



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.  
2012; 26 (2): 79 - 85  
http://www.fusabil.org

Görkem KISMALI  
Tevhide SEL

Ankara Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı,  
Ankara, TÜRKİYE

### Paraquat İle Oluşturulmuş Oksidatif Stresin HepG2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkisinin Araştırılması\*

Bu çalışmada, paraquat ile oluşturulmuş oksidatif stresin HepG2 hücre hattında kaspaz bağımlı apoptozis üzerine etkilerini incelemek, sitokrom C düzeylerindeki değişimi ve DNA kırıklarının oluşumunu ortaya koymaktır. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) hücre canlılık testi, farklı paraquat yoğunluklarında ve zaman periodlarında uygulandı. HepG2 hücreleri için 24 saat inkubasyon süresinde Paraquatın IC50 10mM olarak belirlendi. Lipid peroksidasyonunun belirteci olarak malondialdehit düzeyleri analiz edildi. Kaspaz 3 ve kaspaz 9 düzeyleri, paraquat inkubasyonunun 6., 12. ve 24. saatlerinde kolorimetrik olarak tesbit edildi. Aynı zaman aralıklarında sitokrom C düzeyleri enzimimmunoassay ile belirlendi. DNA laddering testi, DNA fragmentasyonunu gösterebilmek amacıyla gerçekleştirildi. İnkubasyonun 6. ve 12. saatlerinde kaspaz 3 değerleri kontrol ve deneme grupları arasında istatistiksel olarak fark önemli bulunmazken, 24. saatte fark önemli bulundu. Diğer taraftan kaspaz 9 düzeyinde inkubasyonun 12. ve 24. saatlerinde kontrol ve deneme grupları arasında istatistik olarak önemli fark bulundu. Bütün gruplarda ve inkubasyon sürelerinde sitokrom C düzeyleri arasında fark bulunamadı. Ayrıca DNA fragmentasyon analizi sonucunda, kontrol ve deneme gruplarında DNA kırıkları belirlenemedi. HepG2 hücre hattında paraquat ile oluşturulan oksidatif stres kaspaz aktivasyonuna neden olmaktadır. Paraquat ile oluşturulan oksidatif stresin HepG2 hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozis için in vitro model olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptozis, HepG2, paraquat, kaspaz.

#### The Effect of Oxidative Stress Induced by Paraquat on Apoptosis in HepG2 Cells

The current study was undertaken to evaluate paraquat induced oxidative stress on caspase dependent apoptosis, cytochrom C levels and DNA laddering pattern in hepatocellular carcinoma cell line. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cell viability and proliferation assay were performed different paraquat concentrations and time periods. 24h 10mM paraquat treatment was settled as IC50 for HepG2 cell line. Malondialdehyde, a marker of lipid peroxidation was estimated with TBA method. Caspase 3-9 were analyzed at 6., 12. and 24.h as apoptosis indicator with colorimetric assay. Cytochrom C levels were also estimated within the same time periods. DNA laddering assay performed to evaluate DNA fragmentation during apoptosis. The results indicated that there was no statistically significant difference after 6.h and 12.h but significant increase in 24.h for caspase 3. On the other hand statistically significant increase has been found after 12. and 24.h for caspase 9 compared to the control group. In all groups and time periods cytochrom C levels has been found at the same level. DNA fragmentation pattern has not been found in control and experiment groups. Paraquat induced oxidative stress were caused caspase activation. These observations suggested that oxidative stress caused by paraquat may be used as an in vitro model for caspase depended apoptosis pathways in HepG2 cell line.

**Key Words:** Apoptosis, HepG2, paraquat, caspase.

Geliş Tarihi : 10.05.2012  
Kabul Tarihi : 01.06.2012

#### Giriş

Malign hastalıklar kontrolsüz aşırı hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının olduğu hastalıklar olarak tanımlanır. Ancak aşırı çoğalmanın yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişiminde rol oynadığı görülmüştür. Fizyolojik ömrünü tamamladığı halde çeşitli nedenlerle apoptozise gidemeyen hücreler malign hücrelere dönüşme potansiyeline sahiptir (1).

Paraquat, kimyasal olarak bipiridil grubunda yer alan bir herbisiddir. Genellikle "Gramoxone" olarak bilinir (2). Paraquat, yüksek miktarda reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana getirmektedir (3). NADPH'ya bağımlı indirgenme/yükseltgenme tepkimesi ile her seferinde elektronlar doğurarak, hücrelerde süperoksid radikali ve

Yazışma Adresi  
Correspondence

Tevhide SEL  
Ankara Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı  
Ankara - TÜRKİYE

sel@veterinary.ankara.edu.tr

\* 1st International Multidisciplinary Cancer Research Congress'de (21-24 Mayıs 2009 Antalya-Türkiye) çalışmanın bir kısmı sözlü olarak sunulmuştur. Aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri fonu tarafından desteklenmiştir.

hidrojen peroksid oluşumuna yol açarak oksidatif stres oluşturmaktadır (4). Paraquatın bu mekanizma dışında sitotoksik etkisi bulunmamaktadır (5). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'nın 1984 yılında yayınladığı rapora göre paraquat karsinojenik değildir (2).

Reaktif oksijen metabolitleri (ROM), maruziyetin süresine ve şiddetine göre farklı sonuçlar doğurur. Genel olarak, düşük seviyedeki ROM mitojendir ve hücre çoğalmasını hızlandırır, orta seviyedeki hücre döngüsünü geçici ya da kalıcı olarak durdurur ve hücre farklılaşmasını uyarır. Yüksek düzeyde ROM ise oldukça zararlıdır ve apoptozisi uyarır ya da nekroza neden olur (6). Akut ROM maruziyeti apoptozisi uyandırır, bu uyarının sağlanması günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların etki mekanizmalarından biridir (7). Oksidatif stres, sadece zararlı etkileri olan kimyasal bir olay değildir. Bunun yanında organizmanın savunma mekanizmasının da bir parçasıdır (8).

Bu çalışmada, bir herbisid olan paraquat ile oksidatif stres oluşturulan HepG2 hücrelerinde apoptozis belirteçlerinden olan kaspaz 3, kaspaz 9, sitokrom C, DNA laddering tayini ve MTT hücre canlılık testleri paraquat ilave edilmeyen ve kontrol grubunu oluşturan Hep G2 hücreleri ile karşılaştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Hepatosellüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücreleri, %10 Fetal Bovine Serum (FBS), 50 mg/L Gentamisin sülfat ve 300 mg/L L-glutamin içeren RPMI 1640 Medium besi ortamı içerisinde, 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> varlığında hücre kültürü inkubatoründe üretilir. Hücrelerin besiyeri iki günde bir değiştirildi ve canlılıkları, çoğalma hızları ve morfolojik yapıları invert mikroskop ile takip edildi.

**MTT Hücre Canlılık Testi:** MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) hücre proliferasyon ve canlılık testi, hücre çoğalmasında ve canlılığını in vitro ortamda hassas bir şekilde belirleme testidir. Hücreler düz zeminli 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında üretildikten sonra tetrazolium bileşiği olan MTT hücreler üzerine eklenip inkube edilir. Sarı renkli MTT, mor renkli çözünmeyen formazan'a indirgenir. Bu indirgenme yalnızca mitokondrial redüktaz enzimi varlığında gerçekleştiği için formazan'ın oluşum miktarı ile canlı hücre sayısı doğru orantılıdır. Daha sonra detarjan solüsyonunun ortama eklenmesi ile formazan kristalleri çözünür ve spektrofotometrik olarak okunur (9,10).

Hücre kültürü plakları (96 kuyucuklu) 5 x 10<sup>6</sup> hücre/mL'den 0.0244 x 10<sup>6</sup> hücre/mL 'ye kadar 12 farklı seri dilüsyonda kaplandı. 24 saatlik inkubasyondan sonra MTT testi ile değerlendirildi ve hücrelerin logaritmik fazda ürettiği en uygun kaplama konsantrasyonu elde edildi. Sonuç olarak 100.000 hücre/kuyucuk ve 24 saat inkubasyon süresi HepG2 hücreleri için optimum üreme

şartları olarak belirlendi ve diğer analizler bu şartlarda gerçekleştirildi.

HepG2 hücrelerinin MTT hücre canlılık testi için uygun kaplama konsantrasyonu ve inkubasyon süreleri belirlendikten sonra Paraquat toksisite testine (IC<sub>50</sub>) geçildi. Bu amaçla daha önceden belirlenen kaplama konsantrasyonu olan 1x10<sup>5</sup> hücre/kuyucuk ile hücreler 96 kuyucuklu, steril düz tabanlı, steril hücre kültürü plaklarına kaplandı. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkubatörde bekletildi. Paraquat (Metylviolegen hidrat), RPMI 1640 besiyeri içerisinde 200 µM, 150 µM, 100 µM, 75 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.12 µM, 1.06 µM ve 0 µM konsantrasyonlarda hazırlandı. MTT testi için 96 kuyucuklu plakaya kaplanan hücrelerin üzerindeki besiyeri boşaltıldı ve hücreler bir kez steril PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 100 µL farklı konsantrasyonlarda Paraquat içeren besiyeri ilave edildi ve 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 24 saat inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda her kuyucuğa MTT hücre canlılık testi uygulandı. Paraquat'ın HepG2 hücre hattında IC<sub>50</sub> değeri 10 µM olarak belirlendi. Bu analizler "TACS MTT cell viability assay" ticari kiti (R and D Systems, Inc Cat no.TA5355) kullanılarak gerçekleştirildi.

**Kaspaz 3 Kolorimetrik Analizi:** Kaspaz 3 analizleri "R and D systems, Inc. Caspase-3 colorimetric assay" kiti (Cat no: BF3100) ile gerçekleştirildi. Hücre lizatındaki proteaz aktivasyonu p-nitroanaline (pNA) ile konjuge edilmiş kaspaz 3 spesifik peptid ile belirlendi. Peptidin kaspaz 3 tarafından parçalanması sonucu kromofor madde olan pNA serbest kalır. pNA'nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm de spektrofotometrik olarak okunup kantitatif sonuç elde edildi.

**Kaspaz 9 Kolorimetrik Analizi:** Kaspaz 9 analizleri "R and D systems, Inc. Caspase-9 colorimetric assay" kiti (Cat no: BF10100) ile gerçekleştirildi. Hücre lizatındaki proteaz aktivasyonu pNA ile konjuge edilmiş kaspaz 9 spesifik peptid ile belirlendi. Peptidin kaspaz 9 tarafından parçalanması sonucu kromofor madde olan pNA serbest kalır. pNA'nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm de spektrofotometrik olarak okunup kantitatif sonuç elde edildi.

**DNA Laddering Testi:** Hücrelerden genomik DNA'nın izole edilmesi ve izole edilen DNA'nın agaroz jel elektroforezde yürütülüp EtBr ile boyanması prensibine dayanır (11). "TACS DNA Laddering" kiti (R and D Systems, Inc Cat No: TA4630) ile analizler yapıldı. DNA izolasyonu için 1 x 10<sup>6</sup> hücreden DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen toplam DNA miktarı spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen toplam DNA miktarı 1 µg/µL olacak şekilde sulandırıldı.

**Agaroz Jel Elektroforez ve EtBr ile Boyama:** Tris-Borik asit-EDTA tamponunda agar jel hazırlandı. Jele, EtBr solüsyonundan eklendi ve izole edilen DNA örnekleri, 1 µg/kuyucuk olacak şekilde yükleme tamponu ile jelde daha önceden açılmış kuyucuklara uygulandı. Yaklaşık olarak 45-50 dk, 100 Voltta elektroforez devam

ettirildi (11,12). Elektroforez sonunda jel görüntüleme sistemi kullanılarak U.V. ışık altında fotoğraflandı.

**Sitokrom C Tayin Yöntemi:** Sitokrom C, kantitatif sonuç veren sandviç enzim immunoassay formatında hazırlanmış ve western blot tekniğine alternatif olarak geliştirilmiş ELISA yöntemi ile çalışılan kit (R and D Systems, Human cytochrom C Immunoassay, Quantikine) kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçların hesaplanması için standartların sonuçları kullanılarak 4-parameters logistic (4-PL) grafik çizildi ve örneklerin ng/mL cinsinden içerdikleri sitokrom C miktarı belirlendi.

**Malondialdehid Tayin Yöntemi:** Poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşan bir ürün olan MDA, kısa zincirli bir aldehidtir ve poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif parçalanmasını belirlemek için kullanılır. Yoshioka ve ark. (13)'ün geliştirdiği yöntem kullanılarak MDA miktar tayini gerçekleştirildi. 1.1.3.3.tetraetoksipropan kullanılarak hazırlanmış standartlar ile çizilen grafikten yararlanılarak okunan absorbanslara karşılık gelen MDA değerleri nmol/mL olarak verildi.

**İstatistiksel Yöntem:** İstatistiksel analizler non-parametrik independed Mann-Withney testi kullanılarak gerçekleştirildi (14).

### Bulgular

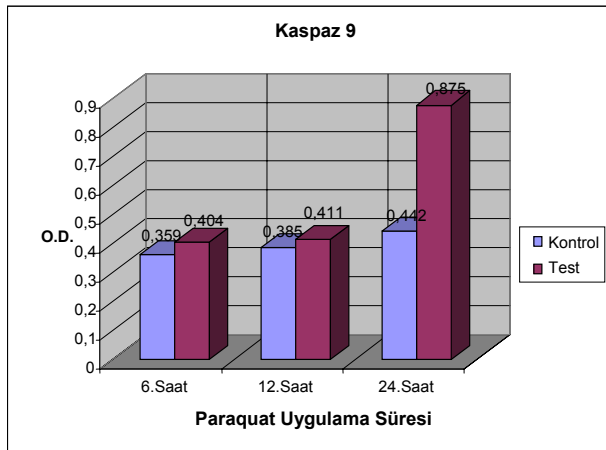
Hepatoselüler karsinoma hücrelerinden HepG2 hücrelerinin paraquat ile 24 saat inkubasyonu sonunda % 50 oranında öldüğü yani IC<sub>50</sub> yoğunluğunu, hücre çoğalması ve canlılığının in vitro ortamda belirlenmesinde bir kriter olan MTT testi ile 10 µM olarak belirlenmiştir.

Başlatıcı kaspazlar grubu içerisinde bulunan ve mitokondri aracılı apoptoziste rol alan aspartik asit spesifik proteazlardan Kaspaz 9'un HepG2 hücrelerinin 10 µM paraquat ile inkubasyon süresinin 12. ve 24. saatlerinde kaspaz 9 aktivasyonunun arttığı gözlenmiştir (P<0.05, Şekil 1). Efektör kaspaz olan kaspaz 3 aktivasyonunun zamana bağlı olarak değişimine bakıldığında, inkubasyon süresinin 24. saatinde aktivasyonunun arttığı (P<0.05) tesbit edilmiştir (Tablo1, Şekil 2).

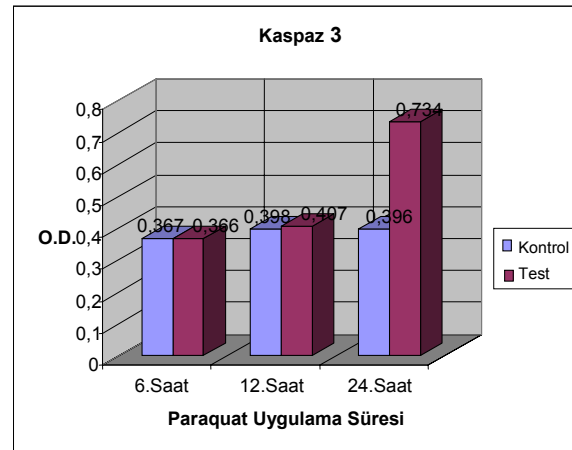
**Tablo 1.** Kaspaz 9 kaspaz 3 ve sitokrom C sonuçları.

		İnkubasyon Süresi		
		6.Saat	12.Saat	24.Saat
		X ± SD	X ± SD	X ± SD
Kaspaz 9	Test Grubu	0.404 ± 0.080	0.414 ± 0.028	0.875 ± 0.179
	Kontrol Grubu	0.359 ± 0.005	0.385 ± 0.004	0.442 ± 0.034
	P	-	*	*
Kaspaz 3	Test Grubu	0.366 ± 0.007	0.408 ± 0.032	0.734 ± 0.142
	Kontrol Grubu	0.367 ± 0.002	0.398 ± 0.015	0.396 ± 0.026
	P	-	-	*
Sitokrom C ng/mL	Test Grubu	125.83 ± 2.64	123.83 ± 7.18	117.50 ± 5.19
	Kontrol Grubu	121.00 ± 5.19	125.16 ± 6.65	124.00 ± 3.60
	P	-	-	-

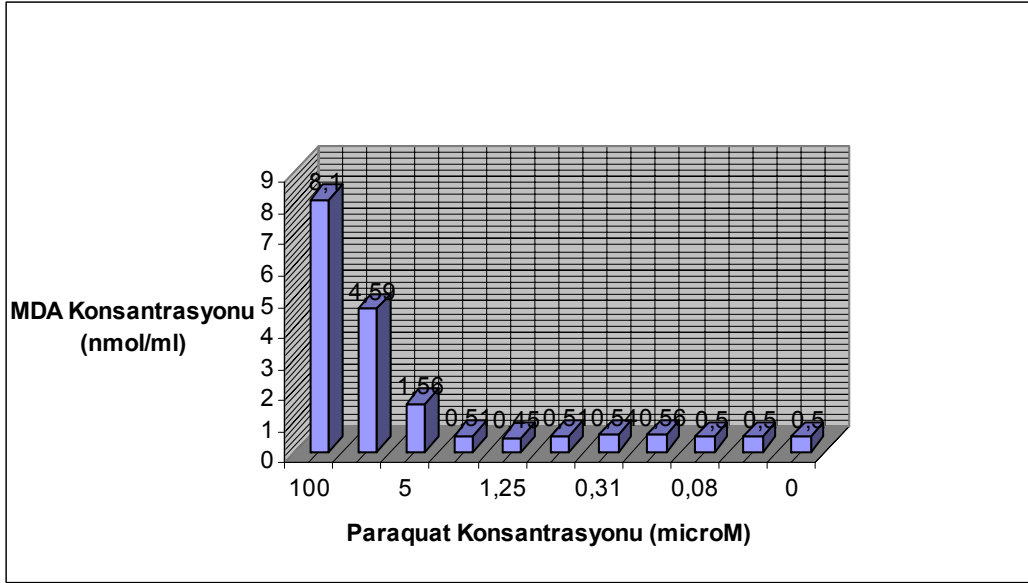
-: P>0.05, \*: P<0.05



**Şekil 1.** İnkubasyon süresine bağlı olarak Kaspaz 9 düzeyindeki değişim.



**Şekil 2.** İnkubasyon süresine bağlı olarak Kaspaz 3 düzeyindeki değişim.



Şekil 3. MDA düzeyinin paraquat dozuna bağlı değişimi.

Tablo 2. MDA düzeyinin paraquat dozuna bağlı değişimi.

PQ (µM)	100	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039
MDA (nmol/mL)	8.10	4.59	1.56	0.51	0.54	0.56	0.50	0.50	0.51	0.50

HepG2 hücrelerinde 10 µM dozunda paraquat ile 24 saat inkubasyonu sonunda DNA üzerinde kırıklar oluşturup oluşturmadığı, izole edilen çekirdek DNA'sının agaroz jel elektroforez uygulaması ile gerçekleştirilmiştir, 6., 12. ve 24. saatlerde belirgin bir DNA kırılması gözlenmemiştir.

Mitokondri dış membranında geçirgenlik artışı sonucu meydana gelen sitozolik sitokrom C artışı, 10 µM dozunda paraquat ile 24 saat inkubasyona tutulan HepG2 hücrelerinde 6., 12. ve 24. saatlerde tesbit edilememiştir ( $P>0.05$ ).

Paraquat içeren besiyeri ortamında üretilen hücrelerin MDA düzeyleri doza bağımlı olarak paraquatın oluşturduğu oksidatif streste paralel bir artış gösterdi (Tablo 2 ve Şekil 3).

### Tartışma

Farklı doku ve organlardan köken alan hücrelerin metabolizma hızları, detoksifikasyon yetenekleri, oksidatif strese dayanıklılıkları ve yaşam süreleri birbirinden farklıdır. Bu nedenle farklı hücre hatlarında aynı kimyasal maddenin lethal dozları farklılık göstermektedir. Nakamura ve Liptan (15)'in nöroblastoma (SK-N-SH) hücreleri kullanarak paraquatın apoptotik etkilerinin araştırdıkları çalışmada, 200 µM konsantrasyonda paraquat, bu hücre hattında 18 saat inkubasyon için  $IC_{50}$  değeri olarak belirlenmiştir. 32D/Neo fare miyeloid hücre hattında paraquatın apoptotik etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise 400 µM dozunda

uygulanan paraquatın, 24 saatlik inkubasyon sonunda hücrelerin yaklaşık % 30'unu öldürdüğü bildirilmiştir (16). Cappelletti ve ark. (17)'nin insan akciğer epitel hücre hattı olan A549 kullanarak paraquat toksisitesi ve antioksidanların bu toksite üzerine koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmada, 160 µM paraquat ile 24 saat inkubasyona bıraktıkları hücrelerde 24. saat sonunda apoptozisin indüklendiğini belirtmişlerdir. Paraquat'ın HepG2 hücre hattında  $IC_{50}$  değerini belirlemek amacıyla hücre çoğalması ve canlılığının in vitro ortamda belirlenmesinde bir kriter olan MTT testi uygulanmıştır. Hücrelerin 24 saat inkubasyon sonunda % 50 oranında öldüğü yani  $IC_{50}$  konsantrasyonu olarak 10 µM belirlenmiştir. Çalışmada belirlenen 10 µM konsantrasyondaki paraquatın  $IC_{50}$  dozu yukarıda belirtilen çalışmalarda bildirilen konsantrasyonlardan daha düşük dozda olduğu görülmektedir. Niso-Santano ve ark. (18)'nin rat beyin nöroblast hücre hattında (E18) yaptıkları çalışmada ise, düşük doz paraquatın (2.5 µM konsantrasyonda) 24 saat inkubasyon sonunda hücrelerin % 50'sini öldürdüğünü bildirmektedir (18).

Çalışmada, paraquatın HepG2 hücreleri üzerine etkisini hangi metabolik yol üzerinden gösterdiğini anlayabilmek amacıyla, intrinsik apoptozis yolunda önemli rol oynayan kaspaz 9 enziminin aktivasyonu, paraquat inkubasyon süresine bağlı olarak incelenmiştir. Kaspaz 9, başlatıcı kaspazlar grubu içerisinde bulunan ve mitokondri aracılı apoptoziste rol alan aspartik asit spesifik proteazdır (19). Prokaspaz 9'un aktive olabilmesi ve kaspaz kaskadını başlatabilmesi üç

aşamada olur. İlk olarak dATP/ATP, APAF-1'e bağlanır ve hidroliz olarak ADP'ye dönüşür. İkinci aşamada sitokrom C APAF-1'e bağlanır ve multimerize olur, son aşamada ise prokaspaz 9 bu multimerik yapıya bağlanır ve otokatalizasyonla aktive olur. Aktive olan kaspaz 9, APAF kompleksinden serbest hale geçer ve diğer kaspazları uyararak apoptozisin devamını sağlar (20). Lopez ve Ferrer (21), nöroblastoma hücrelerinde diğer apoptozis belirteçleri pozitif olmasına rağmen kaspaz 9'un aktive olmadığını, intrinsik olarak apoptozisin uyarılması durumunda kaspaz 9'un aktivasyonunun şart olmadığını, sitokrom C'nin kaspaz kaskadının başlatılmasında kilit rol oynadığını bildirmişlerdir. Xu ve ark. (22), alisom B asetat kullanarak gastrik adenokarsinom hücre hattında yaptıkları çalışmada, doza bağımlı olarak apoptozis yüzdesinin yükseldiğini, kaspaz 9 ve kaspaz 3 ifadesinin arttığını ve buna paralel olarak pro-apoptotik protein olan Bax miktarındaki artış ile Bax/Bcl-2 oranının yükseldiğini bildirmişlerdir. Sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3 aktivasyonu için kaspaz 9'un mutlaka aktive olması gerektiği ve sitokrom C'nin mitokondri dışı membran potansiyelindeki azalma ile sitoplazmaya saliverilmesinin gerektiği sonucuna varmışlardır (22). HepG2 hücrelerinin paraquat ile inkubasyon süresinin 6. saatinde kontrol ve deneme grupları arasında kaspaz 9 düzeylerinde istatistik olarak fark bulunmazken, 12. ve 24. saatlerde deneme gruplarında kaspaz 9 aktivasyonunun arttığı gözlenmiştir.

Efektör kaspazlar kendilerine spesifik proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (23). Pro-kaspaz 9'un aktive olması sonucu kaspaz yolu aktive olur ve bunun sonucunda da efektör kaspaz olan kaspaz 3 aktivasyonu gerçekleşir (24). Çalışmada, efektör kaspaz olan kaspaz 3 aktivasyonunun zamana bağlı olarak değişimine bakıldığında, inkubasyon süresinin 6. ve 12. saatlerinde kontrol ve deneme grupları arasında istatistiksel bir fark bulunmazken, 24. saatte kaspaz 3 aktivasyonunun arttığı ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür.

Nöroblastoma hücrelerinde staurosporinin uyardığı apoptozis sırasında inkubasyonun 12. saatinde kaspaz 3 seviyesinin en üst düzeye çıktığı bildirilmiştir (21). Median ve ark. (25)'nin flavanon türevi olan (3aRS,4SR)-2- (2 - chloro - 4 - methylsulfonylphenyl) - 4 - chloro - 3, 4-diethoxy-flavane[4,3- d]-D1,9b-1,2,3-thiadiazoline) MAFTZ'nin hepatosellüler karsinom hücreleri üzerinde apoptotik etkilerini araştırdıkları çalışmada, apoptotik etkinin doz ve zamana bağlı olarak kaspaz 3 aktivasyonu ve poly (ADP-riboz) polimeraz aktivasyonunun meydana geldiğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak ROS miktarında artış ve mitokondrial membran potansiyelinde kayıp olduğu ve bunun sonucunda da ölüm sinyalinin mitokondrial oksijen stres yolağından kaynaklandığı gösterilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı kanser hücre hatlarında kaspaz 3'ün belirlenebilir limitlerin çok altında sentezlendiği ortaya konulmuştur. MCF-7 hücre hattında yapılan bir çalışmada bunun nedeninin kaspaz 3

genindeki (CASP-3) parsiyal delesyondan kaynaklandığı ortaya konulmuştur (26). Kanser oluşum nedenlerinden biri apoptozisi kontrol eden genlerin mutasyonu ve sonucunda da kaspazların sentezinde azalma ya da hiç sentezlenememesidir. Olası kanser terapötik ajanlarının geliştirilmesi, bu enzimlerin sentezlerinin uyarılabilmesinin sağlanması esasına dayanır.

Primer hepatosellüler karsinom hücreleri ile Sun ve ark. (27) tarafından yapılan çalışmada, in-situ hibridizasyon yöntemi ile kaspaz 3 gen ifadesi ölçülmüş ve kanserli dokularda normal karaciğer dokusuna oranla kaspaz 3 ifadesinin düşük olduğu ve ayrıca diferansiyasyon ve kaspaz 3 arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Kaspaz 3 ifadesindeki azalmanın HCC oluşumunda etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmada dikkat çeken bir nokta da kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonlarının inkubasyon süresine göre farklılık göstermesidir. Inkubasyonun 12. saatinde ilk olarak başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 9 aktive olmuş bunu takiben kaspaz 3 inkubasyonun 24. saatinde aktive olarak apoptotik süreci devam ettirmiştir. Bu ard arda devam eden süreç bugüne kadar tanımlanmış kaspaz kaskadı fenomeni ile uyumludur.

Kaspaz 3'ün aktive olması ile sitoplazma ve nükleus içerisinde hedef proteinler yıkılır. Nükleus içerisindeki hedef proteinlerden biri de DNA endonükleaz ile çapraz bağlanma yapan bir proteindir (PARP). Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı aktifleştirir, endonükleazın aktifleşmesi ile 180 baz çifti ve katları şeklinde kırıklar oluşur ve DNA laddering paterni meydana gelir (23). HepG2 hücrelerinde 10 µM dozunda paraquat inkubasyonunun 6., 12. ve 24. saatlerinde DNA üzerinde kırıklar oluşturup oluşturmadığını incelemek amacıyla çekirdek DNA'sını izole ettikten sonra agaroz jel elektroforez uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve deneme gruplarında 6., 12. ve 24. saatlerde belirgin bir DNA kırılması gözlenememiştir. DNA laddering testi, kitlesel hücre ölümlerini ve çok miktarda DNA'nın yıkılmasını gösterebilen bir testtir. 32D/Neo fare miyeloid hücre hattında paraquatın apoptotik etkilerinin incelendiği bir çalışmada (16), 400 µM dozunda uygulama sonucunda DNA laddering görünümünün ortaya çıktığı bildirilmiştir. MCF-7 hücre hattında, çeşitli apoptozis uyarıcıları ile (TNF/sikloheksimid, staurosporin) yapılan çalışmalarda, hücre ölümünün DNA fragmentasyonu olmadan gerçekleştiği bildirilmiştir. Diğer yandan HeLa D98 hücrelerinde aynı uyarıcılar kullanıldığında, apoptozisin meydana geldiği fakat MCF-7 hattından farklı olarak bunlarda DNA fragmentasyonunun da olduğu görülmüştür (26). Daha hassas ve tek hücre bazında sonuç verebilen TUNEL testinin ileride yapılacak çalışmalarda DNA laddering testi yerine kullanılması tavsiye edilmektedir (28).

Paraquat dozuna bağlı olarak sitozolde sitokrom C miktarının arttığı ve bu artışın kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak meydana geldiği ortaya konulmuştur (15). Sitokromlar elektron taşıyan proteinler olup,

hemoglobinin hem halkasına benzer bir porfirin halkasına bağlı demir içerir. Sitokrom C, apoptozis sırasında kolayca sitoplazmaya geçebilen küçük bir moleküldür. Diğer sitokromlar ise mitokondri iç membranında yer alan proteinlerdir. HepG2 hücrelerinde, paraquatın sitokrom C düzeyi üzerine etkisini incelemek amacıyla inkubasyonun 6., 12. ve 24. saatlerinde hücre içi toplam sitokrom C miktarı ELISA yöntemi ile ölçüldü. Belirtilen saatlerde kontrol ve deneme grupları arasında sitokrom C düzeylerinde fark bulunamadı. İntrinsik hücre ölüm yolunda kilit rolü sitokrom C oynar. Nöroblastoma hücrelerinde paraquatın apoptozisi başlatması intrinsik hücre ölüm yolu üzerinden olduğu bildirilmiştir. Sitokrom C'nin sitozole salınımı ve kaspaz 3 aktivasyonu sonucu apoptotik hücre ölümleri şekillenmesine rağmen mitokondri membran geçirgenliğinde herhangi bir fonksiyon bozukluğu gözlenmemiştir (29).

Sonuç olarak, HepG2 hücrelerinin 10 µM paraquat ile inkubasyonu sonucu Kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonları inkubasyon süresine göre farklılık göstermektedir. İnkubasyonun 12. saatinde ilk olarak başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 9 aktive olmakta bunu takiben inkubasyonun 24. saatinde kaspaz 3 aktive olmaktadır. Bu ard arda devam eden aktivasyon ile bugüne kadar tanımlanmış kaspaz kaskadı fenomeniyle uyumlu olarak apoptotik süreç başlamıştır.

#### Kaynaklar

- Stratton M, Campbell P, Futreal A. The cancer genome. *Nature* 2009; 458: 719-724.
- Anonim. "Stop the poisonings! Stop paraquat!". [www.panap.net/11.03-2011](http://www.panap.net/11.03-2011).
- Mollace V, Lannone M, Muscoli C, et al. The role of oxidative stress in paraquat induced neurotoxicity in rats: protection by non peptydyll superoxide sismutase mimetic. *Neurosci Lett* 2003; 335:163-166.
- Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg* 2004; 15(1-2): 91-96.
- Cuthbert C, Wang Z, Zhang X, Tam S. Regulation of human apolipoprotein A-I gene expression by gramoxane. *J Bio Chem* 1997; 272: 14957-14960.
- Finkel T, Holbrook J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408:239-247.
- Lau T, Chiu F. Proteomic and biochemical analyses of in vitro carcinogen-induced lung cell transformation: synergism between arsenic and benzo(a)pyrene. *Proteomics* 2006; 6: 1619-1630.
- Lau T, Wang Y, Chiu J. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem* 2008; 104(2): 657-667.
- Molinari BL, Tasat DR, Palmieri MA, O'Connor SE, Cabrini RL. Cell-based quantitative evaluation of the MTT assay. *Anal Quant Cytol Histol* 2003; 25(5): 254-262.
- Plumb JA. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Med* 2004; 88: 165-169.
- Dypbukt JM, Ankarcrona M, Burkitt M, et al. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J Biol Chem* 1994; 269: 30553-30560.
- Burkitt MJ, Milne L, Nicotera P, Orrenius S. 1,10-Phenanthroline stimulates internucleosomal DNA fragmentation in isolated rat-liver nuclei by promoting the redox activity of endogenous copper ions. *Biochem J* 1996; 313: 163-169.
- Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135(3): 372-376.
- Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. *Biyoistatistik*. 9.Baskı, No.53, Ankara: Hatipoğlu yayınları, 2000.
- Nakamura T, Liptan A. Molecular mechanisms of nitrosative stress-mediated protein missfolding in neurodegenerative diseases. *Cell and Mol L Sci* 2007; 64(13): 1609-1620.
- Fabisiak J, Kagan V, Tyurina Y, Tyurin V, Lazo J. Paraquat induced phosphatidylserine oxidation and apoptosis are independent of activation of PLA2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998; 274: 793-802.
- Cappelletti G, Maggioni M, Maci R. Apoptosis in human epithelial cells: triggering by paraquat and modulation by antioxidants. *Cell Biology Internationale* 1998; 22: 671-678
- Niso-Santano M, Morán JM, García-Rubio L, et al. Low concentrations of paraquat induces early activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2, protein kinase B, and c-Jun N-terminal kinase 1/2 pathways: role of c-Jun N-terminal kinase in paraquat-induced cell death. *Toxicol Sci* 2006; 92(2): 507-515.

#### Teşekkür

Çalışmada kullanılan HepG2 hücre hattı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr.Cemalettin Aybay'dan temin edilmiştir.

19. Lei K, Nimnual A, Zong W, et al. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c- Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol* 2002; 22 (13): 4929-4942.
20. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochom C multimeric coplex is a functional apoptosome that activates procaspase 9. *J Bio Chem* 1999; 274: 11549-11556.
21. Lopez E, Ferrer I. Staurosporine and H-7 induced cell death in SH-SY%Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation but not with activation of Fas/Fas-L- caspase 8 signaling pathway. *Mol Brain Res* 2000; 85: 61-67.
22. Xu Y, Zhao L, Li Y. Alisol B asetate induces apoptosis of SGC7901 cells via mitochondrial and phoshatidylinositol 3-kinases / Akt signaling pathways. *World J Gastroentero* 2009; 15: 2870-2877.
23. Lavrik N, Golks A, Krammer P. Caspases: Pharmacological manipulations of cell death. *J Clinic Invest* 2005; 115: 2665-2672.
24. Green D, Kroemer G. Pharmacological manipulation of cell death: Clinical applications in sight? *J Clinic Invest* 2005; 115: 2610-2617.
25. Meidan Y, Tu Chongxing T, Ying H, et al. MSFTZ, a flavanone derivative, induces human hepatoma cell apoptosis via a reactive oxygen species and caspase dependet mitochondrial pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325:758-765
26. Janicke UR, Sprengart M, Wati R, Porter A. Caspase-3 is required for DNA fragmentation on morphological changesassociated with apoptosis. *J Bio Chem* 1998; 273: 9357-9360
27. Sun HB, Zhang B, Zhao PX, et al. Analysis of in vivo patterns if caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21Waf1 expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroentero* 2000; 6(3): 356-360
28. Reshef A, Shirvan A, Shohami E, et al. Targeting cell death in vivo in experimental traumatic brain injury by a novel molecular probe. *J Neurotrauma* 2008; 25: 1-12.
29. Fei Q, Mccormac A, Monte D, Ethell D. Paraquat neurotoxicity is mediated by a Bak-dependet mechanism. *J Bio Chem* 2007; 4: 1-8.