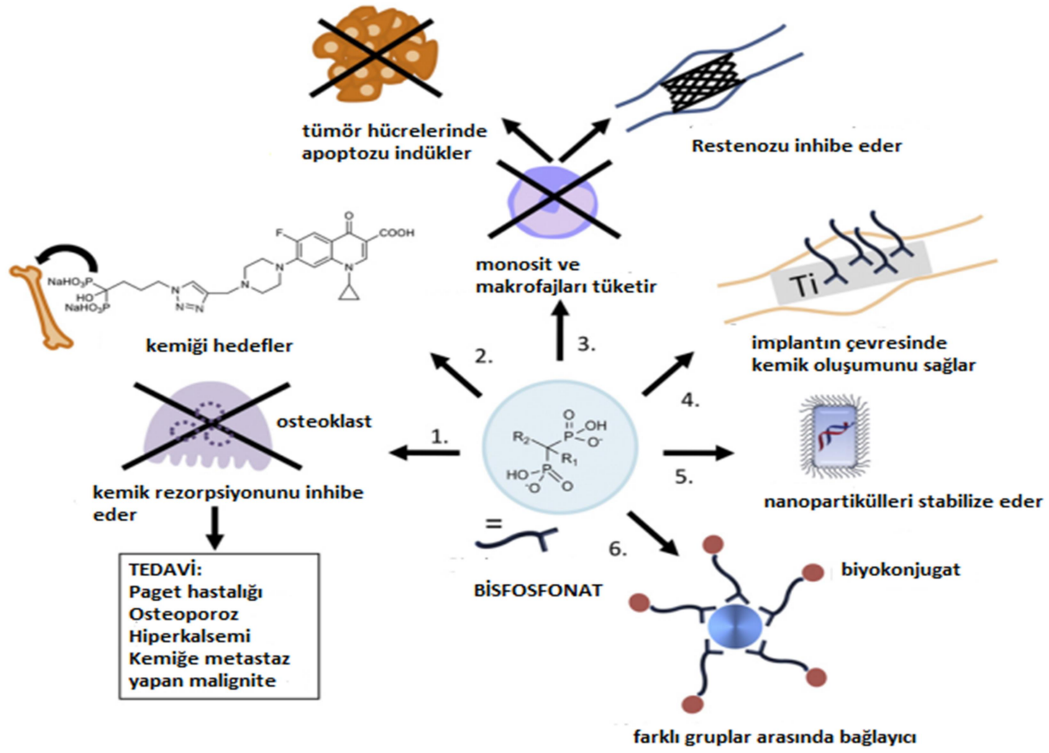
Azot içeren bisfosfonatlar osteoklastların öncüsü olan makrofajların sayısını azaltır. Ayrıca osteoblastlar tarafından osteoprotegerin üretimini artırarak monositlerin/makrofajların osteoklastlara farklılaşmasını engellediğine dair kanıtlar vardır. Osteoprotegerin, osteoklastogenezisin önemli bir aracısı olan RANKL'a bağlanır ve osteoklastlar üzerine olan etkisini baskılar (Hirbe ve ark, 2009). N-BP'ler, osteosarkoma ve tümörle ilişkili endotel hücreleri üzerinde pleiotropik inhibe edici etkilere sahiptir (Conry ve ark, 2016).

### **2.15.3. Bisfosfonatların Metabolik Etkileri**

Bisfosfonatların oral yoldan kullanımında gastrointestinal sistemde emilimi oldukça düşüktür (%1) ve biyoyararlanımı beraberinde alınan yiyecek ve içeceklerin etkileri ile de düşebilmektedir. Emilen miktarın büyük bir kısmı kemikler tarafından tutulurken diğer bir kısmı ise böbrekler tarafından atılır. Dolaşımdaki yarılanma ömrü 30-120 dk gibi kısa bir süre olmasına karşın kemiklerde bu süre oldukça uzundur (Reszka ve Rodan, 2003; Tıraş ve Taşkiran, 2005; Owens ve ark, 2007).

Bisfosfonatlar osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunun en güçlü inhibitör sınıfıdır ve kemik metabolizması düzenleyicileri olarak rol oynarlar. Kemik döngüsünün arttığı bölgelerde mineral yüzeylere absorbe edilerek, osteoklast aktivitesini inhibe ederler ve böylece kemik resorpsiyonunun azalmasına neden olurlar (Evdokiu ve ark, 2003; Basso ve ark, 2013). Bu nedenle farklı kemik hastalıklarının (Paget hastalığı, postmenopozal osteoporoz ve tümör kaynaklı osteoliz gibi) tedavisinde diğer ilaçlar için kemik hedefleyici ajan olarak ve makrofajları tüketen nanopartiküllerin formülasyonunda (kaplamak ve stabilize etmek için) kullanılır (Evdokiu ve ark, 2003; Fu ve ark, 2011; Basso ve ark, 2013; Giger ve ark, 2013). Bisfosfonatlar kemik yüzeyini kapladığından implantların etrafındaki

kemik oluşumunu destekler. Ayrıca restenozun inhibisyonu üzerinde etkili olup, tümör hücrelerinde apoptozu indükler (Giger ve ark, 2013) (Şekil 14).



Şekil 14. Bisfosfonatların biyomedikal alanında uygulamaları (Giger ve ark, 2013).

Ayrıca, monositlerin osteoklastlara dönüşümünü, osteoklastların kemiğe yönelimini, kemik iliği hücrelerinden kemik rezorpsiyonuna neden olan sitokin üretimini önlerler (Berenson, 2001). BP'ler osteoblastlar üzerindeki dolaylı etkileriyle de rol oynayabilirler (Evdokiou ve ark, 2003; Basso ve ark, 2013). BP'lerin in vivo kemik oluşumunun biyokimyasal belirteçlerini inhibe ettiği bilinmektedir, ancak bunun osteoklastların fonksiyonlarının inhibisyonu veya osteoblast hücreleri üzerinde doğrudan inhibitör etkisinin bir sonucu olduğu açık değildir (Idris ve ark, 2008).

Bisfosfonatların tümörün indüklediği osteolizin neden olduğu kemik ağrıları ve maligniteye bağlı hiperkalsemi tedavisinde kullanımı araştırılmıştır. Bunun yanında fibröz displazi, osteogenezis imperfekta, osteoartrit ve romatoid artrit tedavisi için bisfosfonat kullanımı üzerine çalışmalar da yapılmaktadır (von Knoch ve ark, 2005). BP'lerin ayrıca in vitro mineralize kemik nodül oluşumunu uyardığı ve mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını teşvik ettiği bildirilmiştir (Idris ve ark, 2008).

Osteolitik metastazlarda tümör hücreleri tarafından osteolitik mediyatörlerin salınımı, kemik degredasyonu, degrede kemikten büyüme faktörlerinin salınımı, tümör hücrelerinin



gelişimi, osteolitik mediyatörlerin daha fazla salımını içeren kısır döngüden bahsedilir. Kemik rezorpsiyonu inhibitörleri, bu nedenle iskelet metastazlarını yönetmek için daha umut verici araçlardan biri olarak ortaya çıkmaktadır. Bu kısır döngünün primer kemik tümörleri durumunda da geçerli olabileceği ve BP'ler gibi kemik rezorpsiyon inhibitörlerinin bir iskelet bölgesinde primer tümör gelişimini engelleyebileceği tahmin edilmektedir (Heymann ve ark, 2005). Çünkü yüksek BP konsantrasyonları yumuşak doku tümörlerine göre bu kemik tümörlerinin çevresine daha kolay ulaşılabilirdiğinden, osteojenik sarkomlar için BP tedavisi uygulanabilir (Conry ve ark, 2016).

Bisfosfonatlar ile yapılan *in vitro* çalışmalar insanlarda miyelom (Shipman ve ark, 1998; Tassone ve ark, 2000), meme (Fromigue ve ark, 2000; Senaratne ve ark, 2000) ve prostat kanseri (Lee ve ark, 2001) hücrelerinde apoptozun indüklenmesinde proapoptotik etkilere sahip olduğunu bildirilmiştir. BP'lerin hem klinik öncesi hem de klinik çalışmalarda malign kemik hastalıklarında terapötik etkinliklerine katkıda bulunabilecek doğrudan antitümör özelliklere sahip olduğunu öne süren kanıtlar mevcuttur (Fu ve ark, 2011; Botter ve ark, 2014; Cheng ve ark, 2016).

## 2.16. Zoledronik Asit

Zoledronik asit (ZA,  $C_5H_{10}N_2O_7P_2$ ), üçüncü nesil azot içeren endojen pirofosfat analogu bir aminobisfosfonattır (Conry ve ark, 2016). Kimyasal adı [1-Hidroksi-2(1 H-imidazol-1-il) etiliden] bis [fosfonik asit]'tir. İmidazol halka içeren yan zincire sahiptir. Diğer bisfosfonatlar gibi osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunun güçlü bir inhibitörüdür (Michele ve ark, 2010; Basso ve ark, 2013).

Halka yapısında ikinci bir azot atomu bulunduğu için diğer bisfosfonatlardan farklıdır ve klodronat, pamidronat, risedronat, alendronik asit ve etidronat gibi diğer bisfosfonatlardan yaklaşık 100-1000 kat daha etkilidir (Kubista ve ark, 2006; Horie ve ark, 2007; Zhao ve Hu, 2015). ZA'nın plazma yarı ömrü 24 saatten az olmasına rağmen, bisfosfonatlar kemikte daha stabil olduğundan iskelet yarı ömrü 300 günden fazladır (Conry ve ark, 2016).

Zoledronik asit, kalsiyum içeren hidroksiapatit kemik mineraline güçlü bir şekilde bağlanır (Conry ve ark, 2016) ve kemik rezorpsiyonunu inhibe eder. Böylece kemik kaybını ve kemik dönüşümünü etkili bir şekilde azaltır (Rogers ve ark, 2000; Ebert ve ark, 2009). Osteoporoz, Paget hastalığı, maligniteye bağlı hiperkalsemi, multipl miyelom ve meme

kanserinin kemik metastazı gibi kansere bağı osteolitik lezyonların tedavisinde antirezorptif özelliğinden yararlanır (Ebert ve ark, 2009; Patntirapong ve ark, 2012). Osteoporoz tedavisi için yılda bir kez verilen Zoledronik asit (Reclast®), Ağustos 2007'de FDA tarafından onaylanmıştır. İntravenöz olarak uygulanan ZA'nın dolaşımında  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bulunduğu bunun sonucunda minerallerin eklenmesi ile kemik kitlesinde artışa yol açtığı ve vertebral kırık riskini %70'e kadar azalttığı bildirilmiştir (Ebert ve ark, 2009).

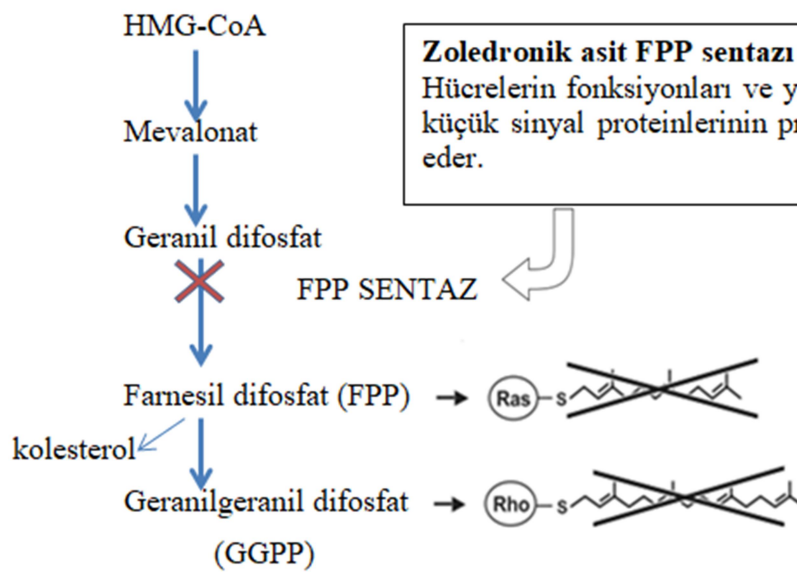
Son yıllarda ZA osteoklastlar üzerinde inhibe edici etkisinden dolayı kemik metastazlarının engellenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Michele ve ark, 2010; Conry ve ark, 2016). Aşırı veya düzensiz osteoklastik aktivite, malign osteolizin ve buna bağı ağrının oluşumunda merkezi bir öneme sahiptir (Fan ve ark, 2007). ZA'nın kemiğe metastaz yapan prostat kanseri, mesane kanseri, hepatosellüler kanser, meme kanseri ve akciğer kanserli birçok yetişkin hastada tümör ile ilişkili ağrı ve iskelete bağı olayları azalttığı bildirilirken ZA ile tedavinin ardından kemik mineral yoğunluğunun arttığı ve kemik ile ilgili semptomların azaldığı görülmüştür (Goldsby ve ark, 2013).

Kemik metastazlı prostat kanserli hastalarda iskelet morbiditesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gösteren tek bisfosfonattır (Heymann ve ark, 2005; Steinman ve ark, 2012). Kemiğe metastaz yapan kanserlerde tümörün kemiğe yapışmasını önler ve gelişimini sınırlandırır (van der Pluijm ve ark, 1996). Yapılan klinik çalışmalar kemik metastazları veya multipl miyeloma hastalarında ZA'nın test edilen tüm dozlarının güvenle uygulanabileceğini ve metabolizma tarafından yan etkilerinin iyi tolere edilebildiğini göstermiştir (Evdokiou ve ark, 2003). Sistemik tedavi ile birlikte ZA'nın uygulandığı çalışmaların olumlu sonuçları Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (United States Food and Drug Administration) tarafından solid tümör ve kemik metastazı olan yetişkin hastalarda kullanılmak üzere onaylamasına neden olmuştur (Goldsby ve ark, 2013).

Zoledronik asidin primer tümör büyümesini inhibe ettiği, akciğer metastazlarını azalttığı ve osteosarkoma hayvan modellerinde hayatta kalma süresini artırdığı bildirilmektedir (Goldsby ve ark, 2013; Conry ve ark, 2016). Yapılan prelinik çalışmalarda antimetastatik potansiyeli dışında, ZA'nın doğrudan veya dolaylı olarak antitümör aktivitesine sahip olduğunu, proliferasyonu önlediğini ve tümör hücre hatlarında apoptozu indükleyebildiğini göstermektedir (Kubista ve ark, 2006; Rack ve ark, 2010; Conry ve ark, 2016). ZA'nın osteosarkoma dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde doğrudan intraselüler sinyal molekülleri ile etkileşerek antitümör aktivitesini gösterdiği ve S ve G2/M fazları arasındaki hücre döngüsünü durdurduğu bildirilmiştir (Green, 2005; Ory ve ark, 2008; Zekri

ve ark, 2014). Ayrıca apoptoz indükleyici gaktör ve endonükleaz-G'nin translokasyonu ile karakterize kaspaz aktivasyonundan bağımsız apoptozu indüklemektedir (Ory ve ark, 2008).

Zoledronik asit, farnesil ve geranilgeranil difosfat sentazın aktif merkezine bağlanarak, enzimleri inhibe eder ve farnesil difosfat ve geranilgeranil difosfat oluşumunu baskılar. Her iki enzimde kolesterolün biyosentezinin gerçekleştiği mevalonat yolağının kilit enzimleridir (Steinman ve ark, 2012). Farnesil difosfat (FPP) ve geranilgeranil difosfat (GGPP) oluşumunun baskılanması izoprenoid lipidlerin tükenmesine neden olur (Wellington ve Goa, 2003; Cheng ve ark, 2016; Conry ve ark, 2016) (Şekil 15).

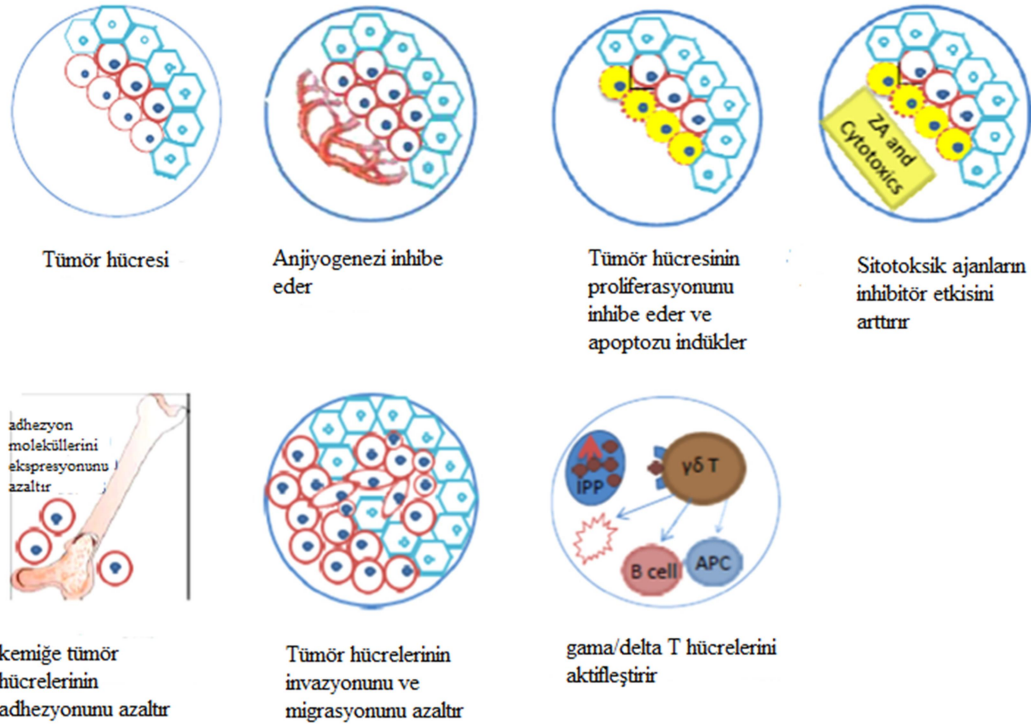


**Şekil 15.** Zoledronik asit, farnesil difosfat (FPP) sentaz enzimini inhibe eder ve küçük GTPazlar Ras ve Rho'nun prenilasyonunu engeller (HMGCoA = 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim-A) (Clézardin, 2005).

Hücre canlılığı için gerekli metabolik yollarda rol oynayan küçük GTPazlar, hücrelerin sabitlenmesi, hücre iskelet düzenneği, intraselüler sinyal ve apoptoz gibi çeşitli hücre süreçlerini düzenleyen önemli sinyal proteinleridir (Evdokiou ve ark, 2003; Zhao ve Hu, 2015). Farnesil ve geranilgeranil difosfat sentaz enzimlerinin inhibisyonu Ras, Rho, Rac ve Rab gibi GTP bağlayıcı hedef proteinlerin prenilasyonunu bozar, prenilasyon olmamış proteinlerin birikimine yol açarak bu proteinlerin hücre içi dağılımını etkiler böylece sinyal yollarının kesilmesine neden olurlar (Heyman ve ark, 2005; Roelofs ve ark, 2006). Sonuç olarak, GTPazların fonksiyonu ile ilişkili aktin hücre iskeletinin bozulmasına yol açar.

Hücre içi komponentlerin dağılımında değişkenlik olur ve osteoklastlarda integrin sinyallerinde zayıflama meydana gelir (Hirbe ve ark, 2009).

Zoledronik asit kemik hücreleri üzerindeki etkileri dışında ayrıca hücre göçü modülasyonu, anjiyogenez ve bağışıklık sistemi üzerinde etkilere sahiptir (Steinman ve ark, 2012). Tümör hücrelerine yönelik immün yanıtların oluşumunda düşük molekül ağırlıklı fosfat kalıntısı içeren peptid olmayan bileşiklere yapısal benzerliğinden dolayı gama/delta T hücreleri tarafından tanınmaktadır. *In vitro* olarak tümör hücre ölümünün neden olduğu proinflamatuvar sitokinlerin yüksek seviyede salgılanmasının gama/delta T hücreleri tarafından sitümlü edilmesini sağlar. Bağışıklık sistemini modüle ederek de dolaylı anti-tümör etkisi gösterir (Labrinidis ve ark, 2010; Zhao ve Hu, 2015).



**Şekil 16.** ZA'nın olası antitümör etkileri (Zekri ve ark, 2014).

Zoledronik asit, tümör hücrelerinin, kemoterapinin sitotoksik etkilerine daha duyarlı hale gelmesini sağlayan hücrelerin adhezyonunu engellemektedir (Clézardin ve ark, 2005; Gnant ve ark, 2009; Cheng ve ark, 2016). Buna ek olarak ZA'nın ekstraselüler matrikse tümör hücrelerinin invazyonunu ve migrasyonunu engellediği belirlenmiştir (Green, 2004; Rack ve ark, 2010) (Şekil 16).

Anjiyogenez, solid tümörlerin büyümesinin ilerlemesi ve metastazı için önkoşuldur (Folkman, 1971). Anjiyogenez, tümörün çeşitli bölgelere metastaz yapmasını sağlar. ZA mineralize olmayan dokuda meydana gelen anjiyogenezi inhibe etmektedir (Zekri ve ark, 2014). Vasküler endotel büyüme faktörü-A (VEGF-A) ve vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1), agresif osteosarkoma hücreleri tarafından yüksek oranda ifade edilir. Dolayısıyla plazma VEGF-A seviyeleri osteosarkoma hastalarında yükselir ve ZA bu hastalarda dolaşımdaki VEGF-A seviyelerini azaltır. ZA, tümörle ilişkili anjiyogenezi, sadece endotel hücrelerinin doğrudan inhibisyonu ile değil, aynı zamanda osteosarkomada VEGF-A ekspresyonunu azaltarak da inhibe eder. Ayrıca, kanıtlar ZA'nın agresif osteosarkoma hücrelerinde kısmen VEGF-A ve VEGFR sinyalleme sinin otokrin yoluyla stimülasyonunu inhibe ederek apoptozu indüklediğini göstermektedir (Conry ve ark, 2016). Zoledronik asit ayrıca dolaşımdaki VEGF, bFGF seviyelerinde geçici bir düşüş sağlayarak, antianjiyogenik aktivite ve tümör hücrelerinin kemiğe invazyonunu inhibe etmektedir (Ferretti ve ark, 2005).

Zoledronik asidin hücelere uygulaması ile mitokondriyal ADP/ATP transkolazını inhibe eden ve osteoklastlarda apoptoza neden olan yeni bir endojen ATP analogu (trifosforik asit 1-adenosin-50-il ester 3-(3-metilbut-3-enil) ester) "APPPI" ürettiği bildirilmiştir (Ebert ve ark, 2009).

Zoledronik asidin etkilerinin şelatlama mekanizmasına bağlı olup olmadığına dair hipotezler ortaya atılmış bununla ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunun için iki değerli katyonların ZA'nın etkisini engelleyebileceği düşünülmüş ve yapılan çalışmalar sonucunda ZA'nın antiproliferatif etkisinin iki değerlikli katyonların eklenmesiyle güçlendirildiği bildirilmiştir (Reinholz ve ark, 2000). Bu bulgular, ZA'nın şelatlama etkileriyle bağımsız olarak osteosarkoma hücrelerinin büyümesini seçici olarak inhibe ettiğini göstermektedir (Horie ve ark, 2007).

Osteolizis ve tümör gelişimi kısır döngüsünde kemik matriksinden serbest kalan tümörün gelişimini destekleyen büyüme faktörlerini engeller (Hirbe ve ark, 2009). ZA osteoblast olgunlaşmasını ve osteolizin bir inhibitörü olan ligand antagonisti osteoprotegerin üretimini de desteklemektedir. Ayrıca, kemikte veya diğer bölgelerde tümör büyümesini indükleyebilecek stromal IL-6 salgılanmasını ve matriks metalloproteinaz-1 üretimini inhibe etmektedir (Steinman ve ark, 2012). ZA'nın matriks metalloproteinazları inhibe ettiği çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (Green, 2004; Rack ve ark, 2010).

Mezenkimal kök hücreler (MSC) ve osteoblast öncü hücreleri de bisfosfonatların hedefleridir. ZA'nın osteoblast gelişimi üzerindeki inhibe edici etkisiyle osteogenezi inhibe

etmesi ve böylece kemik oluşumunu baskılaması mümkün olduğu düşünülmektedir ancak bu etkilerin klinik önemi tartışmalıdır (Ebert ve ark, 2009; Patntirapong ve ark, 2012).

Zoledronik asidin hem neoadjuvan hemde kemoterapi sonrası uygulamalarında uzak veya yakın metastaz yapan agresif tümör hücrelerinin sağkalım sürelerini etkilediğini gösteren kanıtlar da mevcuttur. Buda mikrometastazlardan tümör hücrelerinin yayılım riskinin azalmasına neden olur (Bidard ve ark, 2008; Aft ve ark, 2010; Rack ve ark, 2010).

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Hücre Hattı

Araştırmada Tübitak tarafından desteklenen 1160388 nolu proje kapsamında Amerikan Hayvan Hücre Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection, ATCC, USA, Manassas, VA) satın alınan CCL-183 kodlu D-17 köpek osteosarkoma hücre hattı kullanıldı. Bu hücre hattı, 11 yaşlı dişi köpekte akciğere metastaz yapan osteosarkomadan türetilmiştir.

#### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizlerde Zoledronik asit (Novartis), minimum essential medium eagle (Sigma, M4655), dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma D8418), fosfat tamponu tableti (PBS) (Invitrogen, 003002), fetal sıgır serum (FBS) (Sigma F0804), penisilin/streptomisin 10.000 U/ml (Gibco 15140122), %0,25 tripsin-etilendiamintetraasetik asit (Trypsin-EDTA) (Sigma T4049), tripan mavisi (Sigma T8154), non-esansiyel aminoasit (Sigma M7145), sodyum pirüvat (Sigma P5280), glasiyel asetik asit (Merck, K41429056), agaroz (Sigma, A5093), Tris baz (Sigma, T1503), etilendiamintetraasetik asit (EDTA, Merck, K43782018), absolut etanol (Sigma, 32221), borik asit (Bioshop10043-35-3), benzalkonyum klorit (Sigma, 234427), DNA Ladder 100bp (Invitrogen, 15628-019), 6xjel yükleme tamponu (Intron Biotechnology, 21161), nükleik asit jel boyası (Biotium, Amerika), RNase-ZAP (Ambion, AM9782), Ultra saf DNaz/RNaz içermeyen distile su, izopropil alkol ve diğer bütün kimyasallar analitik saflıkta kullanıldı.

#### 3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Sarf malzeme olarak 25 ve 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kapları (Orange Specific), 6, 12, 24 ve 96 kuyucuklu plakalar (Orange Specific), cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml, Isolab), 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ml'lik reaktif şişeleri (Isolab), 15 ve 50 ml'lik steril santrifüj tüpleri (Orange Specific), steril tek kullanımlık filtreler (0,22 µm) (chromofil), Neubauer lamı (Marienfeld), 10, 100 ve 1000 µl'lik pipet takımı ve 0-10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl pipet uçları (Vertex), lamel 15x15, hücre dondurma tüpleri (Orange Specific), 5, 10, 25 ml'lik

steril pipet (cell star), 5 ml ve 10 ml'lik enjektörler, 1.5 ve 2 ml'lik DNaz/RNaz içermeyen ependorf tüpler(İsolab) , 0,1 ve 0,2 ml'lik PCR tüpleri (Applied biosystems) kullanıldı.

### **3.1.4. Kullanılan Cihazlar**

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı laboratuvarlarında bulunan steril laminar hava akımlı çalışma kabini (Nükleon), karbondioksit inkübatörü (Nüve), ELİSA okuyucu (İvymen), ışık mikroskop (Olympus), inverted mikroskop (Euromax), su banyosu (Nüve), PCR kabini, otoklav (Hırayama), mikrodalga fırın (Altes), elektroforez tankları (Biorad) ve güç kaynağı (Biorad), lightcycler nano Real Time PCR cihazı(Roche), analitik terazi (Denver Instrument), distile su cihazı (Nüve), mikrolaka okuyucu (Thermo scientific multiscan go microdrop), etüv (Memmert), pH metre (Hanna Instrument), soğutmalı santrifüj (Nüve), mini santrifüj (VWR mini star silverline), manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica), su banyosu (Nüve), laboratuvar tipi derin dondurucu (-80°C) (Nuair), buzdolabı (+4°C) (Indesit), derin dondurucu (-20°C) (Beko), sıvı azot tankı, otomatik pipetler (ependorf), karıştırıcı (Velp Scientifica), şarj edilebilir pipetleme cihazı (Capp), görüntüleme sistemi (UVP EC3 Imaging System Chemi HR 410) ve çeşitli cam malzemeler kullanıldı.

### **3.1.5. Kullanılan Kitler**

WST-1 hücre canlılık analiz kiti (2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu) (Roche-11644807001), Apoptotik DNA-Ladder Kit (Roche-11835246001), total RNA izolasyon kiti (Riboex Geneall), köpek spesifik kaspaz 3 ELİSA kiti (Finetest), köpek spesifik kaspaz 8 ELİSA kiti (Finetest), köpek spesifik kaspaz 9 ELİSA kiti (Finetest), cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthese kit, Roche), Sybr Green PCR master mix kiti (Fast Start Essential DNA Green Master kit, Roche).

### **3.1.6. Primerler**

Gen ekspresyon düzeylerini belirlemek için qRT-PCR analizinde, hedef gen bölgesi olan Bcl-2, Bax, survivin, Bid ve referans gen bölgesi olan köpek gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaza (dogGAPDH) spesifik primerler kullanıldı. Gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) köpeklere ait Bcl-2, Bax, survivin, Bid ve gliseraldehit 3-



fosfat dehidrogenaz (dogGAPDH) genine ait mRNA verileri ışığında baz dizilimleri değerlendirmeye alındı ve oluşturulan primerlerin ilgili bölgeye spesifiklikleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) kontrol edilerek, ampliconların uzunluğu belirlendi.

**Tablo 2.** qRT-PCR için kullanılan primer dizileri.

NCBI Referans Sekans (RefSeq numarası)	Gen Bölgesi	Forward Primer (5'→3')	Revers Primer (5'→3')	Amplikon uzunluğu
NM_001003142.2	Canis lupus familiaris glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Mrna	AGTCAAGGCTGAGAACGGGAAA	TCCACAACATACTCAGCACCAGC	114 bp
NM_001251938.1	Canis lupus familiaris BH3 interacting domain death agonist (BID), mRNA	AATTTGCTAGTGTGGCTTCCTC	ATCGTCGTAGTCCTCCTTCAG	117 bp
NM_001003011.1	Canis lupus familiaris BCL2 associated X, apoptosis regulator (BAX), mRNA	TTCCGAGTGGCAGCTGAGATGTTT	TGCTGGCAAAGTAGAAGAGGGCAA	79 bp
NM_001003348.1	Canis lupus familiaris baculoviral IAP repeat containing 5 (BIRC5), mRNA	CCCAGTGTTTCTTCTGCTTCAA	AGAAAGGAAAGCACACCAGATG	101 bp
NM_001002949.1	Canis lupus familiaris BCL2, apoptosis regulator (BCL2), mRNA	CATGCCAAGAGGGAAACACCAGAA	GTGCTTTGCATTCTTGGATGAGGG	76 bp

### 3.1.7. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

D-17 köpek Osteosarkoma hücrelerinin üretimi aşamasında, hücre tipine özel besiyerleri kullanıldı. Besiyeri için kullanılan tüm malzemeler, steril bir şişede ve por büyüklüğü 0,22 µm olan filtreden geçirilerek hazırlandı.

a) MEM (Minimum Essential Medium Eagle) (Sigma M4655) sıvı besiyeri: Son kullanma tarihine kadar +4°C’de saklandı.

b) Fetal sığır serumu (FBS) (Sigma F0804): 500 ml’lik şişelerde ve ısıyla inaktive edilmemiş halde temin edildi. FBS’nin ısı ile inaktivasyonu 56°C’de 30 dakika boyunca 10’ar dakikalık periyotlar ile çalkalanarak inkübatörde gerçekleştirildi. Isı ile inaktive edilen FBS 50 ml’lik falkon tüplere bölünerek, son kullanma tarihine kadar -20°C’de saklandı. FBS besiyerine toplam hacmin %10’u olacak şekilde ilave edildi.

c) Dimetil sülfoksit (DMSO): 250 ml’lik şişede temin edildi. Oda sıcaklığında saklandı. Hücre dondurma işlemi esnasında düşük ısılarda oluşan buz kristallerini hücre meydana getireceği hasarı önlemek için dondurma solüsyonuna koruyucu madde olarak ilave edildi.

d) Hücre dondurma solüsyonu: %20 FBS ve %5 DMSO içeren MEM dondurma işleminden hemen önce hazırlandı.

e) Sodyum pirüvat çözeltisi: 220 mg sodyum pirüvat 20 ml steril MEM içerisinde çözüldü. Hazırlanacak besiyerinin içerisine 0,11 g/L olacak şekilde 0,22 µm’lik enjeksiyon filtresinden geçirilerek steril hale getirilip eklendi.

f) Fosfat salin tamponu: 100 ml distile suda 1 adet PBS (Invitrogen) tablet çözülerek, 10 mM fosfat, 150 mM sodyum klorür içeren pH’sı 7,3-7,5 olan tampon elde edildi.

g) Protein liziz tamponu: RIPA (Santa Cruz) liziz tamponu kullanıldı. Tampon prosedürde belirtildiği gibi 1X 1 ml RIPA tamponuna 10 µl fenilmetilsulfonil florür (PMSF) solüsyonu, 10 µl sodyum ortovanadat solüsyonu ve 10 µl proteaz inhibitör kokteyl solüsyonu ilave edilerek hazırlandı.

h) Glisin-KOH (pH 10.5) tamponu: 1 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> ve 0,1 M glisin 750 ml suda çözüldü. Hazırlanan solüsyonun pH’sı 1 N KOH ile 10,5’e ayarlanarak 1L’ye distile su ile tamamlandı.

ı) TBE tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA tamponu): DNA fragmentlerinin agaroz jelde görüntüleme analizinde, jeli hazırlama ve yürütme tamponu olarak kullanıldı. Steril 80 ml DNaz/Rnaz içermeyen distile su içerisinde 18,6 g EDTA tartılarak çözüldü. Çözeltinin

pH'sı  $8,0 \pm 0,1$ 'e 5 M NaOH ile ayarlandıktan sonra steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 0.5 M EDTA çözeltisi hazırlandı.

TBE tamponunu hazırlamak için 5,4 g Tris ve 2,8 g borik asit yaklaşık 800 ml steril distile su içerisinde çözüldü. Çözeltiye 2 ml pH'sı  $8,0 \pm 0,1$  olan 0,5 M EDTA'dan ilave edilerek karıştırıldı ve pH'sı (8,0) kontrol edildi.

i) PCR ürünleri yürütme tamponu (TAE tamponu, 10X): 24,2 g Tris baz, 1,85 g EDTA ve 5,7 ml asetik asit (pH~8,0) distile su ile 1 litreye tamamlandı.

## **3.2. Yöntem**

Bütün analizler Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalının laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

### **3.2.1. Sterilizasyon**

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan tüm malzemeler steril edilerek kullanıldı. Radyasyona maruz bırakılan hücre kültür kapları ve kullanıma hazır durumdaki steril besiyerleri ticari firmalardan elde edildi. Cam pipetler, az miktarda deterjan ilave edilen suda bekletildi ve belirli periyotlarda kromat çözeltisi ile temizlendikten sonra sterilize edildi. Cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak, cam pipetler ise alimünyum kutularda  $180^{\circ}\text{C}$ 'de 3 saat sterilizatörde sterilize edildi. Bazı cam ve plastik malzemeler alüminyum folyolara sarılı bir şekilde, sıvı solüsyonlar otoklava dayanıklı şişelerde  $121^{\circ}\text{C}$  ve 1,2 atm/Hg basınçta 30 dakika süre ile otoklavda steril edilerek kullanıldı. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar por büyüklüğü  $0,22\ \mu\text{m}$  aralıklı selüloz asetat özelliğindeki enjektör filtresinden geçirilerek kullanıldı. Çalışma ortamının ve steril laminar hava akımlı çalışma kabininin temizliği zefiran ve %70'lik alkol ile yapıldı. Steril laminar hava akımlı çalışma kabininin haftalık temizliği %1'lik benzalkonyum klorit solüsyonu ile silindikten sonra %70 alkol, %80 izopropil alkol ve tekrar %70'lik alkol ile silinerek yapıldı. Hücre kültürü çalışmalarında steril laminar hava akımlı çalışma kabininin içinde kullanılan tüm malzemeler, %70'lik alkol ile temizlendi. Tüm işlemler eldiven kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.2.2. D-17 (CCL-183) Köpek Osteosarkoma Hücre Hattının Kültüre Edilmesi

Hücre kültürü ile yapılan tüm çalışmalar steril laminar hava akımlı çalışma kabiniinde gerçekleştirildi. Bu çalışmada ATCC'den sağlanan D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma hücre hattı %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS), %0,1 Penisilin/Streptomisin 10.000 U/ml (Gibco), %1 nonesansiyel aminoasit, 0,11 g/L sodyum piruvat içeren MEM (Minimum Essential Medium Eagle) besiyerinde 37°C'de, %95 nemlendirilmiş hava içeren %5 CO<sub>2</sub> ortamında çoğaltıldı.

Hücre kültür kaplarında yeterli sayıya ulaşarak %80-90 konfluent olan hücreler kültürün devam etmesi için 1:2 (1:3 ve 1:4 olabilir) oranında yeni hücre kültür kaplarına yada analizler için taze medyum bulunan (6, 12, 24 ve 96 kuyucuklu) plakalara istenilen yoğunlukta olacak şekilde pasajlandı.

Hücreleri açma ve pasajlama işlemlerinde kullanılacak besiyeri, yıkama amacıyla kullanılan PBS ve %0,25 tripsin EDTA solüsyonu su banyosu yada inkübatörde 37°C'ye kadar ısıtılarak kullanıldı.

Pasajlama işleminde, hücreler tarafından kullanılmış besiyeri pipet yardımıyla boşaltıldı. Kültür kabının hücre bulunmayan yüzeyine doğru PBS ilave edilerek hücrelerin kültür yüzeyi iki kez yıkandı. Besiyeri uzaklaştırılmış hücre kültür kaplarına, hücre yoğunluğu ve hücre kültür kaplarının büyüklüğüne göre 2-4 ml 37°C su banyosunda ısıtılan %0,25'lik tripsin-EDTA, por büyüklüğü 0,22 µm olan enjektör filtresinden geçirilerek ilave edildi. Tripsin-EDTA solüsyonu eklenen hücre kültür kapları 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda hücrelerin yapıştıkları hücre kültür kabından ayrılana kadar (yaklaşık 5 dakika) inkübatörde bekletildi. Hücre kültür kabının tabanına tutunmuş hücrelerin inkübasyon süresince ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskopta kontrol edildi. Hücrelerin yapıştıkları hücre kültür kabından ayrıldıkları gözlenir gözlenmez tripsinin hücrelere zarar vermesini engellemek için tripsin-EDTA miktarının 2 katı hacminde taze besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Her hücre kültür kabındaki hücre süspansiyonu ayrı steril santrifüj tüplerine aktararak, 400xg'de 5 dk santrifüjlendi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenip, pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu elde edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu, önceden içerisine taze besiyeri konmuş 2 ayrı hücre kültür kabına (hücre yoğunluğuna göre 3-4 olabilir) yada analizler için taze medyum bulunan (6, 12, 24 ve 96 kuyucuklu) plakalara eşit miktarda paylaştırıldı. Pasajlanan hücrelerin hücre kültür kabı içindeki yoğunlukları, canlılık takibi, çoğalma hızı ve kontaminasyon oluşumu açısından her gün inverted mikroskopta günlük olarak izlendi.

### 3.2.3. Hücrelerin Dondurulması ve Açma İşlemi

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere yeterli hücre sayısı ve yoğunluğuna ulaşan hücrelerin bir kısmı uygun şekilde donduruldu. Bu amaçla hücreler PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra hücre kültür kabından yeterli miktarda %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldı. Süspansiyon olarak elde edilen hücreler 400xg'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı ve kalan pelletin üzerine yoğunluğuna göre %20 ısı ile inaktive edilmiş FBS içeren besiyeri eklendi ve tekrar süspansiyon edildi. Süspansiyon hücre kültürlerinin canlılık oranları ve hücre yoğunluğu belirlendi. Buz üzerinde hücre süspansiyonuna %10 DMSO içeren besiyeri (%20 ısı ile inaktive edilmiş FBS içeren) eklendi.

Hücre süspansiyonları hücre yoğunluğuna göre uygun sayıdaki kriyo tüplere 1'er ml konuldu. Kademeli dondurma yapmak için 24 saat -80°C'de tutuldu. Daha sonra kriyo tüpler sıvı azot (-196°C) tankına aktarıldı.

Hücre açma işlemlerinde -196°C'de sıvı azot tankında depolanan hücreler tanktan çıkarıldı. Kapak kısmından tutarak 37°C su banyosunda hafifçe sallayarak hızlı bir şekilde çözüldü. Steril laminar hava akımlı çalışma kabini içerisine alınmadan önce hücrelerin bulunduğu kriyo tüp %70'lik alkol ile iyice temizlendi. Hücre içeriği 10 ml taze besiyeri içeren steril santrifüj tüpüne yavaşça transfer edildi ve 400xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası DMSO içeren süpernatant kısmı uzaklaştırıldı, hücre pelleti uygun miktarda taze besiyeri ile süspansiyon edildi. Hücreler metabolik aktivitelerini tekrar kazanabilmeleri için 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına alınıp 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'de kültüre edildi.

Her aşamada hücreler tripan mavisi boyama yönteminden yararlanılarak hücre süspansiyonundaki ölü ve canlı hücreler ayrı ayrı sayılabildiği için canlılık düzeyi ve 1 ml'deki hücre miktarı belirlendi. Bu boyama yönteminde boya negatif yüküdür. Hücreler zardan geçen bileşenlere karşı çok seçici olduklarından eğer hücre membranı zarar görmemiş ve canlı bir hücre ise, tripan mavisi hücre içine giremez. Boya canlı hücreler tarafından absorbe edilemeyip boyanmazken, ölü hücrelerde zar bütünlüğü bozulduğu için tripan mavisi ile boyanırlar. Dolayısıyla ölü hücreler boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi görünürler. Böylelikle yapılacak analizler için hücre yoğunluğu ve canlılık düzeyinin yeterli olup olmadığına, pasajlama yapılıp yapılmayacağına karar verildi. Bu yöntemle göre boyama işlemi aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

### 3.2.4. Hücrelerin Kaplama Yoğunluğunun Belirlenmesi

Bu çalışma hücrelerin logaritmik fazda ürettiği, sitotoksik analizler için en uygun hücre yoğunluğunu elde etmek amacıyla yapıldı. Azot tankından çıkarılan D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma hücrelerinin ilk pasajı bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi hızlı bir şekilde çözdürülerek hücre kültür kabına alındı. Ardından 37°C'de, %95 nemlendirilmiş hava, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda %80 konfluent olana kadar inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücre kültür kaplarından tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler santrifüj sonrası resüspanse edilerek Neubauer lamında dört karede bulunan hücreler sayıldı ve ortalaması alınıp dilüsyon oranı dikkate alınarak 1 ml'deki hücre sayısı (hücre/ml) hesaplandı. Bu işlem üç kez tekrarlanıp ortalaması alınarak değerlendirildi. Elde edilen hücre süspansiyonu 1:2 oranında seyreltilerek 2x10<sup>5</sup> hücre/ml'den 3750 hücre/ml'ye kadar 8 farklı seri dilüsyonda hazırlandı. Her bir dilüsyondan 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına 200 µl eklendi ve 24 saat inkübasyonun ardından besiyeri uzaklaştırılarak, 100 µl %10 WST-1 içeren besiyeri ilave edildi. Hücreler 3 saat boyunca 37°C %5 CO<sub>2</sub>'de içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda ELİSA okuyucusunda 450 nm'de ölçüm yapılarak, sonuçlar kaydedildi. Sonuçlar üç farklı zamanda yapılan tekrarların ortalaması alınarak değerlendirildi. Sonuç olarak D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma hücrelerinin sitotoksik analizler için hücre yoğunluğu 5x10<sup>3</sup> hücre/kuyucuk ve hücrelerin tutunması için gerekli inkübasyon süresi 24 saat optimum üreme şartları olarak belirlendi ve bütün sitotoksik analizler belirlenen koşullarda gerçekleştirildi.

D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma hücrelerinin WST-1 canlılık testi için uygun hücre konsantrasyonu ve inkübasyon süreleri belirlendikten sonra zoledronik asidin D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma hücrelerindeki etkisini belirlemek amacıyla canlılık testi uygulamasına geçildi.

### 3.2.5. Zoledronik Asidin Doz ve Zamana Bağlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

İlaç firmasından (Novartis) temin edilen zoledronik asidin ilaç formu zoledronik asit stok çözeltisi olarak kullanıldı. Bu stok çözeltisinin 100 ml'si 5 mg zoledronik asit (susuz) içermektedir. Zoledronik asit (ZA) çözeltisi 1000 µl'lik küçük hacimler halinde analizlerde kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı. Her deney için yeni stok solüsyon kullanıldı.

Stoktan çıkarılan D-17 köpek osteosarkoma hücreleri gerekli sayıya çoğaldıktan sonra zoledronik asidin sitotoksik etkisini ve doz aralığını belirlemek için WST-1 yönteminden yararlanıldı. Zoledronik asidin stok solüsyonundan taze besiyeri ile seyreltmeler yapılarak 1

$\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları hazırlandı. Hazırlanan bu konsantrasyonlarda D-17 köpek osteosarkoma hücreleri 24, 48, 72 ve 96. saat  $37^\circ\text{C}$ 'de, %95 nemlendirilmiş hava, %5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin sonunda WST-1 ile sitotoksosite analizleri yapıldı, her bir deney 3 kez tekrarlandı. Çalışılan doz aralığında elde edilen veriler ile  $\text{IC}_{50}$  değeri hesaplandı. Sadece hücre ve besiyeri içeren, zoledronik asit konulmayan kuyucuklar pozitif kontrol olarak kabul edildi. Hücre ve ilaç içermeyen kuyucuklara ise sadece besiyeri eklenerek negatif kontrol olarak kullanıldı.

### **3.2.6. WST-1 (Water Soluble Tetrazolium tuzu) Canlılık Testi**

Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin olup olmadığı yada sitotoksik etkisinin ne düzeyde olduğu hücre canlılık analizleri ile belirlendi. Zoledronik asidin 24.-48.-72.-96. saatlerdeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek için WST-1 (Roche) hücre canlılık kiti kullanıldı.

1. Hücre kültür kaplarından tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler santrifüj sonrası resüspanse edilerek sayıldı ve  $2,5 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı.

2. 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde toplam hacmi 200  $\mu\text{l}$  olan hücre süspansiyonu eklendi.

3. Hücreler  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda 24 saat inkübe edildikten sonra besiyeri uzaklaştırılarak, 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında zoledronik asit içeren besiyeri eklendi. Her bir grup için 4 kuyucuk hazırlandı.

4. 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sonunda hücrelere uygulanan zoledronik asit içeren besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  %10 WST-1 solüsyonu içeren besiyeri eklendi.

5. Hücre kültür plakları 3 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  ve %95 nem içeren ortamda inkübe edildikten sonra ELİSA okuyucusunda (İvymen) 450 nm'de ölçümü yapıldı.

6. Yapılan WST-1 testi 3 kere tekrar edildi. Ortalamalar hesaplandı ve Microsoft Excel programı yardımıyla ortalama absorpsiyon  $\pm$  standart sapma baz alınarak grafikler çizildi.

7. Sitotoksitenin yüzde canlılık üzerinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı;



% Canlılık = (Zoledronik asit içeren kuyucukların absorbans ortalaması/pozitif kontrol kuyucuklarının absorbans ortalaması) x 100

### 3.2.7. IC<sub>50</sub> Değerinin Hesaplanması

Zoledronik asit ile muamele edilen hücrelerin WST-1 canlılık testi sonucu elde edilen canlılık absorbans değerleri kontrol değeri (zoledronik asit uygulanmayan) ile normalize edildi. Normalizasyon sonucu elde edilen veriler grafik haline getirilip değerlendirildi.

Zoledronik asit uygulanan D-17 köpek osteosarkoma hücresinin WST-1 canlılık analizi ile doza bağımlı olarak elde edilen canlılık sonuçları GraphPad Prism 5 programı kullanılarak doz etki eğrisi oluşturuldu

Hesaplanan sitotoksosite değerleri ile her inkübasyon süresi (24 saat, 48 saat, 72 saat) için CompuSyn 1.0 (ComboSyn Inc., Paramus, NJ, USA) programı kullanılarak büyümenin %50 azaldığı IC<sub>50</sub> değeri hesaplandı. Zoledronik asidin apoptotik etkilerinin araştırılacağı dozları ve inkübasyon süreleri belirlendi.

### 3.2.8. Koloni Oluşturabilme Yeteneklerinin İncelenmesi

Klonojenik test, tümör hücrelerinin sitotoksik ilaçlara ve radyasyona duyarlılığının test edilmesi için kullanılan bir yöntemdir (Grenman ve ark, 1989). Bu nedenle D-17 köpek osteosarkoma hücre hattının zoledronik aside duyarlılığını belirlemede bu yöntemden yararlanıldı. Bu amaçla D-17 köpek osteosarkoma hücreleri, 24 kuyulu plakaların her kuyucuğunda 1,25x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin plakaya tutunmaları için 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda 24 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda mikroskop altında hücrelerin tutunup tutunmadığı kontrol edilerek, hücreler steril PBS ile yıkandı. Stok zoledronik asit solüsyonundan 1 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 15 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM konsantrasyonları besiyeri ile hazırlanarak hücrelerin üzerine uygulandı. Zoledronik asit uygulanan D-17 köpek osteosarkoma hücreleri 48 ve 72 saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından besiyeri steril pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuk bir kez PBS ile yıkandı. Hücreler %10 formaldehit ile oda sıcaklığında 15 dakika fikse edildi.

Metanol içinde %0,5 g olacak şekilde hazırlanan kristal viyole boyasının stok solüsyonundan 1/10 oranında distile su ile dilüe edilerek çalışma solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyondan fikse edilen hücrelerin üzerine 250 µl eklendi ve 15 dakika bekletildi.

İnkübasyonun ardından hücreler boyayı uzaklaştırmak için 3 kez distile su ile birer dakikalık periyotlarla yıkandı. Ardından plakalar kapakları açık vaziyette kurumaya bırakıldı. Işık mikroskobu altında değerlendirme yapılarak, sonuçlar fotoğraflandı.

### **3.2.9. Zoledronik Asidin Mineralizasyona Etkisi**

Zoledronik asidin mineralizasyona olan etkisini belirlemek için Alizarin kırmızısı S boyaması yapıldı (Gregory ve ark, 2004). Bu amaçla D-17 köpek osteosarkoma hücreleri, 24 kuyulu plakaların her kuyusunda  $1,25 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat boyunca inkübe edildi. Stok zoledronik asit solüsyonundan besiyeri ile dilüe edilerek hazırlanan 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  zoledronik asit D-17 köpek osteosarkoma hücreleri üzerine uygulanarak, 48 ve 72 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  ve %95 nem içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından zoledronik asit içeren besiyeri steril pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Hücrelerin bulunduğu kuyucuklar steril PBS ile bir kere yıkandı ve hücreler %10 formaldehit ile 15 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Hücrelerin fikse edildiği kuyular iki defa bolca distile su ile yıkandı.

Alizarin kırmızısı S boyama solüsyonu, 2 g alizarin kırmızısı S 100 ml distile suda çözülüp %0,1  $\text{NH}_4\text{OH}$  ile pH'sı 4,1-4,3 olacak şekilde hazırlandı (çözünmemiş boyayı uzaklaştırmak için filtreden geçirildi). Her bir kuyucuğa alizarin kırmızısı S boyama solüsyonundan 250  $\mu\text{l}$  ilave edilip ara ara çalkalayarak oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi. Bağlanmayan boya aspire edildikten sonra 1 ml distile su ile 5'er dakika süreyle çalkalayarak 4 defa yıkama işlemi gerçekleştirildi. Plakalar daha sonra fazla suyun uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak için bir açıyla 2 dakika bırakıldı, yeniden su aspire edildi. Mineralizasyon kapasitesi yüksek olan konsantrasyonlar parlak kırmızı-turuncu renk oluştururken, mineralizasyon kapasitesi düşük olan konsantrasyonlar ise biraz kırmızımsı renkte gözlemlendi. Boyanmış yapıların ışık mikroskobu altında görüntüleri incelendi ve fotoğraflandı.

### **3.2.10. Zoledronik Asidin Alkalen Fosfat (ALP) Aktivitesine Olan Etkisi**

D-17 köpek osteosarkoma hücreleri, her kuyusunda  $5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekilerek, plakaya tutunmaları için  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  ve %95 nem içeren ortamda 24 saat inkübe edildi. Tutunmayan hücreleri uzaklaştırmak için kuyucuklar steril PBS ile yıkandı ve 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$

konsantrasyonlarında ZA içeren besiyeri hazırlanarak hücrelerin üzerine uygulandı. Zoledronik asit uygulanan D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma hücreleri 48 ve 72 saat inkübasyonun ardından %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılıp, sayıldı. Süspanse olarak elde edilen hücreler 400xg'de 5 dk santrifüj edildi ve hücreler pellet şeklinde elde edildi. Hücreler 2 defa PBS ile resüspanse edilip tekrar santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Toplanan hücrelerin sayısına göre RIPA liziz tamponu eklendi ve 60 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Hücre lizatları +4°C'de 10.000xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüjün ardından süpernatantlar ayrı bir ependorfa alınarak, hemen ALP aktivite düzeyleri ve protein miktarları BCA protein kiti (Biovision, USA) ile prosedüre uygun olarak belirlendi. Örneklerin protein miktarları standart grafiğinden yararlanarak µg cinsinden hesaplandı. Protein analizinden sonra her bir örnek eşit miktarda protein içerecek şekilde PBS ile dilue edildi.

Alkalen fosfataz enzim aktivitesi tayininin prensibi; *p*-Nitrofenil fosfatın pH 10,4'te ALP katalizörlüğünde *p*-Nitrofenol ve fosfata hidrolizlenerek, *p*-Nitrofenol'ün oluşma hızının kolorimetrik olarak ölçümüne dayanır. Bu nedenle alkalen fosfataz konsantrasyonu *p*-nitrofenol'ün oluşma hızıyla orantılıdır. ALP enzim aktivitesi tayini Bisswanger (2004) metoduna göre belirlenmiştir. Her uygulanan ZA konsantrasyonu için sonuçlar U/L cinsinden hesaplandı.

### 3.2.11. Zoledronik Asidin Hücrelerin Migrasyonuna Olan Etkileri

Bu yöntem *in vivo* yara iyileşmesi sırasında hücrelerin migrasyonunu taklit ettiğinden dolayı yara iyileşmesi olarak da adlandırılmaktadır. Bu yöntemde tek katlı katman oluşturmuş hücrelerin yüzeyinde yara bölgeleri oluşturulur ve yara genişliği görüntülenerek başlangıç zamanı olarak kaydedilir. Belirlenen zaman aralıklarında yaranın kapanması sırasında hücrelerin migrasyonuna ilişkin görüntüler alınarak yara genişliği ölçülür. Düzenli aralıklar ile elde edilen bu görüntüler karşılaştırılarak hücrelerin migrasyon oranı belirlenir (Rodriquez ve ark, 2005).

D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma hücreleri 6 kuyucuklu plakalara  $5 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve tutunmaları için 24 saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 ortamda inkübe edildi. Hücrelerin tutunup tutunmadığı mikroskop altında kontrol edildikten sonra 100 µl'lik pipet ucuyla çizik atılarak yaralar oluşturuldu. Yara oluşturulan kuyulardaki besiyeri steril pipet yardımıyla aspire edildi ve yara oluşturma esnasında plakalardan ayrılan hücre ve kalıntıları PBS ile yıkanıp uzaklaştırıldı. PBS steril pipetle çekildikten sonra 5 µM,

7,5 µM, 10 µM ve 15 µM zoledronik asit içeren besiyerleri uygulandı. Uygulamadan hemen sonra her kuyucuk için aynı noktanın birden fazla görüntüsü alınarak 0. saat olarak kaydedildi. ZA uygulamasından 48 ve 72 saat sonra yaralardaki kapanma inverted mikroskopta 200X objektif kullanılarak görüntülendi. Elde görüntüler ImageJ programından yararlanılarak mesafeler hesaplandı, grafiğe aktarılarak istatistikleri yapıldı. Sonuçlar değerlendirilerek, ZA'nın hücre göçüne olan etkisi doz ve süreye bağlı olarak yorumlandı.

### **3.2.12. Zoledronik Asidin D-17 (CCL-183) Köpek Osteosarkoma Hücreleri Üzerinde Apoptotik Etkileri**

#### **3.2.12.1. Apoptotik DNA fragmentlerinin ELİSA yöntemi ile kantitatif analizi**

Apoptotik DNA kırıklarının kantitatif tayini, DNA fragmentasyonu esnasında oluşan sitoplazmik DNA-histon kompleksini H1, H2A, H2B ve H4 histonlarına bağlanan anti-histon-biotin antikoru ve tek/çift DNA zinciri ile reaksiyon veren anti-DNA-Peroksidaz ile belirlenmesini sağlayan kantitatif sandiviç enzim immunoassay prensibine dayanır (Krishan ve Frankfurt, 2001). Bu amaçla hazır ticari kit (Cell Death Detection ELISA Plus kit, Roche, Mannheim, Germany) kullanıldı.

Zoledronik asidin etkisi ile apoptoza uğrayan hücrelerdeki DNA kırıklarını belirlemek için D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma hücreleri, 6 kuyucuklu plakalara  $5 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak ekildi ve hücrelerin plakalara tutunmaları için 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda 24 saat inkübasyonun edildi. Zoledronik asidin apoptoza olan etkisinin belirlenmesinde 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 15 µM konsantrasyonlarında ZA içeren besiyeri hazırlanarak hücrelerin üzerine uygulandı. Zoledronik asit uygulanan D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma hücreleri 48 ve 72 saat inkübasyonun ardından %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılıp, sayıldı. Temiz bir 2 ml'lik ependorfa  $10^4$  hücre içeren miktar pipetajlanarak, +4°C'de 500xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletinin üzerine 200 µl liziz tamponu ilave edilerek hücreler resüspanse edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından lizatlar +4°C'de 200xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Hücre kalıntıları uzaklaştırılmış nükleer ekstraktdaki apoptotik DNA fragmentleri ile analize başlandı.

Kitin prosedürüne göre hazırlanan immunoreaktifin içerisinde bulunan Anti-histon biotin nükleozomları, histon komponentlerini bağlar ve kaplı mikroplakaya biotin aracılığıyla immunokompleksin tutunmasını sağlar. Anti-DNA-Peroksidaz ise

nükleozomların DNA komponentlerine bağlanır ve ABTS (2,2'-azinobis-[3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit]) substratı ile renk reaksiyonu verir. Böylece immunokomplekslere tutunmuş olan peroksidaz enziminin ABTS substratı ile verdiği renk apoptotik DNA miktarı ile doğru orantılı olarak belirlendi. ZA uygulanmayan (kontrol hücreleri) örnek 1,00 kabul edilerek, diğer örneklerle ait zenginleşme faktörleri oransal olarak hesaplandı.

### **3.2.12.2. Apoptotik DNA fragmentasyonunun ekstraksiyonu ve agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi**

DNA merdiveni tekniğinin temel kullanım prensibi, apoptoz endonükleaz parçalanma ürünlerini görselleştirmesidir (Kasibhatla ve ark, 2006).

D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma hücreleri filtre kapaklı 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü kabına 1x 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde pasajlandı ve 24 saat hücre kültür kabına tutunması için inkübe edildi. Logaritmik fazda bulunan hücrelerin üzerine ZA'nın apoptotik etkisini belirlemek için 5 µM, 7,5 µM, 10 µM ve 15 µM ZA içeren besiyerleri uygulandı. Hücreler ZA ile 48 ve 72 saat muamele edildikten sonra DNA ekstraksiyonu DNA spesifik kolonlar kullanılarak apoptotik DNA Ladder (Roche, Almanya) kiti ile yapıldı.

DNA fragmentleri 1X TBE tamponunda hazırlanan %1'lik agaroz jelde 75 V elektrik akımı uygulanarak ~90 dakika süresince yürütülerek, ayrıştırıldı. DNA fragmentlerinin görüntülenmesini sağlayan GelRed (Biotium) (10.000X DMSO) nükleik asit jel boyası kullanıldı. Yürütme işleminin ardından jel üniteden alınıp, UV görüntüleme sisteminden yararlanarak (UVP EC3 Imaging System Chemi HR 410) görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

### **3.2.13. Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9'nun ELİSA ile Belirlenerek Apoptozun Değerlendirilmesi**

D-17 (CCL-183) köpek osteosarkoma hücreleri filtre kapaklı 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kabına 3x10<sup>6</sup> olacak şekilde pasajlandı ve 24 saat tutunması için inkübe edildi ve 3'er flaskta hücreler üretildi. Hücrelerin inverted mikroskop altında konfluent miktarı kontrol edildikten sonra besiyeri aspire edilerek, hücreler PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından hücrelerin üzerine 5 µM, 7,5 µM, 10 µM ve 15 µM ZA içeren besiyerleri uygulanarak, hücreler 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi. İnkübasyon süresinin sonunda

besiyeri içerisinde süspans halde bulunan hücreler 1500xg'de 10 dakika santrifüj edilerek, toplandı. Monolayer halde bulunan hücreler ise %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ile süspans hale getirildi.

Süspans olarak elde edilen hücreler 500xg'de 5 dk santrifüj edilerek, pellet şeklinde elde edildi. Hücreler 2 defa PBS ile resüspans edilip tekrar santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Toplanan hücrelerin sayısına göre RIPA liziz tamponu eklendi ve 60 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Hücre lizatları +4°C'de 10.000xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüjün ardından süpernatantlar ayrı bir ependorfa alınarak, hemen kaspaz 3, 8, 9 miktarları belirlendi. Hücre lizatlarındaki kaspaz 3, 8, 9 düzeyleri hücre kültürleri için uygun köpek spesifik ticari ELISA (FineTest, Canine CASP3, CASP8,CASP9, Çin) kitleri kullanıldı.

Kaspazların (3, 8, 9) ELİSA yöntemi ile analizi, kantitatif sandviç-enzim immünoassay prensibine dayanır. Hazırlanan hücre lizatları kitin (FineTest, Canine CAPS Çin) içerdiği anti-kaspaz antikoları ile kaplı plakalara uygun seyreltmeler yapılarak eklendi. Biotinle konjüge edilmiş anti-kaspaz antikolar hücre lizatlarında bulunan antikoları saptamak için kullanıldı. Standartlar, hücre lizatları ve biyotin ile konjüge antikolar kuyucuklara eklendi. İnkübasyon süresi sonunda yıkama tamponu ile manuel yıkama işlemi yapılarak bağlanmamış konjugatlar uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından HRP-Streptavidin solüsyonu ilave edildi. HRP'nin enzimatik reaksiyonunu gözlemleyebilmek için TMB (tetrametilbenzidin) substrat solüsyonu eklendi. TMB substratı, HRP tarafından katalize edilerek mavi renkli ürünlere dönüştürdü. Oluşan renkli ürünler asidik durdurmasolüsyonunun ilavesinden sonra sarı renk meydana getirdi. Mikroplaka okuyucusunda 450 nm'de örneklerin optik dansite değerleri okunup, standart grafiklerinden yararlanarak kaspaz (3, 8, 9) konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen optik dansite değerleri hücre lizatlarında bulunan kaspaz (3, 8, 9) miktarıyla orantılıdır.

### **Hesaplanması:**

Bütün örneklerin, kontrol ve standartlarının absorbansı belirlendikten sonra her bir örnek ve standart için rölatif optik dansitesi aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$(\text{rölatif O.D.450}) = (\text{O.D.450 örnek} / \text{standart}) - (\text{O.D.450 Kör})$$

Standartların rölatif O.D. ile curve expert 1.4 programı kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlandı ve örneklerin konsantrasyonu elde edilen eğriden yararlanılarak belirlendi. Standart grafiğinden elde edilen sonuçlar sulandırma faktörü dikkate alınarak kaspaz 3, 8, 9 düzeyleri değişimleri % ng/ml cinsinden hesaplandı.

### 3.2.14. RT-PCR ile Gen İfadelerinin Belirlenmesi

#### 3.2.14.1. Total RNA izolasyonu

Zoledronik asidin etkisi ile apoptoza uğrayan hücrelerde ekstrinsik ve intrinsik yollar üzerinde bulunan genlerin ekspresyon düzeyini belirlemek için ZA ile muamele edilen hücrelerden ilk olarak total RNA izolasyonu yapıldı.

D-17 köpek osteosarkoma hücreleri 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 15 µM konsantrasyonlarında ZA uygulamasının ardından belirlenen inkübasyon süresi sonunda süspanse halde bulunan ve yapışmış tüm hücreler pellet şeklinde elde edildi. Bir sonraki aşamada hücrelerden ticari RNA izolasyon kiti (RiboEX (GeneAll), Kore) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

İzole edilerek, saflaştırılan RNA örneklerinin mikropılaka okuyucusunda (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher) 260 ve 280 nm dalga boyunda ölçümü yapılarak, absorbansları kaydedildi. RNA'nın yapısındaki nükleotidlerde bulunan heterosiklik halkaların 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği göstermesinden yararlanılarak RNA'nın konsantrasyonu 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri kullanılarak µg/ml düzeyinde belirlendi. RNA moleküllerinin 260 nm'deki 1 optik dansitesi 40 µg/ml'yi ifade ettiği için RNA'nın miktarının belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Total RNA (ng/}\mu\text{l)} = 260 \text{ nm'deki absorbans} \times 40 \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

Proteinlerin Warburg-Christian yöntemine göre triptofan ve tirozin rezidülerinin 280 nm dalga boyunda absorpsiyon özelliğinden yararlanarak, izole edilen örneklerdeki protein girişimi belirlendi. RNA örneklerinin 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen absorbans değerleri arasındaki oran RNA'nın saflığını göstermektedir. İzole edilen total RNA örneklerinin saflığı  $A_{260}/A_{280}$  oranının 1,8-2,0 arasında olmalıdır.

Çalışmamızda qRT-PCR aşamasında sonuçların daha güvenilir olması için RNA kalitesini göstergesi olarak kabul edilen  $A_{260}/A_{280}$  oranı belirlenerek uygun örnekler ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi için her örnekten 1µg total RNA olacak şekilde örnekler dilue edildi.

### 3.2.14.2. cDNA sentezi

RNA'nın stabil bir yapıya sahip olmamasından dolayı mRNA'lar ile analizlerin yapılması oldukça güçtür, bu nedenle revers transkriptaz enzimi ile komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülerek analizlere devam edilmektedir. Bu amaçla RNA örneklerimiz cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthese kit, Roche) kullanılarak prosedürüne uygun bir şekilde Light Cycler Nano Real Time PCR cihazında cDNA'ya dönüştürüldü.

RNA örnekleri 100 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde DNaz/RNaz içermeyen su ile uygun seyreltmeleri yapıldı. Hazırlanan bu 100 µg/ml konsantrasyonundaki RNA örneklerinden 0,2 µl'lik pcr tüplerine 9,4 µl eklendi. RNA örneklerinin ardından 1 µl random hegzamer ve 1 µl Oligo dT'den eklendikten sonra karışım 65°C'de 10 dakika RNA'nın sekonder yapılarının denaturasyonu için qRT-PCR cihazında inkübe edildi. Reaksiyon karışımı; her bir örnek için 4 µl Reaksiyon tamponu (8 mM), 0,5 µl RNaz inhibitör solüsyonu (20 U), 2 µl dNTP (1 mM), 1 µl DTT (5 mM), 1,1 µl Revers Transkriptaz enzim solüsyonu (10 U) kullanılarak hazırlandı. Karışım kısa aralıklarla 2-3 kez vortekslenildikten sonra her örneğe 8,6 µl pipetlenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan örnekler qRT-PCR'da; 60 dakika 55°C'de, 5 dakika 85°C tutuldu. Elde edilen cDNA'lar 100 µl'ye tamamlanarak aliyatlara ayrılıp hemen kullanılacaksa 4°C'de ya da daha sonraki qRT-PCR çalışması için -20°C'de saklandı.

### 3.2.14.3. Primerlerin hazırlanışı

Primerler, qRT-PCR analizi için Atlas Biyoteknoloji firmasından liyofilize olarak temin edildi. Liyofilize primerler santrifüjlenerek firmanın gönderdiği primer örneklerinin nM miktarı dikkate alınarak 10 katı kadar DEPC'li H<sub>2</sub>O ile sulandırılıp, 2-3 defa kısa süreli vortekslendi. Primerlerin çözünürlüğünü arttırmak için 37°C'de termal blokta 5 dakika bekletildi. Böylece 100 µM'lık konsantrasyona sahip primer stoğu elde edildi. Elde edilen bu stoktan PCR reaksiyonunda kullanmak için 10 µM'lık konsantrasyona sahip ara stok hazırlandı.



#### 3.2.14.4. mRNA ekspresyon düzeylerinin qRT-PCR yöntemi ile analizi

Eş zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (qRT-PCR), reaksiyon ortamında bulunan floresan özellikteki moleküllerin yardımıyla her amplifikasyon döngüsüyle oluşan ampikonların miktarında artış meydana geldikçe eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan yöntemdir. Amplifikasyon sırasında floresan emisyon yoğunluğunun aşıldığı; yani üründeki ilk anlamlı artışın olduğu döngü sayısı eşik döngü değeri (cycle threshold, Ct) olarak adlandırılmaktadır. qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değerleri sonuçların hesaplanmasında kullanılmaktadır (Wong ve Medrano, 2005). Ct değerleri hedeflenen gen bölgesinin ekspresyon seviyesi ile ters orantılıdır. Hedef genin ekspresyon seviyesi ne kadar fazla ise qRT-PCR sonucu elde edilen Ct değeri o kadar küçüktür.

qRT-PCR’da ilk olarak Reverse-Transkriptaz (RT) kullanılarak cDNA sentezlendi, sonraki aşamada ise hedeflenen gene spesifik primerler ile sentezlenen cDNA kullanılarak ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirildi.

Apoptotik yollarda görev alan Bcl-2, Bax ve Bid genleri ve hücre sağkalımı ile ilişkili gen olarak kabul edilen survivin geninin ekspresyon düzeyleri özel primer setleri ve referans gen olarak da gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni kullanılarak LigthCycler®480 cihazında (Roche) qRT-PCR yöntemi ile belirlendi. Bu primerler internet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) köpekler için Bcl-2, Bax, Survivin, Bid, NF-κB ve gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (dogGAPDH) genine ait mRNA verileri ışığında baz dizilimleri değerlendirmeye alındı ve oluşturulan primerlerin ilgili bölgeye spesiflikleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak kontrol edildi. Her bir cDNA örneği üç kez test edildi ve eşik döngü değeri (Ct) belirlendi. Her bir replikasyonda, cDNA ve reverz transkriptaz içermeyen PCR uygulamaları negatif kontrol olarak kullanıldı. Ct değeri, referans gen olarak kullanılacak olan GAPDH için de tespit edildi ve test edilen genlerin ekspresyonu GAPDH ile normalize edildi. Ct değeri 40 ve üzerinde olan örneklerde amplifikasyon olmadığı kabul edildi ve hesaplamalara dahil edilmedi. Reaksiyon koşulları Tablo 3 ve 4’te belirtilirken her iki koşulda da aynı referans gen kullanıldı.

**Tablo 3.** Bid ve Survivin genleri için RT-PCR reaksiyon koşulları.

Sıcaklık (°C)	Ramp Oranı (°C/s)	Süre (s)
<b>İlk Denatürasyon Aşaması</b>		
95	4	600
<b>Amplifikasyon Aşaması</b>		
95	5	20
55	4	20
72	4	15
<b>Erime (Melting) Aşaması</b>		
40	4	60
99	0,1	1

**Tablo 4.** Bax ve Bcl-2 genleri için RT-PCR reaksiyon koşulları.

Sıcaklık (°C)	Ramp Oranı (°C/s)	Süre (s)
<b>İlk Denatürasyon Aşaması</b>		
95	4	600
<b>Amplifikasyon Aşaması</b>		
95	5	20
60	4	20
72	4	15
<b>Erime (Melting) Aşaması</b>		
40	4	60
99	0,1	1

### 3.2.14.5. Ekspresyonun değerlendirilmesi

qRT-PCR sonucu her deney seti için elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. Gen ekspresyonunun rölatif kantitasyonunun hesaplanmasında  $\Delta\Delta Ct$  metodundan (Livak ve Schmittgen, 2001) yararlanıldı. Bu metoda göre (izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarından dolayı örnekler arası başlangıç miktarlarının farklılıklarını, oluşan deneysel hataların getirdiği farklılıkları en aza indirmek için) normalize etmek amacıyla ilgilenilen genin ifade düzeyi, çeşitli koşullarda ifade düzeyi değişmediği bilinen (en az etkilenen) referans gen olarak kullanılan *housekeeping* genin ifade düzeyine oranlanır.

Hücrelerdeki ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması için zoledronik asit uygulanan örneklerin normalize Ct değerleri ile zoledronik asit uygulanmayan (kontrol grubu) örneklerin normalize Ct değerlerine oranlandı. Elde edilen oran zoledronik asit uygulanmayan deney grubunun (kontrol) “n” katı şeklinde verildi. Aşağıda gösterilen hesaplamalar kullanılarak komperatif Ct metodu,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü ile ifade edildi.

$$\Delta Ct (\text{ZA uygulanan veya uygulanmayan hücreler}) = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{GAPDH})$$
$$2^{\Delta\Delta Ct} = 2^{\Delta Ct (\text{ZA uygulanan hücreler}) - \Delta Ct (\text{ZA uygulanmayan hücreler})}$$

### 3.2.14.6. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi

qRT-PCR sonucu elde edilen amplifikasyon ürünleri; hedef bölgenin çoğaltıldığını kontrol etmek, non-spesifik amplikonların meydana gelmediğini ve primer dimerlerinin oluşmadığını göstermek için agaroz jelde yürütüldü. Bunun için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz jelin hazırlanması için, 2 g agaroz tartılıp erlen içerisinde 100 ml TBE tamponu ilave edildikten sonra, mikrodalga fırına yerleştirildi ve maksimum seviyede ara ara karıştırılarak ısıtıldı. Isıtma işlemine agaroz tamamen çözünene kadar mikrodalga fırında devam edildi. Kaynatma işleminden sonra agaroz solusyonu 60°C'ye kadar soğutuldu ve 5 µl GelRed (Biotium) (10.000X DMSO) nükleik asit jel boyasından eklendikten sonra iyice karıştırıp, homojen hale getirildi. Agaroz solusyonu tarağı takılı yatay elektroforez tankına döküldü 30 dakika agaroz jelinin donması beklenildi. Jelin üzerine 1X TAE yürütme tamponu ilave edilerek taraklar dikkatlice çıkarıldı. Örnek kuyucuklarında hava kalmamasına dikkat edildi. qRT-PCR sonucu elde edilen ürünlerden 10 µl, 3 µl 6X jel yükleme tamponu ve 5 µl steril DNaz/RNaz içermeyen distile H<sub>2</sub>O pipetlenerek hazırlanan örnekler kuyucuklara yüklendi. Amplikonların baz uzunluğunu belirleyebilmek için 3 µl 1 µg/µl DNA markerından, 3 µl 6X jel yükleme tamponundan alınarak ilk kuyucuğa yüklendi. Jele yüklenen amplikonlar 1X TAE yürütme tamponunda 100 V elektrik akımı uygulanarak ~60 dakika süresince yürütüldü. Yürütme işleminin ardından jel üniteden alınarak UV görüntüleme sistemin (UVP EC3 Imaging System Chemi HR 410) görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

### 3.2.15. İstatistiksel Analiz

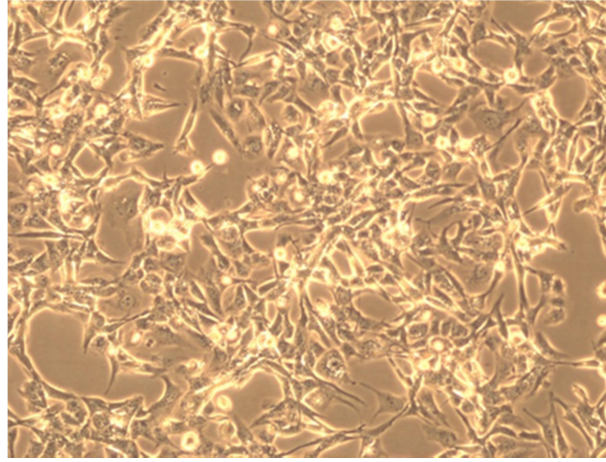
Tüm istatistiksel analiz ve hesaplamalar için MS-Excel 2010 ve "SPSS for Windows Ver. 22.0" (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) paket programları kullanıldı. İstatistiksel kararlarda  $p < 0,05$  düzeyi anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı analizler tüm parametreler için ortalama ve standart sapma şeklinde yapıldı.

Normal dağılıma uygun olduğu belirlenen parametlerde gruplar arasındaki fark tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile belirlendi. Bu farkın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için Tukey testi yapıldı.

## 4. BULGULAR

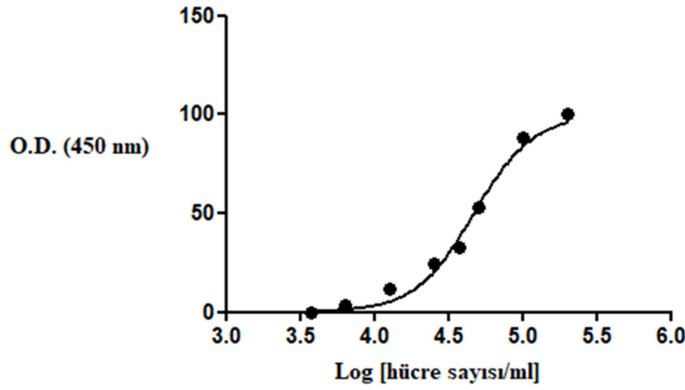
### 4.1. Hücreslerin Kaplama Yoğunluğunun Belirlenmesi

Her hücre hattının ikileme zamanı ve hızı çalışıldığı koşullarda farklılık gösterir. Bu nedenle çalışmanın başlangıcında sitotoksik analizler için en uygun hücre yoğunluğunu elde etmek amacıyla hücrelerin logaritmik fazda ürettiği en uygun zaman ve kaplama yoğunluğu için uygun hücre sayısı belirlendi. Bu amaçla farklı yoğunluktaki hücrelerin 24 saat inkübasyonunun ardından canlılık analizi gerçekleştirildi. Analizler üç kez tekrarlanarak, sonuçları hesaplandı.



**Resim 1.** D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinin morfolojik görüntüsü (20x büyütme).

WST-1 canlılık testine başlamadan önce daha güvenilir sonuçlar elde edebilmek için hücremize göre standardizasyon çalışması sonucunda D-17 köpek osteosarkoma hücreleri (Resim 1) için optimum üreme şartları 5.000 hücre/kuyucuk ve inkübasyon süresi olarak 24 saat belirlendi (Şekil 17).



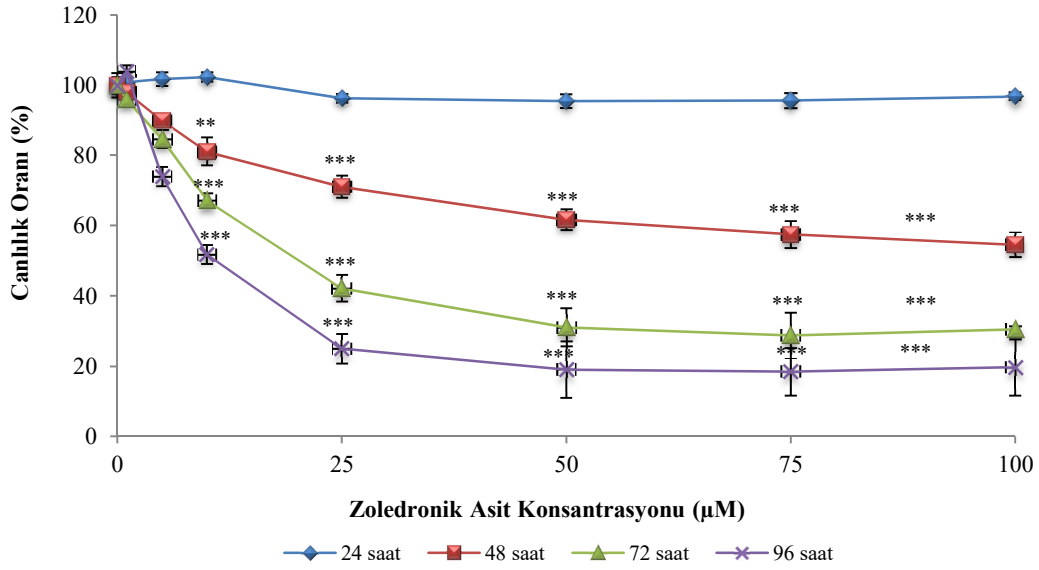
Nonlin fit		A
		Data Set-A
		Y
1	log(inhibitor) vs. normalized response - Va	
2	Best-fit values	
3	LogIC50	4.668
4	HillSlope	2.184
5	IC50	46547
6	Std. Error	
7	LogIC50	0.02263
8	HillSlope	0.2601
9	95% Confidence Intervals	
10	LogIC50	4.613 to 4.723
11	HillSlope	1.548 to 2.821
12	IC50	40975 to 52877
13	Goodness of Fit	
14	Degrees of Freedom	6
15	R square	0.9875
16	Absolute Sum of Squares	125.5
17	Sy.x	4.574
18	Number of points	
19	Analyzed	8

Şekil 17. D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde kaplama yoğunluğunun belirlenmesi.

#### 4.2. Zoledronik Asidin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinin çoğalmasına olan etkisi değişen dozlara (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M) maruz bırakıldıktan sonra 24, 48, 72 ve 96 saat süre ile en az dört tekrar olacak şekilde WST-1 hücre canlılık kiti kullanılarak belirlendi.

Zoledronik asidin hücre üzerine sitotoksik etkisinin belirlenebilmesi için gerçekleştirilen WST-1 hücre canlılık yöntemi sonucu elde edilen verilerle kontrol grubuna göre hücre canlılığı yüzdeleri hesaplandı. Zoledronik asit uygulanmayan (kontrol; 0  $\mu$ M ZA) örneğin canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edilerek, diğer zoledronik asit konsantrasyonlarına ait canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı. ZA ile belirtilen dozlarda 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda WST-1 canlılık analizi ile elde edilen verilerden yararlanılarak hesaplanan hücre canlılık yüzdelerini gösteren grafik Şekil 18'de, bu değerlerin istatistiksel analiz sonuçları ise Tablo 5'de verildi.



**Şekil 18.** D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinin ZA ile belirtilen dozlarda 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda hücre canlılık yüzdeleri. (\*  $0,01 \leq p < 0,05$ ; \*\*  $0,001 \leq p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) (Yüzde Canlılık =  $[\text{ABSortalama (her bir örnek)} / \text{ABSortalama (kontrol)}] \times 100$ ).

İstatistiksel analizler sonucu D-17 köpek osteosarkoma hücresi üzerine zoledronik asidin farklı dozlarının 24 saat inkübasyon süresince kontrole göre anlamlı bir sitotoksik etki göstermediği belirlendi ( $p \geq 0,05$ ).

48 saatlik inkübasyonun ardından istatistiksel analizler sonucunda  $1 \mu\text{M}$  ve  $5 \mu\text{M}$  ZA'nın elde edilen sitotoksik etkisinin kontrole göre anlamlı olmadığı ( $p > 0,05$ ) ve  $25 \mu\text{M}$  ve daha yüksek ZA konsantrasyonlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etkinin meydana geldiği belirlendi ( $p < 0,001$ ). ZA'nın  $5 \mu\text{M}$  ve  $10 \mu\text{M}$  konsantrasyonlarında 48. saatte sırasıyla %10 ve %20 gibi düşük sitotoksik etki,  $25 \mu\text{M}$  konsantrasyonunda ise %30'un üzerinde sitotoksik etki gözlemlendi.

Zoledronik asit D-17 köpek osteosarkoma hücresine uygulandıktan 72 saat sonra 48. saate göre yaklaşık iki kat oranında sitotoksik etkiye artış gözlemlendi.  $1 \mu\text{M}$  ZA uygulanması sonucu hücrede meydana gelen sitotoksik etki ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ( $p > 0,05$ ), ZA'nın  $5 \mu\text{M}$  ve  $10 \mu\text{M}$  konsantrasyonlarında sırasıyla %15 ve %33 düzeyinde;  $25$ ,  $50$  ve  $75 \mu\text{M}$  ZA'da ise sırasıyla %58, %68, %73 düzeyinde sitotoksik etki saptandı ve sonuçlar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,001$ ). Ayrıca

hücreye 50 µM, 75 µM ve 100 µM ZA uygulanması ise doza bağlı olarak benzer sitotoksik etki oluşurken bu etki kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıydı.

Hücreye farklı dozlarda ZA uygulamasının 96 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilen veriler incelendiğinde sitotoksik etkinin büyük ölçüde arttığı belirlendi. Sonuçlar kontrole göre değerlendirildiğinde ZA'nın 1 µM uygulamasının istatistiksel olarak anlamsız olduğu fakat uygulanan diğer tüm konsantrasyonların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ( $p<0,001$ ). ZA'nın 96 saat uygulamasının ardından 5 µM ve 10 µM konsantrasyonlarında sırasıyla %26 ve %48 sitotoksik etki saptanırken, 25, 50, 75 ve 100 µM konsantrasyonlarında ise sırasıyla %75, %81, %81,5 ve %80,5 olarak hesaplandı. Veriler incelendiğinde 10 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücre çoğalmasını %50'nin üzerinde azalttığı gözlemlendi.

**Tablo 5.** Zoledronik asidin doz ve süreye bağlı olarak D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinin canlılığına etkisi.

Zoledronik Asit Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	24 saat			48 saat			72 saat			96 saat		
	% Canlılık $\bar{X} \pm S_x$	x	Önemlilik	% Canlılık $\bar{X} \pm S_x$	x	Önemlilik	% Canlılık $\bar{X} \pm S_x$	x	Önemlilik	% Canlılık $\bar{X} \pm S_x$	x	Önemlilik
<b>Kontrol</b>	100.00 $\pm$ 0.016	a		100.00 $\pm$ 0.029	a		100.00 $\pm$ 0.019	a		100.00 $\pm$ 0.030	a	
<b>1</b>	100.88 $\pm$ 0.019	a	p>0.05	98.08 $\pm$ 0.007	ab	p>0.05	96.04 $\pm$ 0.008	a	p>0.05	103.84 $\pm$ 0.026	a	p>0.05
<b>5</b>	101.80 $\pm$ 0.013	a	p>0.05	89.90 $\pm$ 0.008	bc	*	84.61 $\pm$ 0.026	b	***	73.89 $\pm$ 0.031	b	***
<b>10</b>	102.33 $\pm$ 0.009	a	p>0.05	81.01 $\pm$ 0.027	c	**	67.04 $\pm$ 0.016	c	***	51.73 $\pm$ 0.021	c	***
<b>25</b>	96.33 $\pm$ 0.008	a	p>0.05	71.01 $\pm$ 0.019	d	***	42.18 $\pm$ 0.019	d	***	24.99 $\pm$ 0.016	d	***
<b>50</b>	95.46 $\pm$ 0.012	a	p>0.05	61.68 $\pm$ 0.015	de	***	31.02 $\pm$ 0.020	e	***	18.95 $\pm$ 0.023	d	***
<b>75</b>	95.64 $\pm$ 0.013	a	p>0.05	57.54 $\pm$ 0.018	e	***	28.70 $\pm$ 0.022	e	***	18.43 $\pm$ 0.019	d	***
<b>100</b>	96.81 $\pm$ 0.007	a	p>0.05	54.53 $\pm$ 0.019	e	***	30.45 $\pm$ 0.003	e	***	19.65 $\pm$ 0.024	d	***

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

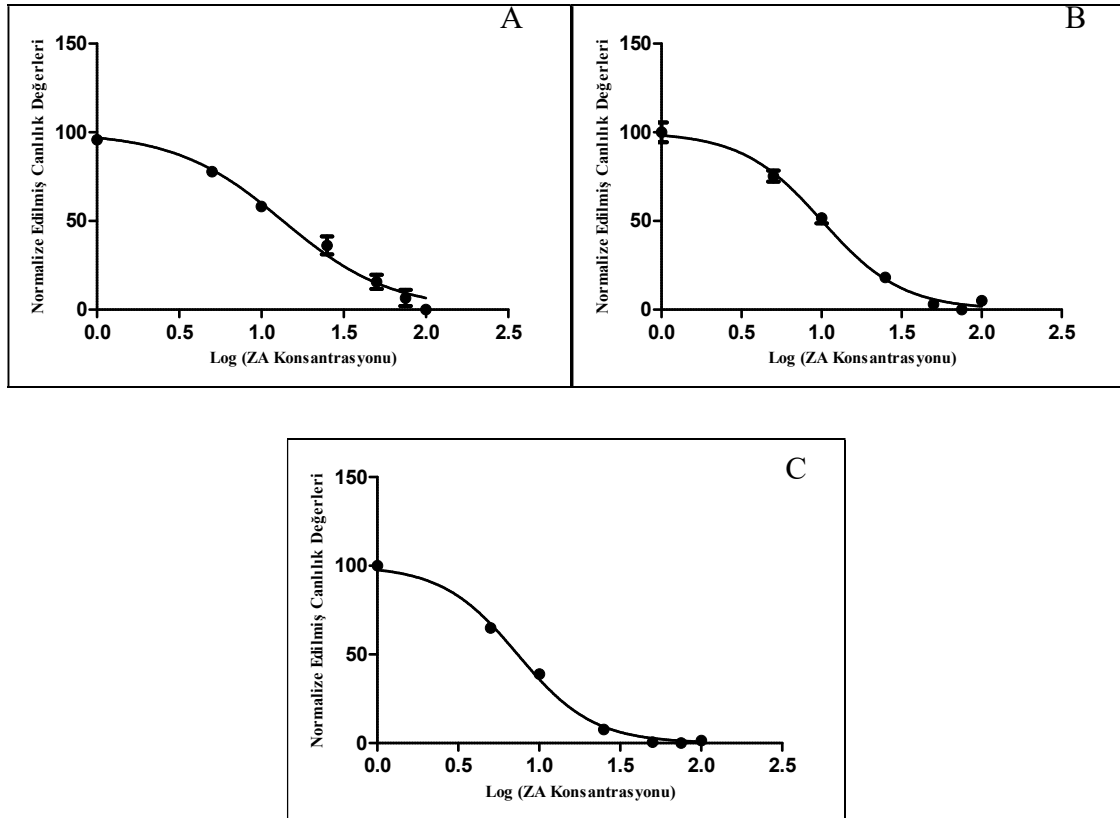
(Kontrol grubuna göre; \* 0,01 $\leq$ p<0,05; \*\* 0,001 $\leq$ p<0,01; \*\*\* p<0,001 )



Zoledronik asit uygulanan D-17 köpek osteosarkoma hüresinin WST-1 canlılık analizi ile doza bağımlı olarak elde edilen canlılık sonuçları ile GraphPad Prism 5 programı kullanılarak doz etki eğrisi (Şekil 19 A-C) oluşturuldu.

Ardından canlılık analizi sonucu hesaplanan sitotoksosite yüzdeleri ile her inkübasyon süresi (48 saat, 72 saat, 96 saat) için CompuSyn 1.0 (ComboSyn Inc., Paramus, NJ, USA) programı kullanılarak büyümenin %50 azaldığı IC<sub>50</sub> değeri hesaplandı.

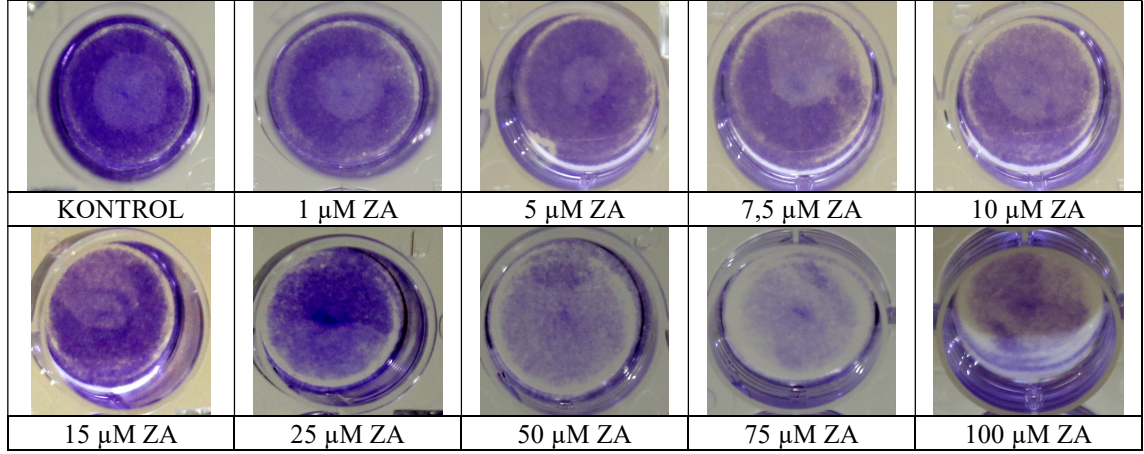
D-17 köpek osteosarkoma hücre hattı üzerine uygulanan ZA'nın IC<sub>50</sub> değeri 48., 72. ve 96. saat için sırası ile 82,50 µM, 26,06 µM ve 17,60 µM olarak hesaplandı.



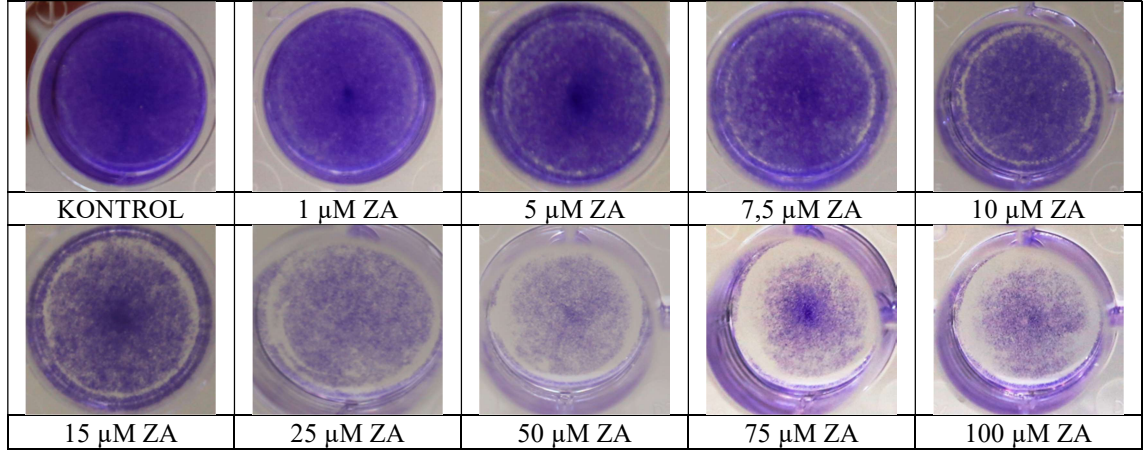
Şekil 19. Zoledronik asit dozlarına bağılı D-17 köpek osteosarkoma hüresinin canlılık grafikleri (A: 48 saat, B: 72 saat, C: 96 saat).

#### 4.3. Zoledronik Asidin D-17 Köpek Osteosarkoma Hücre Hattı Üzerine Koloni Oluşturabilme Yeteneklerine Etkisi

D-17 Köpek Osteosarkoma hücre hattına uygulanan ZA'nın farklı doz ve inkübasyon sürelerinin (48, 72 saat) koloni oluşturabilme yeteneği üzerine olan etkileri kristal violet boyamasının ardından görüntülünerek, sonuçlar Şekil 20 ve Şekil 21'de verildi.



**Şekil 20.** Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında 48 saat inkübasyon süresinde hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneği üzerine etkisi.

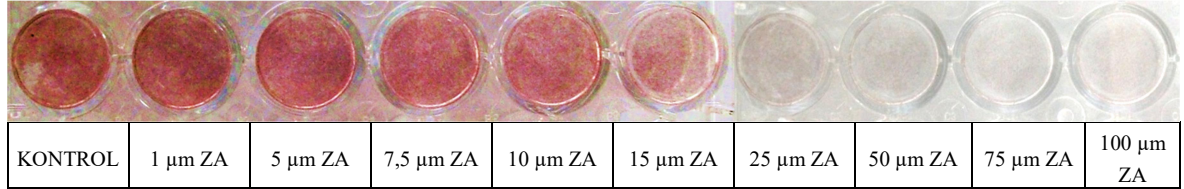


**Şekil 21.** Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında 72 saat inkübasyon süresinde hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneği üzerine etkisi.

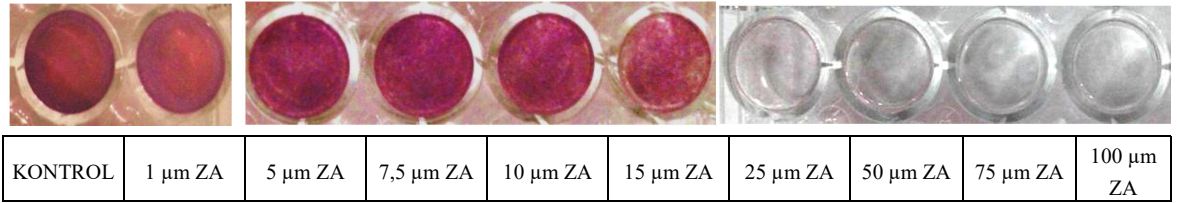
D-17 köpek osteosarkoma hücrelerine uygulanan zoledronik asidin doza bağlı olarak hücre üzerinde sitotoksik etki artışıyla hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin azaldığı gözlemlendi. Düşük dozlarda (1 µM, 5 µM, 7,5 ve 10 µM) kontrol grubuna kıyasla sitotoksik etkinin düşük olduğu, 15 µM konsantrasyonunda ise gözle görülür bir sitotoksik etkinin meydana geldiği görüldü. Zoledronik asidin yüksek dozları (25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM) kontrol ile karşılaştırıldığında hücre canlılığının ve koloni oluşumunun anlamlı ölçüde azaldığı saptandı.

#### 4.4. Zoledronik Asidin Mineralizasyona Etkisi

Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattına farklı konsantrasyon ve sürelerde hücrelerin mineralizasyonuna olan etkisi Alizarin kırmızısı S boyaması yapıldıktan sonra görüntülenerek, sonuçlar Şekil 22 ve Şekil 23’de verildi.



**Şekil 22.** D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında 48 saat inkübasyon süresince zoledronik asidin hücrelerin mineralizasyona etkisi.



**Şekil 23.** D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında 72 saat inkübasyon süresince zoledronik asidin hücrelerin mineralizasyona etkisi.

D-17 köpek osteosarkoma hücrelerine farklı dozlarda uygulanan zoledronik asidin 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası sonuçları incelendiğinde düşük dozlarda (1 µM, 5 µM ve 7,5 µM) kontrol grubuna kıyasla mineral içeriğinin daha yüksek olduğu 10 ve 15 µM konsantrasyonlarının ise kontrole kıyasla mineral içeriğinin daha az olduğu ve doza bağlı olarak azaldığı belirlendi. Zoledronik asidin yüksek dozlarında (25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM) kontrol ile karşılaştırıldığında mineral içeriğinin anlamlı ölçüde azaldığı saptandı.

#### 4.5. Zoledronik Asidin Alkale Fosfat (ALP) Aktivitesine Olan Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda zoledronik asit uygulanan D-17 köpek osteosarkoma hücre besiyerinde ekstraselüler, hücrelerin liziz edilmesi sonucu elde edilen hücre lizatlarında ise intraselüler ALP aktiviteleri belirlendi. Her uygulanan ZA konsantrasyonu için 3 tekrarlı olacak şekilde elde edilen sonuçlar U/L cinsinden hesaplanarak, ortalamaları ve standart hataları bulundu. Ekstraselüler ALP aktivite tayini sonucu elde edilen veriler Tablo 6 ve Şekil 24’de intraselüler ALP aktivitesine ait veriler ise Tablo 7 ve Şekil 25’de verildi.

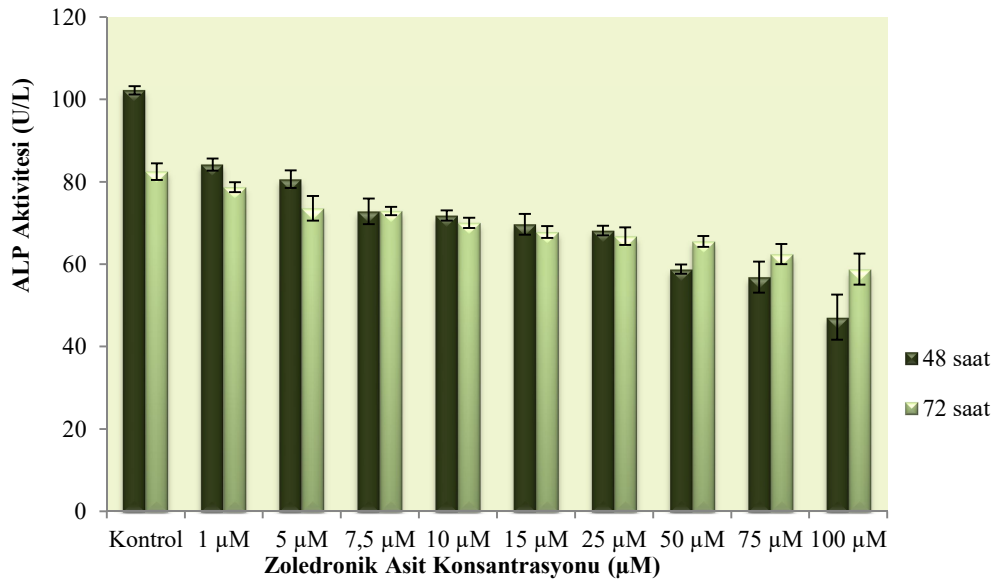
Farklı dozlarda ZA uygulanan D-17 köpek osteosarkoma hücresinin 48 saat ve 72 saat inkübasyonun ardından kontrole göre doz artışına bağlı olarak ekstraselüler ALP aktivitesinin azalışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,001$ ).

**Tablo 6.** D-17 köpek osteosarkoma hücrelerine uygulanan ZA'nın konsantrasyona bağlı 48. ve 72. saatte ekstraselüler ALP aktivitesine olan etkisi.

Zoledronik Asit Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	48. saat			72. saat		
	Hacimsel Aktivite ( $\text{U/mL}$ ) $\bar{X} \pm S_x$	x	Önemlilik	Hacimsel Aktivite ( $\text{U/mL}$ ) $\bar{X} \pm S_x$	x	Önemlilik
<b>Kontrol</b>	102.2 $\pm$ 1.00	a		82.44 $\pm$ 2.00	a	
<b>1</b>	84.17 $\pm$ 1.45	b	***	78.68 $\pm$ 1.20	b	**
<b>5</b>	80.62 $\pm$ 2.13	c	***	73.56 $\pm$ 3.00	c	***
<b>7.5</b>	72.84 $\pm$ 3.12	d	***	72.92 $\pm$ 1.00	c	***
<b>10</b>	71.82 $\pm$ 1.25	d	***	70.01 $\pm$ 1.23	d	***
<b>15</b>	69.67 $\pm$ 2.56	de	***	67.79 $\pm$ 1.45	de	***
<b>25</b>	68.13 $\pm$ 1.17	e	***	66.79 $\pm$ 2.12	e	***
<b>50</b>	58.78 $\pm$ 1.12	f	***	65.52 $\pm$ 1.35	e	***
<b>75</b>	56.85 $\pm$ 3.79	g	***	62.44 $\pm$ 2.47	f	***
<b>100</b>	47.13 $\pm$ 5.48	h	***	58.78 $\pm$ 3.78	g	***

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

(Kontrol grubuna göre; \*  $0,01 \leq p < 0,05$ ; \*\*  $0,001 \leq p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )



**Şekil 24.** D-17 köpek osteosarkoma hücrelerine uygulanan ZA'nın konsantrasyonuna bağlı 48. ve 72. saatte ekstraselüler ALP aktivitesine olan etkisi.

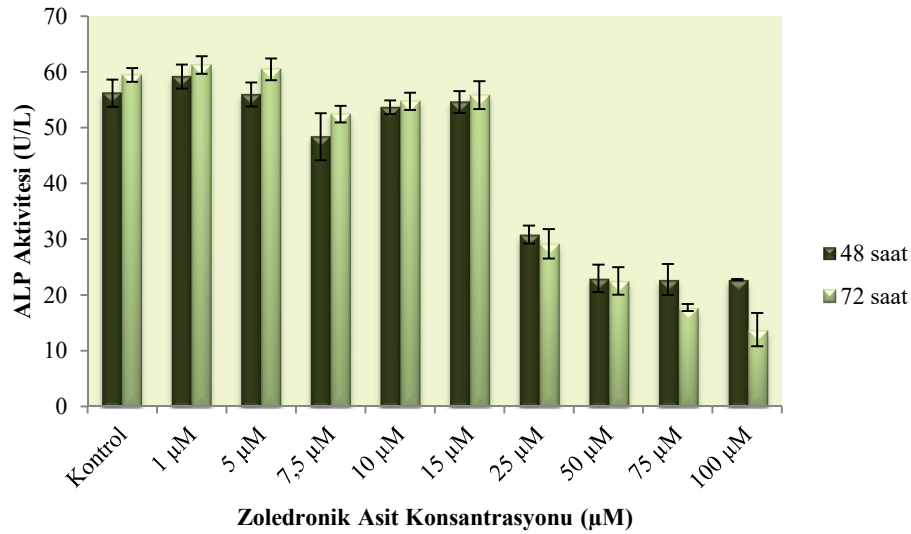
Kontrol grubuna göre yüksek dozda (25, 50, 75 ve 100  $\mu\text{M}$ ) ZA uygulanan D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde intraselüler ALP aktivitesinde doza bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı ciddi bir azalış gözlemlendi ( $p < 0,001$ ).

**Tablo 7.** D-17 köpek osteosarkoma hücresine uygulanan ZA'nın konsantrasyona bağlı 48. ve 72. saatte intraselüler ALP aktivitesine olan etkisi.

Zoledronik Asit Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	48. saat			72. saat		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) $\bar{X} \pm S_x$	x	Önemlilik	Hacimsel Aktivite (U/mL) $\bar{X} \pm S_x$	x	Önemlilik
<b>Kontrol</b>	56.18 $\pm$ 2.46	a		59.44 $\pm$ 1.23	a	
<b>1</b>	59.15 $\pm$ 2.16	b	*	61.23 $\pm$ 1.56	a	$p > 0.05$
<b>5</b>	55.93 $\pm$ 2.16	a	$p > 0.05$	60.46 $\pm$ 1.95	a	$p > 0.05$
<b>7.5</b>	48.37 $\pm$ 4.23	c	***	52.42 $\pm$ 1.48	b	***
<b>10</b>	53.63 $\pm$ 1.23	a	$p > 0.05$	54.72 $\pm$ 1.56	c	***
<b>15</b>	54.58 $\pm$ 1.94	a	$p > 0.05$	55.82 $\pm$ 2.48	cd	**
<b>25</b>	30.83 $\pm$ 1.59	d	***	29.18 $\pm$ 2.64	d	***
<b>50</b>	22.97 $\pm$ 2.49	e	***	22.50 $\pm$ 2.49	d	***
<b>75</b>	22.74 $\pm$ 2.79	e	***	17.73 $\pm$ 0.64	e	***
<b>100</b>	22.71 $\pm$ 0.12	e	***	13.76 $\pm$ 2.98	f	***

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

(Kontrol grubuna göre; \*  $0,01 \leq p < 0,05$ ; \*\*  $0,001 \leq p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  )



**Şekil 25.** D-17 köpek osteosarkoma hücresine uygulanan ZA'nın konsantrasyonuna bağlı 48. ve 72. saatte intraselüler ALP aktivitesine olan etkisi.

#### 4.6. Zoledronik Asidin Hücrelerin Migrasyonuna Olan Etkisi

D-17 köpek osteosarkoma hücre hattı üzerine uygulanan zoledronik asidin (5; 7,5; 10; 15  $\mu\text{M}$ ) farklı dozlarının hücre migrasyonuna (hücrelerin göç etme potansiyeline) olan etkileri yara iyileşmesi yöntemi kullanılarak değerlendirildi. ZA uygulanmasından 48 ve 72 saat sonra D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında hücrelerin yara iyileşmesi sonuçları Şekil 26 ve 27 ile Tablo 8’de verildi.

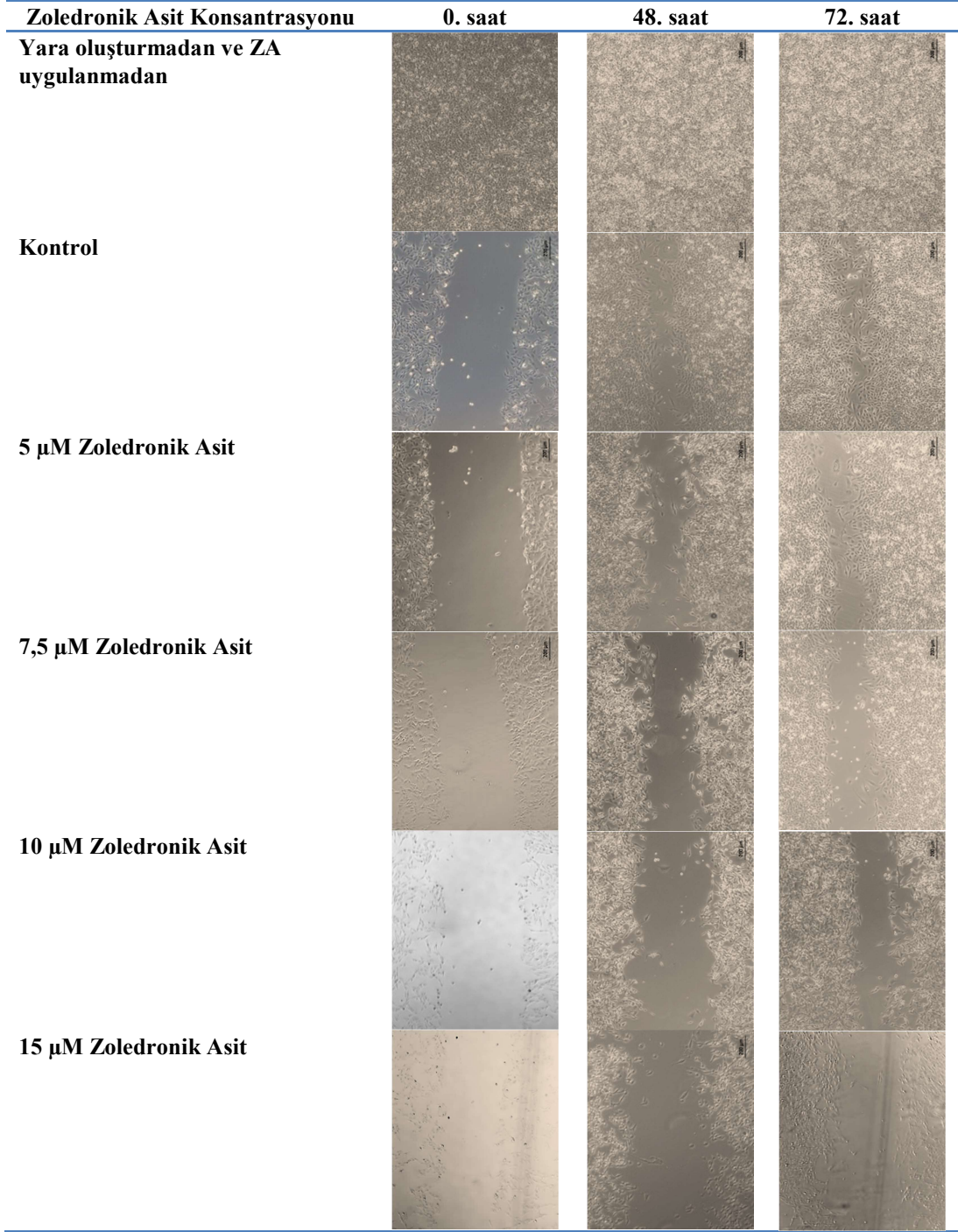
Hücreye uygulanan 5  $\mu\text{M}$  ZA’nın hücrenin göç etme potansiyeli üzerine etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandığında, kontrol grubunda oluşturulan yaralar 48 ve 72. saatlerde sırasıyla %65 ve 85’i kapanırken, 5  $\mu\text{M}$  ZA’nın uygulandığı hücrelerde %55 ve 74’ü kapandı. Veriler değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre 5  $\mu\text{M}$  ZA’nın hücrenin migrasyonu üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı belirlendi.

7,5  $\mu\text{M}$  ZA uygulanan hücrede oluşturulan yaranın ilk 48 saatte %33’ünün kapandığı, 48. ve 72. saatler arasında ise hücreler tarafından kapanan mesafenin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ( $p>0,05$ ).

Zoledronik asidin 10 ve 15  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları uygulanan hücrelerde ilk 48 saatte 0. dakikaya göre hücrelerin göç ederek kapladığı mesafe istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0,05$ ). Böylece 10 ve 15  $\mu\text{M}$  zoledronik asidin hücrenin göç etme potansiyelini önleyerek oluşturulan yaranın kapanmasını inhibe ettiği belirlendi. Kontrol grubuna göre 72. saatte kapanma mesafesinden yararlanarak 7,5  $\mu\text{M}$  ZA’nın 48. saatten sonra hücre göçünü etkilediği, 10 ve 15  $\mu\text{M}$  ZA’nın ise hücrelerin göçünü büyük ölçüde inhibe ettiği saptandı.

Sonuç olarak, zoledronik asidin 10 ve 15  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında 48. ve 72. saat inkübasyon sürelerinde hücrenin migrasyonunu inhibe edici etkisi belirgin bir şekilde gözlemlendi. D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinin migrasyonunu inhibe eden en etkin dozun 10 ve 15  $\mu\text{M}$  ZA olduğu belirlendi.





**Şekil 26.** Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattına doz ve zamana bağlı olarak hücrelerin göç etme potansiyeline etkisi.

**Tablo 8.** Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattına doz ve zamana bağlı olarak hücrelerin göç etme potansiyeline etkisi.

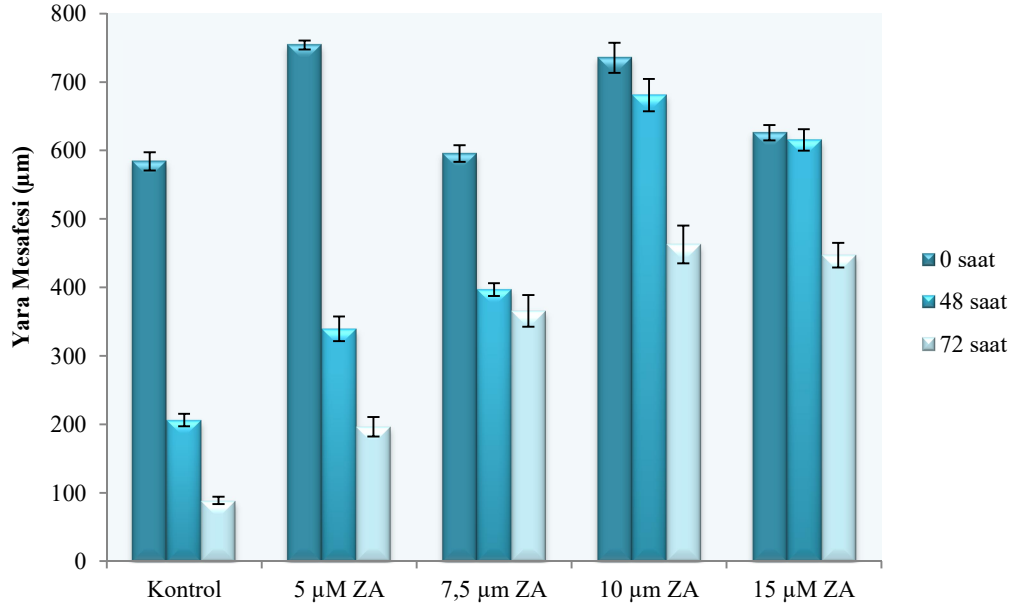
Zoledronik Asit Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	0. saat		48. saat			72. saat				
	Yara Mesafesi ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm S_x$	x	Yara Mesafesi ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm S_x$	x	Önemlilik	Yaranın Kapanma Oranı (%)	Yara Mesafesi ( $\mu\text{m}$ ) $\bar{X} \pm S_x$	x	Önemlilik	Yaranın Kapanma Oranı (%)
<b>Kontrol</b>	584.07 $\pm$ 13.30	a	206.22 $\pm$ 8.95	b		64.69	88.78 $\pm$ 5.32	c		84.80
<b>5</b>	753.91 $\pm$ 6.43	a	339.51 $\pm$ 18.06	b	***	54.97	196.53 $\pm$ 14.25	c	***	73.93
<b>7.5</b>	595.44 $\pm$ 12.01	a	396.79 $\pm$ 9.31	b	***	33.36	365.63 $\pm$ 23.00	b	***	38.59
<b>10</b>	735.42 $\pm$ 22.09	a	680.80 $\pm$ 23.45	a	p>0.05	7.43	462.56 $\pm$ 27.62	b	***	37.10
<b>15</b>	625.86 $\pm$ 11.14	a	615.45 $\pm$ 15.68	a	p>0.05	1.66	447.00 $\pm$ 18.06	b	***	28.58

Aynı satırda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

(Zoledronik asit uygulanan grupların 0. saat verilerine göre; \* 0,01 $\leq$ p<0,05; \*\* 0,001 $\leq$ p<0,01; \*\*\* p<0,001 )

Yaranın kapanma oranı hesaplanırken 0. saatte oluşturulan yaranın mesafesi %100 kabul edilerek, 48. ve 72. saatlerde hücrelerin göç ettiği mesafeler üzerinden hesaplanmıştır ((0. saat yara mesafesi  $\mu\text{m}$ -48. veya 72. saat yara mesafesi  $\mu\text{m}$ )/0. saat yara mesafesi  $\mu\text{m}$ )





**Şekil 27.** Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattına doz ve zamana bağlı olarak hücrelerde oluşturulan yaraların mesafeleri.

#### 4.7. Zoledronik Asidin D-17 (CCL-183) Köpek Osteosarkoma Hücreleri Üzerinde Apoptotik Etkileri

##### 4.7.1. Apoptotik DNA Fragmentlerinin ELİSA Yöntemi ile Kantitatif Analizi

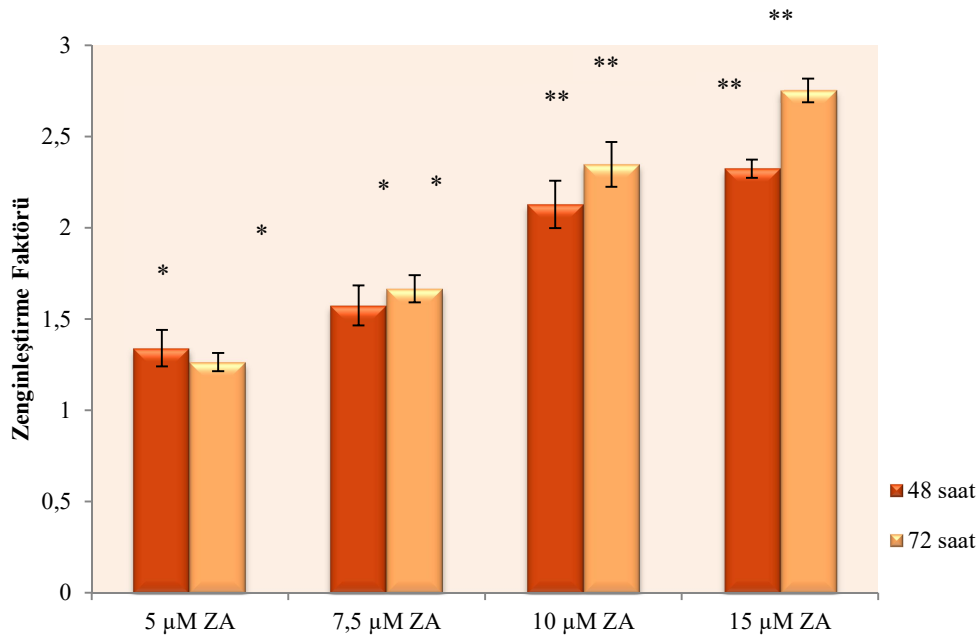
Zoledronik asit uygulaması ile D-17 köpek osteosarkoma hücresinde meydana gelen hücre ölümünün apoptoza bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediği DNA fragmentasyon analizi ile belirlendi.

Pozitif kontrol olarak kabul edilen zoledronik asit uygulanmayan hücreler ile 5; 7,5; 10; 15 µM zoledronik asit uygulanan hücrelerinin 48 ve 72 saat inkübasyonun ardından apoptotik DNA kırıklarının ELİSA sonuçları elde edildi. (DNA kırıklarını ifade eden mono ve oligo-nükleozom zenginleşmesi ZA uygulanmayan (kontrol hücreleri) örnek için 1,00 kabul edilerek, diğer örneklere ait zenginleşme faktörleri oransal olarak hesaplandı.) Elde edilen veriler Şekil 28’de özetlendi. Grafikte X eksenini zoledronik asit konsantrasyonlarını, Y eksenini ise her bir zoledronik asit konsantrasyonunun uygulandığı örneklerden elde edilen ortalama absorbans değerlerinin zoledronik asit uygulanmayan pozitif kontrolün ortalama absorbans değerine oranı ile hesaplanmış zenginleşme faktörünü göstermektedir.

Zoledronik asit uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerine göre ZA uygulaması yapılan hücrelerde DNA kırıklarının miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Şekil 28’de

görüldüğü gibi D-17 köpek osteosarkoma hücresine uygulanan 5  $\mu$ M zoledronik asit uygulamasında DNA kırıklarının miktarı zoledronik asit uygulanmayan kontrol hücrelerine kıyasla sırasıyla 1,34 kat artarken, 7,5  $\mu$ M ZA uygulamasında ise 1,57 kat arttığı belirlendi ( $p<0,05$ ). D-17 köpek osteosarkoma hücresine 10 $\mu$ M ve 15  $\mu$ M zoledronik asit uygulamasında ise DNA fragmentasyonun da zoledronik asit uygulanmayan kontrol grubuna göre sırasıyla 2,13 ve 2,32 kat artış meydana geldi ( $p<0,01$ ). D-17 köpek osteosarkoma hücresine uygulanan tüm ZA konsantrasyonları arasındaki farklarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Sonuç olarak zoledronik asidin etkisiyle hücrede apoptoz kaynaklı DNA kırıklarında doza ve süreye bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. WST-1 hücre canlılığı verileri ile birlikte değerlendirildiğinde zoledronik asidin düşük dozlarında sitotoksik etki oluşturmadan apoptoza neden olduğu belirlendi.

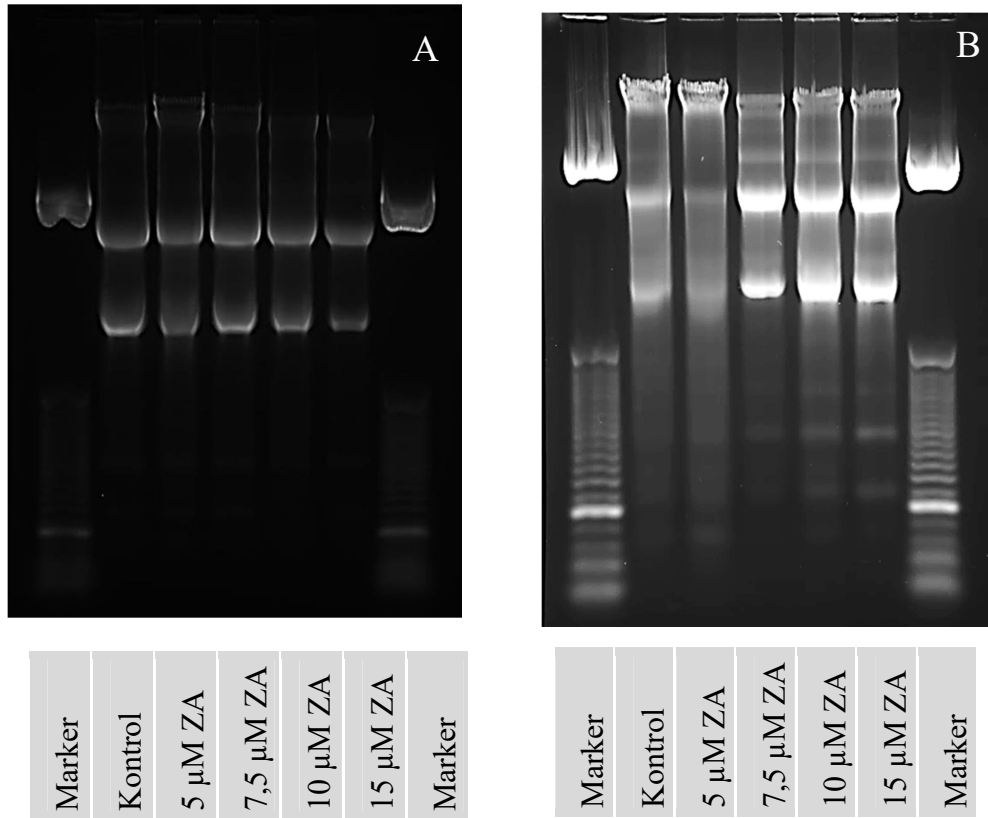


**Şekil 28.** D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde zoledronik asidin apoptotik etkisinin DNA fragmentasyonu analizi (Zenginleşme Faktörü = ABS ortalama (her bir örnek) / ABS ortalama (kontrol)); (Kontrol grubuna göre; \*  $0,01 \leq p < 0,05$ ; \*\*  $0,001 \leq p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.7.2. Apoptotik DNA Fragmentasyonun Ekstraksiyonu ve Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi

Apoptotik hücrelerde DNA kırıklarının meydana gelmesi ile sitoplazmalarında mono- ve oligonükleozomların artışı plazma membran bütünlüğünün bozulmasından birkaç saat önce meydana gelir. ZA uygulanması ile apoptozun indüklenmesi sonucu meydana gelen DNA kırıkları agaroz jelde ayrılıp, ekstrakte edildikten sonra merdiven şeklinde (DNA ladder) bant görüntüsü alınarak belirlendi.

Zoledronik asit uygulanmayan kontrol grubu ile birlikte hücreye 5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  ve 15  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında ZA uygulamasının 48 ve 72 saat inkübasyon süresinin ardından izole edilen DNA kırıkları agaroz jel elektrofrezisi ile ayrılıp, sonuçlar ultraviyole ışık altında değerlendirildi (Şekil 29).



**Şekil 29.** D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinin zoledronik asit ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonrasında görülen DNA fragmentasyonunun %1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. marker: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık belirteci. A: 48 saat inkübasyon sonrası jel görüntüsü B: 72 saat inkübasyon sonrası jel görüntüsü.

Apoptoza bağı hücre ölümünün meydana geldiğini belirleyen ELISA yöntemi ile elde edilen verilerin, DNA kırıklarının agaroz jel elektroforezinde elde edilen görüntülerle uyumlu olduğu belirlendi. Böylece deney sonucunda ZA'nın kontrole göre doz ve süreye bağı olarak DNA kırıklarında meydana gelen artış doğrulandı.

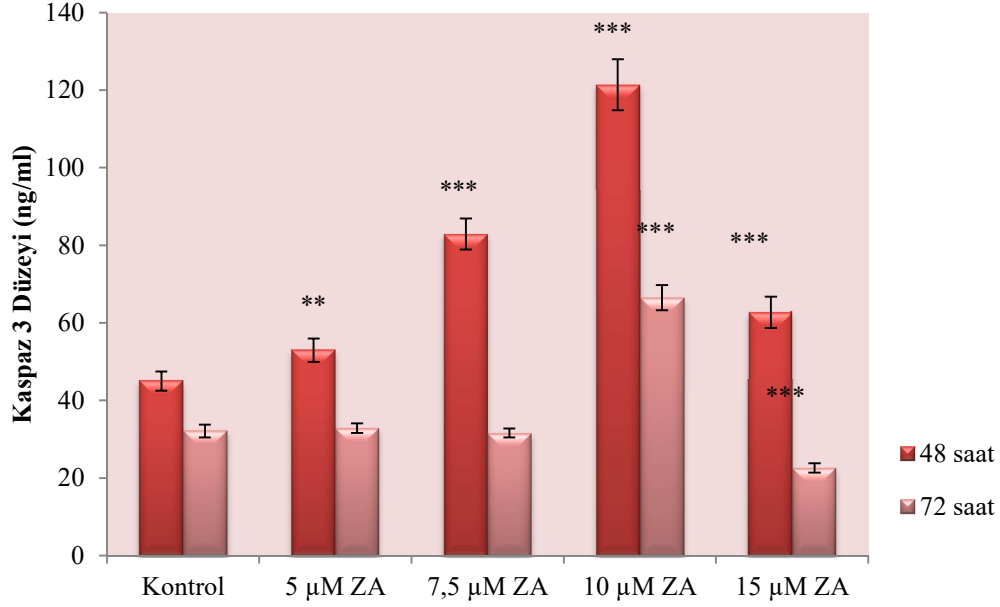
Zoledronik asit uygulanan (48 ve 72 saat) D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinden elde edilen DNA kırıklarının %1,5'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu elde edilen görüntüler incelendiğinde, 48. saatte DNA'ların parçalı band görüntüsü meydana gelen apoptozun başlangıç evresinde olduğunu düşündürmektedir. Uygulamadan 72 saat sonra elde edilen DNA kırıklarının görüntüsü incelendiğinde ise doza bağı olarak DNA kırıklarının arttığı gözlemlendi.

#### **4.7.3. D-17 (CCL-183) Köpek Osteosarkoma Hücre Hattında Zoledronik Asidin Kaspaz 3, 8, 9 Aktivitesine Olan Etkileri**

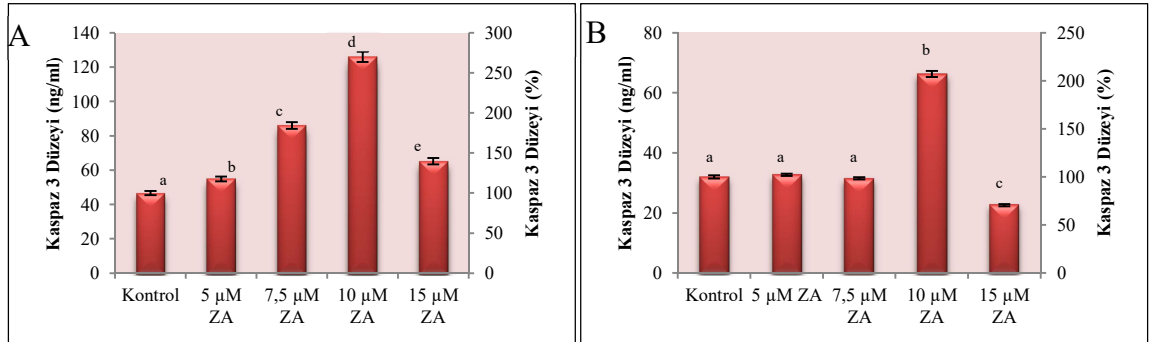
Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücresine olan apoptotik etkileri kaspaz 3, 8, 9 düzeyleri üzerinden belirlendi. D-17 köpek osteosarkoma hücre hattına 5; 7,5; 10; 15  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında ZA uygulandıktan 48 ve 72 saat sonra hücre kültürleri için uygun köpek spesifik ticari ELISA kiti ile kaspaz 3, 8 ve 9 miktarları, oluşturulan standart grafiklerinden yararlanılarak ng/ml cinsinden hesaplandı. Tekrarlanan sonuçların ortalaması alınarak elde edilen sonuçlar kaspaz 3 için Şekil 30 ve 31'de, kaspaz 8 için Şekil 32'de, kaspaz 9 için Şekil 33 ve 34'de verildi.

D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde 48 saat inkübasyonun ardından 5  $\mu\text{M}$  ZA uygulamasında kaspaz 3 miktarında kontrole göre %17 civarında düşük bir artış gözlenirken, 7,5 ve 10  $\mu\text{M}$  ZA konsantrasyonlarında sırasıyla %84 ve %170 artış saptandı. Ancak 15  $\mu\text{M}$  ZA uygulamasında kaspaz 3 düzeyindeki artışın, kontrol grubuna göre %40 civarında olduğu belirlendi.

Zoledronik asit uygulamasından 72 saat sonra D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde kaspaz 3 miktarı 5 ve 7,5  $\mu\text{M}$  ZA konsantrasyonlarında 48. saate göre azalırken kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). Hem 10  $\mu\text{M}$  ZA uygulamasında hem de 15  $\mu\text{M}$  ZA uygulamasında kontrol grubuna göre artış gözlenirken, 48. saate göre bir azalma belirlendi.

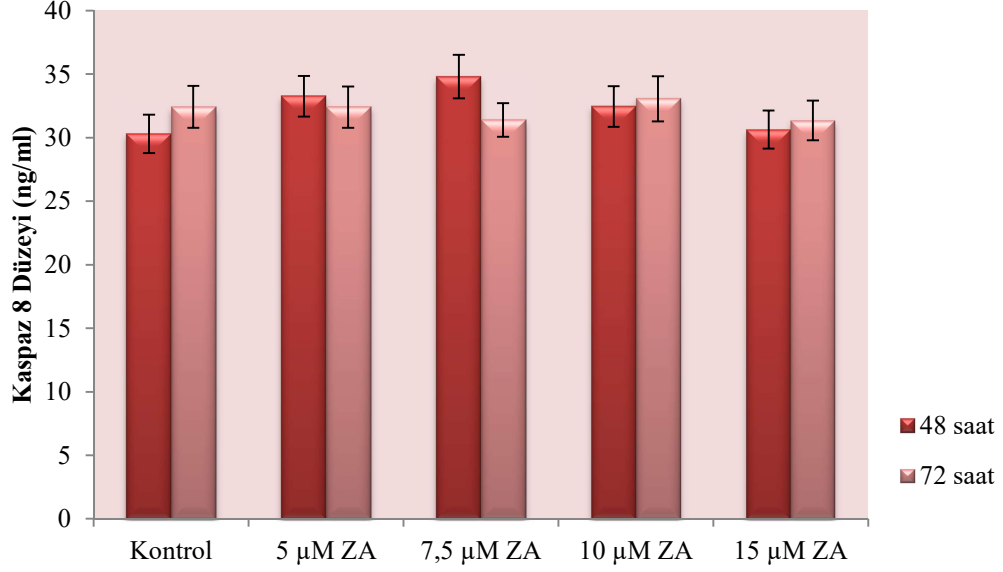


**Şekil 30.** Zoledronik asidin farklı doz ve inkübasyon süresine bağlı D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde kaspaz 3 düzeyleri üzerine etkisi (Kontrol grubuna göre; \*  $0,01 \leq p < 0,05$ ; \*\*  $0,001 \leq p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Şekil 31.** Zoledronik asit dozlarına bağlı kaspaz 3 düzeylerinin değişim grafikleri (A: 48 saat, B: 72 saat). Farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

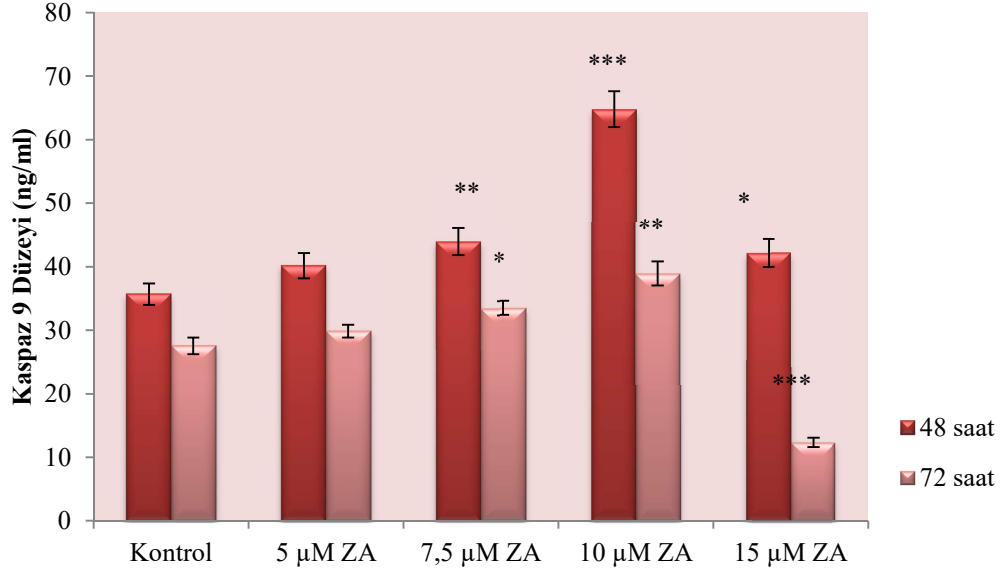
D-17 köpek osteosarkoma hücre hattına farklı dozlarda zoledronik asit uygulaması ile kaspaz 8 düzeylerindeki değişim incelendiğinde hem 48 hemde 72 saatlik inkübasyon sonunda bütün ZA doz grupları ile kontrol grubu aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ( $p > 0,05$ ).



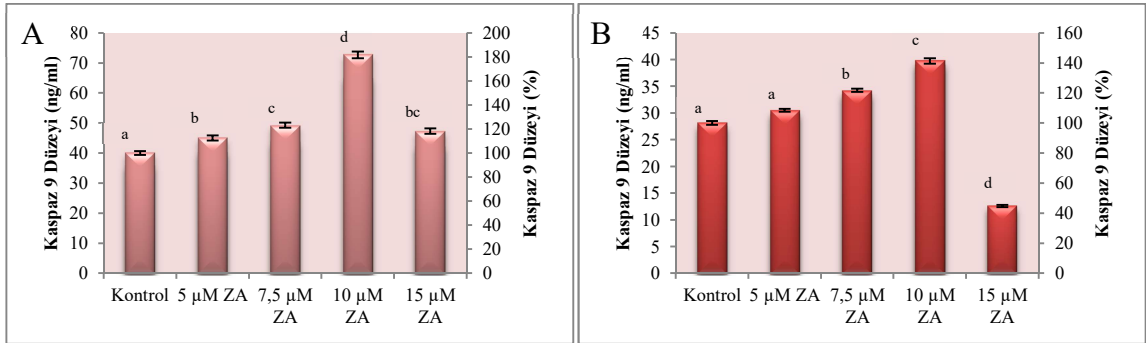
**Şekil 32.** Zoledronik asidin farklı doz ve inkübasyon süresine bağlı D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde kaspaz 8 düzeyleri üzerine etkisi.

D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde 48 saat inkübasyonun ardından 5 ve 7,5 µM ZA konsantrasyonlarının kaspaz 9 miktarlarında kontrole göre sırasıyla %12,5 ve %23'lük düşük bir artış gözlenirken, 10 µM ZA uygulamasında %81'lik artış belirlendi. Ancak 15 µM ZA uygulamasında kaspaz 9 düzeyindeki artış kontrol grubuna göre %18 civarında kaldı.

5 µM ZA uygulamasından 72 saat sonra D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde kaspaz 9 miktarındaki değişim kontrole göre istatistiksel olarak anlamsız bulundu ( $p>0,05$ ). Fakat 7,5 ve 10 µM ZA uygulamasında kaspaz 9 düzeyinde 48. saate göre azalma gözlenirken, en belirgin azalış 15 µM ZA uygulamasında belirlendi.



**Şekil 33.** Zoledronik asidin farklı doz ve inkübasyon süresine bağlı d-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde kaspaz 9 düzeyleri üzerine etkisi (Kontrol grubuna göre; \*  $0,01 \leq p < 0,05$ ; \*\*  $0,001 \leq p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

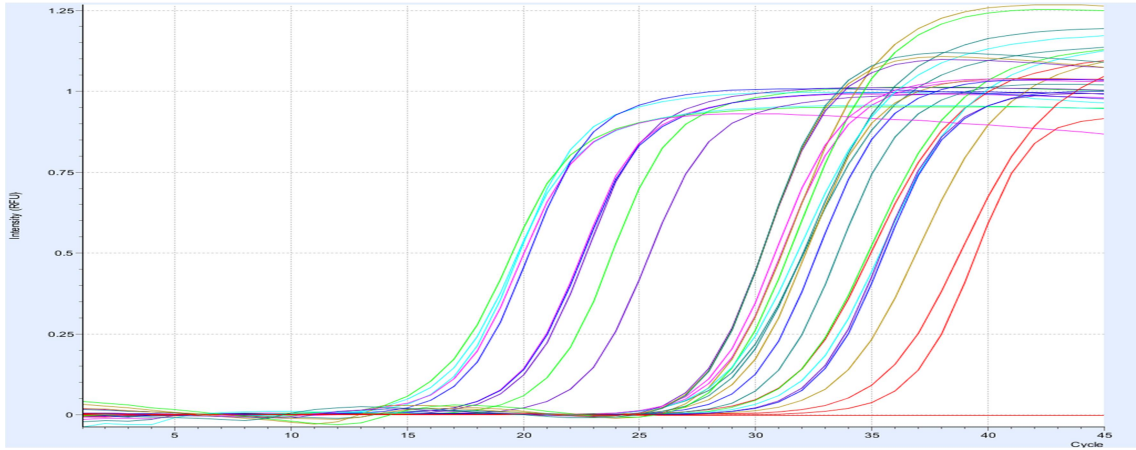


**Şekil 34.** Zoledronik asit dozlarına bağlı kaspaz 9 düzeylerinin değişim grafikleri (A: 48 saat, B: 72 saat). Farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

#### 4.7.4. Genlerin Kantitatif Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Farklı dozlarda zoledronik asit uygulamasının D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında apoptoz ile ilişkili Bax/Bcl-2 oranı, Bid ve hücrede sağkalımı ifade eden survivin geninin ifadelerinde meydana getirdiği değişimler qRT-PCR ile belirlendi. Bu nedenle zoledronik asit uygulanan ve kontrol olarak kullanılan zoledronik asit uygulanmayan hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu RNA'lardan elde edilen cDNA

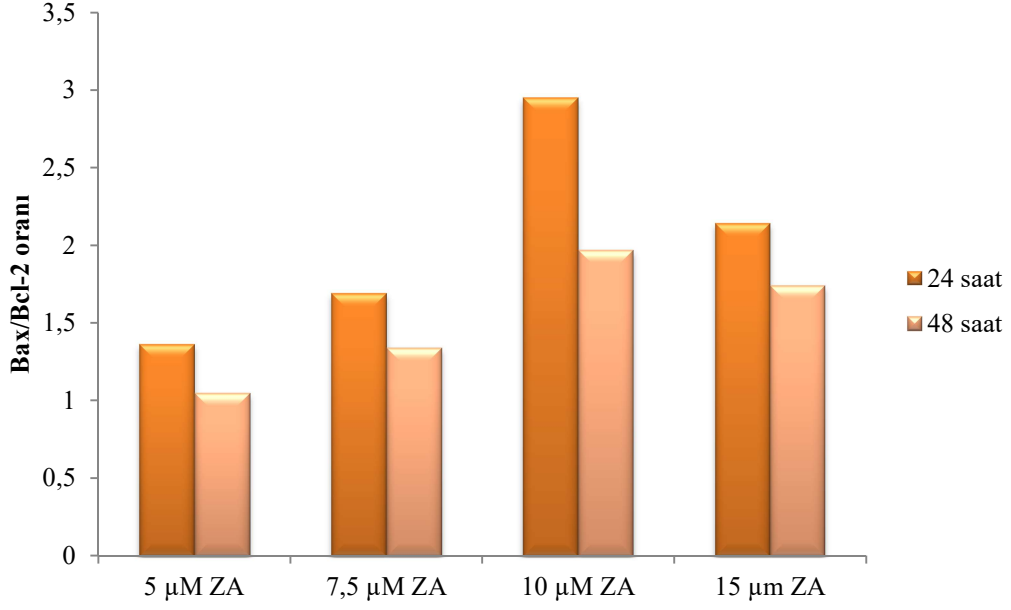
örneklerinde gen spesifik primeler yardımı ile syber green metodundan yararlanarak Light Cyclers cihazında genlerin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi gerçekleştirildi(Şekil 36). qRT-PCR çalışmasında amplifikasyon eğrilerinden elde edilen Ct'ler ile Pfaffl metoduna göre  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri hesaplanarak grafikler oluşturuldu. Zoledronik asit uygulamasına bağlı olarak apoptoz ile ilişkili Bax/Bcl-2 oranı ve bid genlerindeki ifadelerin değişimi sırasıyla Şekil 36 ve 37'de verildi. Survivin genindeki değişimler ise Şekil 38'de verildi.



**Şekil 35.** Genlerin kantitatif RT-PCR analizi sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri (yatay ekseninde genlerin Real Time PCR tepkimesine ait Ct değerleri, dikey ekseninde floresan sinyal yer almaktadır).

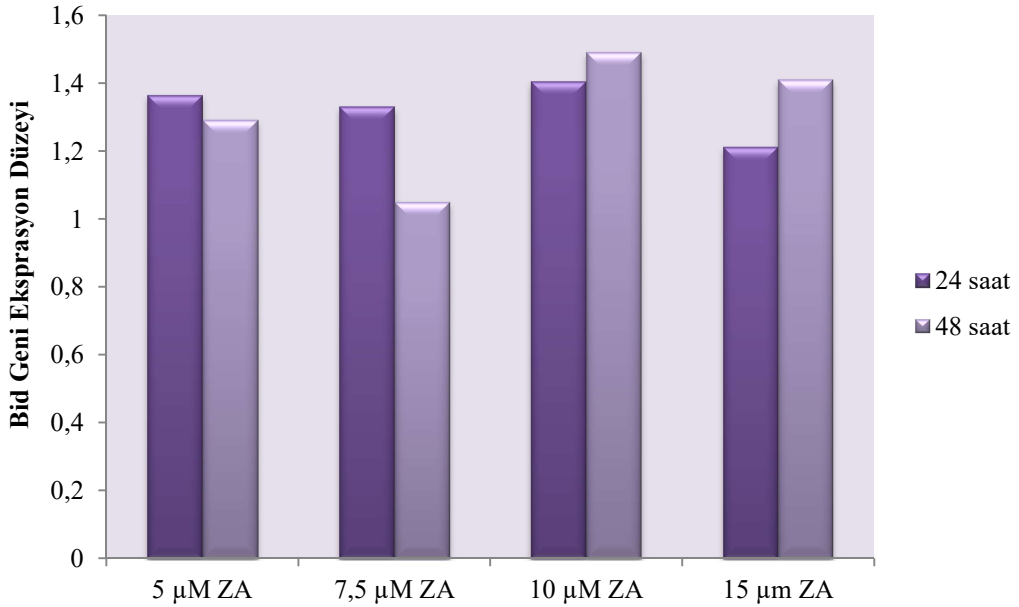
Zoledronik asit uygulanan hücrelerde Bax/Bcl-2 oranındaki değişim incelendiğinde 24. saatte 5 ve 7,5  $\mu$ M konsantrasyonlarında sırasıyla 1,36 ve 1,69 kat, 10 ve 15  $\mu$ M ZA konsantrasyonunda ise kontrol grubuna göre sırasıyla 2,95 ve 2,14 kat artış elde edildi. İnkübasyon süresine bağlı olarak 48. saatte Bax/Bcl-2 oranının 24. saatte göre tüm dozlarda azaldığı görüldü.





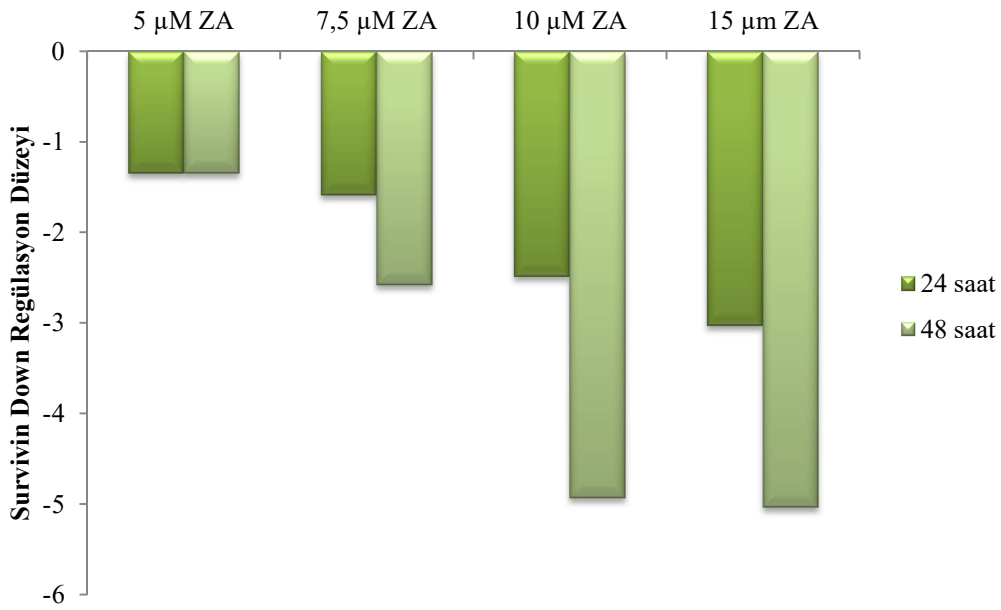
**Şekil 36.** RT-PCR sonuçlarına göre zoledronik asit uygulamasının doz ve süresiye bağlı olarak Bax/Bcl-2 oranındaki değişimi.

Kontrol grubu ile zoledronik asit uygulamaları karşılaştırıldığında doza ve süreye bağlı olarak Bid geninin ifadenme düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Böylece zoledronik asit uygulaması ile Bid geninin aktif olmadığı saptandı.



**Şekil 37.** RT-PCR sonuçlarına göre zoledronik asit uygulamasının doz ve süresiye bağlı olarak Bid geninin ifadesindeki değişim.

D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında survivin geninin kantitatif değişiminde ilk 24. saatte 5 ve 7,5  $\mu\text{M}$  ZA konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre sırasıyla 1,34 ve 1,59 kat, 10 ve 15  $\mu\text{M}$  ZA konsantrasyonunda ise sırasıyla 2,49 ve 3,02 kat azalış belirlendi. İnkübasyon süresine bağlı olarak 48. saatte survivin geninin ifadenmesinde azalmanın devam ettiği görüldü. Kontrol grubuna göre 48. saatte 5  $\mu\text{M}$  ZA'nın survivin geninin ifadenmesi üzerine bir etkisini olmadığı, 7,5, 10 ve 15  $\mu\text{M}$  ZA'nın etkisi ile sırasıyla 2,57, 4,93 ve 5,03 kat azaldığı bulundu.



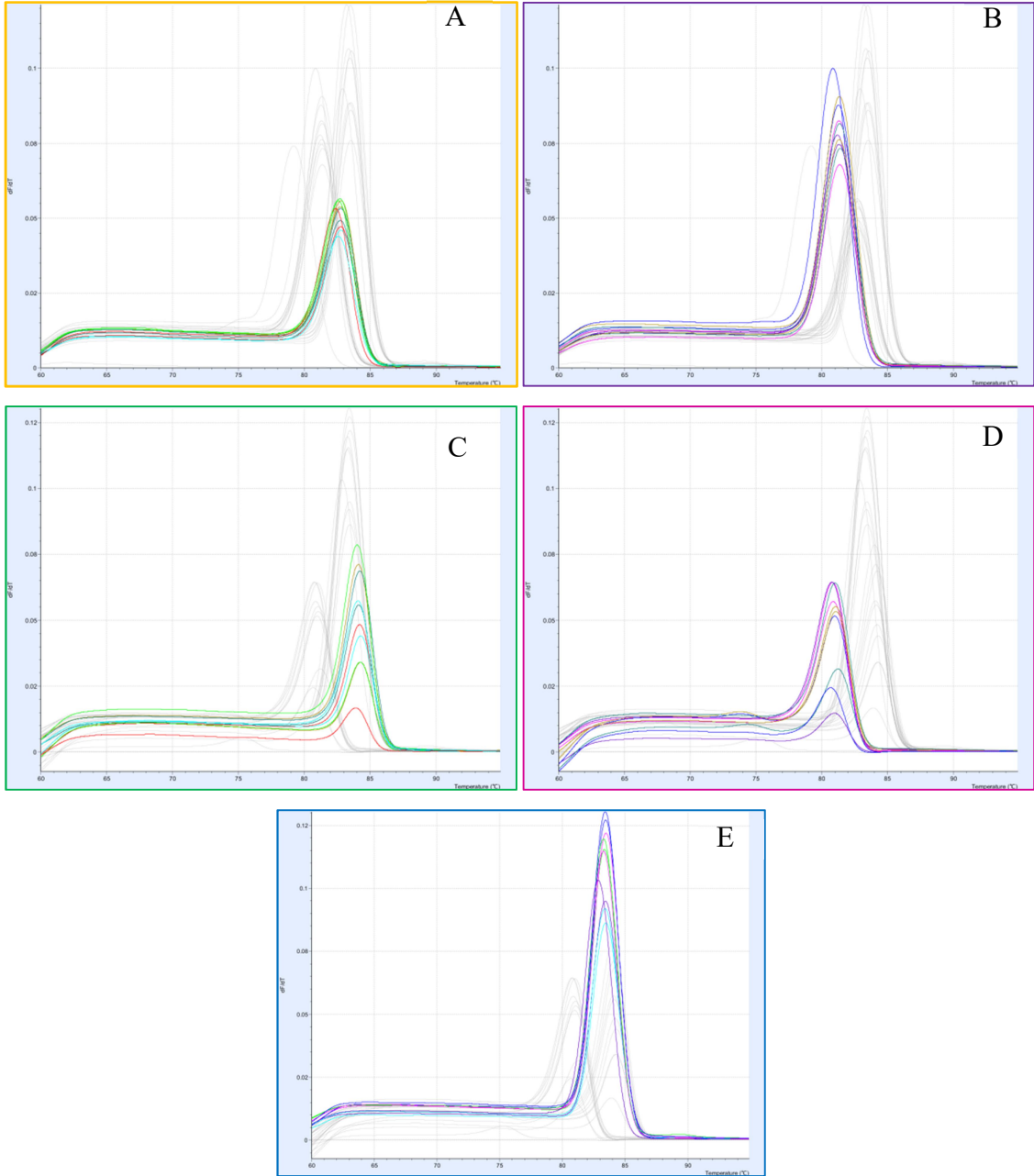
**Şekil 38.** RT-PCR sonuçlarına göre zoledronik asit uygulamasının doz ve süresiye bağlı olarak survivin geninin ifadesindeki değişim.

#### 4.7.4.1. Melting point analizi

qRT-PCR analizi sonucunda hedeflenen bölgenin ve her örnekte aynı gen bölgesinin çoğaltıldığı, elde edilen Ct değerlerinin hedeflenen bölgeye ait olup herhangi bir girişimin olmadığı, primer dimerinin meydana gelip gelmediği melting point analizi ile belirlendi. Bu nedenle qRT-PCR analizlerinin sonunda her örnek ve gen bölgesi için melting point analizi gerçekleştirildi, bunlardan bazıları Şekil 39 (A-E)'de verildi.

Melting point analizlerinde elde edilen görüntülerde piklerin aynı yerde oluşması örneklerde hedeflenen bölgelerin spesifik bir şekilde çoğaltıldığını ve eğrilerin aynı sıcaklıklarda elde edilmesi primer dimerinin oluşmadığını göstermektedir. Piklerin boyutlarındaki değişimler ise örneklerde hedeflenen genin ekspresyon düzeyine göre

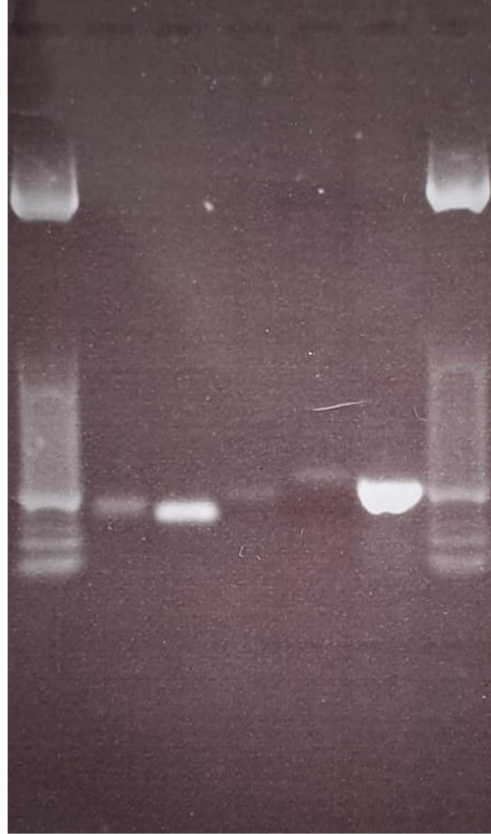
değişmektedir. Şekil 39’da görüldüğü gibi tüm örnekler spesifik primerlerle herhangi bir girişim olmadan çoğaltılmış ve elde edilen Ct değerleri güvenilir bir şekilde hesaplamaya dahil edilebilmiştir.



**Şekil 39.** qRT-PCR analizi sonrası mRNA ekspresyonlarının saflığının belirlenmesinde melting point (Tm) grafikleri. (A: Bax geni, B: Bcl-2 geni, C: Bid geni, D: Survivin geni, E: GAPDH geni (Referans gen)).

#### 4.7.4.2. PCR ürününün agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi

qRT-PCR çalışmalarında hedef spesifik PCR ürünlerinin elde edildiğini, primer dimerinin oluşmadığını kanıtlamak için agaroz jel elektroforezinde görüntüleme işlemi gerçekleştirilir. Çalışmamızda elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü, elde edilen görüntüler Şekil 40'de verildi.



**Şekil 40.** PCR ürününün agaroz jel elektroforezinde görüntüsü. Bantlar soldan sağa sırasıyla Bax, Bcl-2, Survivin, Bid ve Gapdh genlerine aittir.

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda insanlar kadar ortak yaşam alanımızı paylaştığımız evcil hayvanlarda da kanserin görülme oranının artması köpeklerde en önemli ölüm nedenleri sıralamasında değerlendirilmesine neden olmuştur (Baek ve ark, 2009).

Tümörler insanlarda 182/100.000, köpeklerde 381/100.000 ve kedilerde 156/100.000 yıllık insidans oranı ile hem insan hem evcil hayvanlarda önemli hastalıklardan biridir. Evcil hayvanlarda birçok vakanın kayıt dışı olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu insidans oranı daha da ciddi rakamları ifade etmektedir (Meyer ve Walter, 2016).

Kanser evcil hayvanlarda genelde yaşla birlikte daha sık görüldüğünden, evcil hayvan-sahibi ilişkisinin en güçlü olduğu zamanlarda karşılaşılan bir süreçtir. Bu nedenle hasta sahibi evcil hayvanının sağlığı için gerekli olan tüm müdahaleleri yaptırmakta ve bu zaman zarfında yaptığı tüm masraflardan tatmin edici bir sonuç beklemektedir (Biller ve ark, 2016).

Osteosarkoma agresif ve metastatik bir kanser türüdür ve genelde akciğere metastaz yapma eğilimine sahiptir (Szewczyk ve ark, 2015). Tedavi seçenekleri arasında genellikle etkilenen ekstremitenin amputasyonu tercih edilse ve bu tedavi yöntemi etkin olsa da hasta sahipleri tarafından uygun bulunmamaktadır. Kemoterapi ve kemoterapinin cerrahi yöntemler ile kombine edilerek uygulanması osteosarkomada sağkalım süresini önemli ölçüde arttırmış olsa da kemoterapinin yan etkilerine bağlı ölümler gerçekleşmektedir. Kemoterapinin normal dokular üzerindeki sitotoksik etkileri, OSA'lı köpeklerin tedavisinde büyük bir dezavantajdır. Ayrıca antikanser ilaçların kullanımı ilaca dirençli fenotiplerin meydana gelmesi ve ikinci malignitelerin ortaya çıkması gibi ciddi problemlere neden olmaktadır. Bu nedenle mevcut kemoterapiye alternatif yaklaşımları belirlemek için büyük çaba sarf edilmektedir. Ayrıca, standart bir kemoterapi yaklaşımı konusunda hala dünya çapında bir fikir birliği yoktur (Alleva ve ark, 2006; Anninga ve ark, 2011).

Veteriner hekimlikte tedavi yöntemi olarak insan hekimliğinde kullanılan ilaç ve kombinleri uyarlanmaktadır. Köpek osteosarkomunun doksorubisin veya platin bazlı bir ilaçla tek başına veya kombinasyon halinde adjuvan tedavisi genellikle veteriner onkologlar tarafından kullanılmaktadır ancak, aynı hastalık için insan onkologları tarafından uygulanan protokoller daha karmaşıktır (Straw ve ark, 1991; Berg ve ark, 1992; Bacon ve ark, 2008; Phillips ve ark, 2009). Yapılan çalışmalarda her iki tür arasında histolojik ve bazı genlerin ekspresyonu açısından benzerlik olduğu ifade edilse de bunun aksini bildiren çalışmalar da mevcuttur. İnsan hekimliğinde olduğu gibi veteriner hekimlik alanında da evcil hayvanlar

için bireye özgü spesifik tedaviler gereklidir. Kemoterapötik ajanların farklı türlerde hatta aynı türde farklı kanser türlerinde bile farmakokinetik parametrelerinin, etkin doz ve sürelerinin farklı olması köpeklerde osteosarkoma tedavisi ile ilgili spesifik çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Evcil hayvanlar içinde tümör progresyonu, metastaz davranışı, tümör kaynaklı ölümlerin başlıca nedeni ve tümör hücrelerinin ilaca verdiği yanıtı belirlemek klinik öneme sahiptir (Meyer ve Walter, 2016). Bu amaç doğrultusunda etik nedenlerden dolayı, *in vitro* yöntemler canlı hayvanlar üzerinde yapılan deneylerden daha fazla tercih edilmektedir.

Kanser araştırmalarında özellikle ilaç testlerinde deneysel yaklaşımlar için en uygun metod tümör hücrelerinin doğal ölümsüzlüğü nedeniyle hücre kültürlerinin kullanılmasıdır. Bu amaçla çok sayıda insan osteosarkoma (HOS, U2 OS, Saos-2 ve MG-63) ve köpek osteosarkoma (D-17 (CCL-183), Abrams, OSCA-8, OSCA-78) hücre hattı başarılı bir şekilde kültüre ve karakterize edilmiştir (Meyer ve Walter, 2016). Çalışmamızda ZA'in sitotoksik ve apoptotik etkileri ve köpek OSA tedavisinde yeni bir uygulamaya uygun olup olmadığını araştırmak üzere D-17 köpek osteosarkoma hücre hattı kullanıldı.

Zoledronik asit gibi üçüncü jenerasyon bisfosfonatların antitümör etkileri ve ZA'nın insan osteosarkoma hücrelerine karşı tek başına yada diğer antikanser ajanlarla kombine etkileri ile ilgili yayınlar mevcuttur (Ryu ve ark, 2010). Veteriner klinik uygulamalara bakıldığında Fan ve ark (2008) hem sağlıklı hem de malign osteolizis görülen köpeklere ZA uygulandığında osteolizin azaldığını bildirmişlerdir. Spugnini ve ark (2009) ise topallık ve sağ ön ayağı etkileyecek kadar büyük bir tümör ile kliniğe getirilen ve apendiküler OSA tanısı konulan bir köpeğe antirezortif tedavi olarak ZA enjeksiyonu uygulamışlar. Sonrasında tümör büyüklüğünün sabit kaldığını, topallığın azaldığını ve bu tedavi yöntemi ile primer kemik tümörünün yavaş ilerlemesine rağmen hastadaki ağrının tamamen kontrol altına alındığı rapor etmişlerdir. Ancak yapılan literatür taramalarında köpek osteosarkomasına *in vivo* ve *in vitro* zoledronik asit uygulaması ile ilgili çok az çalışmaya rastlanmıştır. Ayrıca ZA, en güçlü N-BP'lerden biri olması ve şu anda insanlarda kemik metastazının adjuvan tedavisinde kullanılır hale gelmesi nedeniyle bu çalışmada tercih edilmiştir (Senaratne ve ark, 2000; Lee ve ark, 2001; Poirier ve ark, 2003).

Zoledronik asidin meme, prostat, miyeloma, osteosarkom gibi çeşitli insan kanser türlerine karşı sitotoksik etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar vardır (Derenne ve ark, 1999; Fromigue ve ark, 2000; Tassone ve ark, 2000; Jagdev ve ark, 2001; Lee ve ark, 2001; Corey ve ark, 2003; Witters ve ark, 2003).

Evdokiou ve ark (2003), zoledronik asidin insan osteojenik sarkoma hücre hatlarına (HOS, BTK-143, MG-63, SJS-A-1, G-292, ve Saos-2) tek başına uygulandığında sitotoksik etkinin her hücrede farklı olduğunu bildirmişlerdir. BTK-143, HOS ve G-292 hücre hatlarında zoledronik asidin oldukça etkili olduğunu ve 72 saat inkübasyonun ardından hücrelerin yarısını etkileyen maksimum dozu sırasıyla 2, 3 ve 3  $\mu\text{M}$  olarak bulmuşlardır. Buna karşın MG-63, SJS-A-1 ve Saos-2 hücre hatlarında zoledronik asidin hücre canlılığı üzerinde etkisinin oldukça zayıf olduğu hücre canlılığında anlamlı azalmanın 48 ve 72 saatlik periyotlarda meydana geldiğini ve hücrelerin yarısını etkileyen maksimum dozun sırasıyla 10, 10 ve 50  $\mu\text{M}$  olduğunu rapor etmişlerdir.

Patntirapong ve ark (2012), MC3T3 (fare osteoblastik hücre hattı) ve MSC (mezenkimal kök hücre) hücrelerinin düşük ZA konsantrasyonlarından etkilenmediğini 5-10  $\mu\text{M}$  ZA ilavesi altında ise hücrelerin olağan morfolojisinin değişerek uzantılarını kaybettiğini ve küresel görünümde olduğunu bazı hücrelerin ise plaka yüzeyinden ayrıldığını gözlemlemişlerdir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (50 ve 100  $\mu\text{M}$ ), hem MC3T3 hem de MSC hücrelerinin tamamen normal formlarını kaybettiği ve hücrelerin sayısının şiddetli bir şekilde azaldığı görülmüştür.

Fu ve arkadaşları (2011) LM8 (murin osteosarkoma hücre hattı) osteosarkoma hücreleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada, ZA uygulamasının 24 saat ardından 1 ve 5  $\mu\text{mol/L}$  ZA'nın CCK-8 testi ile hücre proliferasyonu üzerinde inhibitör etkisi olmadığını göstermişlerdir. Kontrol grubuna göre 10  $\mu\text{mol/L}$  ZA'nın ise hücre proliferasyonu üzerine anlamlı bir azalma meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Canlılık oranlarında belirgin azalış 48 ve 72. saatte meydana gelmiştir.

Benassi ve ark (2007) ZA'in artan konsantrasyonlarına maruz kalan U2-OS, U2-OS/175 ve SAOS insan osteosarkoma hücre hatlarının, 96 saatte büyümelerinin inhibisyonu sonucu canlılık kayıplarının meydana geldiğini göstermişlerdir. U2-OS, U2-OS/175 ve Saos-2 hücrelerinin ZA'ya olan duyarlılığı değerlendirildiğinde  $\text{IC}_{50}$  değerleri sırasıyla  $1,6\pm 0,4 \mu\text{M}$ ;  $2,1\pm 0,7 \mu\text{M}$  ve  $2,2\pm 1,2 \mu\text{M}$  olarak belirlemişlerdir.

Çalışmamızda köpek OSA hücre hatları üzerine uygulanan 1 $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 25 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$ , 75 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında ZA ilk 24 saatte istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki göstermemiştir ( $p\geq 0,05$ ). Benzer şekilde Patntirapong ve ark (2012) çalışmalarında MC3T3 (fare osteoblastik hücre hattı) ve MSC (mezenkimal kök hücre) hücrelerine ilk 24 saat uyguladıkları ZA konsantrasyonlarında sitotoksik etki gözlemleyememiştir. Cheng ve ark (2016) ZA'nın etkisini Saos2, MG-63, HOS ve U2OS olan 4 farklı insan osteosarkoma hücre hattı üzerinde incelemişler ve ZA'nın 25, 50, 75 ve

100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarına 24 saat maruz kalan hücrelerde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ZA'nın 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonuna kadar 4 farklı osteosarkoma hücre hattında sitotoksik etkinin gözlenmemesi çalışmamızdaki sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

İnsan osteosarkoma HOS, MG-63, Saos-2 ve U2OS hücre hatlarına ZA'nın etkisini inceleyen bir çalışmada 72 saat süresince doza bağlı olarak hücre sayısında azalma meydana geldiğini fakat hücrelerin ZA'ya verdikleri yanıtın birbirinden farklı olduğu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda her ne kadar birbirinden farklı değerler elde edilse de ilk 72 saat göz önüne alındığında tüm hücrelerde  $\text{IC}_{50}$  değerinin 50  $\mu\text{M}$  altında kalmıştır (Kubista ve ark, 2006). Ryu ve ark (2010) ise LM8 (murin osteosarkoma hücre hattı), MOS (murin osteosarkoma hücre hattı), MG-63 (insan osteosarkoma hücre hattı) hücre hatlarına ZA uyguladıkları çalışmalarında 72. saatte elde edilen  $\text{IC}_{50}$  değerlerini sırasıyla 8,5; 2,4 ve 27  $\mu\text{M}$  olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda inkübasyon süresine bağlı olarak 48, 72 ve 96 saat sonunda  $\text{IC}_{50}$  değerleri sırasıyla 82,50  $\mu\text{M}$ , 26,06  $\mu\text{M}$  ve 17,60  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. ZA'nın apoptotik etkilerinin araştırıldığı deneylere ise  $\text{IC}_{50}$ 'nin altında sitotoksik etkinin meydana gelmediği zoledronik asit konsantrasyonları (5, 7,5, 10 ve 15 $\mu\text{M}$ ) ile devam edilmiştir.

Poirier ve ark (2003), MG-63 ve Saos-2 insan osteosarkoma hücre hatları ile D-17 ve Abrams köpek osteosarkoma hücre hatlarına ZA'nın etkisini inceledikleri çalışmalarında hücreler 72 saat boyunca 0, 5, 10, 20, 30 ve 50  $\mu\text{M}$  ZA konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda  $\text{IC}_{50}$  değeri için D-17 ve Abrams köpek osteosarkoma hücre hatlarında sırasıyla 7,9 ve 36,3 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda D-17 hücre hattı ile 72 saat inkübasyon sonucu elde edilen  $\text{IC}_{50}$  değeri ise 26,06'dır. Aynı hücre ile çalışılmasına rağmen  $\text{IC}_{50}$  değerleri arasındaki farkın özellikle hücrenin gelişimi üzerine etkili olan fetal sığır serumu ve çoğaltım koşulları farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca canlılık analizinde kullanılan hücre sayısı ve canlılık testinin duyarlılığı elde edilen verileri etkilediğinden dolayı aynı hücre hattının bile farklı ortamlarda farklı yanıtlar verdiği öngörülmektedir.

Hücre hatları üzerinde uygulanan ilaçlara verilen yanıtlar, bu ilaçların etki mekanizması, uygulama dozları olduğu kadar kullanılan hücrelerin köken aldığı dokuya, kanser hücrelerinin özelliklerine ve onların genetik değişikliklerine bağlıdır (Morse ve ark, 2005). ZA'nın farklı hücre hatlarında aktivitesinin ve etkisinin değişmesi açıklanabilmiş değildir. Ancak farklı hücre tiplerinde ZA'nın intraselüler etkisi, biyoyararlanımı, hücreye alımı gibi faktörler farklılık göstermektedir (Evdokiou ve ark, 2003). ZA'nın  $\text{IC}_{50}$  değerleri



her kanser hücresinde farklı olsa da birçok kanser türü üzerinde antiproliferatif etkisi kanıtlanmıştır.

Zoledronik asidin D-17 köpek osteosarkoma hücre hattı üzerine koloni oluşturabilme yeteneklerine etkisi incelendiğinde hücelere ZA uygulaması ile 48 saat inkübasyondan sonra 25  $\mu\text{M}$ 'dan, 72 saat inkübasyon sonunda ise 10  $\mu\text{M}$ 'dan yüksek dozlarda gözle görülebilir bir azalma meydana gelmiştir. Bunun ZA'nın yüksek dozlarında antiproliferatif özellik göstererek hücrelerin bir araya gelmesini engellemesinden kaynaklandığı ve böylece hücrelerin koloni formlarının oluşumunun inhibe edildiği sonucuna varılmaktadır. Koloni oluşumlarının azalması hücreler arasındaki iletişimin giderek azalmasına ve böylece çoğalmayı indükleyen faktörlerin ortadan kalkmasına neden olur. ZA'nın düşük dozlarında ise düşük sitotoksik etki göstermesi nedeniyle kolonileşme üzerine etkisinin az olduğu düşünülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar hücre canlılık testi olan WST-1 analizinin sonuçları ile paralellik göstererek, sonuçlarımızı doğrular niteliktedir.

Bisfosfonatlar, osteoklast aktivitesinin artmasıyla ilişkili kemik hastalıklarının tedavisi için oldukça etkili ajanlardır ancak elde edilen bazı veriler kemik oluşumunu da engellediklerini göstermektedir. Mikromolar konsantrasyonlarda aminobisfosfonatların, in vitro koşullarda osteoblastlarda apoptoza yol açtığı ve mineralizasyon üzerinde inhibe edici etkisinden dolayı osteoblastlarda farklılaşmayı önlediği öne sürülmektedir (Tobias ve ark, 1993). Pamidronat ve aledronatın antiproliferatif etki gösterdiği konsantrasyonlardan yaklaşık on kat daha düşük 500 nM, 750 nM ve 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında kemik nodülü oluşumunu kuvvetle inhibe ettiği bildirilmiştir (Idris ve ark, 2008).

Basso ve ark (2013) ZA uygulanan insan osteoblast MG63 (insan osteosarkoma hücre hattı) hücrelerinin mineralizasyon kapasitesine olan etkisini alizarin kırmızısı testinden yararlanarak mineral nodül oluşumu (MNF) ile değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada ZA'ya maruz kalan hücrelerde, MNF'nin, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak değiştiğini, kontrol gruplarında zamanla belirgin bir MNF artışı meydana geldiğini ve kontrol gruplarına kıyasla ZA uygulanan örneklerde MNF'de istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu bu nedenle ZA'nın kemik matriks sentezini ve mineralizasyon prosesini etkileyebileceğini rapor etmişlerdir.

Orris ve ark (2009), Fare osteoblast hücrelerinde ZA'nın (1 ve 10  $\mu\text{M}$ ) etkisini inceleyen çalışmalarında 10-14 günlük inkübasyonun ardından alizarin kırmızısı ile yapılan analizlerin sonucunda sırasıyla %85 ve %95 oranında mineralizasyon kapasitesinin azaldığını bildirmişlerdir.

Zoledronik asit kaynaklı mineralizasyon inhibisyonunun doğrudan sitotoksositeye bağlı olup olmadığını test etmek için Patntirapong ve ark (2012) MC3T3 (fare osteoblastik hücre hattı) ve MSC (mezenkimal kök hücre) hücrelerinde mineralizasyon kapasitesi analizi (alizarin kırmızısı S boyaması) ile eş zamanlı olarak morfolojik analizlerini de gerçekleştirmişlerdir. Düşük ZA konsantrasyonlarında hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişmediğini fakat mineralizasyon kapasitesinde meydana gelen inhibisyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da elde edilen veriler değerlendirildiğinde düşük ZA konsantrasyonlarında (0-7,5 µM) hücre canlılığında anlamlı bir azalma olmazken mineralizasyon kapasitesinde azalmanın gerçekleştiği, yüksek konsantrasyonlarda ise hücre canlılığı %50'nin altındaki oranlarda korunurken, mineralizasyon kapasitesinin kuvvetli bir şekilde inhibe edildiği gözlenmiştir. Kemik matriks mineralleşmesinin düşük konsantrasyonlarda zoledronat ile inhibe edilmesinin nedeninin bisfosfonatlar ve mineralizasyon inhibitörü pirofosfatlar arasındaki belirgin yapısal benzerlikten ve hidroksiapatit kristal yayılımı üzerindeki doğrudan fizyokimyasal etkilerinden kaynaklandığı düşünülebilir (Orriss ve ark, 2009).

Alkalin fosfataz, birçok dokuda hücreler tarafından sentezlenen, zara bağlı bir enzimdir (Barger ve ark, 2005). ALP'ler, alkali ortamda düşük substrat spesifikliğine sahip organik fosfat esterlerin hidrolizini katalizleyen metalloenzim ailesidir (Ren ve ark, 2015). Köpeklerde ALP bağırsaklarda ve dokuya özgü olmayan iki gen tarafından kodlanır. Dokuya özgü olmayan gen karaciğer ve kemik izoformlarını üretir. ALP öncelikle, epitel dokusunda, karaciğerde, böbreklerde ve plasentada bulunur. Köpeklerde ise ALP üretimi kanıtlanan tek bağ doku kemikdir (Barger ve ark, 2005). Tüm osteoblastların membranında bulunur ve matriks mineralizasyonu ile ilişkilidir (Barger ve ark, 2005; Basso ve ark, 2013). Bu nedenle, reaktif kemikte pozitif ivmeye sahiptir (Barger ve ark, 2005).

İnsanlarda osteosarkom hastalarında serum alkalin fosfataz düzeyi genelde yüksek olduğu bildirilmiştir. İnsan osteosarkom hücre hatları (Farley ve ark, 1989; Pautke ve ark, 2004) ve hayvan osteosarkom hücre hattının (Ali ve ark, 1993) büyük miktarda ALP ürettiği gösterilmiştir (Ren ve ark, 2015). ALP üretimindeki bu artışın osteoblastik tümör hücrelerinden mi yoksa tümörün neden olduğu osteolize yanıt olarak oluşan reaktif kemikten mi kaynaklandığı net bir şekilde tanımlanmasa da ALP'nin osteosarkomada prognostik bir faktör olduğu kanıtlanmıştır (Kim ve ark, 2017). Osteosarkomun ilerlemesinin, yayılmasının veya metastazının osteolizi ve ALP'yi arttıracığı düşünülmektedir. Yüksek ALP düzeyi, osteosarkomun malignitesi ve zayıf tedavi yöntemi ile ilişkilendirilmiştir. İnsanlarda artan ALP düzeyi çoğu hastada, preoperatif kemoterapiden

sonra normal değerlere düşmektedir (Ren ve ark, 2015). Köpeklerde de benzer şekilde artan serum ALP aktivitesi hayatta kalma süresi ile ilişkilendirilmiştir (Simpson ve ark, 2017).

Çalışmamızda ekstraselüler ALP düzeyinde 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda kontrole oranla bütün ZA doz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenirken ve intraselüler ALP düzeyinde bu azalış ilk 48 saatin sonunda 25 µM ve üzeri konsantrasyonlarda, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise 7,5 µM ve üzeri konsantrasyonlardaydı. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde ZA'nın hücre farklılaşmasını inhibe ederek ALP düzeyinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bu azalış tedavi sürecinde değerlendirildiğinde ZA'nın köpek osteosarkoma tedavisi için uygun bir ajan olabileceği ve prognozun serum ALP düzeyleri ile takip edilebileceği ileri sürülebilir. Ayrıca hayatta kalma süresi ile ilişkilendirildiğinde çalışmamızdaki survivin düzeyleri de dikkate alınarak hayatta kalma süresini arttırabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar ALP aktivitesindeki bu azalmanın ZA konsantrasyonlarına bağlı olarak mineralizasyon kapasitesini de önleyebileceğini göstermektedir (Basso ve ark, 2013). Bizim sonuçlarımızda incelendiğinde ALP aktivitesinde doz ve zamana bağlı azalma alizarin kırmızısı ile tespit edilen mineralizasyon kapasitenin azalması ile de paralellik göstermektedir.

Kanser hücrelerindeki göç davranışı malignitenin tipik özelliğidir (Zhang ve ark, 2015). Çalışmamızda ZA'nın hücrelerin göç etme potansiyeline olan etkisi basit ve ucuz bir yöntem olan yara oluşturma tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre uygulanan ZA konsantrasyonları incelendiğinde 5 µM ZA'nın hücrenin migrasyonu üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Hücreye en etkin migrasyon inhibisyonunun gözlendiği konsantrasyonlar ise 48 ve 72 inkübasyon süreleri için 10 ve 15 µM ZA olarak belirlenmiştir. Ory ve ark (2008) da çalışmamıza benzer şekilde yara oluşturulan ve 10 µM ZA uygulanan OSRGA (rat osteosarkoma) hücrelerinde 48 saatin sonunda ZA'nın OSRGA hücrelerinin göçünü tamamıyla bloke ettiğini gözlemlemişlerdir. ZA'nın artan dozlara bağlı olarak osteosarkom hücre iskeleti organizasyonunu bozduğu ve bu yolla hücre göçünü inhibe ettiği ve anti-metastatik etkiye sahip olduğu düşünülebilir.

Kanser tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesi, bileşiklerin hücre proliferasyonunu bloke etme ve/veya apoptozu indüklemeye potansiyeline dayanmaktadır. Son yıllarda malign hücrelerin apoptotik yollarını hedef alarak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi cazip bir kavram haline gelmiştir (Winter ve ark, 2014). ZA'nın *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarında doz ve süreye bağlı olarak birçok kanser türünde apoptozu indüklediğine dair çalışmalar mevcuttur (Koizumi ve ark, 2007; Ullen ve ark, 2009; Koto ve ark, 2010; Zwolak ve ark, 2010; Almubarak ve ark, 2011; Di Salvatore ve ark, 2011; Tamura ve ark, 2011). Ancak

hem osteosarkom üzerine yapılan hem de köpek osteosarkomasında apoptozu indüklediğini gösteren yada hangi yollar üzerinden uyarımı gerçekleştirdiğine dair çalışmalar sınırlıdır (Poirier ve ark, 2003; Fu ve ark, 2011).

DNA fragmentasyonunun varlığının araştırılması amacıyla farklı dozlarda ZA uygulanan D-17 köpek osteosarkoma hücrelerinde oluşan DNA fragmentasyonunun varlığı hem hücre ölümü belirleyici ELISA yöntemi ile kantitatif olarak hem de hücrelerden elde edilen genomik DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi ile kalitatif olarak araştırıldı. Çalışmamızda hücrelere 5, 7.5, 10, 15  $\mu$ M ZA uygulamasının 48 ve 72 saatlik inkübasyonunun ardından agaroz jel elektroforezi ile yapılan analizleri incelendiğinde, DNA kırıklarında ilk 48 saatte doza bağlı bir değişim olmadığı ancak 72 saat inkübasyon sonrası elde edilen sonuçlar incelendiğinde ZA'nın endojen endonükleazları aktive ederek apoptozun temel bir özelliği olan intranükleozomal genomik DNA fragmentasyonunda bir artışa yol açtığı belirlenmiştir. Kantitatif olarak ELISA sonuçlarımız incelendiğinde ise jel görüntülerini destekler nitelikte doza ve zamana bağlı olarak artış gözlemlendi. Benzer şekilde Evdokiou ve ark (2003), zoledronik asidin insan osteojenik sarkom hücre hatlarına (HOS, BTK-143, G-292) tek başına uygulandığında oluşan apoptotik hücre ölümünde gözlenen karakteristik genomik DNA fragmentlerini agaroz jel elektroforezinde gözlemlemişlerdir.

Kaspaz proteinleri normalde hücrede inaktif durumdadır ve aktif hale geldiklerinde hücreyi ölüme sürüklemektedir. Kaspaz 3 proteini apoptoz yolağında en son aktif olan en önemli kaspaz proteinlerinden birisidir. Kaspaz 3'ün aktif formunun ekspresyon seviyesi genellikle apoptozu ortaya çıkarmakta kullanıldığından (Forest ve ark, 2005) kaspaz 3 miktarına bağlı olarak apoptozun düzeyi hakkında bilgi edinilebilmektedir. Sonuçlarımıza göre ZA'nın kaspaz 3'ü aktive ederek apoptozu neden olduğu görülmektedir.

HOS, BTK-143, MG-63, SJSA-1, G-292, MSK-8G ve Saos-2 gibi insan osteojenik sarkom hücre hatları üzerine ZA'nın apoptotik etkilerinin araştırıldığı bir çok çalışma ile apoptozun indüklenmesinin kaspaz aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Croucher ve ark, 2003; Tassone ve ark, 2000; Corso ve ark, 2005;). Ancak ZA uygulanan OSA hücre hatları ortamına ilave edilen kaspaz inhibitörü zVAD-fmk varlığında kaspaz kaskadı inhibe edildiği halde de apoptozun gerçekleştiğini gösteren çalışmaların da olması ZA tarafından indüklenen hücre ölümünün uyarımının kaspaz bağımsız olan başka bir yoldan da gerçekleşebileceğini düşündürmektedir (Evdokiou ve ark, 2003; Labrinidis ve ark, 2010). Bizim çalışmamızda da kaspaz 3 ve 9 düzeyinin özellikle ZA uygulamasının ardından 48. saatte artış göstermesi zamana bağlı olarak başlatıcı kaspaz olarak kaspaz 9'u efektör kaspaz olarak kaspaz 3'ün aktif formunda artış meydana geldiğini göstermektedir.

Apoptotik sinyal iletimi ekstrinsik yolak ve intrinsik yolak olarak bağımsız çalışabilmesine rağmen, biriken kanıtlar iki yolak arasında bağlantı olduğunu göstermektedir. Ekstrinsik sinyal yolağında aktive edilen kaspaz 8, sadece bir BH3 bölgesini içeren Bcl-2 ailesi üyesi Bid proteinini keser ve aktifleştirir. Kesilen Bid (tBid) mitokondriye translokeze olur ve mitokondriyal sitokrom c salınımında pozitif regülatör olarak rol oynar. Bu salınan sitokrom c, intrinsik apoptotik yolağı başlatır ve dış kaynaklı ölüm reseptör aracılı apoptotik ölüm sinyalini güçlendirir (Deng ve ark, 2003; Nguyen ve Blaho, 2009). Çalışmamızda ölüm reseptörlerinin uyarılması sonucu aktifleşen başlatıcı kaspazlardan kaspaz 8 sonuçları incelendiğinde ZA konsantrasyonuna bağlı olarak kaspaz 8 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Uygulanan ZA dozlarının kaspaz 8'den bağımsız apoptoza neden olduğu düşünülmektedir. Bid gen ekspresyon düzeylerinde de buna paralel olarak anlamlı bir değişimin olmaması bu sonuçları destekler niteliktedir.

Bcl-2 ailesi, apoptozun karakterizasyonu için en önemli düzenleyiciler olan Bcl-2 gibi antiapoptotik üyelerden ve Bax gibi proapoptotik üyelerden oluşur (Deveraux ve Reed, 1999). Proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki denge apoptozun ortaya çıkışını belirleyebilir. Bcl-2 ekspresyonunun downregülasyonu Bax/Bcl-2 oranında bir artış ve serbest Bax'ta bir artış ile yansıtılabilir. Daha sonra Bax, mitokondriye translokasyona uğrar ve apoptotik kaskadları aktive eder (Adams ve Cory, 1998). Çalışmamızın sonuçları incelendiğinde ZA uygulanan hücrelerde Bax ile Bcl-2'nin oranının apoptoz lehine değiştiği bulundu. Bu oran mitokondriyal apoptoz yolağının aktivasyonun gösterilmesinde önemli bir belirteçtir ve çalışmalarda bu amaçla kullanılmaktadır (Huang ve ark, 2008; Kim ve ark, 2012; Yu ve ark, 2013). Sonuç olarak ZA'nın köpek osteosarkom hücrelerinde Bax'ın yukarı regülasyonu ve Bcl-2'nin down regülasyonu ile mitokondriyal apoptozu indüklediği ve bunun için en etkin dozun 10 µM olduğu belirlendi.

İnsanlarda survivinin, akciğer, kolon, meme, prostat, pankreas ve mide kanserleri, nöroblastomlar ve lenfomalar dahil olmak üzere en yaygın tümörlerde normal hücrelere göre sürekli olarak aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Ambrosini ve ark, 1997; Adida ve ark, 1998; Kawasaki ve ark, 1998; Lu ve ark, 1998). Malign tümörlerde survivin aşırı ekspresyonu, kötü prognoz, sağkalım süresinin kısalması, daha agresif davranış ve tedaviye daha yüksek direnç ile ilişkilidir. Günümüzde tümör malignitesinin, apoptoz inhibisyonu ve aşırı survivin ekspresyonunun neden olduğu anormal hücre bölünmesi ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Jaiswal ve ark, 2015; Chen, 2017).

Birçok insan neoplazmında prognostik faktör olarak kullanıldığından, insanlarda görülen kanserlerde survivin ile ilgili araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (Kavya ve ark, 2017). Literatürde insan osteosarkomaları ve survivin ekspresyonuna dair yayınlar (Osaka ve ark, 2006; Trieb ve ark, 2003; Wang ve ark, 2006) bulunmasına karşın köpek osteosarkomalarında bu genin ekspresyonu ile ilgili az sayıda çalışma vardır (Bongiovanni ve ark, 2012; Buracco ve ark, 2012; Davles ve ark, 2012).

Uchide ve ark (2005), survivin ekspresyonunun veterinerlik hekimlik alanında da benzer bir marker olarak hareket edip edemeyeceğini belirlemek için, gerçek zamanlı PCR ile çeşitli köpek tümörlerinde survivin mRNA ekspresyonunu nicel olarak analiz etmişlerdir. Histopatolojik olarak tanı konulan 9 benign ve 18 malign tümörden elde edilen veriler 18 malign tümörün 3'ünde aşırı survivin ekspresyonu gözlenmiştir. Aksine, incelenen tüm benign tip tümörlerde bulunan survivin ekspresyon seviyesi düşük kalmıştır. Kavya ve ark, (2017) köpeklerin deri ve deri altı doku tümörlerinde survivinin prognostik önemini belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında benign tümörlerde ortalama survivin gen ekspresyon değerinde  $0.94 \pm 0.63$  kat, malign tümörlerde ise  $18.87 \pm 5.30$  düzeyinde bir artış ve bu değerlerle sağ kalım oranları arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Köpek tümörlerinin daha kapsamlı bir şekilde incelenmesi gerekli olsa da, bu ön sonuçlar, köpeklerde hayatta kalma ve tümör malignitesi ile aşırı survivin ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Shoeneman ve ark (2012), Abrams ve D17 köpek osteosarkom hücre hatlarında survivin inhibisyonunun apoptozu, mitotik arresti ve karboplatin ve doksorubisin varlığında artmış kaspaz aktivitesini indüklediğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde çalışmamızda da D-17 köpek osteosarkom hücre hattında survivin geninin kantitatif değişimi 24 saatte uygulanan bütün ZA dozlarında kontrole oranla azalırken 48. saatte azalış daha da belirgindi. Sonuçlar insan osteosarkomu için prelinik bir model olan köpek osteosarkomasında survivinin değerlendirilmesinin uygulanabilir bir tedavi hedefi olabileceğini göstermektedir. Her iki türün de etkili tedavilerine yönelik terapötiklerin araştırılmasında survivin önemini korumaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Zoledronik asidin antitümöral, antimetastatik etkileri ile ilgili mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için yapılan sınırlı çalışmaların sonucunda hala net bir mekanizmanın tanımlanamaması kanser hücresi üzerine etkilerini açıklayabilecek çalışmaların yapılması gerekliliğini doğurmaktadır. Köpek osteosarkomasına ilişkin zoledronik asit uygulaması ile ilgili in vivo ve in vitro olarak yapılmış çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmanın amacı D-17 köpek osteosarkoma hücre hattı kullanılarak kemiğe spesifik antirezorptif özellik gösteren ZA'nın terapötik yaklaşımlarda uygulanabilirliğini araştırmaktır.

Verilerimiz ve gözlemlerimiz değerlendirildiğinde ZA'nın D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında doz ve zamana bağlı olarak canlılığı inhibe ettiği gösterilmiştir. ZA'nın IC<sub>50</sub> değerleri 48.saat, 72.saat ve 96.saat için sırası ile 82,5 µM, 26,0 µM ve 17,6 µM olarak hesaplandı. Hesaplanan IC<sub>50</sub> değeri diğer kanser hücre hatlarına uygulandığında elde edilen IC<sub>50</sub> değerlerinden daha düşük bulundu. Bu nedenle köpek OSA'nın düşük ZA konsantrasyonu ile toksisiteyi arttırmadan iyileştirme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Zoledronik asidin 24 ve 48 saat boyunca D-17 köpek osteosarkoma hücresine uygulanması sonucunda kristal violet boyaması ile hücrelerin koloni oluşumunu azalttığı, alizarin kırmızısı koyaması ile mineralizasyon oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiş böylece ZA'nın köpek OSA hücrelerinin hücrelerinde biraraya gelmesini ve mineral formlarının meydana engellediği sonucuna varıldı.

OSA'da yüksek ALP düzeyleri hastalığın agresifliği ve sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda ZA'nın intraselüler ve ekstraselüler ALP aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. ALP aktivitesinde doz ve zamana bağlı olarak azalmaya neden olduğu ve dolayısıyla ZA ile tedavide ALP'nin tedavi sürecini tanımlayan bir marker olarak kullanılabileceğini ön görmekteyiz.

Köpek osteosarkomasının proliferasyonu ve sağkalımı üzerinde doğrudan etkisi olan ZA'nın, apoptozun indüksiyonunun gerçekleştiği 5; 7,5, 10 ve 15 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığını ve koloni oluşumunu azaltma nedeninin nekroza değil apoptoza bağlı olduğu saptandı. Apoptozun gerçekleştiği, oluşan apoptotik DNA kırıklarının kantitatif analizi ve jelde gösterimi ile doğrulanmaya çalışıldı. ZA'nın kaspaz kaskat sistemine olan etkisi ise kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 düzeyleri ile belirlendi. Kaspaz 3 ve kaspaz 9

düzeylerinin anlamlı ölçüde artması, kaspaz 8 düzeyinde ise değişim meydana gelmemesi ZA'nın intrinsik yoldan apoptozu indüklediğini göstermektedir.

Yara iyileşmesi ile hücre göçünün de incelendiği 5; 7,5, 10 ve 15 µM ZA dozlarında hücrenin migrasyonunu engellediği belirlendi. Aynı zamanda ZA apoptozu da indüklediği için hem kemoterapik hem de antimetastatik ajan olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Sonuç olarak ZA'nın D-17 köpek osteosarkoma hücre hattında sitotoksik etki oluşturmadan hücrenin apoptoza eğilimini arttırdı.

Köpek osteosarkomasında ZA, metastatik türünde de osteosarkomanın kalıcı kontrolünü sağlayabilen, metabolizma tarafından iyi tolere edilebilen potansiyel bir ajandır. Ancak bu verilerin osteosarkomada tek ajan olarak ZA kullanımının in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca ZA'nın OSA tedavisinde kullanımından önce, biyolojik olarak aktif dozaj rejimlerinin oluşturulmalıdır. Elde edilen verilerimiz değerlendirildiğinde potansiyel kemoterapötik ajan olarak kullanılabilir olan ZA'nın bu bilgiler ışığında ilaç kombinasyonları şeklinde de uygulanabileceği ile ilgili çalışmalar yapılarak sinerjistik yada antagonistik özellikleri araştırılmalıdır.

Veteriner onkoloji alanında köpek osteosarkoma tedavisi ile ilgili çalışmaların az olması aynı zamanda köpek osteosarkoma hücre hattı üzerinde ZA'nın etkilerini ve etki mekanizmalarını inceleyen kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız literatüre katkı sağlaması bakımından özgün ve elde edilen sonuçlarımız ise ZA'nın köpek osteosarkoma üzerindeki etkilerini belirlemek için diğer çalışmalara kaynak oluşturmaktadır.



## KAYNAKLAR

**Abou-ghali M, Stiban J.** Regulation of ceramide channel formation and disassembly : insights on the initiation of apoptosis. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2015, 22(6), 760-772.

**Adams JM, Cory S.** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998, 281 (5381), 1322-1326.

**Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC.** Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998, 351, 882-883.

**Aft R, Naughton M, Trinkaus K, Watson M, Ylagan L, Chavez-MacGregor M, Zhai J, Kuo S, Shannon W, Diemer K, Herrmann V, Dietz J, Ali A, Ellis M, Weiss P, Eberlein T, Ma C, Fracasso PM, Zoberi I, Taylor M, Gillanders W, Pluard T, Mortimer J, Weilbaeher K.** Effect of zoledronic acid on disseminated tumour cells in women with locally advanced breast cancer: an open label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncology* 2010, 11, 421-428.

**Ahmed K, Tabuchi Y, Kondo T.**Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis* 2015, 20, 1411-1419.

**Akl H, Vervloessem T, Kiviluoto S, Bittremieux M, Parys JB, De Smedt H, Bultynck G.** A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014, 1843, 2240-2252.

**Ali NN, Harrison MA, Rowe J, Teich NM.** Spectrum of osteoblastic differentiation in new cell lines derived from spontaneous murine osteosarcomas. *Bone* 1993, 14(6), 847-858.

**Alleva R, Benassib MS, Pazzagliab L, Tomasettic M, Gellertc N, Borghia B, Neuzil J, Piccib P.**  $\alpha$ -Tocopheryl succinate alters cell cycle distribution sensitising human osteosarcoma cells to methotrexate-induced apoptosis. *Cancer Letters* 2006, 232, 226-235.

**Almubarak H, Jones A, Chaisuparat R, Zhang M, Meiller TF, Scheper MA.** Zoledronic acid directly suppresses cell proliferation and induces apoptosis in highly tumorigenic prostate and breast cancers. *Journal of Carcinogenesis* 2011, 10(2), 52.

**Altieri DC.** Survivin - The Inconvenient IAP. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2015, 39, 91-96.

**Altieri DC.** Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Progress in Cell Cycle Research* 2002, 5, 447-452.

**Altieri DC.** Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nature Reviews Cancer* 2008, 8, 61-70.

**Altieri DC.** Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003, 22, 8581-8589.

**Alvarez A, Lacalle J, Cañavate ML, Alonso-Alconada ML, Lara-Celador I, Alvarez FJ, Hilario E.** Cell death. A comprehensive approximation. Necrosis. In: *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. A. Mendez-Vilas and J. Diaz (Eds.), Formatex Research Center 2010 s 1017–1024.

**Ambrosini G, Adida C, Altieri DC.** A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine* 1997, 3(8), 917-921.

**Andrade F, Roy S, Nicholson D, Thornberry N, Rosen A, Casciola-Rosen L.** Granzyme B Directly and Efficiently Cleaves Several Downstream Caspase Substrates: Implications for CTL-Induced Apoptosis. *Immunity* 1998, 8, 451-460.

**Andric M, Nikolic N, Boskovic M, Milicic B, Skodric S, Basta Jovanovic G, Milasin J.** Survivin gene promoter polymorphism-31G/C as a risk factor for keratocystic odontogenic tumor development. *European Journal of Oral Sciences* 2012, 120(1), 9-13.

**Anjum R, Khar A.** Apoptosis: An Overview. *Indian Journal of Biotechnology* 2002, I(January), 58–72.

**Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco Mc, Kroep JR, Taminiau AHM, Hogendoorn PCW, Egeler RM.** Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: Where do we stand? *European Journal of Cancer* 2011, 47, 2431-2445.

**Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH.** Apoptosis: The role of the endonuclease. *American Journal of Pathology* 1990, 136(3), 593-608.

**Arslanyüreği H.** Epigallocatechin-Gallat'ın C6 Glioma Hücrelerine Apoptotik Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2009, 58.

**Ashe PC, Berry MD.** Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2003, 27, 199-214.

**Ashkenazi A, Dixit VM.** Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* 1998, 281, 1305-1308.

**Ashkenazi A.** Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2008, 19, 325-331.

**Bacon NJ, Ehrhart NP, Dernel WS, Lafferty M, Withrow SJ.** Use of alternating administration of carboplatin and doxorubicin in dogs with microscopic metastases after amputation for appendicular osteosarcoma: 50 cases (1999–2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2008, 232, 1504-1510.

**Baek SJ, McEntee MF, Legendre AM.** Review paper: Cancer chemopreventive compounds and canine cancer. *Veterinary Pathology* 2009, 46(4), 576-588.

**Barger A, Graca R, Bailey K, Messick J, De Lorimer LP, Fan T, Hoffmann W.** Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-positive tumors. *Veterinary Pathology* 2005, 42, 161-165.

**Bassett C, Donath A, Macagno F, Preisig R, Fleisch H, Francis MD.** Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. *Lancet* 1969, 18, 845.

**Basso FG, Turrioni APS, Hebling J, de Souza Costa CA.** Zoledronic Acid Inhibits Human Osteoblast Activities. *Gerontology* 2013, 59, 534-541.

**Başaran A.** Tıbbi Biyoloji. Güneş ve Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2005.

**Benassi MS, Chiechi A, Ponticelli F, Pazzaglia L, Gamberi G, Zanella L, Manara MC, Perego P, Ferrari S, Picci P.** Growth inhibition and sensitization to cisplatin by zoledronic acid in osteosarcoma cells. *Cancer Letters* 2007, 250 194-205.

**Bender RP, Jablonksy MJ, Shadid M, Romaine I, Dunlap N, Anklin C, Graves DE, Osheroff, N.** Substituents on etoposide that interact with human topoisomerase II in the

binary enzyme-drug complex: contributions to etoposide binding and activity. *Biochemistry* 2008, 47, 4501-4509.

**Berenson JR, Hillner BE, Kyle RA, Anderson K, Lipton A, Yee GC, Biermann JS.** American society of clinical oncology clinical practice guidelines: the role of bisphosphonates in multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology* 2002, 20, 3719-3736.

**Berenson JR.** New advances in the biology and treatment of myeloma bone disease. *Seminars in Hematology* 2001, 38(3), 15-20.

**Berg J, Weinstein MJ, Schelling SH, Rand WM.** Treatment of dogs with osteosarcoma by administration of cisplatin after amputation or limb-sparing surgery: 22 cases (1987-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992, 200, 2005-2008.

**Berg J, Weinstein MJ, Springfield DS, Rand WM.** Results of surgery and doxorubicin chemotherapy in dogs with osteosarcoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1995, 206, 1555-1560.

**Bidard FC, Vincent-Salomon A, Gomme S, Nos C, de Rycke Y, Thiery JP, Sigal-Zafrani B, Mignot L, Sastre-Garau X, Pierga JY.** Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse. *Clinical Cancer Research* 2008, 14, 3306-3311.

**Biller B, Berg J, Garrett L, Ruslander D, Wearing R, Abbott B, Patel M, Smith D, Bryan C.** 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. *Veterinary Practice Guidelines* 2016, 52(4), 181-204.

**Bisswanger H.** Practical Enzymology, Chichester (UK), Wiley-VCH, 2004.

**Bitetto WV, Patnaik AK, Schrader SC, Mooney SC.** Osteosarcoma in cats: 22 cases (1974-1984). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1987, 190, 91-93.

**Bjelaković G, Nagorni A, Bjelaković M, Stamenković I, Arsić R, Katić V.** Apoptosis : programmed cell death and its clinical implications. *Medicine and Biology* 2005, 12(1), 6-11.

**Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D.** Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death.

*Cell* 1996, 85(6), 803-815.

**Bongiovanni L, Mazzocchetti F, Malatesta D, Romanucci M, Ciccarelli A, Buracco P, Maria RD, Palmieri C, Martano M, Morello E, Maniscalco L, Salda LD.** Immunohistochemical investigation of cell cycle and apoptosis regulators (Survivin,  $\beta$ -Catenin, P53, Caspase 3) in canine appendicular osteosarcoma. *BMC Veterinary Research* 2012, 8, 78.

**Bongiovanni L, Romanucci M, Malatesta D, Andrea AD, Ciccarelli A, Della Salda L.** Survivin and related proteins in canine mammary tumours: Immunohistochemical expression. *Veterinary Pathology* 2014, 134, 1-7.

**Borges BN, Burbano RR, Harada ML.** Survivin-66 31C/G polymorphism and gastric cancer risk in a Brazilian population. *Clinical and Experimental Medicine* 2011, 11, 189-193.

**Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA.** The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 1995, 5, 21-26.

**Botter SM, Neri D, Fuchs B.** Recent advances in osteosarcoma. *Current Opinion in Pharmacology* 2014, 16(1), 15-23.

**Bottone M, Santin G, Aredia F, Bernocchi G, Pellicciari C, Scovassi A.** Morphological features of organelles during apoptosis: an overview. *Cells* 2013, 2(2), 294-305.

**Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM.** Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272, 26159-26165.

**Bratton SB, Cohen GM.** Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends in Pharmacological Sciences* 2001, 22(6), 306-315.

**Brodey RS, Riser WH.** Canine osteosarcoma. A clinicopathologic study of 194 cases. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1969, 62, 54-64.

**Brønden LB, Flagstad A, Kristensen AT.** Veterinary cancer registries in companion animal cancer: A review. *Veterinary and Comparative Oncology* 2007, 5(3), 133-144.

**Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ.** Prognostic factors in non-small cell lung cancer; A decade of progress. *Chest* 2002, 122, 1037-1057.

**Brunelle JK, Leatai, A.** Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of Cell Science* 2009, 122, 437-441.

**BuddRC.** Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *Journal of Clinical Investigation* 2002, 109, 437-442.

**Buracco P, Maria RD, Palmieri C, Martano M, Morello E, Maniscalco L, Salda LD.** Immunohistochemical investigation of cell cycle and apoptosis regulators (Survivin,  $\beta$ -Catenin, P53, Caspase 3) in canine appendicular osteosarcoma. *BMC Veterinary Research* 2012, 8, 78.

**Cabadak H.** Hücre siklusu ve kanser. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2008, 9(3), 51-61.

**Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM.** The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 1997, 90, 315-323.

**Carson DA, Ribeiro JM.** Apoptosis and disease. *The Lancet* 1993, 341, 1251-1254.

**Chang HY, Yang X.** Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000, 64(4), 821-846.

**Chen G.** The relationship between the expression of TAM, survivin and the degree of necrosis of the tumor after cisplatin treatment in osteosarcoma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2017, 21(3), 490-497.

**Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM.** Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 1997, 278, 1966-1968.

**Cheng HL, Lin CW, Yang JS, Hsieh MJ, Yang SF, Lu KH.** Zoledronate blocks geranylgeranylation not farnesylation to suppress human osteosarcoma U2OS cells metastasis by EMT via Rho A activation and FAK-inhibited JNK and p38 pathways. *Oncotarget* 2016, 7(9), 9742-9758.

**Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK.** Caspases-An update. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2008, Part B 151, 10-27.

**Circu ML, Aw TY.** Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 2010,48(6), 749-762.

**Clarke PG, Clarke S.** Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anatomy and Embryology* 1996, 193, 81-99.

**Clarke PGH.** Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology* 1990, 181, 195-213.

**Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A, Kastan MB, Griffin DE, Earnshaw WC, Veluona MA, Hardwick JM.** Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998, 95, 554-559.

**Clézardin P, Ebetino FH, Fournier PG.** Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. *Cancer Research* 2005, 65, 4971-4974.

**Clézardin P.** Anti-tumour activity of zoledronic acid. *Cancer Treatment Reviews* 2005, 31, 1-8.

**Cohen GM.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* 1997, 326(1), 1-16.

**Cohen JJ.** Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus* 1998, 1, 1-19.

**Cohen JJ.** Apoptosis: The physiologic pathway of cell death. *Hospital Practice* 1993, 28(12), 35-43.

**Conry RM, Rodriguez MG, Pressey JG.** Zoledronic acid in metastatic osteosarcoma: encouraging progression free survival in four consecutive patients. *Clinical Sarcoma Research* 2016, 6, 6.

**Cooper GM.** *The Cell: A Molecular Approach* (2nd edition ed.), Sunderland (MA), Sinauer Associates, 2000.

**Cooper, GM.** Programmed cell death. The cell. In: Cooper GM (ed) Chapter 14. Washington, ASM Pres, 1994, s 592.

**Corey E, Brown LG, Quinn JE, Poot M, Roudier MP, Higano CS, Vessella RL.** Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2003, 9, 295-306.

**Corso A, Ferretti E, Lunghi M, Zappasodi P, Mangiacavalli S, De Amici M, Rusconi C, Varettoni M, Lazzarino M.** Zoledronic acid down-regulates adhesion molecules of bone marrow stromal cells in multiple myeloma: A possible mechanism for its antitumor effect. *Cancer* 2005, 104(1), 118-125.

**Cory S, Adams JM.** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2002, 2, 647-656.

**Cotter TG.** Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer* 2009, 9, 501-507.

**Coultas L, Strasser A.** The molecular control of dna damage-induced cell death. *Apoptosis* 2000, 5, 491-507.

**Crawford LJ, Walker B, Irvine AE.** Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Journal of Cell Communication and Signaling* 2011, 5, 101-110.

**Critchley-Thorne RJ, Simonsa DL, Yana N, Miyahiraa AK, Dirbasc FM, Johnsonc DL, Swetterd SM, Carlson RW, Fishere GA, Koongf A, Holmesb S, Lee PP.** Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, 106(22), 9010-9015.

**Croucher PI, De Hendrik R, Perry MJ, Hijzen A, Shipman CM, Lippitt J, Green J, Van Marck E, Van Camp B, Vanderkerken K.** Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003, 18(3), 482-492.

**Cryns V, Yuan J.** Proteases to die for. *Genes Development* 1999, 12, 1551-1570.



**Cryns VL, Yuan JY** in *When Cells Die: A Comprehensive Evaluation of Apoptosis and Programmed Cell Death* (eds Lockshin RA, Zakeri Z, Tilly JL), Wiley–Liss, New York, 1998, 117-210.

**Curtin JF, Cotter TG.** Apoptosis: Historical perspectives. *Assays Biochemistry* 2003, 39, 1-10.

**Curtis RC, Custis JT, Ehrhart NP, Ehrhart EJ, Condon KW, Gookin SE, Donahue SW.** Combination therapy with zoledronic acid and parathyroid hormone improves bone architecture and strength following a clinically-relevant dose of stereotactic radiation therapy for the local treatment of canine osteosarcoma in athymic rats. *Plos one* 2011, 11(6), e0158005.

**Dabrowska C, Li M, Fan Y.** apoptotic caspases in promoting cancer: implications from their roles in development and tissue homeostasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2016, 930, 89-112.

**Danial NN, Korsmeyer SJ.** Cell death : Critical control points review. *Cell* 2004, 116, 205-219.

**Day TW, Wu CH, Safa AR.** Etoposide induces protein kinase c- and caspase-3-dependent apoptosis in neuroblastoma cancer cells. *Molecular Pharmacology* 2009, 76, 632-640.

**DeLong MJ.** Apoptosis: a modulator of cellular homeostasis and disease states. *Annals New York Academy of Sciences* 1998, 842, 82-90.

**Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X.** A JNK-dependent pathway is required for tnfa-induced apoptosis. *Cell* 2003, 115, 61-70.

**Derenne S, Amiot M, Barille S, Collette M, Robillard N, Berthaud P, Harousseau JL, Bataille R.** Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. *Journal of Bone and Mineral Research* 1999, 14, 2048-2056.

**Dernell WS, Straw RC, Withrow SJ.** Tumors of the skeletal system. In: Withrow SJ, MacEwen EG (eds), *Small Animal Clinical Oncology*, 3rd ed. WB Saunders Co, Philadelphia, s 378-418.

**Deveraux QL, Reed JC.** IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes and Development* 1999, 13(3), 239-252.

**Di Salvatore M, Orlandi A, Bagala C, Quirino M, Cassano A, Astone A, Barone C.** Anti-tumour and anti-angiogenetic effects of zoledronic acid on human non- small-cell lung cancer cell line. *Cell Proliferation* 2011, 44(2), 139-146.

**Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas GH, Androutsos GA.** Brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Onkologie* 2008, 31(12), 702-706.

**Dimitrakopoulos FI, Marousi S, Antonacopoulou AG, Floratou K, Bravou V, Kottorou A, Stavropoulos M, Koutras AK, Scopa CD, Kalofonos HP.** The survivin-31 snp in human colorectal cancer correlates with survivin splice variant expression and improved overall survival. *Cell Oncology* 2011, 34, 381-391.

**Dimopoulou M, Kirpensteijn J, Moens H, Kik M.** Histologic prognosticators in feline osteosarcoma: a comparison with phenotypically similar canine osteosarcoma. *Veterinary Surgery* 2008, 37, 466-471.

**Dohi T, Xia F, Altieri DC.** Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Molecular cell* 2007, 27(1), 17-28.

**Doonan F, Cotter TG.** Morphological assessment of apoptosis. *Methods* 2008, 44(3), 200-204.

**Duke RC, Chervenak R, Cohen JJ.** Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: An early event in cell-mediated cytolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1983, 80, 6361-6365.

**Duvall E, Wyllie AH.** Death and the cell. *Immunology Today* 1986, 7, 115-119.

**Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH.** Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 1999, 68, 383-424.

**Ebert R, Zeck S, Krug R, Meissner-Weigl J, Schneider D, Seefried L, Eulert J, Jakob F.** Pulse treatment with zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation. *Bone* 2009, 44(5), 858-864.

**Ebetino FH, Hogan AML, Sun S, Tsumpra MK, Duan X, Triffitt JT, Kwaasi AA, Dunford JE, Barnett BL, Oppermann U, Lundy MW, Boyde A, Kashemirov BA, McKenna CE, Russell RGG.** The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone* 2011, 49, 20-33.

**Ehrhart NP, Ryan SD, Fan TM.** Tumors of the skeletal system. In Withrow SJ, Vail DM, Page RL (Eds), *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology* (Fifth ed.). St. Louis, MO, Elsevier 2013, s 463-503.

**Ellis HM, Horvitz HR.** Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986, 44, 817-829.

**Elmore S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007, 35(4), 495-516.

**Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S.** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998, 391, 43-50.

**Epstein S.** Update of current therapeutic options for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Clinical Therapeutics* 2006, 8(2), 151-173.

**Evdokiou A, Labrinidis A, Bouralexis S, Hay S, Findlay DM.** Induction of cell death of human osteogenic sarcoma cells by zoledronic acid resembles anoikis. *Bone* 2003, 33(2), 216-228.

**Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B.** Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochemical and biophysical research communications* 1999, 266(3), 699-717.

**Fan TM, de Lorimier LP, Garrett LD, Lacoste HI.** The bone biologic effects of zoledronate in healthy dogs and dogs with malignant osteolysis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008, 22, 380-387.

**Fan TM, de Lorimier LP, O'Dell-Anderson K, Lacoste HI, Charney SC.** Single-agent pamidronate for palliative therapy of canine appendicular osteosarcoma bone pain. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007, 21, 431-439.

**Farley JR, Kyeyune-Nyombi E, Tarbaux NM, Hall SL, Strong DD.** Alkaline phosphatase activity from human osteosarcoma cell line SaOS-2: an isoenzyme standard for quantifying skeletal alkaline phosphatase activity in serum. *Clinical Chemistry* 1989, 35(2), 223-229.

**Fennell DA, Chacko A, Mutti L.** BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene* 2008, 27, 1189-1197.

**Ferretti G, Fabi A, Carlini P, Papaldo P, Cordiali Fei P, Di Cosimo S, Salesi N, Giannarelli D, Alimonti A, Di Cocco B, D'Agosto G, Bordignon V, Trento E, Cognetti F.** Zoledronic-acid-induced circulating level modifications of angiogenic factors, metalloproteinases and proinflammatory cytokines in metastatic breast cancer patients. *Oncology* 2005, 69(1), 35-43.

**Fink SL, Cookson BT.** Apoptosis, pyroptosis, and necrosis : mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity* 2005, 73(4), 1907-1916.

**Fischer M, Juremalm M, Olsson N, Backlin C, Sundström C, Nilsson K, Enblad G, Nilsson G.** Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg cells and its possible role in the recruitment of mast cells into lymphomatous tissue. *International Journal of Cancer* 2003, 107, 197-201.

**Fleisch H.** Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Research* 2002, 4, 30-34.

**Folkman J.** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine* 1971, 285(21), 1182-1186.

**Forest V, Peoc'h M, Campos L, Guyotat D, Vergnon JM.** Effects of cryotherapy or chemotherapy on apoptosis in a non-small-cell lung cancer xenografted into SCID mice. *Cryobiology* 2005, 50(1), 29-37.

**Formigli L, Conti A, Lippi D.** Falling leaves': a survey of the history of apoptosis. *Minerva Medica* 2004, 95(2), 159-164.

**Francis MD, Valent DJ.** Historical perspectives on the clinical development of bisphosphonates in the treatment of bone diseases. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* 2007, 7(1), 2-8.

**Frenzel A, Grespi F, Chmelewskij W, Villunger A.** Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis* 2009, 14(4), 584-596.

**Fromiguet O, Lagneaux L, Body JJ.** Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000, 15, 2211-2221.

**Frost M, Jarboe EA, Orlicky D, Gianani R, Thompson LC, Enomoto T, Shroyer KR.** Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology* 2002, 117(5), 738-744.

**Fu D, He X, Yang S, Xu W, Lin T, Feng X.** Zoledronic acid inhibits vasculogenic mimicry in murine osteosarcoma cell line in vitro. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2011, 12, 146-153.

**Fukuda S, Pelus LM.** Elevation of survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry. *Cell Cycle* 2002, 1, 322-326.

**Fulda S, Debatin KM.** Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006, 25, 4798-4811.

**Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A.** Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology* 2010, 214074, 1-23.

**Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G.** Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation* 2007, 14, 1237-1243.

**Gerschenson LE, Rotello RJ.** Apoptosis: a different type of cell death. *The FASEB Journal* 1992, 6(7), 2450-2455.

**Gewies A.** Introduction to Apoptosis. *ApoReview* 2003, 5, 1-26.

**Ghatage DD, Gosavi SR, Ganvir SM, Hazarey VK.** Apoptosis: molecular mechanism. *Journal of Orofacial Sciences* 2012, 4(2), 103-107.

**Giger EV, Castagner B, Leroux JC.** Biomedical applications of bisphosphonates. *Journal of Controlled Release* 2013, 167, 175-188.

**Gill J, Ahluwalia MK, Geller D, Gorlick R.** New targets and approaches in osteosarcoma. *Pharmacology and Therapeutics* 2013, 137(1), 89-99.

**Glick D, Barth S, Macleod KF.** Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology* 2010, 221(1), 3-12.

**Glucksmann A.** Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews* 1951, 26, 59-86.

**Gnant M, Mlineritsch B, Schippinger W, Luschin-Ebengreuth G, Pöstlberger S, Menzel C, Jakesz R, Seifert M, Hubalek M, Bjelic-Radisic V, Samonigg H, Tausch C, Eidtmann H, Steger G, Kwasny W, Dubsky P, Fridrik M, Fitzal F, Stierer M, Rücklinger E, Greil R.** Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 2009, 360, 679-691.

**Goldsby RE, Fan TM, Villaluna D, Wagner LM, Isakoff MS, Meyer J, Randall RL, Lee S, Kim G, Bernstein M, Gorlick R, Krailo M, Marina N.** Feasibility and dose discovery analysis of zoledronic acid with concurrent chemotherapy in the treatment of newly diagnosed metastatic osteosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *European Journal of Cancer* 2013, 49(10), 2384-2391.

**Graham R, Russell G.** Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone* 2011, 49, 2-19.

**Green DR, Kroemer G.** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004, 305(5684), 626-629.

**Green JR.** Skeletal complications of prostate cancer: pathophysiology and therapeutic potential of bisphosphonates. *Acta Oncologica* 2005, 44, 282-292.

**Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ.** An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry* 2004, 329(1), 77-84.

**Grenet J, Teitz T, Wei T, Valentine V, Kidd VJ.** Structure and chromosome localization of the human CASP8 gene. *Gene* 1999, 226(2), 225-232.

**Grenman R, Burk D, Virolainen E, Buick RN, Church J, Schwartz DR, Carey TE.** Clonogenic cell assay for anchorage-dependent squamous carcinoma cell lines using limiting dilution. *International Journal of Cancer* 1989, 44(1), 131-136.

**Gross A, Katz SG.** Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death and Differentiation* 2017, 24, 1348-1358.

**Gustafson DL, Duval DL, Regan DP, Thamm DH.** Canine sarcomas as a surrogate for the human disease. *Pharmacology and Therapeutics* 2018, 188, 80-96.

**Hamburger V, Oppenheim RW.** Naturally Occurring Neuronal Death in Vertebrates. I *Neuroscience Commentaries* 1982, 1(2), 39-55.

**Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100(1), 57-70.

**Heyman SJ, Diefenderfer DL, Goldschmidt MH, Newton CD.** Canine axial skeletal osteosarcoma. A retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). *Veterinary Surgery* 1992, 21, 304-310.

**Heymann D, Ory B, Blanchard F, Heymann MF, Coipeau P, Charrier C, Couillauda S, Thieryc JP, Gouina F, Redini F.** Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* 2005, 37(1), 74-86.

**Hirose Y, Yoshimi, N, Suzui M, Kawabata K, Tanaka T, Mori H.** Expression of bcl-2, bax, and bcl-XL proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas. *Molecular Carcinogenesis* 1997, 19(1), 25-30.

**Hillers KR, Dernell WS, Lafferty MH, Withrow SJ, Lana SE.** Incidence and prognostic importance of lymph node metastases in dogs with appendicular osteosarcoma: 228 cases (1986–2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2005, 226, 1364-1367.

**Hirbe AC, Roelofs AJ, Floyd DH, Deng H, Becker SN, Lanigan LG, Apicelli AJ, Xu Z, Prior JL, Eagleton MC, Piwnica-Worms D, Rogers MJ, Weilbaecher K.** The bisphosphonate zoledronic acid decreases tumor growth in bone in mice with defective osteoclasts. *Bone* 2009, 44, 908-916.

**Hlavaty J, Wolfesberger B, Hauck M, Obermayer-Pietsch B, Fuchs-Baumgartinger A, Miller I, Walter I.** Ezrin and moesin expression in canine and feline osteosarcoma. *Histology and Histopathology* 2017, 32(8), 805-816.

**Hongmei Zhao.** Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. *Apoptosis and Medicine* 2012, 3-22.

**Horie N, Murata H, Kimura S, Takeshita H, Sakabe T, Matsui T, Maekawa T, Kubo T, Fushiki S.** Combined effects of a third-generation bisphosphonate, zoledronic acid with other anticancer agents against murine osteosarcoma. *British Journal of Cancer* 2007, 96, 255-261.

**Horvitz H, Ellis H, Sternberg P.** Programmed cell death in nematode development. *Neuroscience Comments* 1982, 1, 56-65.

**Hsu H, Xiong J, Goeddel DV.** The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995, 81(4), 495-504.

**Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM.** Caspase- 14 is a novel developmentally regulated protease. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273, 29648-29653.

**Huang Z, Chen G, Shi P.** Emodin-induced apoptosis in human breast cancer BCap-37 cells through the mitochondrial signaling pathway. *Archives of Pharmacal Research* 2008, 31(6), 742-748.

**Hung RWY, Chow AW.** Dissecting the “end game”: clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assesment of apoptosis. *Clinical and Investigative Medicine* 2004, 27, 324-344.

**Idris AI, Rojas J, Greig IR, van't Hof RJ, Ralston SH.** Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. *Calcified Tissue International* 2008, 82, 191-201.

**Jaattela M.** Multiple cell death pathways as regulators of tumor initiation and progression, *Oncogene* 2004, 449(2), 175-185.



**Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami HA, Croucher PI.** The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *British Journal of Cancer* 2001, 84, 1126-1134.

**Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD.** Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian Journal of Medical Research* 2015,141(4), 389-397.

**Jang JS, Kim KM, Kang KH, Choi JE, Lee WK, Kim CH, Kang YM, Kam S, Kim IS, Jun JE, Jung TH, Park JY.** Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer. *Lung cancer* 2008, 60(1), 31-39.

**Jiménez-Ruiz A, Alzate JF, MacLeod ET, Lüder CGK, Fasel N, Hurd H.** Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasites and Vectors* 2010, 3(1), 104.

**Johnson M, Howerth E.** Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Veterinary Pathology Online* 2004, 41(6), 599-607.

**Johnson VL, Ko SCW, Holmstrom TH, Eriksson JE, Chow SC.** Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological changes during chemical-induced apoptosis. *Journal of Cell Science* 2000, 113, 2941-2953.

**Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J.** Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death and Differentiation* 2002, 9, 1115-1125.

**Kang YH, Yi MJ, Kim MJ, Park MT, Bae S, Kang CM, Cho CK, Park IC, Park MJ, Rhee CH, Hong SI, Chung HY, Lee YS, Lee SJ.** Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Research* 2004, 64(24), 8960-8967.

**Kanno T, Nishizaki T.** Sphingosine induces apoptosis in hippocampal neurons and astrocytes by activating caspase-3/-9 via a mitochondrial pathway linked to SDK/14-3-3 protein/Bax/cytochrome c. *Journal of Cellular Physiology* 2011, 6, 2329-2337.

**Kasibhatla S, Amarante-Mendes GP, Finucane D, Brunner T, Bossy-Wetzel E, Green DR.** Analysis of DNA fragmentation using agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006, pdb.prot4429.

**Kaufmann SH, Earnshaw WC.** Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research* 2000, 256, 42-49.

**Kaufmann SH, Gores GJ.** Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* 2000, 22, 1007-1017.

**Kavya N, Rao S, Sathyanarayana ML, Narayanaswamy HD, Byregowda SM, Ranganath L, Kamaran A, Purushotham KM, Kishore TK.** Survivin expression in canine spontaneous cutaneous and subcutaneous tumors and its prognostic importance. *Veterinary World* 2017, EISSN: 2231-0916, 1286-1291.

**Kawamoto Y, Nakajima YI, Kuranaga E.** Apoptosis in cellular society: Communication between apoptotic cells and their neighbors. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, 17(12), 2144-2158.

**Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N.** Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer, *Cancer Research* 1998, 22, 5071-4.

**Kawata N, Tsuchiya N, Horikawa Y, Inoue T, Tsuruta H, Maita S, Satoh S, Mitobe Y, Narita S.** Two survivin polymorphisms are cooperatively associated with bladder cancer susceptibility. *International Journal of Cancer* 2011, 129(8), 1872-1880.

**Kerr JF, Wylie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972, 26, 239-257.

**Kerr JFR, Searle J.** A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. *The Journal of Pathology* 1972, 107, 41-44.

**Kerr JFR.** Shrinkage necrosis of adrenal cortical cells. *The Journal of Pathology* 1972, 107(3), 217-219.

**Kerr JFR.** Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *The Journal of Pathology*

1971, 105,13-20.

**Khan KH, Blanco-Codesido M, Molife LR.** Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2014, 90, 200-219.

**Kidd VJ.** Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annual Review of Physiology* 1998, 60(1), 533-573.

**Kim SH, Shin KH, Moon SH, Jang J, Kim SH, Suh JS, Yang WI.** Reassessment of alkaline phosphatase as serum tumor marker with high specificity in osteosarcoma. *Cancer Medicine* 2017, 6(6), 1311-1322.

**Kim SJ, Kim HJ, Kim HR, Lee SH, Cho SD, Choi CS, Nam JS, Jung JY.** Antitumor actions of baicalein and wogonin in HT-29 human colorectal cancer cells. *Molecular Medicine Reports* 2012, 6(6), 1443-1449.

**Kirpensteijn J, Kik M, Rutteman GR, Teske E.** Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Veterinary Pathology* 2002, 39, 240-246.

**Koizumi M, Nakaseko C, Ohwada C, Takeuchi M, Ozawa S, Shimizu N, Cho R, Nishimura M, Saito Y.** Zoledronate has an antitumor effect and induces actin rearrangement in dexamethasone-resistant myeloma cells. *European Journal of Haematology* 2007, 79, 382-391.

**Kostić M, Nikolić N, Ilić B, Carkić J, Milenković S, Vukadinović M.** Analysis of polymorphism in the survivin gene promoter as a potential risk factor for head and neck cancers development. *Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo* 2013, 141, 304-307.

**Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT.** Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997, 278, 294-298.

**Koto K, Murata H, Kimura S, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, Ryu K, Sakabe T, Itoi M, Ashihara E, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T.** Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents. *Oncology Reports* 2010, 24(1), 233-239.

**Krajarng A, Nilwarankoon S, Suksamrarn S, Watanapokasin R.** Antiproliferative effect of a-mangostin on canine osteosarcoma cells. *Research in Veterinary Science* 2012, 93, 788-794.

**Krajewska M, Kim H, Shin E, Kennedy S, Duffy MJ, Wong YF, Marr D, Mikolajczyk J, Shabaik A, Meinhold-Heerlein I, Huang X, Banares S, Hedayat H, Reed JC, Krajewski S.** Tumor-associated alterations in caspase-14 expression in epithelial malignancies. *Clinical Cancer Research* 2005, 11, 5462-5471.

**Krishan A, Frankfurt S.** Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the specific detection of apoptotic cells and its application to rapid drug screening. *Journal of Immunological Methods* 2001, 253, 144-133.

**Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M.** The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology* 1998, 60, 619-642.

**Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G.** Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation* 2005, 12(2) 1463-1467.

**Kubista B, Trieb K, Sevelde F, Toma C, Arrich F, Heffeter P, Elbling L, Sutterlüty H, Scotlandi K, Kotz R, Micksche M, Berger W.** Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells. *Journal of Orthopaedic Research* 2006, 24(6), 1145-1152.

**Labrinidis A, Hay S, Liapis V, Findlay DM, Evdokiou A.** Zoledronic acid protects against osteosarcoma-induced bone destruction but lacks efficacy against pulmonary metastases in a syngeneic rat model. *International Journal of Cancer* 2010, 127, 345-354.

**LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE.** The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998,17, 3247-3259.

**Lamers F, Narendran A.** Pathways of intrinsic apoptosis in neuroblastoma: targets for therapeutics and new drug development. In Neuroblastoma, Shimada H (eds), Intech, 2013, s 131-142.

**Lauxen I, Oliveira MG, Rados PV, Lingen MW, Nor JF, Sant'ana Filho, M.** Immunoprofiling of oral squamous cell carcinomas reveals high p63 and survivin expression. *Oral Diseases* 2014, 20, 76-80.

**Lazebnik Y, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC.** Cleavage of Poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994, 371, 346-347.

**Lee MV, Fong EM, Singer FR, Guenette RS.** Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer Research* 2001, 61, 2602-2608.

**Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross R.** Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Molecular Cell* 1998, 1, 553-563.

**Li J, Zhang Z, Dai Z, Anthony PP, Christoph P, Carl M, Yian W, Ming Y.** RASSF1 a promoter methylation and kras2 mutations in non-small cell lung cancer. *Neoplasia* 2003, 5, 362-366.

**Liptak JM, Dernel WS, Ehrhart N, Withrow SJ.** Canine appendicular osteosarcoma: diagnosis and palliative treatment. *Compendium* 2004, (March), 172-183.

**Liu T, Brouha B, Grossman D.** Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene* 2004, 23, 39-48.

**Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001, 25 (4), 402-408.

**Long JS, Ryan KM.** New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene* 2012, 31(49), 5045-5060.

**Lossi L, Merighi A.** In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Progress in Neurobiology* 2003, 69(5), 287-312.

**Loukopoulos P, Robinson WF.** Clinicopathological relevance of tumour grading in canine osteosarcoma. *Journal of Comparative Pathology* 2007, 136, 65-73.

**Lowe SW, Lin AW.** Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 2000, 21, 485-495.

**Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N.** Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas *Cancer Research* 1998, 58, 1808-1812.

**Mantovani FB, Morrison JA, Mutsaers AJ.** Effects of epidermal growth factor receptor kinase inhibition on radiation response in canine osteosarcoma cells. *BMC Veterinary Research* 2016, 12, 82.

**Mapara MY, Sykes M.** Tolerance and cancer: Mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *Journal of Clinical Oncology* 2004, 22(6), 1136-1151.

**Martinez MM, Reif RD, Pappas D.** Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods* 2010, 2(8), 996-1004.

**Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J.** Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005, 22, 355-370.

**Mauchle U, Selvarajah GT, Mol JA, Kirpensteijn J, Verheije MH.** Identification of anti-proliferative kinase inhibitors as potential therapeutic agents to treat canine osteosarcoma. *The Veterinary Journal* 2015, 205, 281-287.

**Mehrotra S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC.** IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell* 2010, 17, 53-64.

**Meller R, Skradski SL, Simon RP, Henshall DC.** Expression proteolysis and activation of caspases 6 and 7 during rat c6 glioma cell apoptosis. *Neuroscience Letters* 2002, 324(1), 33-36.

**Meyer F, Walter I.** Establishment and characterization of new canine and feline osteosarcoma primary cell lines. *Veterinary Science* 2016, 3(2), 9.

**Michele C, Monica M, Silvio N, Gerardo B, Raffaele A, Alberto A.** Zoledronic acid: an unending tale for an anti-resorptive agent. *Expert Opinion On Pharmacotherapy* 2010, 11(1), 141-154.

**Millanta F, Asproni P, Cancedda S, Vignoli M, Baccix B, Poli A.** Immunohistochemical Expression of COX-2, mPGES and EP2 receptor in normal and reactive canine bone and in canine osteosarcoma. *Journal of Comparative Pathology* 2012, 147, 153e160.

**Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S.** Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53- dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002, 21(17), 2613-2622.

**Misdorp W, Hart AA.** Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1979, 62, 537-545.

**Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ.** Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clinical Cancer Research* 2008,14(16), 5000-5005.

**Morello E, Martano M, Buracco P.** Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: Similarities and differences with human osteosarcoma. *The Veterinary Journal* 2011, 189, 268-277.

**Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y.** An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(37), 34287-34294.

**Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes CF, Gauldie J, Bleackley RC.** Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 2000, 103, 491-500.

**Mountz JD, Zhou T.** Apoptosis and autoimmunity. In: Kopman WJ (eds), *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions*. Lippincott-Williams and Wilkins, Pennsylvania, USA, 2001

**Mueller F, Fuchs B, Kaser-Hotz B.** Comparative biology of human and canine osteosarcoma, *Anticancer Research* 2007, 27(1A), 155-164.

**Murayama T, Kawasoe Y, Yamashita Y, Ueno Y, Minami S, Yokouchi M, Komiya S.** Efficacy of the third-generation bisphosphonate risedronate alone and in combination with anticancer drugs against osteosarcoma cell lines. *Anticancer Research* 2008, 28, 2147-2154.

**Nagata S.** Fas ligand-induced apoptosis. *Annual Review of Genetics* 1999, 33, 29-55.

**Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J.** Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature* 2000, 403, 98-103.

**Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Gopin IS, Opas M, Bleackly CR, Green RD, Michalak M.** Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *Journal of Cell Biology* 2000, 150, 731-740.

**Nakano J, Huang CL, Liu D, Ueno M, Sumitomo S, Yokomise H.** Survivin gene expression is negatively regulated by the p53 tumor suppressor gene in non- small cell lung cancer. *International Journal of Oncology* 2005, 27(5), 1215-1221.

**Nguyen ML, Blaho JA.** Cellular players in the herpes simplex virus dependent apoptosis balancing act. *Viruses* 2009, 1(3), 965-978.

**Nicholson DW, Thornberry NA.** Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences* 1997, 22(8), 299-306.

**Nicholson DW.** Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* 1999, 6, 1028-1042.

**Norbury CJ, Hickson ID.** Cellular responses to DNA damage. *Annual Review Pharmacology and Toxicology* 2001, 41, 367-401.

**O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, Nath AK, Pober JS, Altieri DC.** Control of apoptosis during angiogenesis by Survivin expression in endothelial cells. *American Journal of Pathology* 2000, 156, 393-398.

**Okada H, Bakal C, Shahinian A, Elia A, Wakeham A, Suh WK.** Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *The Journal of Experimental Medicine* 2004, 199, 399-410.

**Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U.** A novel anti- sense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Research* 2000, 60, 2805-2809.



**Oliveira JB, Gupta S.** Disorders of apoptosis: mechanisms for autoimmunity in primary immunodeficiency diseases. *Journal of Clinical Immunology* 2008, 28(1), 20-28.

**Ong SM, Saeki K, Tanaka Y, Nishimura R, Nakagawa T.** Effects of etoposide alone and in combination with piroxicam on canine osteosarcoma cell lines. *The Veterinary Journal* 2016, 218, 51-59.

**Ong SM, Yamamoto H, Saeki K, Tanaka Y, Yoshitake R, Nishimura R, Nakagawa T.** Anti-neoplastic effects of topoisomerase inhibitors in canine mammary carcinoma, melanoma, and osteosarcoma cell lines. *Japanese Journal of Veterinary Research* 2017, 65(1), 17-28.

**Orriss, IR, Key ML, Colston KW, Arnett TR.** Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009, 106, 109-118.

**Ory B, Moriceau G, Trichet V, Blanchard F, Berreur M, Rédini F, Rogers M, Heymann D.** Farnesyl diphosphate synthase is involved in the resistance to zoledronic acid of osteosarcoma cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2008, 12(3), 928-941.

**Osaka E, Suzuki T, Osaka S, Yoshida Y, Sugita H, Asami S, Tabata K, Hemmi A, Sugitani M, Nemoto N, Ryu J.** Survivin as a prognostic factor for osteosarcoma patients. *Acta Histochemica et Cytochemica* 2006, 39, 95-100.

**Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK.** Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation* 2012, 45(6), 487-498.

**Owens G, Jackson R, Lewiecki EM.** An integrated approach: bisphosphonate management for the treatment of osteoporosis. *The American Journal of Managed Care* 2007, 13, 290-308.

**Patntirapong S, Singhatanadgit W, Chanruangvanit C, Lavanrattanakul K, Satravaha Y.** Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2012, 41(9), 713-720.

**Pattingre S, Levine B.** Bcl-2 inhibition of autophagy: A new route to cancer? *Cancer Research* 2006, 66(6), 2885-2888.

**Pautke C, Schieker M, Tischler T, Kolk A, Neth P, Mutschler W, Milz S.** Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Research* 2004, 24(6), 3743-3748.

**Pavlyukov MS, Antipova NV, Balashova MV, Vinogradova TV, Kopantzev EP, Shakhparonov MI.** Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation. *Journal of Biological Chemistry* 2011, 286(26), 23296-23307.

**Petroianu GA.** Pharmacist Theodor Salzer (1833-1900) and the discovery of bisphosphonates. *Pharmazie* 2011, 66, 804-807.

**Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW.** Structural biology of the bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004, 1644(2-3), 83-94.

**Phillips B, Powers BE, Dernell WS, Straw RC, Khanna C, Hogge GS, Vail DM.** Use of single-agent carboplatin as adjuvant or neoadjuvant therapy in conjunction with amputation for appendicular osteosarcoma in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2009, 45, 33-38.

**Plati J, Bucur O, Khosravi-Fat R.** Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative Biology* 2011, 3(4), 279-296.

**Poirier VJ, Huelsmeyer MK, Kurzman ID, Thamm DH, Vail DM.** The bisphosphonates alendronate and zoledronate are inhibitors of canine and human osteosarcoma cell growth in vitro. *Veterinary and Comparative Oncology* 2003, 1(4), 207-215.

**Poradowski D, Ciaputa R, Obmińska-Mrukowicz B, Nowak M, Górzyńska E, Janus I.** Comparison of cell markers expression in canine and human spontaneous osteosarcomas and established osteosarcoma cell lines. *Pakistan Veterinary Journal* 2016, 36(1), 25-30.

**Porrello A, Cardelli P, Spugnini EP.** Oncology of companion animals as a model for humans. An overview of tumor histotypes. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2006, 25, 97-105.

**Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT.** Anti-apoptosis and cell survival. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011, 1813, 238-259.

**Priester WA, Mc Kay FW.** The occurrence of tumors in domestic animals. *Journal of The National Cancer Institute Monographs* 1980, 54, 1-210

**Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL.** Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* 2003, 283, 1-16.

**Qin C, Cao Q, Li P, Ju X, Wang M, Chen J, Liu N, Yin Y, You Y.** Functional promoter-31G>C variant in survivin gene is associated with risk and progression of renal cell cancer in a Chinese population. *PLoS One* 2012, 7, 288-289.

**Quigley PJ, Leedale AH.** Tumors involving bone in the domestic cat: a review of fifty-eight cases. *Veterinary Pathology* 1983, 20, 670-686.

**Rack B, Juckstock J, Genss EM, Schoberth A, Schindlbeck C, Strobl B, Heinrigs M, Rammel G, Zwingers T, Sommer H, Friese K, Janni W.** Effect of zoledronate on persisting isolated tumour cells in patients with early breast cancer. *Anticancer research* 2010, 30, 1807-1813.

**Raff M.** Cell suicide for beginners. *Nature* 1998, 396, 119-122.

**Rastogi RP, Sinha R, Sinha RP.** Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal* 2009, 8, 155-181.

**Reed JC.** Mechanisms of Apoptosis. *American Journal of Pathology* 2000, 157(5), 1415-1430.

**Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, Spelsberg TC.** Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Research* 2000, 60(21), 6001-6007.

**Ren HY, Sun LL, Li HY, Ye ZM.** Prognostic Significance of Serum Alkaline Phosphatase Level in Osteosarcoma: A Meta-Analysis of Published Data. *BioMed Research International* 2015, 160835.

**Reszka AA, Rodan GA.** Mechanism of action of bisphosphonates. *Current Osteoporosis Reports* 2003, 1, 45-52.

**Ricci JE, Waterhouse N, Green DR.** Mitochondrial functions during cell death, a complex

(I-V) dilemma. *Cell Death and Differentiation* 2003, 10(5), 488-492.

**Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ.** Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clinical Cancer Research* 2006, 12(20), 6222-6230.

**Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J.** Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 2011, 49, 34-41.

**Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkinen J, Frith JC.** Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000, 88, 2961-2978.

**Rousalova I, Krepela E.** Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (Review). *International Journal of Oncology* 2010, 37, 1361-1378.

**Rudel T, Bokoch GM.** Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 1997, 276, 1571-1574.

**Rutkowski DT, Kaufman RJ.** A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biology* 2004, 14, 20-28.

**Ryu K, Murata H, Koto K, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, Sakabe T, Takeshita H, Itoi M, Kimura S, Ashihara E, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T.** Combined effects of bisphosphonate and radiation on osteosarcoma cells. *Anticancer Research* 2010, 30(7), 2713-2720.

**Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y.** Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 1999, 401, 168-173.

**Sakahira H, Enari M, Nagata S.** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998, 391, 96-99.

**Salvesen GS, Dixit VM.** Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceeding of The National Academy of Sciences of The USA* 1999, 96, 217-245.

**Sarela A, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ.** Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic

adenocarcinoma. *British Journal of Cancer* 2002, 86, 886-892.

**Saunders JW.** Death in Embryonic Systems. *Science* 1966, 154(3749), 604-612.

**Sawada M, Nakashima S, Banno Y, Yamakawa H, Hayashi K, Takenaka K, Nishimura Y, Sakai N, Nozawa Y.** Ordering of ceramide formation, caspase activation, and Bax/Bcl-2 expression during etoposide-induced apoptosis in C6 glioma cells. *Cell Death and Differentiation* 2000, 7, 761-772.

**Schmidt AF, Nielen M, Withrow, SJ, Selmic LE, Burton JH, Klungel OH, Groenwold RH, Kirpensteijn J.** Chemotherapy effectiveness and mortality prediction in surgically treated osteosarcoma dogs. *Preventive Veterinary Medicine* 2016, 125, 126-134.

**Schultz DR, Harrington WJ.** Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2003, 32(6), 345-369.

**Schwartzman RA, Cidlowski JA.** Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Review* 1993, 14, 133-150.

**Schweichel JU, Merker HJ.** The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973, 7, 253-266.

**Selvarajah GT, Kirpensteijn J.** Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. *The Veterinary Journal* 2010, 185, 28-35.

**Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW.** Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer* 2000, 82, 1459-1468.

**Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, Kandimalla ER, Agrawal S, Shafit-Zagardo B.** Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. *Journal of Neurochemistry* 2011, 79, 426-436.

**Sharili AS, Allen S, Smith K, Hargreaves J, Price J, McGonnell I.** Expression of Snail2 in long bone osteosarcomas correlates with tumour malignancy. *Tumor Biology* 2011, 32(3), 515-526.

**Shi Y.** Activation of Initiator Caspases: History, Hypotheses and Perspectives. *Journal of Cancer Molecules* 2005, 1(1), 9-18.

**Shidoji Y, Hayashi K, Komura S, Ohishi N, Yagi K.** Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999, 264, 343-347.

**Shipman CM, Croucher PI, Russell RG, Helfrich MH, Rogers MJ.** The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Research* 1998, 58, 5294-5297.

**Shoeneman JK, Ehrhart EJ, Eickhoff JC, Charles JB, Powers BE, Thamm DE.** Expression and function of survivin in canine osteosarcoma. *Cancer Research* 2012, 71 (1), 249-259.

**Sinkovics JG.** Programmed cell death (apoptosis): its virological and immunological connections (a review). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 1991, 38, 321-334.

**Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F.** Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000, 5(5), 415-418.

**Simpson S, Dunning MD, de Brot S, Grau-Roma L, Mongan NP, Rutland CS.** Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2017, 59(1), 71.

**Song Z, Yao X, Wu M.** Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278, 23130-23140.

**Spodnick GJ, Berg J, Rand WM, Schelling SH, Couto G, Harvey HJ, Henderson RA, MacEwen G, Mauldin N, McCaw DL, Moore AS, Morrison W, Norris AM, O'Bradovich J, O'Keefe DA, Page R, Ruslander D, Klausner J, Straw R, Thompson JP, Withrow SJ.** Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978–1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992, 200, 995-999.

**Spugnini EP, Vincenzi B, Caruso G, Baldi A, Citro G, Santini D, Tonini G.** Zoledronic acid for the treatment of appendicular osteosarcoma in a dog. *Journal of Small Animal Practice* 2009, 50, 44-46.

**Steinman RA, Brufsky AM, Oesterreich S.** Zoledronic acid effectiveness against breast cancer metastases - a role for estrogen in the microenvironment? *Breast Cancer Research* 2012, 14(5), 213.

**Straw RC, Withrow SJ, Richter SL, Powers BE, Klein MK, Postorino NC, LaRue SM, Ogilvie GK, Vail DM, Morrison WB, McGee M, Dickinson K.** Amputation and cisplatin for treatment of canine osteosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1991, 5, 205-210.

**Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, Akahane K, Shiraki K.** Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16 INK4a and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000, 19(29), 3225-3234.

**Szewczyk M, Lechowski R, Zabielska K.** What do we know about canine osteosarcoma treatment? - review. *Veterinary Research Communications* 2015, 39(1), 61-67.

**Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC.** Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochemistry and Cell Biology* 2008, 129(1), 33-43.

**Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik Y, Fernandez-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Eamshaw WC.** Cleavage of lamin A by Mch2 $\alpha$  but not CPP32: Multiple interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996, 93, 8395-8400.

**Tamura T, Shomori K, Nakabayashi M, Fujii N, Ryoike K, Ito H.** Zoledronic acid, a third-generation bisphosphonate, inhibits cellular growth and induces apoptosis in oral carcinoma cell lines. *Oncology Reports* 2011, 25(4), 1139-1143.

**Tassone P, Forciniti S, Galea E, Morrone G, Turco MC, Martinelli V, Tagliaferri P, Venuta S.** Growth inhibition and synergistic induction of apoptosis by zoledronate and dexamethasone in human myeloma cell lines. *Leukemia* 2000, 14, 841-844.

**Theodoropoulos GE, Michalopoulos NV, Panoussopoulos, SG, Taka S, Gazouli M.** Effects of caspase-9 and survivin gene polymorphisms in pancreatic cancer risk and tumour characteristics. *Pancreas* 2010, 39, 976-980.

**Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995, 267, 1456-1462.

**Thompson RR, Pool KG.** Tumors of bones p. In: Meuten DJ (eds) Tumors in domestic animals, 4th edn. Iowa State Press, Ames, 2008, pp 245–318

**Thornberry NA, Lazebnik Y.** Caspases: enemies within. *Science* 1998, 281(5381), 1312-1316.

**Tıraş B, Taşkıran Ç.** Postmenopozal Osteoporozda tedavi Modaliteleri. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi (Elektronik Dergi)* 2005, 2(5), 21-30.

**Tilly JL.** Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001, 2(11), 838-848.

**Tobias JH, Chow JW, Chambers TJ.** 3-Amino-1-hydroxypropylidene-1-bisphosphonate (AHPPrBP) suppresses not only the induction of new, but also the persistence of existing bone-forming surfaces in rat cancellous bone. *Bone* 1993, 14, 619-623.

**Tomatır AG.** Apoptoz; Programlı Hücre Ölümü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 2003, 23, 499-508.

**Tomlin J, Sturgeon C, Peard M, Muir P.** Use of the bisphosphonate drug alendronate for palliative management of osteosarcoma in two dogs. *Veterinary Record* 2000, 147(5), 129-132.

**Trieb K, Lehner R, Stulnig T, Sulzbacher T, Shroyer KR.** Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. *European Journal of Surgical Oncology* 2003, 29 (4), 379-382.

**Tsujimoto Y.** Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells* 1998, 3, 697-707.

**Uchida T, Takatsu N, Fujimori Y, Fukushima U, Itoh H.** Expression of survivin mRNA in dog tumours. *DNA Sequence* 2005, 16, 329-334.



**Ullen A, Schwarz S, Lennartsson L, Kalkner KM, Sandstrom P, Costa F, Lennernas B, Linder S, Nilsson S.** Zoledronic acid induces caspase-dependent apoptosis in renal cancer cell lines. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 2009, 43(2), 98-103.

**Upadhyay R, Khurana R, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B.** Role of survivin gene promoter polymorphism (-31G>C) in susceptibility and survival of esophageal cancer in northern India. *Annals of Surgical Oncology* 2011, 18, 880-887.

**van der Pluijm G, Vloedgraven H, van Beek E, van der Wee-Pals L, Lowik C, Papapoulos S.** Bisphosphonates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 1996, 98, 698-705.

**Vanden Berghe T, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko DV, Takahashi N, Vandenaabeele P.** Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* 2013, 61(2), 117-129.

**Vanel M, Blond L, Vanel D.** Imaging of primary bone tumors in veterinary medicine: Which differences? *European Journal of Radiology* 2013, 82(12), 2129-2139.

**Vaux DL, Cory S, Adams JM.** Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988, 335, 440-442.

**Vaux DL, Korsmeyer SJ.** Cell death in development. *Cell* 1999, 96(2), 245-254.

**Vaux DL, Weissman IL, Kim SK.** Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992, 258, 1955-1957.

**Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN.** Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology* 2005, 84(10), 627-639.

**Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC.** Caspases and caspase inhibitors. *Trends in Biochemical Sciences* 1997, 22, 388-393.

**von Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabrea C, Martin I, Rubasha HE, Shanbhag AS.** Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005, 26, 6941-6949.

**Walker NI, Harnon BW, Gobe GC, Kerr JF.** Patterns of cell death. *Methods and*

*Achievements in Experimental Pathology* 1988, 13, 18-54.

**Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD.** Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell* 1994, 78, 343-352.

**Wang W, Luo H, Wang A.** Expression of survivin and correlation with PCNA in osteosarcoma. *Journal of Surgical Oncology* 2006, 93(7), 578-584.

**Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Heinrikson RL, Tomasselli AG, Watenpaugh KD.** The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure* 1999, 7(9), 1135-1143.

**Weisbrode SE.** Bones and Joints. In: *Pathologic Basis of Veterinary Diseases*, 4th Edition. Elsevier, 2006, s 1041-1105.

**Wellington CL.** Inhibiting caspase cleavage of huntington reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and non neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 19831-19838.

**Wellington K, Goa KL.** Zoledronic acid a review of its use in the management of bone metastases and hypercalcaemia of malignancy. *Drugs* 2003, 63(4), 417-437.

**Widmann C, Gibson S, Johnson GL.** Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273, 7141-7147.

**Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young KM, Friedrichs K, Argyle DJ.** Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *The Veterinary Journal* 2008, 175(1), 69-75.

**Winter E, Chiaradia LD, Silva AH, Nunes RJ, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB.** Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action. *Toxicology in Vitro* 2014, 28, 769-777.

- Witters LM, Crispino J, Fraterrigo T, Green J, Lipton A.** Effect of the combination of docetaxel, zoledronic acid, and a COX-2 inhibitor on the growth of human breast cancer cell lines. *American Journal of Clinical Oncology* 2003, 26, 92-97.
- Wolfesberger B, Tonar Z, Gerner W, Skalicky M, Heiduschka G, Egerbacher M, Thalhammer JG, Walter I.** The tyrosine kinase inhibitor sorafenib decreases cell number and induces apoptosis in a canine osteosarcoma cell line. *Research in Veterinary Science* 2010, 88(1), 94-100.
- Wolke RE, Nielsen SW.** Site incidence of canine osteosarcoma. *Journal of Small Animal Practice* 1966, 7, 489-492.
- Wyllie AH.** Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 1980, 68, 251-306.
- Xu YZ, Kanagaratham C, Youssef M, Radzioch D.** New Frontiers in Cancer Chemotherapy - Targeting Cell Death Pathways. In: Cell Biology, Najman S (eds), InTech, 2016, s 93-140.
- Yang JN, Liu CX.** Caspases promoted DADA6 induced apoptosis in human Leukemia HL-60 cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 2002, 23(5), 461-466.
- Yang L, Zhu H, Zhou B, Gu H, Yan H, Tang N, Dong H, Sun Q, Cong R, Chen G, Wang B.** The association between the survivin C-31G polymorphism and gastric cancer risk in a Chinese population. *Digestive Diseases and Sciences* 2009, 54, 1021-1028.
- Yehielly F, Deiss LP.** Apoptosis and cancer, Basic Science of Cancer. In: Kruh GD, Tew, KD (eds), Current Medicine inc, Philadelphia, 2000.
- Yonekawa T, Thorburn A.** Autophagy and Cell Death. *Essays Biochemistry* 2013, 55, 105-117.
- Yu JQ, Bao W, Lei JC.** Emodin regulates apoptotic pathway in human liver cancer cells. *Phytotherapy Research* 2013, 27(2), 251-257.
- Yuan CQ, Ding ZH.** Structure and function of caspases. *Guowai Yixue Fenzi Shengwuxue Fence* 2002, 24, 146-151.

**Zekri J, Mansour M, Karim SM.** The anti-tumour effects of zoledronic acid. *Journal of Bone Oncology* 2014, 3(1), 25-35.

**Zhang R, Thamm DH, Misra V.** The effect of Zhangfei/CREBZF on cell growth, differentiation, apoptosis, migration, and the unfolded protein response in several canine osteosarcoma cell lines. *BMC Veterinary Research* 2015, 11, 22-32.

**Zhao X, Hu X.** Dosing of zoledronic acid with its anti-tumor effects in breast cancer. *Journal of Bone Oncology* 2015, 4(3), 98-101.

**Zhivotovsky B, Orrenius S.** Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium* 2011, 50, 211-221.

**Zhou BB, Li H, Yuan J, Kirschner MW.** Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998, 95, 6785-6790.

**Ziegler U, Groscurth P.** Morphological Features of Cell Death. *News in Physiological Sciences* 2004, 19(3), 124-128.

**Zwolak P, Manivel JC, Jasinski P, Kirstein MN, Dudek AZ, Fisher J, Cheng EY.** Cytotoxic effect of zoledronic acid-loaded bone cement on giant cell tumor, multiple myeloma, and renal cell carcinoma cell lines. *Journal of Bone and Joint Surgery* 2010, 92(1), 162-168.

## ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : EKREN AŞICI, Gamze Sevri  
Uyruk : Türkiye Cumhuriyeti  
Doğum Yeri ve Tarihi : Aydın 31.05.1987  
Telefon : 0505 6306898  
E-mail : gmz-svr@hotmail.com  
Yabancı Dil : İngilizce

### EĞİTİM

<u>Derece</u> :	<u>Kurum</u>	<u>Mezuniyet tarihi</u> :
Doktora	ADÜ	
Y. Lisans	ADÜ	2013
Lisans	Ege Üniversitesi	2010

### İŞ DENEYİMİ

<u>Yıl</u> :	<u>Kurum</u>	<u>Unvan</u> :
2013- Devam Ediyor	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya A.D	Araş. Gör.

### BURSLAR:

Tübitak 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı (2013-2017)

### AKADEMİK YAYINLAR

#### 1.MAKALELER

##### A) Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Demir Ş, Ünübol M, Aypak SÜ, Ipek E, Aktaş S, **Ekren GS**, Yılmaz M, Tunca R, Güney E. Histopathologic Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Hypothyroidism-Induced Rats. *International Journal of Endocrinology* 2016, 5083746.
2. Karademir Ü, Akın İ, Erdoğan H, Ural K, **Ekren Aşıcı G S**. Effect of Ketoprofen on acute phase protein concentrations in goats undergoing castration. *BMC Veterinary Research* 2016, 12(1), 123.

3. Ulutaş P A, Ulutaş B, Kıral F, **Ekren Aşıcı G S**, Gültekin M. Changes of acute phase protein levels in Saanen goat kids during neonatal period. *Small Ruminant Research* 2017, 146, 33-36.
4. Gultekin M, Ural K, Pasa S, Balikci C, **Ekren Asici G S**. Oxidative status and lipid profile in mono and co-infection with canine monocytic ehrlichiosis. *Medycyna Weterynaryjna* 2017, 73 (12), 797-801.
5. Yılmaz M, Altın T, Kıral F, Taşkın T, **Ekren Aşıcı G S**, Kızılkaya K. Effects of Season on Physiological and Endocrine Traits and on HSP70 in Saanen Goats under Mediterranean Climate Conditions. *Medycyna Weterynaryjna* 2018, 74 (1), 39-47.
6. Yılmaz M, Kaykı M, **Ekren Aşıcı G S**, Kıral F. The mRNA Gene Expression Profiles for HSP60 and HSP70 in Various Aged Saanen Goats in Different Seasons. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi** 2018, 24 (1), 75-81.
7. Bildik A, **Aşıcı Ekren G S**, Akdeniz G, Kıral F. Effect of Environmental Temperature on Heat Shock Proteins (HSP 30, HSP 70, HSP90) and IGF-I mRNA expression in Sparus aurata. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* DOI: 10.22092/ijfs.2018.116979
8. Altın T, Yılmaz M, Kıral F, Yorulmaz E, **Ekren Aşıcı G S**. Effects of the genotype and the seasons on physiological parameters related with adaptability in sheep in mediterranean climate conditions. *Veterinarija Ir Zootechnika* 2018, 76(98).
9. Tuna G E, Dinler C, Ekren Aşıcı G S, Ulutaş B. Serum concentrations of some acute phase proteins in cats with anaemia. *Medycyna Weterynaryjna* 2018 DOI: dx.doi.org/10.21521/mw.5998.
10. Ünsal C, Ünsal H, Ekici M, Koç Yıldırım E, Üner A G, Yıldız M, Güleş Ö, **Ekren Aşıcı G S**, Boyacıoğlu M, Balkaya M, Belge F. The effects of exhaustive swimming and probiotic administration in trained rats: Oxidative balance of selected organs, colon morphology, and contractility. *Physiology International*, 2018, 105(4), 309-324.

## **B) Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler**

- 1.Gültekin M, Paşa S, Ural K, Balıkçı C, Ekren Aşıcı G S, Balat G. Visseral Leishmaniasis'in Farklı Evrelerindeki Köpeklerde Oksidatif Durum ve Lipid Profili. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2017, 41, 183-187.

## **2. PROJELER**

- 1.Fitaz üreten fungusdan enzimin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, FEF-12028, Yardımcı Araştırmacı, 2012-2013.
- 2.Oğlaklarda doğum sonrası bazı akut faz proteinlerinin serum konsantrasyonlarının incelenmesi, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, VTF-14006, Yardımcı Araştırmacı, 2014-2016.
- 3.Hipotiroidizm Oluşturulmuş Ratlarda Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı Gelişiminin ve Epikardiyal Yağ Dokusunun Değerlendirilmesi, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, TPF-15011, Yardımcı Araştırmacı, 2015.
- 4.Paklitaksel ile Glutasyon Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücre Hattında Sitotoksik ve Antioksidan Etkileri, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, VTF-15054, Yardımcı Araştırmacı, 2015-devam ediyor.
- 5.Köpeklerde Vektörlerle Bulaşan Bazı Hastalıklarda Paraoksonaz/Arilesteraz Enzim Aktiviteleri ve Oksidatif Durumun Araştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, VTF-16003, Yardımcı Araştırmacı, 2016-2017.
- 6.Tiroid Nodülü ve Adrenal Adenom Oluşumunda Metabolik Sendromun Rolünün Rat Modelinde Değerlendirilmesi, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, TPF-16017, Yardımcı Araştırmacı, 2016-devam ediyor.
- 7.İndometazinle İndüklenmiş Gastrik Ülserde Androgropolide'nin Farklı Dozlarda Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması, TPF-17002, Yardımcı Araştırmacı, 2017-devam ediyor.
- 8.Büyüme Dönemindeki Oğlaklarda Peynir Altı Suyu Tozunun Kullanım Olanakları, ZRF-17035, Yardımcı Araştırmacı, 2017-devam ediyor.
- 9.Köpek osteosarkom hücre hattı üzerine klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün sitotoksik etkilerinin incelenmesi, Adnan Menderes Üniversitesi BAP, VTF-17025, Yardımcı Araştırmacı, 2017-devam ediyor.

10. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Warburg Etkisinin ve Hipoksinin Glikoliz Enzimleri Gen Ekspresyonu Düzeyinde Araştırılması, TÜBİTAK 1002, Yardımcı Araştırmacı, 2017-devam ediyor.

### 3. BİLDİRİLER

#### A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. **Ekren G S**, Metin K. Production purification and characterization of phytase from phytase producing fungus. European Biotechnology Congress 16-18 May 2013, Bratislava, Slovakia. Doi: 10.1016/j.copbio.2013.05.234 (Poster Bildiri).
2. Tekeli H, Tosun G, Bildik A, **Ekren G S**, Kırall F, Beceriklisoy H B. Effects of enzymatic antioxidant parameters of boric acid application in ovariectomized rats. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, 09-12 September 2014, Isparta, Turkey (Poster Bildiri).
3. Kırall F, Sekkin S, Paşa S, Ertabaklar H, Ulutaş P A, **Ekren G S**. Investigation of DNA Damage and Protein Damage Caused by Oxidative Stress with Canine Visceral Leishmaniasis. 1st International Congress on Applied Biological Sciences, 16-20 September 2015, Skopje, Macedonia. (Poster Bildiri).
4. Ünübol Aypak, Coşkun A, Ulu H, Kandemir A, Aktaş S, **Ekren Aşıcı G S**, Kurt Ömürlü İ. Effects of lansoprasole and adrographolide on some biochemical parameters in rats with gastric ulcer models induced by indomethacin. 1. Uluslararası Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Atatürk Üniversitesi, Erzurum (Sözlü Sunum).
5. Gültekin M, Ural K, Paşa S, Balıkcı C, **Ekren Aşıcı G S**. Oxidative status and lipid profile in mono and co-infection with canine monocytic ehrlichiosis. 2nd International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics (ICAVST), 4-8 October 2017, Skopje, Macedonia (Poster Bildiri).
6. Gültekin M, Ural K, Erdoğan H, Paşa S, **Ekren Aşıcı G S**, Gültekin G, Guler A G. Oxidative Status In Neonatal Calves With Acute Infectious Diarrhea: Preliminary Findings. 2nd International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics (ICAVST), 4-8 October 2017, Skopje, Macedonia (Sözlü Bildiri).
7. Ulutaş P A, Ural K, Ulutaş B, Gültekin M, **Ekren Aşıcı G S**. Acute Phase Response In Dogs With Leishmaniasis At Different Stages Of Renal Damage 1st International



Veterinary Biochemistry and Clinical Biochemistry Congress 15.04.2018. (Poster Bildiri).

**8.** Yılmaz M, Kaykı M, **Ekren Aşıcı G S**, Kırıl F. The mRNA Gene Expression Profiles For Hsp60 And Hsp70 In Various Aged Saanen Goats In Different Seasons. 1st International Veterinary Biochemistry and Clinical Biochemistry Congress 15.04.2018. (Poster Bildiri).

**9.** **Ekren Aşıcı G S**, Kırıl F. Cytotoxic And Apoptotic Effects Of Zoledronic Acid On D-17 Canine Osteosarcoma Cell Line. 1st International Veterinary Biochemistry and Clinical Biochemistry Congress 15.04.2018 (Sözlü Bildiri).

**10.** Yücel B, Taşkın T, Koşum N, Kandemir Ç, Duru M E, **Ekren Aşıcı G S**, Kırıl F. A Research on Androgenic Effects for Saanen Male Kids of Drone Bee Larvae (Apilarnil) by Administered Oral Way "Effects on Growth and Testosterone Hormone Levels". 6. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi. 25.11.2018 (Tam Metin Bildiri).

**11.** Koşum N, Taşkın T, Kandemir Ç, Yücel B, **Ekren Aşıcı G S**, Kırıl F. Effects of Apilarnil on growth, body measurements and testes characteristics for Saanen male kids 29th International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry 29.11.2018 (Tam Metin Bildiri).

**12.** Ulutaş P A, Ural K, **Ekren Aşıcı G S**, Gültekin M, Ulutaş B. Acute Phase Protein Levels in Different Stages of Renal Damage in Dogs Naturally Infected with Leishmaniasis TBD Uluslararası Biyokimya Kongresi 2018 // 29. Ulusal Biyokimya Kongresi, 26-30 Ekim 2018 (Poster Bildiri)

## **B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler**

**1.** Tuna G E, Erdoğan H, Uçar E H, Parlatır Y, **Ekren G S**, Ulutaş B. Gebe Kedilerde Serum Akut Faz Protein Konsantrasyonunun Değerlendirilmesi Ön Bulgular, 11. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 21-24 Mayıs 2015, Samsun (Poster Bildiri).

**2.** Tuna G E, Erdoğan H, Dinler C, **Ekren G S**, Ulutaş B. Anemili Kedilerde Serum Akut Faz Protein Konsantrasyonları, 11. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 21-24 Mayıs 2015, Samsun (Poster Bildiri).

**3.** Bildik A, **Ekren G S**, Tosun G. Çevre Sıcaklığı *Sparus aurata* (çipura)'da Isı Şok

Protein Genlerini (Hsp30 Hsp70 Hsp90) Nasıl Etkiler? 7. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 28-30 Mayıs 2015, Samsun (Poster Bildiri).

4. Karademir Ü, Akın İ, Erdoğan H, Ural K, **Ekren G S**. Kastrasyon Uygulanan Keçilerde Ketoprofenin Akut Faz Protein Konsantrasyonlarına Etkisi. Türk Veteriner Jinekoloji Derneği VI. Ulusal Kongresi (Uluslararası katılımlı), 15-18 Ekim 2015, Muğla (Poster Bildiri).
5. Demir Ş, Ünübol M, Aypak SÜ, İpek E, Aktaş S, **Ekren GS**, Yılmaz M, Tunca R, Güney E. Hipotiroidizm Modeli Oluşturulmuş Ratlarda Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı Gelişiminin Değerlendirilmesi. 17. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 14-18 Ekim 2015, Antalya (Sözlü Bildiri).
6. Aypak S Ü, Ünübol M, Aktaş S, İpek E, **Ekren G S**, Tunca R, Güney E. Sprinolakton Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Gelişimini Önler mi? (Deneysel Çalışma). 18. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 12-16 Ekim 2016. (Sözlü Bildiri).

#### 4. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

1. Hücre Ölümü Araştırma Derneği, Üye, 2014-Devam ediyor.

#### 5. Sertifikalar

- 1 .Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu, Ege Üniversitesi, 7 Mart 2008, İzmir.
- 2.Nanoteknoloji Sempozyumu, Ege Üniversitesi, 02 Kasım 2009, İzmir.
- 3.Biyogirişimcilik Günü Sempozyumu, Ege Üniversitesi, 05 Mart 2010, İzmir.
- 4.European Biotechnology Congress 2013, 16-18 May 2013, Bratislava, Slovakia.
- 5.7. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 28-30 Mayıs 2015, Samsun.
- 6.IV. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi, 21-24 Ağustos 2015, Afyon.
- 7.International Congress on Applied Biological Sciences, Nobel Science and Research Center, 16-20 September 2015, Skopje, Macedonia.
- 8.1st International Cell Death Research Congress- Turkey\* (2nd Congress of Cell Death Research Society-Turkey), Cell Death Research Society of Turkey, 04-07 May 2016, İzmir, Turkey.

9.Tıpta Yenilikler: Kök Hücre ve Diyabet, Maltepe Üniversitesi, 18 Kasım 2016, İstanbul.

### **Katıldığı Kurslar**

- 1.Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Adnan Menderes Üniversitesi, 01-10 Şubat 2014, Aydın.
- 2.Gen İfadesi Uygulamalı Real Time PCR Kursu, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 28-29 Nisan 2014.
- 3.Temel Hücre Kültürü ve Hücre Ölümü Analiz Yöntemleri Uygulamalı Kursu-II, Hücre Ölümü Araştırma Derneği, 06-08 Haziran 2014, İzmir.
- 4.RNAi Uygulama ve miRNA Analiz Yöntemleri, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 23-25 Haziran 2014, Ankara.
- 5.Moleküler Biyolojide Biyoinformatik Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 26-27 Haziran 2014, Ankara.
- 6.Sağlıkta Araştırma Yöntemleri Kursu, Adnan Menderes Üniversitesi Sürekli Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi, 13-17 Nisan 2015, Aydın.
- 7.Kişiselleştirilmiş Kanser Tedavisinde Hücre Kültürü, Proteomik & Genomik Uygulamalar Kursu, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme & Farmakokinetik Araştırma – Uygulama Merkezi (ARGEFAR), 01-04 Şubat 2016, İzmir.
- 8.Akım Sitometresi Uygulamalı oturumu, Tıpta Yenilikler: Kök ve Diyabet Sempozyumu, Maltepe Üniversitesi, 18 Kasım 2016, İstanbul.
9. Applied Molecular Biology & Cell Culture Course, Atlas Biyoteknoloji, 3-14 April 2017, Ankara.

### **6. Ödüller**

1. Deneysel araştırma destek ödülü, Türk İç Hastalıkları Uzmanlık Derneği, 2015.
2. Poster bildiri ödülü, 7. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 2015