



Humik asit, insan premyelositik lösemi HL-60 hücrelerinde apoptozu indükler

Hsin-Ling Yanga , You-Cheng Hseub*, Yi-Ting Hseua, Fung-Jou Luc ,
Uzun Linb , Jim-Shoung Yattı

^aBeslenme Enstitüsü, Çin Tıp Üniversitesi, Taichung, Tayvan bGıda Bilimi Bölümü, Chungtai Sağlık Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü, No.11 Pu-tzu Lane, Pei-tun Bölgesi 406, Taichung, Tayvan cUygulamalı Kimya Bölümü, Chun Shan Tıp Üniversitesi , Taichung, Tayvan dÇevre Sağlığı Yüksek Lisans Enstitüsü, Çin Tıp Üniversitesi, Taichung, Tayvan

23 Eylül 2003'te alındı ; 26 Şubat 2004'te kabul edildi

Soyut

Fenolik bir polimer olan hümitik asidin (HA) pro-oksidan ve sitotoksik etkiler gösterdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, kültürlenmiş insan premyelositik lösemi HL-60 hücreleri kullanılarak HA'nın apoptoz indüksiyonu incelenmiştir. Çeşitli HA konsantrasyonları (50 – 400 Ag/ml) tedavi, hücre canlılığı kaybı, kromatin yoğunlaşması ve internükleozomal DNA fragmentasyonu gibi apoptotik özelliklerin gösterdiği gibi, apoptoz ile işaretlenen doza ve zamana bağlı olay dizileriyle sonuçlandı. HL-60 hücrelerinde HA kaynaklı bu apoptoz, esas olarak mitokondriden sitokrom c'nin salınması ile ilişkilendirildi. Ayrıca, HL-60 hücrelerinde apoptoz, kaspaz-3'ün aktivasyonu ve apoptotik hücre ölüm mekanizmasında önemli bir bileşen olan poli (ADP-riboz) polimerazının (PARP) spesifik proteolitik bölünmesi eşlik etti. HA kaynaklı apoptoz, Bax protein seviyeleri ile ilişkili olması na rağmen, ihmal edilebilir düzeyde Bcl-2 azalması gözlemlendi. Burada bildirilen verilerin analizi, HA'nın, yeni ilaç ürünlerinin geliştirilmesi için potansiyel olarak faydalı antikanser özelliklerine sahip olabilecek apoptozun indüklenmesi yoluyla HL-60 hücreleri üzerinde antiproliferatif etki ve büyüme inhibisyonu uyguladığı ortaya koymaktadır.

© 2004 Elsevier Inc. Tüm hakları saklıdır.

Anahtar Kelimeler: Humik asit; HL-60 hücreleri; apoptoz

* Sorumlu yazar. Tel.: +886-4-2239-1647x7509; faks: +886-4-22396771.

E-posta adresi: yhseu@chtai.ctc.edu.tw (Y.-C. Hseu).

Giriş

Hümik asit (HA), karasal ve sucul ortamlarda her yerde bulunan koyu renkli ve heterojen bir organik madde karışımıdır. Yüksek moleküler ağırlıklı makromoleküllere sahip bir polimer grubu olan HA, organik maddenin, özellikle ölü bitkilerin ayrışmasıyla elde edilir. Turba, toprak, kuyu suyu ve diğer birçok kaynakta bol miktarda bulunur (Hartenstein, 1981). HA, arsenik ve asit-baz kararlıdır ve genellikle arsenik, demir, manganez, kurşun, kadmiyum, çinko ve nikel gibi metal iyonlarıyla kompleks halindedir (Lu, 1990). Kimyasal ve fiziksel özellikleri spektroskopik analizler, hümik asitte aromatik halkalar ile fenolik hidroksil, ketonil, kinon karbonil, karboksil ve alkoksil gruplarının varlığını ortaya koymuştur (Burgess ve diğerleri, 1964). HA'nın oksidasyon, indirgeme veya mikrobiyal reaksiyon yoluyla bozunması resorsinol, orto- ve meta-ftalik asitler ve diğer fenolik bileşikler üretebilir (Burgess ve diğerleri, 1964; Keyser ve diğerleri, 1976; Choudhry, 1981).

Lösemi, şu anda var olan hastalıkların en tehditkarlarından biridir. Çoğu yetişkin lösemi hastasını transplantasyon için aday olmadığı ve daha rasyonel bir tedavinin yeterince tanımlanmadığı kabul edildiğinde, bu bireyler kemoterapiye odaklanan (veya en azından içeren) rejimlerle tedavi edilir. Son araştırmalar, çok çeşitli kemoterapötik ajanların duyarlı hücre hatlarında apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Apoptoz, fizyolojik ve patolojik hücrelerde karşılaşılan aktif bir hücre ölümü modudur ve pasif varyant olan nekrozdan farklıdır. Bu işlemin morfolojik özellikleri arasında hücre hacmi kaybı, plazma zarının hiperaktivitesi ve periferik heterokromatinin yoğunlaşması, ardından çekirdeğin ve sitoplazmanın kromatin fragmanları içeren çok sayıda zarla çevrili gövdelere bölünmesi yer alır (Wyllie ve diğerleri, 1980; Wyllie, 1987; Bortner ve diğerleri, 1995; Earnshaw, 1995). Hayvanlarda yapılan deneyler ve lösemi hastalarında dolaşan patlamalarla ilgili çalışmalar, apoptozun in vivo kemoterapiye yanıt olarak meydana geldiğine dair kanıtlar sağlamıştır. İnsan akut lösemi hücre dizilerinin (HL-60 hücreleri), kemoterapi ile ilişkili apoptotik proteolitik olayların çalışmasıyla özellikle bilgilendirici olduğu kanıtlanmıştır. Bu araştırmaların sonuçları, HL-60 hücrelerinin çeşitli kemoterapötik ajanlarla tedavisine sitokrom c'nin artan sitosolik translokasyonu, CPP32 aktivasyonu (kaspaz 3) ve PARP'nin bozulmasını eşlik ettiğini göstermiştir (Lazebnik ve diğerleri, 1994; Tewari ve diğerleri, 1995). Bcl-2 ailesinin, apoptozda aktivatör (Bax) veya inhibitör (Bcl-2) olarak önemli bir düzenleyici rol oynadığı, Bcl-2 ve Bax proteinlerinin oranının düzenlenmesinde anahtar bir faktör olarak kabul edildiği de gösterilmiştir. apoptotik süreç veya hücre ölümü (Rao ve White, 1997; Adams ve Cory, 1998; Green ve Reed, 1998).

HA, geleneksel Çin tıbbi uygulamalarında kullanılmıştır ve anti-enflamatuar, anti-hipertansif, anti-neoplastik ve hemostatik aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir (Guan ve Yang, 1999). Bu çalışmada, monomerik protokatekuik asidin fenolik türevlerinden polimerize edilen sentetik HA'nın insan premiyelositik lösemi HL-60 hücrelerinin kültürleri üzerindeki in vitro etkilerini araştırdık. Verilerin analizi, HA'nın, apoptozu karakterize eden ultrastrüktürel ve biyokimyasal özellikler sergileyen ölmekte olan hücrelerle birlikte, HL-60 hücrelerinin kitlesel ölümüne neden olduğunu ortaya koymaktadır. Ek olarak, HA'yı apoptotik sürece bağlayan biyokimyasal adımlar incelenmiştir.

Malzemeler ve yöntemler

Kimyasallar

Fetal sı ğı r serumu (FBS)-RPMI 1640, penisilin-streptomisin (PS) ve glutamin, GIBCO Laboratories'den (GIBCO BRL, Grand Island, NY) elde edildi. Protokatekuik asit, sodyum periyodat, XAD-7 ve taksol, Sigma Chemical Co.'dan (ST. Louis, MO) satı n alı nmı ştı r. Bax tavşan poliklonal antikoru ve Bcl-2 fare monoklonal antikoru, Oncogene Research Products'tan (Cambridge, MA) satı n alı nmı ştı r. PARP tavşan poliklonal antikoru, Upstate biotechnology'den (Lake Placid, NY) satı n alı ndı . Kaspaz 3'e karşı tavşan poliklonal antikoru, Santa Cruz Biotechnology, Inc.'den (Heidelberg, Almanya) satı n alı ndı . ApoAlert Kaspaz Kolormetrik Tahlil Kitleri, Clontech Laboratories, Inc.'den (Palo Alto, CA) satı n alı nmı ştı r. SuperSignal ULTRA chemilumines cence substratı , Pierce'den (Rockford, IL) satı n alı ndı . Diğ er tüm kimyasallar ticari olarak temin edilebilen en yüksek kalitedeydi ve Merck (Darmstadt, Almanya) veya Sigma Chemical Co. tarafı ndan tedarik edildi.

Sentetik HA'nı n hazı rlanması

Sentetik HA, daha önce aç ı klandı ğı gibi (Haninen ve diğ erleri, 1987) küçük de ğ iş ikliklerle yayı nlanan prosedüre göre sentezlendi . Oksidatif polimerizasyon için 100 ml distile suda 1 g protokatekuik asit sodyum periyodat ile 24 saat 50 jC'de ç alkalanarak su banyosunda okside edildi. 3,000 g'de santrifüjlemeden sonra süpernatant, 0.1 N HCl ile pH 1.0'a asitleştirildi. Asitleştirilmiş solüsyon tekrar santrifüjlendi ve ç ökelti, HA'yı ç özmek için 0.1 N NaOH ile iş lendi. HA, XAD-7 reçenesi ile absorpsiyon kromatografisi kullanı larak daha da saflaşt ı rı ldı ve daha önce tarif edildiğ i gibi (Yang ve diğ ., 1996) Sephadex G-25 kromatografisiyle daha da fraksiyonlandı . Nihai HA solüsyonu, bir Molecular/Por membranı ndan (molekül ağı rlı ğ ı < 500 Da olan partikülleri hariç tutan) ultra-filtrelendi. Bu genel prosedür, HA'yı (500 Da MW ile birkaç on binlerce Dalton arası nda) ve düşük moleküler ağı rlı klı HA'yı (MW < 500 Da ile) ayı rabilir.

Hücre kültürü ve hücre büyümesinin ve hücre canlı lı ğ ı nı n de ğ erlendirilmesi

Bir insan akut promyeloblastik lösemik hücre dizisi olan HL-60 hücreleri, Amerikan tipi Culture Collection'dan (Rockville, MD) elde edildi. Bu hücreler , 37 jC'de %5 CO2 ile nemlendirilmiş bir inkübatörde %10 ı sı yla inaktive edilmiş FBS, 2 mM glutamin, %1 penisilin-streptomisin-neomisin ile desteklenmiş RPMI-1640 içinde büyütüldü. Hücre, HA ilavesinden önce 6 oyuklu plakalara ekildi. HL-60 hücreleri, 24, 48 ve 72 saat boyunca çeş itli konsantrasyonlarda (0, 50, 100, 200 ve 400 Ag/ml) HA ile inkübe edildi. Kültürler toplandı ve bir hemasitometre ile hücre süspansiyonları sayı larak hücre sayı sı izlendi. Hücre 106 hücre/ml), tedavi büyümesinden önce ve sonra kontrol edildi (2.0, tripan mikroskopu kullanı larak hücre canlı lı ğ ı nı n de ğ erlendirilmesi (1.0 mavisidi ş lama kullanı larak HA ile ve faz kontrast

DNA apoptotik parçalanması için TÜNEL testi

DNA fragmentasyonu, KLENOW FrgEL DNA fragmentasyonu ile terminal deoksinnükleotidil transferaz aracılı dUTP nick uç etiketleme (TUNEL) yöntemi kullanı larak tespit edildi.

tespit kiti (Calbiochem, San Diego, CA) (Gavrieli ve diğerleri, 1992). Kı saca, apoptotik HL 60 hücreleri (106 hücre/ml) proteaz K ile kaplı ve 10 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra, hücreler PBS ile yıkandı ve 200 µl 3V-OH uçları nı n, 37 jC'de klenow kullanı larak biotin-dNTP ile etiketlenmesiyle saptandı . 1.5 saat Lamlar daha sonra streptavidin yabanturpu peroksidaz konjugatı ile inkübe edildi, ardı ndan 3,3V-diaminobenzidine ve H202 ile inkübasyon yapı ldı . Apoptotik hücreler, ışık mikroskobu altı nda görülen koyu kahverengi çekirdekleri ile tanı mlandı .

DNA jel elektroforezi (DNA Laddering)

hücrelerinde internükleozomal DNA bölünmesinin varlı ğı (1.0, DNA jel elektroforezi ile araştırı ldı) (Müşteriler, 1992). DNA-60 saflaştır ma kiti (Gentra Corp, Minneapolis, Minn, ABD) üreticinin talimatları na göre kullanı ldı . DNA saflı ğı ve konsantrasyon, etidyum bromür içeren %1.5 agaroz jel yoluyla elektroforez yoluyla belirlendi, ardı ndan ultraviyole aydı nlatma altı nda gözlem yapı ldı .

Toplam hücre özütünün hazı rlanması ve immünoiblot analizi

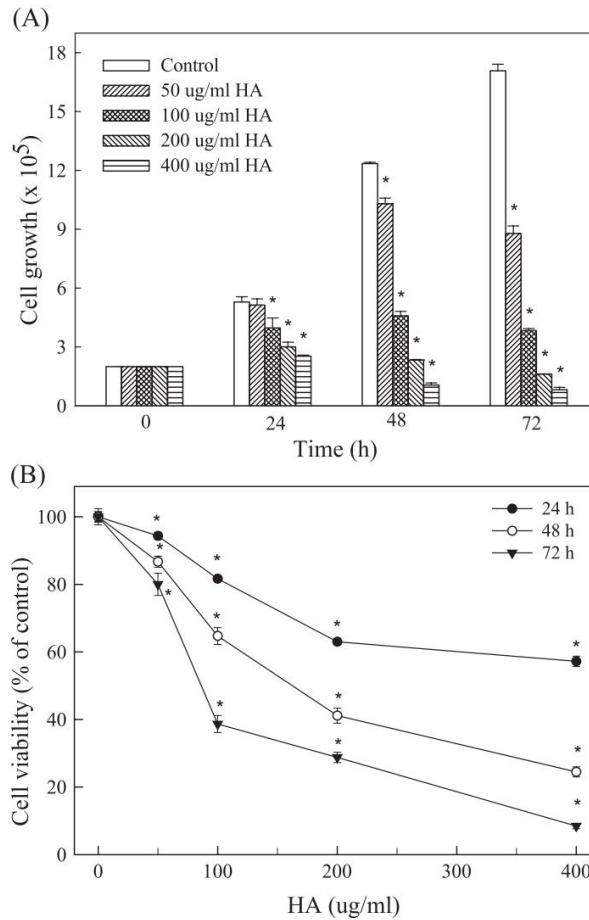
Tüm hücre ekstraktı nı hazı rlamak için HL-60 hücreleri (5.0 x 10⁵ hücre/ml) bir kez soğuk fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkandı ve 100 µl lizis tamponu (10 mM Tris-HCl (pH 8), 0.32 M sukroz, %1 Triton X-100, 5 mM EDTA) içinde süspansiyon edildi. 2 mM DTT ve 1 mM fenilmetil sülfonilflorür). Süspansiyon 20 dakika buz üzerine kondu ve daha sonra 5000 rpm'de 20 dakika 4 jC'de santrifüjlendi. Toplam protein içeri ği, standart olarak sı ğı r serum albümini kullanı larak Bio-Rad protein tahlil reaktifi ile belirlendi ve protein özleri, numune tamponunda (0,062 M Tris-HCl, %2 SDS, %10 gliserol ve %5 (hacim/hacim) sulandı rı ldı) h-merkaptetanol ve karı şı m 5 dakika kaynatı ldı . Denatüre proteinlerin eşit miktarları (50 µg) her şeride yüklendi, %10 veya %12 SDS poliakrilamid jeli üzerinde ayrı ldı , ardı ndan proteinler gece boyunca PVDF zarları na aktarı ldı . Membranlar, oda sıcaklı ğı nda 20 dakika boyunca %5 yağsı z kuru süt içeren Tris tamponlu salin içinde %0.1 Tween-20 ile bloke edildi ve membranlar, 2 saat boyunca birincil antikorlarla reaksiyona sokuldu. Daha sonra SuperSignal ULTRA kemilüminesans substratı ile geliştirilmeden önce yaban turpu peroksidaz konjuge keçi anti tavşan veya anti fare antikorları ile 2 saat inkübe edildiler.

Kaspaz-3 aktivite testi

Süpernatandaki kaspaz-3 aktivitesi, ApoAlert Caspase Colorimetric Assay Kits 105 cell/ml kullanı larak belirlendi (Gottlob Kı saca, HA ile ön inkübasyonun ardı ndan, HL-60 hücreleri (5.0 x 10⁵ hücre/ml) ve soğuk PBS ile yıkandı ve daha sonra 10 dakika boyunca buz üzerinde lizis tamponu kullanı larak parçalandı . Eppendorf santrifüj kullanı larak 3 dakika 4 jC'de 13 000 rpm'de santrifüjlemeden sonra süpernatantlar toplandı ve DEVD-pNA (p-nitronilin) ile 50 µM'lik son konsantrasyona eklendi. Her numune bir su banyosunda 37 jC'de 1 saat inkübe edildi ve 405 nm'de optik yoğunluk ölçüldü. Çeşitli pNA miktarları nı n A405'i ölçülerek standart eğri yapı ldı ve A405 değeri üretilen pNA miktarları na dönüştürüldü.

Nitrik oksit (NO) Tayini

HL-60 hücrelerinden salınan NO, Griess testi (Ungureanu-Longrois ve diğerleri, 1995) kullanılarak 105 hücre/kültür ortamında nitrit (NO₂) konsantrasyonu ölçülerek belirlendi. HL-60 hücreleri (5 mi), %10 FBS ile RPMI-1640 içinde 6 oyuklu kültür plakalarında kültürlendi ve daha sonra 4 saat HA ile inkübe edildi. Ortam, inkübasyondan sonra Dulbecco'nun PBS'si ile değiştirildi, çünkü HA bir floresans bileşimidir ve verileri engelleyecektir. 4 saat sonra tampon toplandı ve bir kez 1500 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüjlendi ve bu süpernatandan 150 µl, 1:1 (hacim/hacim) Griess reaktifi (%0.75 sülfanilamid) karışımına eklendi, 0,5 N HCl/%0,075 N-(1-naftil) etilendiamin içinde [nihai konsantrasyon] ve absorbans kaydedildi.



Şekil 1. HA'nın HL-60 hücre büyümesi (A) ve canlılığı (B) üzerindeki etkileri. HL-60 hücreleri 0, 50, 100, 200 ve 400 µg/ml (105 hücre/büyümesi (tripan mavisi dilüsyon kullanılarak HA ile 20 min süreyle tedavi edildi) ile 24, 48 ve 72 saat boyunca kültürlendi. 4 saat sonra hücreler toplanarak hücre süspansiyonları bir hemasitometre ile sayılarak hücre sayısı araştırıldı. Sonuçlar ortalama ± SEM'dir. Üç tahlilin SEM'i.

* Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı

gösterir (p < 0.05).

540 nm'de bir spektrofotometre ile ölçüldü. Bilinen sodyum nitrit konsantrasyonları kullanılarak standart bir eğri oluşturuldu.

İstatistik

Verilerin ortalama değerleri sapmalarıyla birlikte sunulur (üç tahlilin ortalama F SEM'si). Tüm veriler varyans analizi (ANOVA) ve ardından ikili karşılaştırma için Dunnett testi ile analiz edildi.

İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak tanımlandı.

Sonuç

Bu çalışmada, HA ile ilişkili apoptoz indüksiyonunu araştırmak ve ilgili moleküler mekanizmayı/mekanizmaları ifade etmek için bir HL-60, insan promiyelositik lösemi hücre dizisi kullanıldı. Apoptoz, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve internükleozomal DNA fragmantasyonu ile karakterize edilen karmaşık bir süreçtir. Monomerik protokatekuik asidin (PCA) fenolik türevlerinden polimerize edilen HA'nın sentetik formu kullanıldı (Yang ve diğerleri, 1994, 1996).

HA'nın hücre büyümesi ve HL-60 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi

HA'nın HL-60 hücrelerinin çoğalması ve hayatta kalması üzerindeki potansiyel etkilerini araştırmak için, 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0-400 Ag/ml) HA'ya maruz bırakıldı. Şekil 1(A), tripan mavisi dökülmesi kullanılarak belirlendiği üzere, doza ve zamana bağlı olarak HA kaynaklı hücre ölümünü göstermektedir. Ayrıca, HA'nın hücre canlılığı üzerindeki etkisinin doza ve zamana bağlı olduğu gösterildi (Şekil 1B).

tablo 1

Monomerik PCA, düşük moleküler ağırlıklı HA, HA ve taksolün HL-60 hücre büyümesi üzerindeki etkileri

Konsantrasyon	Hücre büyümesi (10 ⁵)	
	24 saat	48 saat
Kontrol	5,14 K 0,15	9,18 K 0,12
100 Ag/ml PCA	4,55 K 0,11* 3,72	4,52 K 0,06* 3,22
200 Ag/ml PCA 100	K 0,06*	K 0,11* 7,93 K
Ag/ml HA (MW < 500)	4,94 K 0,03	0,63* 5,98 K
200 Ag/ml HA (MW < 500)	4,17 K 0,13* 3,02	0,32* 3,08 K
100 Ag/ml HA	K 0,17* 2,37 K	0,02* 1,48 K
200 Ag/ml HA 0,1	0,15* 2,41 K	0,11* 0,34 F
Ag/ml Taxol 0,2	0,12* 1,78 K	0,06* 0,19 F 0,08*
Ag/ml Taxol 105	0,45*	

ağırlıklı HA (100, 200, 400 Ag/ml) ile (100 ve 200 Ag/ml) ve taksolün (PCA) (100 Ag/200 Ag/400 Ag/ml) için, DMSO, 0,2 ve 0,19 F 0,08* (kontrol) hücre büyümesi üzerindeki etkileri araştırıldı. DMSO'nun izlenen parametrelerin hiçbirinde etkisi olmaması kontrol hücreleri, belirtilen süreler boyunca (24 ve 48 saat) araştırıldı. Sonuçlar, 3 tahlilin ortalama F SEM'si olarak sunulmuştur.

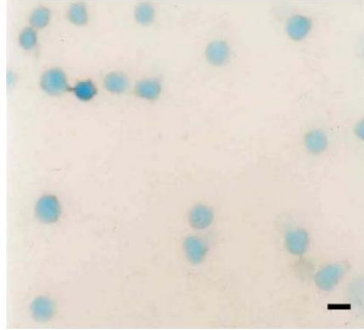
* Kontrol grubundan önemli bir farkı gösterir ($p < 0.05$).

Çalışmalar, monomerik bir fenolik bileşik olan PCA'nın antioksidan ve antitümör destekleyici aktiviteler gösterdiğini göstermiştir (Tseng ve diğerleri, 1996, 1998). Taksol, lösemiler gibi çeşitli habis hücrelere karşı antitümör aktivite sergileyen bir diterpenoid bitki ürünüdür (Wani ve diğerleri, 1971; Rowinsky ve diğerleri, 1989). Bu çalışmada monomerik PCA, düşük moleküler ağırlıklı HA (MW < 500 ile), HA ve taksolün HL-60 hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkileri de incelenmiştir. HL-60 hücreleri 105 hücre/ml, çeşitli konsantrasyonlarda monomerik PCA (100 ve 200 Ag/ (2.0 ml)), düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin HA (100 ve 200 Ag/ml) ve HA (100 ve 200 Ag/ml) ile birlikte HL-60 hücreleri (105 hücre/ml) 24 saat süreyle tedavi edildi. Bu çalışmada, PCA ve HA, düşük moleküler ağırlıklı HA'ya kıyasla HL-60 hücre büyümesi üzerinde daha yüksek inhibitör etkiler gösterdi.

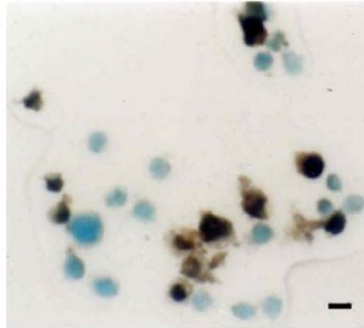
HA ile Apoptoz İndüksiyonu

Ayrıca 24 saatlik inkübasyondan sonra 100 Ag/ml HA ile tedavi edilen HL-60 hücrelerinin çoğunun yoğunlaşmış çekirdekler içerdiğini de bulduk. Şekil 2, TUNEL tahlili kullanılarak HA ile işlenmiş HL-60 hücrelerinin karakteristik bir popülasyonunun bir fotoğrafıdır. Apoptotik hücreler, ışık mikroskobu altında görüldüğü gibi koyu çekirdeklerle tanımlanır. HA ile muamele edilmiş kromozomal DNA'nın agaroz jel elektroforezi, merdiven benzeri bir DNA modeli ortaya çıkardı.

(A) Control



(B) HA



Şekil 2. HA'ya maruz kalan HL-60 hücrelerinin TUNEL testi. HL-60 hücreleri, (A) olmadan veya 100 Ag/ml HA (B) ile 24 saat muamele edildi ve mikroskop altında incelendi. Üç başlımsız deneyden elde edilen tipik bir sonuç gösterilmektedir. Çubuk, sabah 10'u temsil eder.

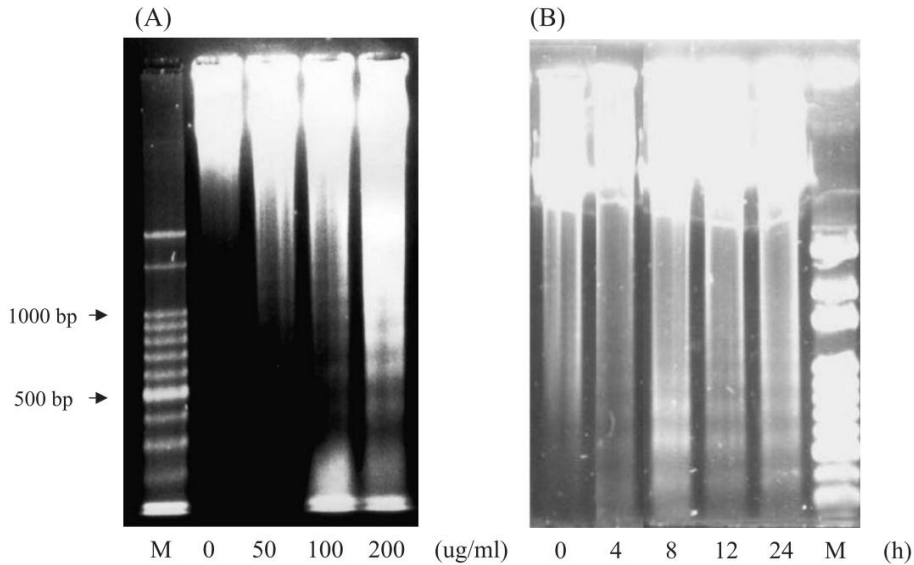
yaklaşık 180–200 baz çiftinin katları ndan oluşan fragmanlar (Şekil 3). HA'nın apoptozu indükleyen aktivitesi doza ve zamana bağlıydı (Şekil 3A ve B).

HA'nın Sitokrom c üzerindeki Etkisi

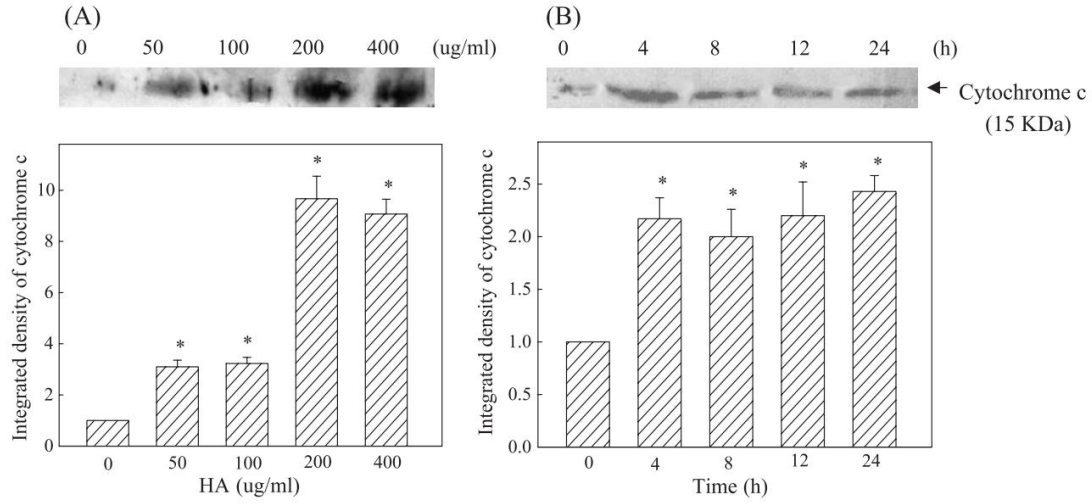
Sitokrom c'nin sitozol seviyeleri, western blot analizi kullanılarak incelenmiştir. Bu analizin sonuçları, sitosolik sitokrom c miktarının kademeli olarak 4 saatten 24 saate yükseldiğini gösterdi (Şekil 4B). HA'nın (0, 50, 100, 200 ve 400 Ag/ml'de) 24 saatlik tedaviden sonra sitokrom c translokasyonu üzerindeki konsantrasyon-yanıt etkisi de belirlendi (Şekil 4A), HA'nın mitokondriden sitokrom c translokasyonunu arttırdığı ortaya koydu doza ve zamana bağlı olarak sitozole biçim.

HA'nın Kaspaz 3 Aktivitesi ve PARP bölünmesi üzerindeki etkileri

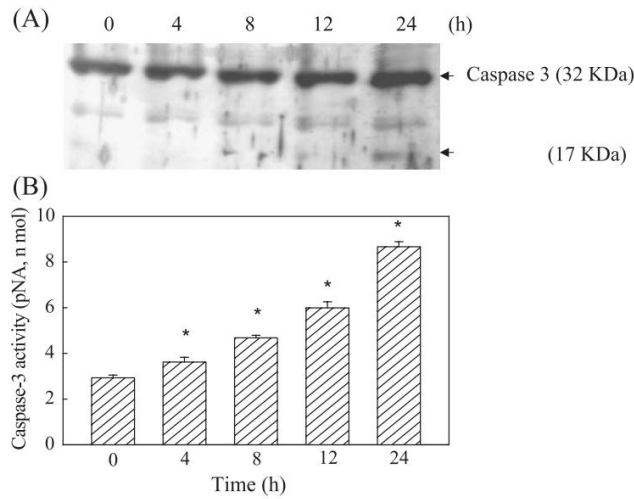
Apoptozu tetikleyen kaspazların aktivasyonunda sitokrom c'nin yer aldığı bildirildiğinden, kaspaz 3'ün HA'ya hücre yanıtındaki rolünü araştırdık. HA ile muamele edilmiş hücrelerdeki kaspaz aktivitesi, kolometrik analiz kullanılarak ölçüldü. Şekil 5'te gösterildiği gibi, HA (100 Ag/ml), işlenmiş HL-60 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinde 4 saatten 24 saate bir artışa neden oldu. PARP, DNA onarım sürecinde yer alan bir nükleer enzimdir ve 116 kDa PARP proteininin, son zamanlarda kaspaz-3 olarak adlandırılan bir proteaz olan CPP32'nin etkisiyle 89 ve 24 kDa'lık parçalara bölüldüğü belirlenmiştir (Nicholson ve ark., 1995). PARP'ın bu spesifik proteolitik bölünmesinin bir



Şekil 3. HA'ya maruz kalan HL-60 hücrelerinin DNA fragmentasyonu. (A) HL-60 hücreleri, 24 saat boyunca 0, 50, 100 ve 200 Ag/ml HA ile inkübe edildi. (B) HL-60 hücreleri, 0, 4, 8, 12 ve 24. saatlerde 100 Ag/ml HA ile inkübe edildi. DNA fragmanlarını varlığı, DNA merdivenlerini yansıtır, etidyum bromürle boyanmış jel üzerinde görüntülendi. Üç başlığımsız deneyden elde edilen tipik bir sonuç gösterilmektedir. M: moleküler ağırlık belirteçleri.

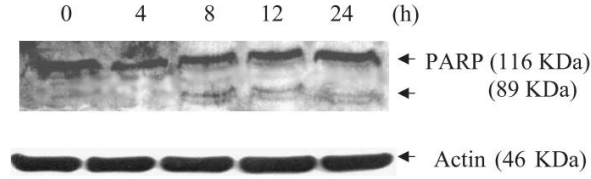


Şekil 4. HA maruziyetinden sonra sitokrom c protein seviyelerinin Western blot analizi. (A) HL-60 hücreleri, 24 saat boyunca 0, 50, 100, 200 ve 400 Ag/ml HA ile işlendi. (B) HL-60 hücreleri, 0, 4, 8, 12 ve 24. saatlerde 100 Ag/ml HA ile işlendi. Her numuneden alınan protein (50 Ag), %12 SDS-PAGE'de çözüldü ve western blot yapıldı. Sitokrom c protein bantlarındaki nispi değişiklikler dansimetrik analiz kullanılarak ölçüldü. Üç bağımsız deneyden elde edilen tipik bir sonuç gösterilmektedir.



Şekil 5. HL-60 hücrelerinde HA kaynaklı kaspaz-3 aktivasyonu için zaman akışı. (A) HA maruziyetinden sonra kaspaz-3 protein seviyelerinin Western blot analizi. HL-60 hücreleri, 0, 4, 8, 12 ve 24. saatlerde 100 Ag/ml HA ile işlendi. Her numuneden alınan protein (50 Ag), %12 SDS-PAGE'de çözüldü ve western blot yapıldı. (B) HL-60 hücreleri, 100 Ag/ml HA ile işlendi ve numuneler 0, 4, 8, 12 ve 24 saatte toplandı. Kaspaz proteazların enzim aktivitesi, Malzemeler ve Yöntemler'de açıklanmış gibi belirlendi. Kaspaz-3 aktivasyonu, Kaspaz 3'ün spesifik bir kolorimetrisi olan Ac-DEVD-pNA kullanılarak ölçüldü. pNA'nın absorbansı, bir spektrofotometre kullanılarak 405 nm'de ölçüldü. Kaspaz aktivitesi, pNA değişimi (nmol) olarak ifade edildi. Sonuçlar, üç tahlilin ortalama F SEM'si olarak sunulur.

* Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı gösterir ($p < 0.05$).

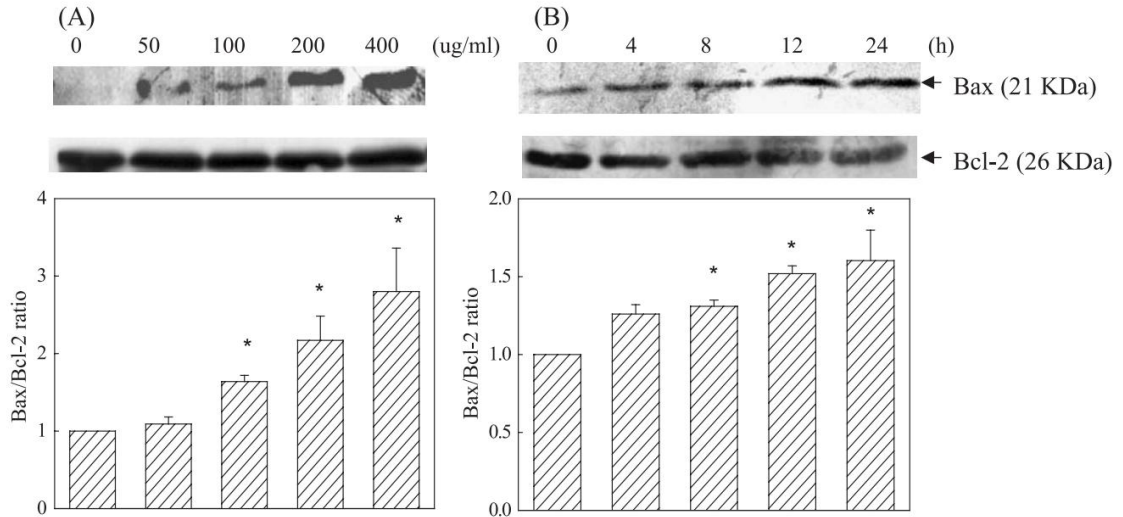


Şekil 6. HA'ya maruz kaldıktan sonra PARP protein seviyelerinin Western blot analizi. HL-60 hücreleri, 0, 4, 8, 12 ve 24. saatlerde 100 Ag/ml HA ile işlendi. Her numuneden alınan protein (50 Ag), %10 SDS-PAGE'de çözüldü ve western blot gerçekleştirildi. Üç bağımsız deneyden elde edilen tipik bir sonuç gösterilmektedir.

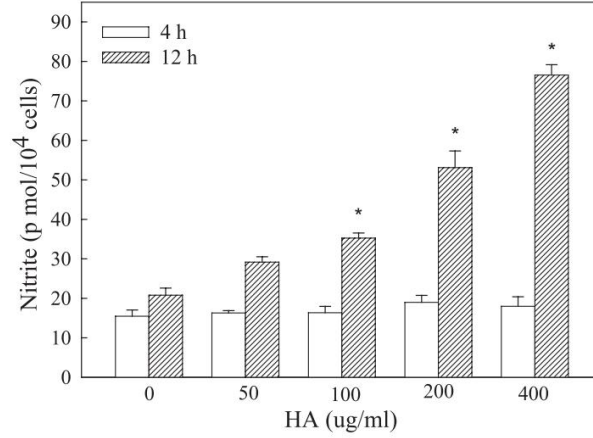
apoptozun biyokimyasal belirtici (Nicholson ve diğerleri, 1995), PARP antikorunu kullanılarak Western-blot deneyi yapıldı. Şekil 6, HA'nın (100 Ag/ml) eklenmesinden 8 saat sonra 89 kDa'lık parçalara bölünen PARP'yi göstermektedir.

HA'nın Bcl-2 ve Bax Protein Üzerindeki Etkisi

Kültürlenmiş HL-60 hücrelerinde Bcl-2 ve Bax protein seviyelerinin katınlığı, HA aracılı apoptozda incelenmiştir. Bcl-2 ve Bax'ın Western blot analizi, %12 SDS-PAGE'de çözüldü. Şekil 7'de gösterildiği gibi, HL-60 hücrelerinin HA ile inkübasyonu, doza ve zamana bağlı bir şekilde Bax protein seviyelerini önemli ölçüde artırdı. Bununla birlikte, Bcl-2 proteini üzerinde herhangi bir etki olmamıştır. HA kaynaklı apoptozdaki artış, Bax'taki artışla ilişkilendirildi. Bu sonuçlar, HA'nın Bcl-2 ve Bax oranını bozabileceğini ve dolayısıyla HL-60 hücrelerinin apoptozisine yol açabileceğini göstermektedir.



Şekil 7. HA'ya maruz kaldıktan sonra Bcl-2 ve Bax protein seviyelerinin Western blot analizi. (A) HL-60 hücreleri, 24 saat boyunca 0, 50, 100, 200 ve 400 Ag/ml HA ile işlendi. (B) HL-60 hücreleri, 0, 4, 8, 12 ve 24. saatlerde 100 Ag/ml HA ile işlendi. Her numuneden alınan protein (50 Ag), %12 SDS-PAGE'de çözüldü ve western blot gerçekleştirildi. Üç bağımsız deneyden elde edilen tipik bir sonuç gösterilmektedir. Bcl-2 ve Bax protein bantlarındaki nispi değişiklikler, dansitometrik analiz kullanılarak ölçüldü. * Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farkı gösterir (p < 0.05).



Şekil 8. HA'ya maruz kalan HL-60 hücrelerinden NO oluşumu için zaman akışı. HL-60 hücreleri, çeşitli HA konsantrasyonları (0, 50, 100, 200 ve 400 Ag/ml) yokluğunda ve varlığına 4 ve 12 saat süreyle inkübe edildi ve ardından NO oluşumu ölçüldü. Sonuçlar, üç tahlilin ortalama F SEM'si olarak sunulur. * Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farkı gösterir (p < 0.05).

HA işleminin NO üretimi üzerindeki etkileri

HA'nın NO üretimi üzerindeki etkileri, NO'nun kararlı son metaboliti olan nitrit (NO₂) oluşumu ölçülerek belirlendi. Şekil 8, farklı HA konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 200 ve 400 Ag/mL) çeşitli ön işlem süreleri (4 ve 12 saat) için HA'nın nitrit oluşumu üzerindeki etkilerini göstermektedir. Muamele edilmemiş hücrelerde nitrit oluşumu deney periyodu boyunca değişmedi, ancak HA ön muamelesi, konsantrasyona bağlı bir şekilde 12 saatte NO oluşumunu arttırdı.

Tartışma

Son çalışmalar, apoptoz ve kanser arasındaki ilişkiyi vurgulamış, neoplastik transformasyon, ilerleme ve metastaz süreçlerinin normal apoptotik yollarının değişimini içerdiğini öne süren kanıtlar artmaktadır (Bold ve diğerleri, 1997). Apoptoz, kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek antitümör etkilerini uyguladığı bildirilen birçok kemoterapötik ajanla etkili antikanser tedavisi için bazı ipuçları verir (Kamesaki, 1998). Burada bildirilen veriler, HA'nın kültürlenmiş insan premiyelositik lösemi HL-60 hücrelerinde çoğalmayı önleyici etki ve büyüme inhibisyonu uyguladığını ortaya koymaktadır.

Ayrıca, bu çalışmada, ölmekte olan hücreler, kromatin yoğunlaşması ve internükleozomal DNA fragmantasyonu ile ilişkili hücre canlılığı kaybı ile gösterildiği gibi, apoptozun karakteristiği olan ultrayapısal ve biyokimyasal özellikler sergiledi.

Bu çalışmada ayrıca, çoğu apoptozun biyobelirteçleri olarak kullanılan ve HA kaynaklı HL-60 insan lösemi apoptotik hücre ölümü ile ilişkili olayları tanımlamaktadır. Apoptoz, hücre ölümüne yol açan bir dizi moleküler olayın aktivasyonunu içeren oldukça düzenlenmiş bir süreçtir. Erken çalışmalar, HL-60 hücrelerinin çeşitli kemoterapötik ajanlarla tedavisine, PARP dahil olmak üzere bir dizi nükleer polipeptitin proteolitik bozunmasını eşlik ettiğini göstermiştir.

(Lazebnik ve diğerleri, 1994; Tewari ve diğerleri, 1995). Ayrıca immüno blot ve aktivite deneyleri, PARP'yi parçalayabilen enzimlerden biri olan kaspaz 3'ün, bir dizi farklı ajanla tedavi edilen insan lösemi hatları nda aktive edildiğini gösterir. Kaspaz 3 aktivasyonunun ve ardından poli (ADP riboz) polimerazın (PARP) bölünmesinin apoptoza yol açan ardışık seri olaylarda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (Lazebnik ve diğerleri, 1994; Tewari ve diğerleri, 1995). Apoptoz geçiren HL-60 hücrelerinin, mitokondride buna karşı ilk gelen bir azalma ile birlikte, sitozolde bir sitokrom c yükselmesine sahip olduğu bulundu (Yang ve diğerleri, 1997). Kaspaz 3'ün bu aktivasyonu, sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınmasıyla başlamış gibi görünmektedir (Nicholson ve diğerleri, 1995). Mevcut çalışmada, HL-60 hücrelerinin HA ile indüklenen apoptozunun sitokrom c'nin artan sitozolik translokasyonu, kaspaz 3 aktivasyonu ve PARP'nin bozulması için bir aracı rolü olduğunu gösteren kanıtlar sunuyoruz. Son zamanlarda, birçok makale, apoptotik hücre ölümünde internükleozomal DNA fragmentasyonunun gerekli olmadığını ve bazı nekrotik hücre ölümlerine internükleozomal DNA fragmentasyonunun eşlik ettiğini bildirerek, bu fragmentasyonun apoptotik hücre ölümünün bir göstergesi olarak yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir (Cohen ve ark., 1992; Schulze-Osthoff ve arkadaşları, 1994). Bununla birlikte, apoptozun merkezi mekanizması için evrimsel olarak korunduğu ve kaspaz aktivasyonunun bu karmaşık apoptotik yollarda önemli bir adı m olduğu açıktır (Thornberry ve Lazebnik, 1998). Bu nedenle verilerimiz, HA kaynaklı hücre ölümünün apoptoz ile ilişkili olduğuna dair ek önemli kanıtlar sağlar.

Bcl-2 ve Bax gen ürünlerinin apoptotik hücre ölümünde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Oltvai ve diğerleri, 1993; Jacobson ve diğerleri, 1994; Jacobson ve Raff, 1995). Bcl-2 ailesinde, Bcl-2 ve Bax proteinlerinin oranı, apoptotik sürecin düzenlenmesinde anahtar bir faktör olarak kabul edilmiştir (Rao ve White, 1997; Adams ve Cory, 1998; Green ve Reed, 1998). Bu çalışmada, HA kaynaklı apoptozdaki artış, hetero dimerize olan ve böylece Bcl-2'yi inhibe eden Bax proteini seviyelerindeki artışla ilişkilendirildi. Bununla birlikte, ihmal edilebilir düzeyde Bcl-2 azalması gözlemlendi. Çalışmamız, HA'nın Bcl-2 ve Bax oranını değiştirebileceğini ve dolayısıyla HL-60 hücrelerinin apoptozisine yol açabileceğini göstermiştir.

Hücre sel süreçlerden, büyük miktarda birikmiş kalsiyum, Ca²⁺ ve oksidatif stresin apoptozun ortak bir aracı sı olarak anahtar bir rol oynadığı gösterilmektedir (Cohen ve Duke, 1984; McConkey ve diğerleri, 1988; Ueda ve Shah, 1992; Forrest ve diğerleri, diğerleri, 1994; Nosseri ve diğerleri, 1994). Son çalışmalar, HA'nın canlılığı azaltabileceğini ve kültür lenmiş endotel hücrelerinin işlevini değiştirebileceğini göstermektedir. Daha önce HA'nın endotel hücrelerle etkileşiminin Ca²⁺ geçirgenliğini doğrudan artırabileceğini, dolayısıyla protein kinaz ve adenilat siklaz yoluyla Ca²⁺ ikinci haberi ile hücre içi sinyal yollarını aktive ettiğini (Yasuno ve diğerleri, 1994; Baruglia ve diğerleri, 2002a). HA'nın hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunun yükselmesi yoluyla HL-60 hücre ölümünü indükleyebileceğini ima eder (Hseu ve diğerleri, 2002a).

HA'da serbest radikallerin varlığı, ESR spektroskopisi kullanılarak ortaya çıkarılmıştır (Lu ve diğerleri, 1988). Son araştırmalar, radikallerin HA'nın katı (makromoleküler) matrisinde immobilize edildiğini göstermiştir (Jeziarski ve diğerleri, 2000). Sıçan karaciğer mitokondrisinde podzol ile uyarılan solunumdan ekstrakte edilen hü mik ve fulvik asit, hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden oldu (Visser, 1987). Bir dizi çalışma, kültür lenmiş tavşan eklem kondrositlerinde HA kaynaklı oksidatif hasara süperoksit anyon üretiminin aracı rolü edebileceğini göstermiştir (Liang ve diğerleri, 1998; Liang ve diğerleri, 1999). Önceki araştırmamız, HA kaynaklı ekinosit dönüşümünün insan eritrositlerinde oksidatif üretim yoluyla gerçekleştiğini göstermiştir (Hseu ve diğerleri, 2000). Bu nedenle, bu çalışmada HA'nın neden olduğu HL-60 hücrelerinde oksidatif stresin apoptozun bir aracı sı olabileceğini tahmin ettik. Önceki araştırmalarımız, endotel hücrelerinin HA tedavisinin NO üretimini ve bunun sonucunda hücreyi uyardığı göstermiştir.

yaralanma (Hseu ve diğerleri, 2002b). Bu nedenle, kültürlenmiş HL-60 hücrelerinde ölümcül hücre hasarı sürecinde HA'nın nitrik oksit (NO) oluşumu üzerindeki etkilerini inceledik. Süperoksit anyonu ile reaksiyona giren NO'nun, peroksinitrit anyonu gibi oksidanları (ROS) oluşumunu arttırdığı ve bunun yüksek sitotoksikite ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Beckman ve diğerleri, 1990; Huie ve Padmaja, 1993; Noronha-Dutra ve diğerleri., 1993). HL-60 hücrelerinin HA tedavisinin, HL-60 hücre hasarı na neden olabilecek NO üretimini uyardığı öneriyoruz.

Sonuç olarak HA, HL-60 hücrelerinde sitokrom c translokasyonu, kaspaz 3 aktivasyonu, PARP'nin bozulması ve Bcl-2 ve Bax'ın düzensizliği ile ilişkili apoptozu indükleyerek antiproliferatif bir etki sergiler. Apoptoz, kanser araştırması nın yeni bir terapötik hedefi haline geldi ve bu sonuçlar, HA'nın yeni ilaç ürünlerinin geliştirilmesinde uygulanmak üzere antikanser özelliklere sahip olabileceğini ima ediyor. Bununla birlikte, bu umut verici bulguları doğrulamak için aktivitesinin daha fazla in vivo araştırılması garanti edilir.

teşekkürler

Bu çalışma NSC 91-2320-B-242-009, DMR 90-131 ve CMU 91-NT-01 hibeleri ile desteklenmiştir. Ulusal Bilim Konseyi ve Çin Cumhuriyeti Çin Tıp Üniversitesi'nden.

Referanslar

- Adams, JM, Cory, S., 1998. Bcl-2 protein ailesi: hücre sağlığını hakemleri. *Bilim* 281, 1322 - 1326.
- Beckman, JS, Beckman, TW, Chen, J., Marshall, PA, Freeman, BA, 1990. Peroksinitrit tarafından görünür hidroksil radikal üretimi: nitrik oksit ve süperoksitten kaynaklanan endotel hasarı için çıkarımlar. *Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Bilimler Akademisi Tutanakları* 87, 1620 - 1624.
- Bold, RJ, Termuhlen, PM, McConkey, DJ, 1997. Apoptoz, kanser ve kanser tedavisi. *Cerrahi Onkoloji* 6, 133 - 142.
- Bortner, CD, Oldenburg, NBE, Cidrowski, JA, 1995. DNA parçalanmasını apoptozdaki rolü. *Hücre Biyolojisindeki Eğilimler* 5, 21 - 26.
- Burges, NA, Hurst, HM, Walkdenene, B., 1964. Hüyük asidin fenolik bileşenleri ve bunların ligninle ilişkileri bitki örtüsünün. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 28, 1547 - 1554.
- Cohen, JJ, Duke, RC, 1984. Timosit çekirdeklerinde kalsiyuma bağımlı bir endonükleazın glukokortikoid aktivasyonu hücreye yol açar ölüm. *İmmünoloji Dergisi* 132, 38 - 42.
- Cohen, GM, Sun, XM, Snowden, RT, Dinsdale, D., Skilleter, DN, 1992. Apoptozun temel morfolojik özellikleri internükleozomal DNA fragmentasyonu yokluğunda meydana gelir. *Biyokimyasal Dergi* 286, 331 - 334.
- Choudhry, GG, 1981. Hüyük maddeler. Bölüm I: yapısal yönler. *Çevresel Toksikoloji ve Kimya* 4, 209 - 259.
- Earnshaw, WC, 1995. Apoptozda nükleer değişiklikler. *Hücre Biyolojisinde Güncel Görüş* 7, 337 - 343.
- Forrest, VJ, Kang, YH, McClain, DE, Robinson, DH, Ramakrishnan, N., 1994. Oksidatif stres kaynaklı apoptoz Trolox tarafından engellendi. *Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp* 16, 675 - 684.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, SA, 1992. Belirli etiketleme yoluyla in situ programlanmış hücre ölümünün tanımlanması nükleer DNA parçalanması. *Journal of Cell Biology* 119, 493 - 501.
- Gottlob, K., Fulco, M., Levvero, M., Graessmann, A., 1998. Hepatit B Virüsü HBx Proteinini Kaspaz 3 Aktivitesini Engeller. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33347 - 33353.
- Green, DR, Reed, JC, 1998. Mitokondri ve apoptoz. *Bilim* 281, 1309 - 1312.
- Guan, J., Yang, H., 1999. Hüyük asitlerin tıbbi değeri. *Zhong Yao Cai* 22, 430 - 431.
- Haninen, KI, Klocking, R., Helbig, B., 1987. Hüyük asit benzeri polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu. *Toplam Çevre Bilimi* 62, 201 - 210.
- Hartenstein, R., 1981. Çamur ayrıştırma ve stabilizasyon. *Bilim* 212, 743 - 749.

- Hseu, YC, Lu, FJ, Engelking, LR, Chen, CL, Chen, YH, Yang, HL, 2000. İnsan eritrositlerinde hümitik asit kaynaklı ekinosit trans oluşumu: morfolojik değişikliklerin karakterizasyonu ve hasar mekanizması nı n belirlenmesi. Toksikoloji ve Çevre Sağlığı Dergisi bölüm A 60, 215 - 230.
- Hseu, YC, Wang, SY, Chen, HY, Yang, HL, 2002a. Hümitik Asit İnsan Endotel Hücrelerinde Apoptozu İndükler. Toksikoloji ve Uygulamalı Farmakoloji 182, 34 - 43.
- Hseu, YC, Chang, WC, Wang, SY, Chen, HY, Yang, HL, 2002b. Hümitik asit, insan göbük damarı endotel hücrelerinde nitrik oksit oluşumunu indükler: Hücre hasarı sı rasi nda nitrik oksit sentezi n uyarı lması . Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp 32, 619 - 629.
- Huie, RE, Padmaja, S., 1993. Hayı rlı n süperoksit ile reaksiyonu. Serbest Radikal Araştırma Bildirimleri 18, 195 - 199.
- Jacobson, MD, Burne, JF, Raff, MC, 1994. Programlanmı ş hücre ölümü ve Bcl-2 koruması nı n mekanizmaları . Biyokimyasal Toplum İşlemleri 22, 600 - 602.
- Jacobson, MD, Raff, MC, 1995. Çok düşük oksijende programlanmı ş hücre ölümü ve Bcl-2 koruması . Doğa 374, 814 - 816.
- Jezierski, A., Czechowski, F., Jerzykiewicz, M., Chen, Y., Drozd, J., 2000. Kompost, toprak, turbadan bñhumik asitlerdeki kararlı ve geçici radikaller üzerinde Elektron Paramanyetik rezonans (EPR) çalı şmaları ve linyit kömürü. Spectrochimica Acta bölüm A Moleküler ve Spektroskopi 56, 379 - 385.
- Kamesaki, H., 1998. Kemoterapi kaynaklı apoptozda yer alan mekanizmalar ve bunları n kanser kemoterapisindeki etkileri. Uluslararası Hematoloji Dergisi 68, 29 - 43.
- Keyser, P., Pujar, BG, Eaton, RW, Ribbons, DW, 1976. Bakteriler tarafı ndan ftalatları n ve bunları n esterlerinin biyolojik bozunması . Çevre Sağlığı Perspektifleri 18, 159 - 166.
- Lazebnik, YA, Kaufmann, SH, Desnoyers, S., Poirier, GG, Earnshaw, WC, 1994. Poli(ADP-riboz) polimerinin bölünmesi ICE gibi özelliklere sahip bir proteinaz tarafı ndan ase. Doğa 371, 346 - 347.
- Liang, HJ, Tsai, CL, Chen, PQ, Lu, FJ, 1999. Sentetik hümitik asit polimeri ve monomerinin indüklediği oksidatif yaralanma kültürlenmiş tavşan eklem kondrositleri. Yaşam Bilimleri 65, 1163 - 1173.
- Liang, HJ, Tsai, CL, Lu, FJ, 1998. Kültürlenmiş tavşanda hümitik asit çözücü ekstraksiyon fraksiyonunun neden olduğu oksidatif stres eklem kondrositler. Toksikoloji ve Çevre Sağlığı Dergisi bölüm A 54, 477 - 489.
- Lu, FJ, Yamamura, Y., Yamauchi, H., 1988. Endemik Kara Ayak hastalı ğı nda bir kuyunun suyundaki flüoresan bileşikleri üzerine çalı şmalar Tayvan'daki alanlar: Hümitik maddeler. Journal Formosan Tabipler Birliğı 87, 66 - 75.
- Lu, FJ, 1990. Tayvan'da floresan hümitik maddeler ve kara ayak hastalı ğı . Uygulamalı Organometalik Kimya 4, 191 - 193.
- McConkey, DJ, Hartzell, P., Duddy, SK, Hakansson, H., Orrenius, S., 1988. 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin olgunlaşmamı ş timositleri Ca2 + aracı lı endonükleaz aktivasyonu ile öldürür. Bilim 242, 256 - 259.
- Nicholson, DW, Ali, A., Thornberry, NA, Vaillancourt, JP, Ding, CK, Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, PR, Labelle, M., Lazebnik, YA, vd., 1995. Memeli apoptozu için gerekli olan ICE/CED-3 proteazı n tanı mlanması ve inhibisyonu. Doğa 376, 37 - 43.
- Noronha-Dutra, AA, Epperlein, MM, Woolf, N., 1993. Sigara içmenin kültürlenmiş insan endotel hücreleri üzerindeki etkisi. Kardiyovasküler Araştırma 27, 774 - 778.
- Nosseri, C., Coppola, S., Ghibelli, L., 1994. Stresi tetiklemede poli(ADP-ribosil) polimerazı n olası katı lı mı uyarı lı mı ş apoptoz. Deneysel Hücre Araştırması 212, 367 - 373.
- Oltvai, ZN, Milliman, CL, Korsmeyer, SJ, 1993. Bcl-2, programlanmı ş hücre ölümünü hı zlandı ran, korunmuş bir homolog olan Bax ile in vivo heterodimerize olur. Hücre 74, 609 - 619.
- Rao, L., White, E., 1997. Bcl-2 ve ICE ailesi apoptotik düzenleyiciler: bir bağlantı kurmak. Genetik ve Gelişimde Güncel Görüş 7, 52 - 58.
- Rowinsky, EK, Burke, PJ, Karp, JE, Tucker, RW, Ettinger, DS, Donohower, RC, 1989. Dirençli akut lösemilerde taksolün Faz I ve farmakodinamik çalı şması . Kanser Araştırması 49, 4640 - 4647.
- Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Droge, W., Krammer, PH, 1994. Hücre çekirdeği ve DNA parçalanması gerekli değildir. apoptoz. Hücre Biyolojisi Dergisi 127, 15 - 20.
- Tewari, M., Quan, LT, O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, DR., Poirier, GG, Salvesen, GS, Dixit, VM, 1995. CED-3'ün bir memeli homologu olan Yama/ CPP32 beta, ölüm substratı poli(ADP-riboz) polimerazı parçalayan CrmA ile inhibe edilebilen bir proteazdır. Hücre 81, 801 - 809.
- Tseng, TH, Wang, CJ, Kao, ES, Chu, CY, 1996. Hibiscus protokatekuik asit, indüklenen oksidatif hasara karşı korur sı çan birincil hepatositlerinde tert-bütillhidroperoksit ile. Kimya Biyolojik Etkileşim 101, 137 - 148.
- Tseng, TH, Hsu, JD, Lo, MH, Chou, FP, Huang, CL, Chu, CY, Wang, CJ, 1998. Hibiscus'un inhibe edici etkisi fare derisinde tümör teşvikinde protokatekuik asit. Yengeç Mektubu 126, 199 - 207.

- Thornberry, NA, Lazebnik, Y., 1998. Kaspazlar: İçimizdeki düşmanlar. *Bilim* 281, 1312 – 1316.
- Ueda, N., Shah, SV, 1992. Hidrojen peroksit kaynaklı böbrek tübüler hücre hasarı nda hücre içi kalsiyumun rolü. *American Journal of Physiology* 263, f214 – f221.
- Ungureanu-Longrois, D., Balligand, JL, Okada, I., Simmons, WW, Kobzik, L., Lowenstein, CJ, Kunkel, SL, Michel, T., Kelly, RA, Smith, TW, 1995. Kası İma tepkisi ventriküler miyositlerin izoproterenole dönüşümü, heterotipik birincil kültürde kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz aktivitesinin indüklenmesiyle düzenlenir. *Dolaşı m Araştır ması* 77, 486 – 493.
- Visser, SA, 1987. Hümk maddelerin mitokondriyal solunum ve oksidatif fosforilasyon üzerindeki etkisi. *Toplam Çevre Bilimi* 62, 347 – 354.
- Wani, MC, Yaylor, HL, Wall, ME, Coggon, P., McPhail, AT, 1971. Bitki antitümör ajanları . VI. *Taxus brevifolia*'dan yeni bir antilösemik ve antitümör ajan olan taksolün izolasyonu ve yapısı . *Journal American Chemistry Society* 93, 2325 – 2327.
- Wyllie, AH, Kerr, JF, Currie, AR, 1980. Hücre ölümü: apoptozun önemi. *Uluslararası Sitoloji İncelemesi* 68, 251 – 306.
- Wyllie, AH, 1987. Apoptosis: doku regülasyonunda hücre ölümü. *Patoloji Dergisi* 153, 313 – 316.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, CN, Ibrado, AM, Cai, J., Peng, TI, Jones, DP, Wang, X., 1997. Bcl-2 ile apoptozun önlenmesi : mitokondriden sitokrom c salı nı mı engellendi. *Bilim* 275, 1129 – 1132.
- Yang, HL, Lu, FJ, Wang, SL, Chiu, HC, 1994. Hümk asit, kültürlenmiş endotel hücreleri tarafı ndan doku faktörünün ekspresyonunu indükler: Sitozolik kalsiyum ve pprotein kinaz C ile düzenleme. *Tromboz ve Hemostaz* 71, 325 – 330.
- Yang, HL, Chiu, HC, Lu, FJ, 1996. Hümk asidin insan göbek damarı nı n canlı lı ğı ve pı htı laştır ıcı özellikleri üzerindeki etkileri endotel hücreleri. *Amerikan Hematoloji Dergisi* 51, 200 – 206.
- Yang, HL, Hseu, YC, Lu, FJ, Tsai, HD, 1998. Hümk asit, insan göbek damarı endotel hücrelerinin trombomodulinin protein C'yi aktive eden kofaktör aktivitesini azaltı r. *British Journal Hematology* 101, 16 – 23.