

TİTANYUM DİOKSİTİN A549 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİ

Ayşe KAPLAN ^{1, *}, Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ ², Hatice Mehtap KUTLU ¹

¹Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 26470, Eskişehir, Türkiye

²Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 26470, Eskişehir, Türkiye

ÖZET

Metal temelli bileşikler potansiyel etkilerinden ve az toksisiteye neden olduklarından dolayı uzun zamandır kullanılmaktadır. Metal bileşikler cisplatin çeşitli kanser türlerine karşı tıbbi olarak kullanılmış ve yan etkiler göstermiştir. Bu çalışmada cisplatin alternatif ajan olarak düşünülen titanyum dioksit A549 hücreleri üzerindeki etkileri ve apoptotik mekanizması araştırıldı. Titanyum dioksit 24, 48 ve 72 saatlik sürelerdeki zamana ve konsantrasyon aralığına bağlı olarak antiproliferatif etkileri MTT canlılık analizi kullanılarak belirlendi. Titanyum dioksit apoptozisi tetiklediği saptandı. Titanyum dioksit IC₃₀ konsantrasyonu, 72 saat süresince A549 hücreleri üzerinde uygulandığında erken ve geç apoptozisi tetiklediği belirlendi. Titanyum dioksit IC₃₀ konsantrasyonu, 72 saat süresince A549 hücreleri üzerine uygulandığında mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak apoptozisi tetiklediği gösterildi. Buna rağmen kaspaz-3 aktivitesi gözlenmedi. Titanyum dioksit IC₃₀ konsantrasyonunun 72 saatlik süre sonundaki hematoxilen ve eozin, TUNEL, BrdU, Bcl-2 ve Bax immünohistokimyasal analizleri sonucunda apoptotik indekslerinde artış belirlendi. Titanyum dioksit IC₃₀ konsantrasyonunun uygulandığı A549 hücrelerinde 72 saatlik süre sonunda konfokal ve TEM mikroskopisi kullanılarak çeşitli apoptotik yapılar gözlemlendi. Bu sonuçlar titanyum dioksit A549 hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkilerini ve cisplatin eş potansiyel kemoterapötik bir ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: TiO₂, Antiproliferatif, Apoptoz, İmmünohistokimya, A549.

THE APOPTOTIC EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE ON A549 CELLS

ABSTRACT

Metal-based compounds have been used for a long time because of their potential effects and low toxicity. Metal compound cisplatin has been used medically against various types of cancer and has shown side effects. In present study, we researched the effects of titanium dioxide, which is considered as an alternative agent against cisplatin on the A549 cells and its apoptotic mechanism were investigated. The antiproliferative effects of titanium dioxide were determined using MTT viability analysis depending on the time and concentration intervals at 24, 48 and 72 hours. We assessed that titanium dioxide induced apoptosis. The IC₃₀ concentration of titanium dioxide triggered early and late apoptosis for 72 hours in A549 cells. The IC₃₀ concentration of titanium dioxide was shown to induce apoptosis by reducing mitochondrial membrane potential for 72 hours. However, caspase-3 activity was not observed. The IC₃₀ concentration of titanium dioxide revealed an increase in apoptotic index with immunocytochemical analysis of hematoxylin and eosin, TUNEL, BrdU, Bcl-2 and Bax for 72 hours. The apoptotic structures were scanned by using confocal and TEM microscopy in A549 cells for 72 hours. These results show that titanium dioxide induce antiproliferative and apoptotic effects on A549 cells and that titanium dioxide may be a potential chemotherapeutic agent like cisplatin.

Keywords: TiO₂, Antiproliferative, Apoptosis, Immunocytochemistry, A549.

1. GİRİŞ

Metal bileşiklerin özellikle geçiş metal bileşiklerin kanser tedavisinde büyük başarı gösterdiği önceki yıllarda ve günümüze dayanan birçok çalışmada gösterilmiştir. Kanser ve lösemide metal ve metal içeren bileşiklerin terapötik (tedavi edici) kullanımı üzerine en erken veriler 16. yüzyıla dayanmaktadır [1-2]. Metal bileşik cisplatinin [cis-diamminedichloroplatinum(II)] 1965 yılında Rosenberg tarafından antiproliferatif etkisinin keşfi ve 1978 yılında FDA (U.S. Food and Drug Administration = Amerikan

*Sorumlu yazar: aysekapan26@hotmail.com

Gıda ve İlaç Kurumu) tarafından onaylanması ile kemoterapötik bir madde olarak çeşitli kanser türlerine (ovaryum, baş ve boyun, mesane, testiküler ve akciğer kanserleri) karşı yüksek etki gösterdiği kanıtlanmıştır [3]. Sisplatinin büyük başarısına rağmen, tıbbi kullanımında nörotoksisite, hepatotoksisite ve nefrotoksisite gibi toksik yan etkiler görülmüştür [4]. Tüm bunların sonucu olarak sisplatin kadar etkili ancak yan etkisi az veya olmadığı düşünülen metal içerikli güçlü kemoterapötiklere ilgi artmıştır. Metal bileşiklerinin öneminin artması ile titanyum gibi şimdiye kadar göz ardı edilmiş metal temelli ilaçların gelişimi önem kazanmıştır [5]. Dioksit, salisilat ve tannat gibi titanyum bileşikleri günümüzde birçok farmasötik ve kozmetik ürünlerinde önemli bir bileşen olarak kullanılmaktadır [6-9]. Titanyum dioksit, titanyumun en önemli endüstriyel bileşiğidir. Titanyum dioksit, Fujishima ve Honda'nın 1972'deki bu madde ile ilgili yayınlarından bu yana araştırılmaktadır [10-11]. Araştırmacılar son yıllarda titanyum dioksitin kanser tedavisinde yeni bir araç olup olmadığını araştırmaktadır [12-13].

Kanser tedavisinde, hücre ölümü mekanizmaları yapılan çalışmalarda yoğun ilgi görmektedir. Apoptoz en çok araştırılan hücre ölüm yollarından biridir. Apoptozu anlamak tümör gelişim ve tedavisinde daha iyi değerlendirmeler yapmak açısından önemlidir [14]. Apoptoz, "genetiksel olan programlı hücre ölümü" istenmeyen ya da hasarlı hücreleri gelişim sürecinde, DNA veya enfeksiyon hasarına bağlı olarak yok edebilmektedir [15]. Apoptozun azalması sonucu tümör gelişimi yani kanser meydana gelebilmektedir [16]. Hastalık durumunda apoptozu anlamak, patogeneze esnasında belirlenen ipuçları açısından hastalığın nasıl tedavi edileceği konusunda bilgi vereceğinden önem kazanmaktadır [17]. Bu nedenle, apoptozun moleküler mekanizmasının anlaşılması yeni ilaçlar ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için şarttır [15].

Bu çalışmanın amacı sisplatin gibi metal türevli bileşik olan titanyum dioksitin A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkilerini analiz etmektir.

2. MATERYALLER

A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleri American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, ABD)'den satın alınmıştır. Titanyum dioksit (TiO₂) (250 gram) ABCR GmbH'den satın alınmıştır. Sisplatin Sigma Aldrich, ABD'den elde edilmiştir. Fetal Bovin Serum (FBS), penisilin-streptomisin Gibco, Güney Amerika'dan satın alınmıştır. Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline Concentrate (10X) Biological Industries, İsrail'den elde edilmiştir. Tripsin/EDTA solüsyonu Biochrom, Almanya'dan satın alınmıştır. Dimetil sülfoksit (DMSO) Sigma Aldrich, ABD'den elde edilmiştir. Anneksin-V FITC/Propidyum iyodid (PI), kaspaz-3 ve JC-1 kitleri BD Biosciences, San Diego, ABD'den satın alınmıştır. Anneksin-V FITC ve akridin oranj kitleri Santa Cruz Biotechnology, ABD'den satın alınmıştır. TUNEL, BrdU, hematoksilen/eozin, Bcl-2 ve bax kitleri Santa Cruz Biotechnology, ABD'den satın alınmıştır.

3. YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültür Modeli

A549 hücreleri, adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleridir. A549 hücreleri ilk kez 1972 de D.J. Giard ve ark. tarafından elde edilmiştir. Kanserli akciğer doku kültürü 58 yaşındaki bir Kafkasyalı erkekten alınmıştır [18]. Bu hücreler tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir. A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleri, % 10 FBS ve % 1 penisilin-streptomisin içeren RPMI besiyeri içerisinde % 5 CO₂ ortamlı 37 ° C'de bekletilerek kültüre edildi.

3.2. MTT Analizi

Hücreler, 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 5×10^3 yoğunlukta ekildi. Hücreler, sisplatin ve titanyum dioksitin 1, 5, 10, 25, 50, 100, 125, 250, 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarında % 5 CO_2 içeren hava ortamında 37°C 'de 24, 48 ve 72 saat süresince bekletildi. Sisplatinin ana stok solüsyonu DMSO ve medyum içerisinde hazırlandı. Titanyumun ana stok solüsyonu PBS ve medyum içerisinde hazırlandı. DMSO oranı % 0.1'i geçmeyecek şekilde maddeler besiyerinde % 0.1 olacak şekilde 1 ml içinde 1 μl DMSO'da verilmiştir ve sisplatin ve titanyum dioksitin final konsantrasyonları: 1, 5, 10, 25, 50, 100, 125, 250, 500 ve 1000 μM dozlar olması sağlanmıştır. Bekleme sonunda PBS içerisinde 5 mg/mL olacak şekilde çözülen MTT tozundan hazırlanan solüsyon her bir kuyucuğa 20 μl olacak şekilde eklendi ve 2-4 saat bekletildi. Sonrasında plakadan ortamdaki besiyeri uzaklaştırılıp 100 μl DMSO boyanın çözünmesi için her bir kuyucuğa ilave edildi ve 10 dakika bekletildi. Hücreler, ELİZA (Bio. Tec. ELx808IU, ABD) okuyucuda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okutuldu. Hücre canlılığı kontrol hücrelerine kıyasla yüzde bir oran olarak hesaplandı. Her bir konsantrasyon 3 kez tekrarlandı ve $\text{IC}_{50}/\text{IC}_{30}$ değerleri belirlendi [19].

3.3. Anneksin V-FITC/ PI ile İşaretleme

Hücreler, 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 10^5 yoğunlukta ekildi. Sisplatinin IC_{50} ve TiO_2 'in IC_{30} konsantrasyonları kuyucuklardaki hücreler üzerine uygulandı. Hücreler sonrasında %5 CO_2 içeren hava ortamında 37°C 'de 72 saat süresince bekletildi. Sonrasında hücreler PBS ile yıkandı ve tripsin ya da hücre kazıyıcı kullanılarak kaldırıldı. Hücreler 15 ml lik tüplere toplanıp iki kez PBS ile yıkanarak her defasında santrifüj edildi. Bu işlem sonunda kitin Binding Buffer solüsyonu 100 μl her bir örneğe ilave edilerek bu hücreler Anneksin V-FITC (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve PI (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ile oda sıcaklığında ($20-25^\circ\text{C}$) karanlık ortamda 15 dakika işaretlendi. Örnek hücreler üzerine 400 μl Binding Buffer ilave edildi. En son olarak BD FACS Aria Cell Sorter flow cytometry cihazı ile analiz edildi [19].

3.4. Kaspaz- 3 İşaretleme

Hücreler, 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 10^5 yoğunlukta ekildi. Sisplatinin IC_{50} ve TiO_2 'in IC_{30} konsantrasyonları kuyucuklardaki hücreler üzerine uygulandı. Hücreler sonrasında % 5 CO_2 içeren hava ortamında 37°C 'de 72 saat süresince bekletildi. Sonrasında hücreler kaldırıldı ve PBS ile iki kez yıkandı. BD Cytofix/Cytoperm solüsyon (her bir örnek için 0.5 ml) ile yeniden süspansedilerek 20 dakika buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda santrifüj yapıldı. Pellet hücrelerden BD Cytofix/Cytoperm uzaklaştırıldı. BD Perm/Wash buffer (1X) (her bir örnek için 0.5 ml) ile hücreler iki kez yıkandı. Sonrasında her bir örnek için 100 μl BD Perm/Wash buffer (1X) ve 20 μl antipedi eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda her örnek 1 ml BD Perm/Wash buffer ile yıkanarak ve santrifüj edilerek akış sitometri (flow sitometri) cihazında okutulmak üzere 0.5 ml BD Perm/Wash buffer (1X) da süspansedildi ve analiz yapıldı [19].

3.5. JC-1 ile İşaretleme

Hücreler, 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 10^5 yoğunlukta ekildi. Sisplatinin IC_{50} ve TiO_2 'in IC_{30} konsantrasyonları kuyucuklardaki hücreler üzerine uygulandı. Hücreler sonrasında %5 CO_2 içeren hava ortamında 37°C 'de 72 saat süresince bekletildi. Sonrasında hücreler kaldırıldı ve PBS ile yıkandı. Hücreler 400 xg de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. JC-1 boyama solüsyonu (1X assay buffer + JC1 stok solüsyon) her bir örneğe 0.5 ml olacak şekilde uygulandı. JC-1 stok solüsyon 125 μl DMSO ile çözülerek hazırlandı. 1X assay buffer için (12.375 ml) 125 μl JC-1 stok solüsyon kullanıldı. JC-1 boyama solüsyonu içerisinde hücreler 10-15 dakika 37°C de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler iki kez yıkandı. İlk yıkamada her bir örneğe 2 ml 1X assay buffer kullanıldı, ikinci yıkamada 1 ml 1X assay buffer uygulanarak yıkama sonrası 0.5 ml 1X assay buffer ile süspansedilen hücreler flow sitometride okutuldu [20].

3.6. İmmünohistokimyasal Analizler

3.6.1. Fiksasyon, Parafin Gömme ve Deparafinizasyon

A549 hücreleri, 75 cm² steril flasklarda kültüre edildi. Sisplatinin IC₅₀ ve TiO₂'in IC₃₀ konsantrasyonları 72 saat süresince uygulandı. Sonrasında hücreler gece boyunca % 10 formaldehit (nötral-tampon), 900 ml distile su (pH 7), 4 gram sodyum fosfat monobazik, 6.5 gram sodyum fosfat dibazik, 100 ml saf formaldehit ile fikse edildi. Parafine gömme işlemi için metal gömme kalıbına az miktarda parafin döküldü ve hücreler kalıba yerleştirildi. Kalıp soğuk bir kısma alındı ve kalıp içindeki hücrelere bastırılarak tabana eşit olarak yapışmaları sağlandı. Üzerine blok kaseti koyuldu. Blok kasetinin deliklerini geçinceye kadar parafin ilave edildi. Mikrotom cihazı blok tutucu yuvasına blok kaseti takıldı. Dokunun ön yüzü tıraşlanarak doku bütünlüğüne ulaşıldı. 4 mikron kalınlığında kesitler alındı (Ultramikrotom cihazı/LEICA EM UC6, Almanya). Fırça yardımıyla 45 derece su banyosuna alınan kesitler kırıştırılmadan atıldı. Suda açılan kesitler lama aktarıldı ve %60, %70, %80, %90 ve %96'lık alkol serisinden 1 saat boyunca geçirildi. Sonrasında kesitler saf alkolde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda aseton ve ksilen kesitler üzerine yarım saat boyunca uygulandı. Kesitler 1 saat boyunca deparafinizasyon işlemi için 60 °C'de bekletildi. İnkübasyon sonunda ksilen 5 dakika boyunca kesitler üzerine 3 kez uygulandı. Kesitler, saf alkolde ve hidrasyon için sırasıyla %96, %90, %80, %70 ve %50 alkol serisinde 1 dakika süresince bekletildi. Sonra her bir kesit 1 dakika boyunca distile suda inkübe edildi. En son olarak 2 dakika hematoksilen boyaya maruz bırakıldı [19].

3.6.2. İmmünohistokimyasal Boyama

Hematoksilen ve Eozin Boyama

Her kesit 1 dakika için distile su ile inkübe edildi. Sonra hematoksilen boya 2 dakika için bekletildi. Kesitler tekrar distile suda 1 dakika süresince inkübe edildi. %0.3 asit alkol, boyayı uzaklaştırmak için kullanıldı. Bu işlemde sonra kesitler tekrar 1 dakika boyunca distile suda bekletildi. Amonyaklı su (%1) birkaç kez kesitlere uygulandı. Kesitler 5 kez % 96'lık alkole batırılıp çıkarıldı. Sonrasında eozin Y, 2 dakika süresince bekletildi. Dehidratasyon için sırasıyla %70, %90, % 96 ve saf alkol serisi tercih edildi. Entellan lamların üzerine damlatıldı ve 24×60 lamelle 45 derece açı yapılarak kapatıldı. Örnekler ışık mikroskopunda görüntülendi.

TUNEL Boyama

Kesitler distile suda bekletildikten sonra 15 dakika boyunca 37 ° C de proteinaz K enzimine maruz bırakıldı. Sonrasında PBS ile yıkanan kesitler hidrojen peroksit (%3 su içeren) ile bekletildi. Kesitler tekrar PBS ile yıkandı ve Equilibration Buffer içinde 3 dakika bekletildi. Kesitler sonra 1 saat süresince TdT enzim çalışma solüsyonuna maruz bırakıldı. Digoksijenin peroksidaz sekonder antidi kesitlerde 30 dakika süresince inkübe edildi. DAB kromojen 5 dakika boyunca bekletildi. Bekleme sonunda aseton ve ksilen kesitler üzerine yarım saat uygulandı. Kesitler yarım saat süresince parafinde 3 kez bekletildi. Tüm işlemler 16 saat sürdü. Dehidratasyon için %70, %90, %96 ve saf alkol serisi tercih edildi. Entellan lamlara damlatıldı ve 24×60 lameller 45 derece açı ile kapatıldı. Örnekler ışık mikroskopunda görüntülendi.

BrdU İşaretleme

Antijen maskelenmesini uzaklaştırmak için antijen alımı adımı uygulanması yapıldı. Dilue edilmiş sitrat (pH:6, 1/10) kesitler üzerine koyuldu. Kesitler 30 saniye distile suda inkübe edildi. Daha sonra örnekler 3 dakika süresince PBS içinde bekletildi ve serum blok solüsyon 5 dakika boyunca uygulandı. Primer antidi (BrdU) 1 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kesitler PBS ile 3 dakika boyunca yıkandı ve sekonder antidi HRP polimer 20 dakika boyunca bekletildi. Sonrasında örnekler tekrar

PBS ile 3 dakika yıkandı. Yıkamadan sonra DAB kromojen 3 dakika boyunca inkübe edildi. Dehidratasyon için %70, %90, %96 ve saf alkol serisi tercih edildi. Entellan lamlar üzerine damlatıldı ve 24×60 lameller ile 45 derece açı yapılarak kapatıldı. Örnekler ışık mikroskopunda görüntülendi.

Bcl-2 ve Bax İşaretleme

Antijen maskelenmesini uzaklaştırmak için antijen alımı adımı uygulanması yapıldı. Dilue edilmiş EDTA (pH:8, 1/10) kesitler üzerine koyuldu. Kesitler 30 saniye distile suda inkübe edildi ve hidrojen peroksit (%3 sulandırılmış) 10 dakika bekletildi. Daha sonra örnekler 3 dakika boyunca PBS içinde inkübe edildi ve serum blok solüsyon 5 dakika boyunca uygulandı. Primer antipodi (bcl-2 ve bax) 1 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kesitler 3 dakika süresince PBS ile yıkandı ve 20 dakika boyunca amplifikatör bekletildi. Sonrasında örnekler tekrar 3 dakika boyunca PBS ile yıkandı. Yıkamadan sonra örnekler, HRP polimer ile 20 dakika boyunca ve PBS ile 3 dakika boyunca inkübe edildi. Kromojen AEC ile 3 dakika süresince inkübe edildi ve 30 saniye boyunca distile su ile yıkandı. Dehidratasyon için %70, %90, %96 ve saf alkol serisi tercih edildi. Entellan lamlara damlatıldı ve 24×60 lameller ile 45 derece açı yapılarak kapatıldı. Örnekler ışık mikroskopunda görüntülendi [19].

3.6.3. Konfokal Mikroskobu

A549 hücreleri üzerine sisplatinin IC₅₀ ve titanyum dioksitin IC₃₀ konsantrasyonları uygulandı. Uygulama sonrasında A549 hücreleri 6 kuyucuklu plakada 37 °C de 72 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler PBS ile yıkayıp akrinin oranj ve Anneksin FITC floresan boya ile boyanarak hücrelerde çekirdek ve hücre zarlarının yapısına bakıldı. Doku üzerindeki yapısal değişiklikler Leica TCS-SP5 II konfokal mikroskop kullanılarak görüntülendi ve Leica Confocal Software version 2.00 programı kullanıldı [20].

3.6.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

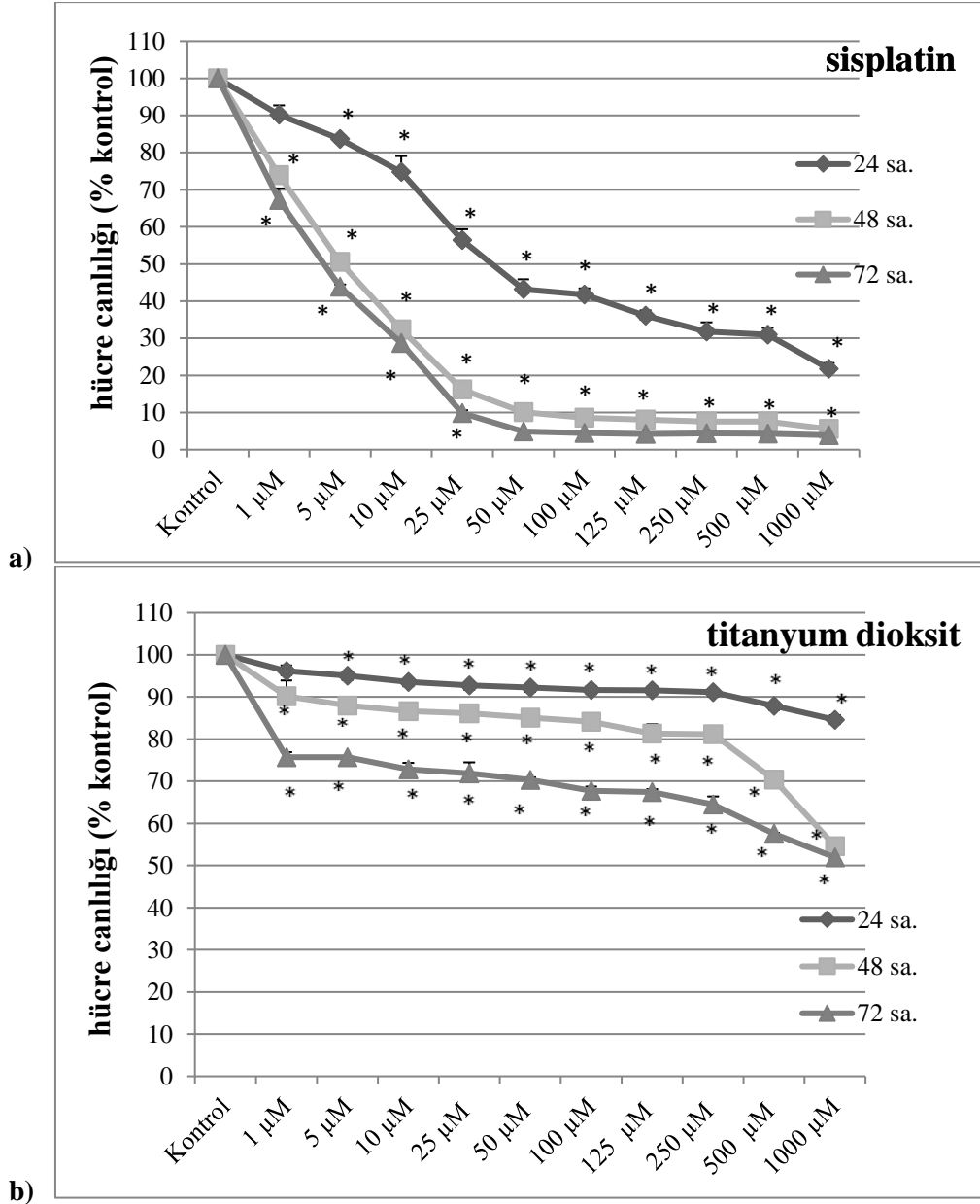
A549 hücreleri üzerine sisplatinin IC₅₀ ve TiO₂'in IC₃₀ konsantrasyonları verildi. A549 hücreleri 75 cm² lik flaklarda 37 °C de 72 saat süresince inkübe edildi. Sonrasında kaldırılan hücreler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve 0.1 M PBS içindeki % 2.5 glutaraldehit ile fikse edildi. Fikse edilen pelletler aynı fiksatif içerisinde 4 °C'de gece boyunca bırakıldı. Bu süre sonunda pelletler agara gömüldü ve bir kez daha osmiyum tetroksit (%2) içerisinde fikse edildi. Daha sonra dehidratasyon (%70, %90, %96 etil alkol) yapıldı ve en son saf etanolde (%100) dehidre edildi. EPON 812 epoxy resine gömülen dehidre hücrelerin ultramikrotom (LEICA EM UC6) ile 100 nm kalınlığında elmas bıçak kullanılarak ince kesitleri alındı. Kesitler kurşun sitrat ve uranil asetat ile boyandı ve TEM görüntüleme yapıldı [19].

4. BULGULAR

4.1. MTT Canlılık Belirleme

Hücre canlılığını belirlemek için MTT analizi kullanıldı. Metabolik aktiviteyi ölçmek için en yaygın şekilde kullanılan analizlerden bazıları tetrazolyum indirgenmesine dayanmaktadır. Bu analizlerden en çok kullanılan MTT (2-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür) indirgenmesidir [21]. MTT analizi, çözünebilir sarı renkli MTT tetrazolyum tuzunun, çözünmez mavi renkli mor formazan ürününe dönüşmesi için mitokondriyal süksinik dehidrojenaz yardımı ile alınımına ve indirgenmesine dayanmaktadır [22]. Sisplatinin, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 125, 250, 500 ve 1000 µM konsantrasyon aralığında 24, 48 ve 72 saat süreler sonundaki etkileri A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel kanseri hücre hatlarında belirlendi. Sisplatin, kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve konsantrasyon aralığına bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler gösterdi. Sisplatinin sitotoksik etkisi sonucu A549 hücrelerinin canlılığı azalmıştır (Şekil 1a). TiO₂'in sitotoksik etkisi, A549 adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel kanseri hücre hatlarında 1, 5, 10, 25, 50, 100, 125, 250, 500

ve 1000 μM konsantrasyon aralığında belirlendi. TiO_2 , kontrol hücrelerine kıyasla zamana ve konsantrasyon aralığına bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler gösterdi. TiO_2 'in sitotoksik etkisi sonucu A549 hücrelerinin canlılığı azalmıştır (Şekil 1b). Buna rağmen TiO_2 A549 hücreleri üzerinde pozitif kontrol sisplatin kadar sitotoksik ve antiproliferatif etkiler göstermedi. Pozitif kontrol sisplatinin IC_{50} ve TiO_2 'in IC_{30} değerleri Microsoft Excell 2010 ve 11.5 SPSS programı kullanılarak istatistiksel olarak hesaplandı (Tablo 1). Biz TiO_2 'in düşük dozlardaki toksik olmayan etkilerini gözlemek için 72 saat süre sonundaki etki gösteren IC_{30} değerini belirledik ve diğer analizlerde bu değeri uyguladık.



Şekil 1. MTT analizi kullanılarak sisplatin (a) ve TiO_2 (b) bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarda (1-1000 μM) A549 hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saat süresince antiproliferatif ve sitotoksik etkileri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Tablo 1. MTT analizleri sonucu 24, 48 ve 72 saat sonundaki IC₅₀ ve IC₃₀ değerleri

Maddeler (μM)	24 saat	48 saat	72 saat
Sisplatin (IC ₅₀)	31.25 \pm 1.76	5.1 \pm 1.69	3 \pm 0
TiO ₂ (IC ₃₀)	yok	500 \pm 0	50 \pm 0

4.2. Erken/Geç Apoptotik Etki

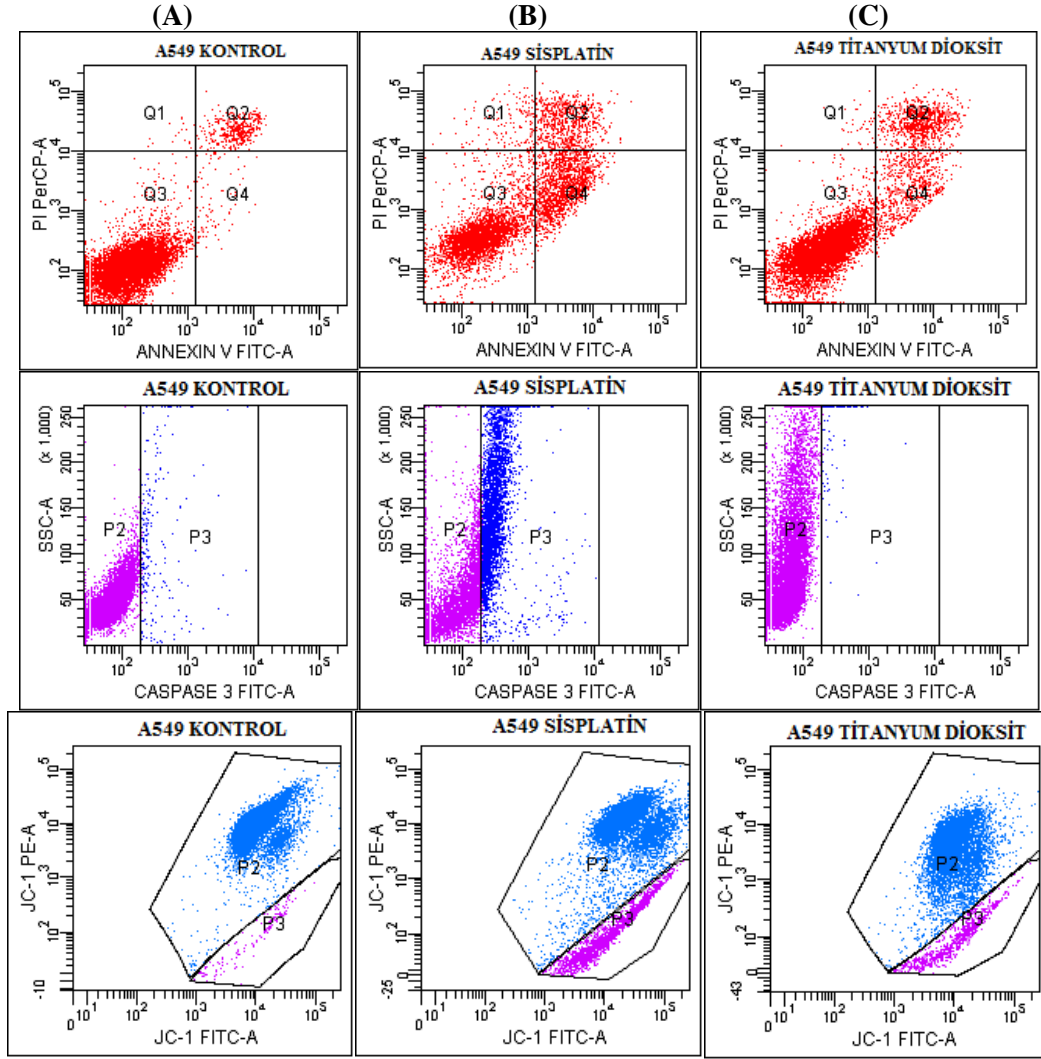
Erken ve geç apoptotik etkiler, Anneksin-V FITC/PI kiti kullanılarak flow sitometri ile analiz edildi. Apoptozun erken olaylarından birisi, plazma membranının iç yüzeyinden fosfatidilserin (PS)'in membranın dış yüzeyine çıkmasıdır. Anneksin V, 'Ca²⁺ bağımlı fosfolipid bağlayıcı protein' PS için yüksek affiniteye sahiptir. Anneksin V, fosfatidil serine bağlanarak erken apoptotik hücreyi işaretlemektedir. Anneksin V boyama, erken ve geç apoptotik hücrelerin birbirinden ayrılması için kullanılan propidyum iyodid (PI) boya ile birlikte kullanılmaktadır. Ölü ve hasar görmüş membrana sahip hücreler PI'ya karşı geçirengindir. Erken apoptotik hücrelerde Anneksin V pozitif, PI negatiftir. Hücreler çoktan ölmüşse veya geç apoptotik evredeyse hem Anneksin V hem de PI pozitifdir [23]. Sisplatin ve TiO₂, A549 hücreleri üzerinde kontrol grubu hücrelerine kıyasla daha fazla erken ve geç apoptotik etkiler gösterdi (Şekil 2). Sisplatinin kontrol hücrelerine kıyasla erken ve geç apoptotik etkisi 7.2 kat kadar arttı (Şekil 2b). Buna rağmen titanyum dioksitin kontrol hücrelerine kıyasla erken ve geç apoptotik etkisi 3.9 kat artmıştır (Şekil 2c). Her iki bileşiğin geç apoptotik etkisi yaklaşık olarak % 10 olarak belirlendi. Ancak sisplatinin erken apoptotik etkisi hücreler üzerinde % 24.5 olarak gözlemlendi. TiO₂'in ise erken apoptotik etkisi % 8.8 olarak saptandı (Tablo 2). Bu bulgulara göre hem sisplatin hem de TiO₂ erken ve geç apoptotik etkileri arttırdı.

4.3. Kaspaz-3 Aktivitesi

Kaspazlar, apoptotik sinyaller tarafından aktive edildiklerinde hücrel ve nükleer proteinleri tetikleyerek hücreyi parçalamaktadır. Kaspazlar etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır. Apoptotik başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10), apoptotik öldürücü kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) ve sitokin işlevci kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13 ve -14) olarak sınıflandırılmaktadır [24]. Kaspaz-3'ün aktivitesi flow sitometri ile test edildi. Sisplatinin (IC₅₀ konsantrasyon: 3 μM) 72 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi gözlemlendi (Şekil 2). Ancak TiO₂'in (IC₃₀ konsantrasyon: 50 μM) 72 saat süresince uygulandığı A549 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi gözlemlenmedi (Şekil 2c). Sisplatin tedavisinden sonra kaspaz-3 aktivitesi önemli derecede artış gösterdi (Şekil 2b). Sisplatin, kaspaz-3 aktivitesini kontrol hücrelerine kıyasla 19 kat arttırmıştır (Tablo 3). Bu bulgular sisplatinin kaspaz-3 aktivitesini arttırdığını buna rağmen TiO₂'in kaspaz-3 aktivitesine neden olmadığını göstermektedir.

4.4. Mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi\text{m}$)

Mitokondri işlev bozukluğu apoptoz indüklenmesinde önemli bir etken olarak gösterilmektedir. Bazı apoptotik sistemlerde $\Delta\Psi\text{m}$ (membran potansiyeli) kaybı olabilir ya da olmayabilir. Bu $\Delta\Psi\text{m}$ fonksiyonunu belirlemek için [25] fluorokromlar (JC-1, CMX-Ros, DiOC₆(3) ve TMRE) kullanılmaktadır [26]. Mitokondri membran potansiyeli, JC-1 kiti kullanılarak flow sitometri ile belirlendi. Sisplatin (IC₅₀ konsantrasyon: 3 μM) ve TiO₂ (IC₃₀ konsantrasyon: 50 μM) bileşiklerinin 72 saatlik tedavisi A549 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli kaybına neden oldu (Şekil 2). Mitokondriyal membran potansiyeli kaybı, sisplatinin A549 hücrelerinde 72 saatlik uygulanması ile kontrol hücrelerine kıyasla 5.4 kat artarken (Şekil 2b) (Tablo 4), titanyum dioksitin uygulanması ile 2.1 kat arttı (Şekil 2c) (Tablo 4). Bu bulgular sisplatinin ve titanyum dioksitin mitokondriyal membran potansiyeli kaybına bağlı olarak apoptozisi tetiklediğini göstermektedir.



Şekil 2. Flow sitometri analizi kullanılarak A549 hücrelerinde titanyum dioksitin apoptotik etkilerinin belirlenmesi. A) Kontrol. B) Sisplatin IC₅₀ (3µM). C)TiO₂ IC₃₀ (50µM).

Tablo 2. Anneksin-V FITC/PI boyama ile erken ve geç apoptozun sayısal olarak hesaplanması. A549 hücreleri üzerine sisplatin ve TiO₂ uygulanarak, erken ve geç apoptotik hücreler gösterildi.

Q1: Nekroz, Q2: Geç apoptoz, Q3: Canlılık, Q4: Erken apoptoz				
Maddeler	Q1	Q2	Q3	Q4
Kontrol (%)	0.2	4.1	94.8	0.9
Sisplatin (%)	2.6	11.5	61.5	24.5
TiO ₂ (%)	0.5	10.9	79.8	8.8

Tablo 3. Flow sitometri analizi ile kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi. A549 hücreleri üzerine sisplatin ve TiO₂ uygulanarak, kaspaz-3 aktiviteli hücreler belirlendi.

P2: canlı hücreler, P3: kaspaz-3 aktiviteli hücreler		
Maddeler	P2	P3
Kontrol (%)	98.1	2.1
Sisplatin (%)	61.2	40.7
TiO₂ (%)	99.0	1.1

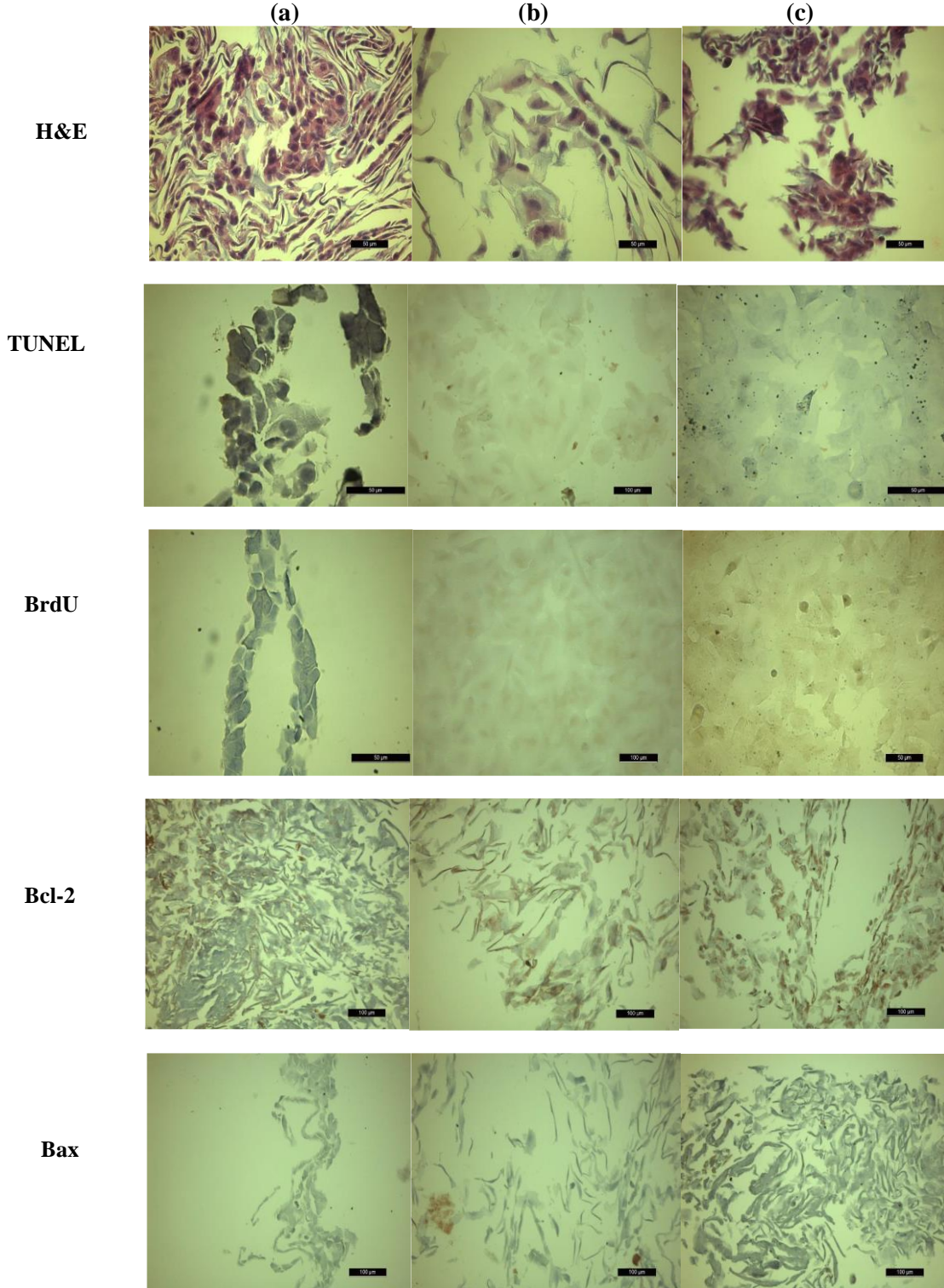
Tablo 4. JC-1 boyama ile mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi. A549 hücreleri üzerine sisplatin ve TiO₂ uygulanarak, depolarize olan mitokondriyal membranlı hücrelerin yüzdesi belirlendi.

P2: polarize mitokondriyal membranlı hücreler, P3: depolarize mitokondriyal membranlı hücreler

Maddeler	P2	P3
Kontrol (%)	95.3	4.1
Sisplatin (%)	76.6	22.3
TiO₂ (%)	90.2	8.9

4.5. İmmünohistokimyasal Analizler

Apoptotik indeksler, hematoksilen ve eozin (H&E), TUNEL parafin gömme, BrdU, Bcl-2 ve Bax boyamaları yapılarak ışık mikroskobu ile incelendi (Şekil 3) (Tablo 5). Hematoksilen, mavi-mor renge sahiptir ve nükleik asitleri boyar. Eozin pembe renktedir ve proteinleri boyamaktadır. Çekirdek mavi renge boyanırken, sitoplazma ve ekstrasellüler matriks pembe renge boyanmaktadır [27]. Apoptoz, terminal deoksiniükleotidil transferaz [TdT]- aracılı deoksiüridin trifosfat [dUTP] kesme ve işaretleme (TUNEL) kullanılarak, DNA zincir kırıkları enzimatik şekilde işaretlenerek belirlenmektedir[28]. BrdU işaretleme, nüklear morfoloji hakkında detaylı bilgi vermektedir. BrdU işaretleme, in vitro çalışmalarda apoptotik hücreleri belirleyebilmektedir. BrdU ile işaretlenen hücrelerde nüklear görüntü genellikle beneklenme şeklinde görülmektedir. Bcl-2 antiapoptotik bir proteindir ve ekspresyon seviyesine göre antipodi ile işaretlenmesi apoptozda etki mekanizmasını göstermektedir. Fazla ekspresyonu apoptozu engellemektedir. Bax, antiapoptotik etkili Bcl-2'yi etkisiz hale getirmektedir ve böylece apoptozu tetikleyebilmektedir [29]. A549 hücrelerinde sisplatin (IC₅₀ konsantrasyon: 3 µM) ve TiO₂ (IC₃₀ konsantrasyon: 50 µM) bileşiklerinin 72 saatlik tedavisi sonucu immünohistokimyasal boyamalar ile belirlenen apoptotik indeksi artış gösterdi (Tablo 5). Hematoksilen ve eozin boyama sonuçlarına göre sisplatin, kontrol hücrelerine kıyasla eşit derecede boyama gösterirken, titanyum dioksit daha fazla boyamaya neden oldu. TUNEL ve BrdU boyama sonuçlarına göre sisplatin uygulanan hücreler kontrol hücrelerine kıyasla çok boyandı. Ancak titanyum dioksit uygulanan hücreler daha az boyanma göstermiştir. Bcl-2 boyama sonuçlarına göre sisplatin uygulanan hücreler kontrol hücrelerine göre az boyanma gösterirken, TiO₂ uygulanan hücreler çok boyanma göstermiştir. Bax boyama sonuçlarına göre ise sisplatin uygulanan hücreler kontrol hücrelerine kıyasla az boyanma gösterirken, TiO₂ uygulanan hücreler hiç boyanmamıştır (Tablo 5). Bu sonuçlara göre, A549 hücrelerinde 72 saat süresince uygulanan sisplatinin IC₅₀ değeri, immünohistokimyasal boyamaların (TUNEL, BrdU, Bcl-2 ve Bax) sonucuna bağlı olarak apoptozu tetikledi (Şekil 3b) (Tablo 5). A549 hücrelerinde 72 saat süresince uygulanan titanyum dioksitin IC₃₀ değeri, hematoksilen/eozin, TUNEL ve BrdU boyamalarının sonucuna bağlı olarak apoptozu tetikledi (Şekil 3c) (Tablo 5).



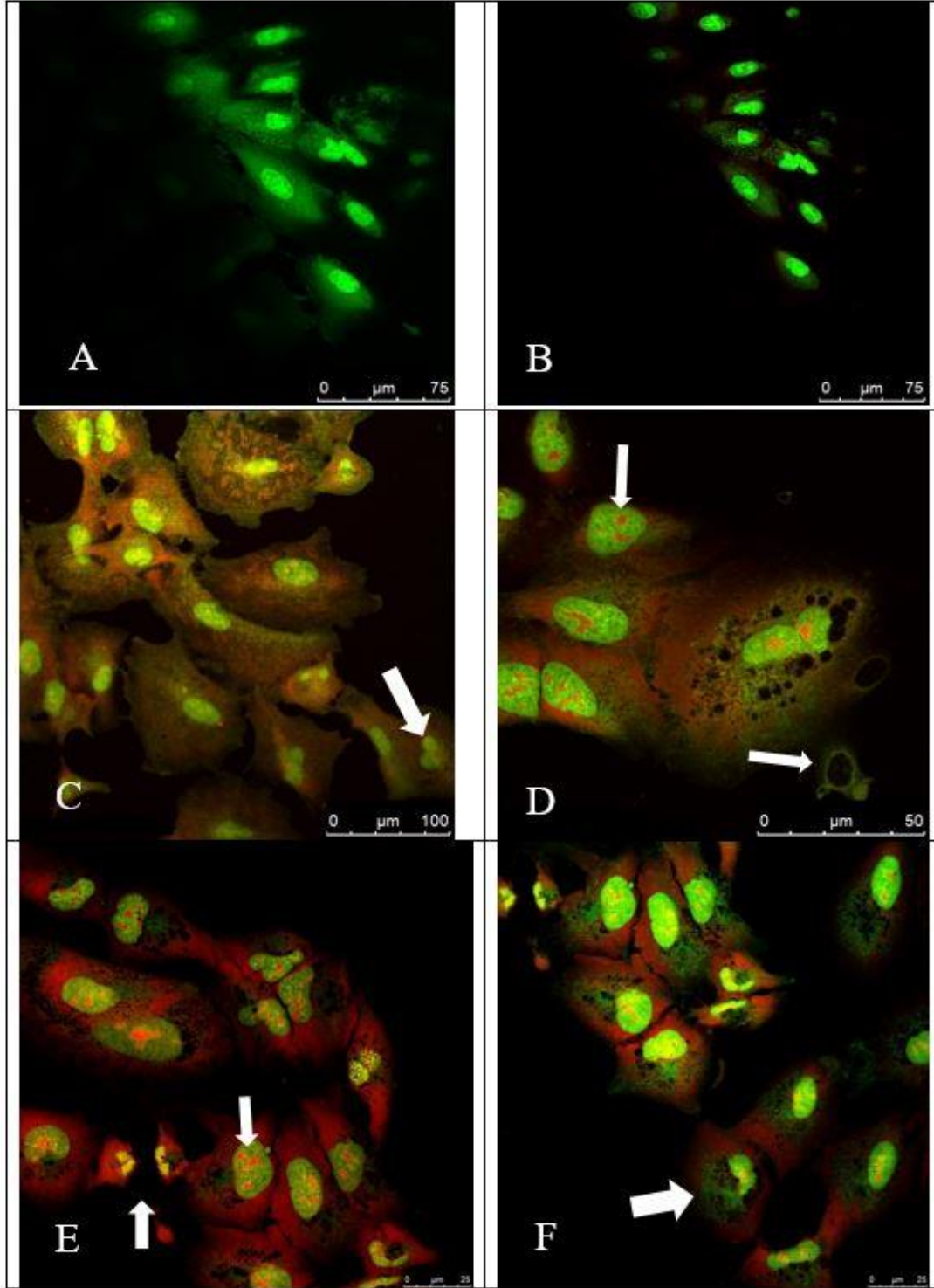
Şekil 3. A549 hücrelerinde sisplatin (IC_{50} konsantrasyon: 3 μ M) (b) ve TiO_2 (IC_{30} konsantrasyon: 50 μ M) (c) tedavisinin 72 saat sonunda kontrol hücrelerine (a) kıyasla ışık mikroskobu ile immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

Tablo 5. İmmünotokimyasal boyama ile apoptotik skorların belirlenmesi 3: çok boyama, 2: orta boyama, 1: daha az boyama, 0: yok

Gruplar	Skorlar		
	Kontrol	Sisplatin	TiO ₂
H&E	2	2	3
TUNEL	0	3	1
BrdU	0	3	2
Bcl-2	3	1	3
Bax	0	1	0

4.6 .Konfokal Mikroskopisi ile İnceleme

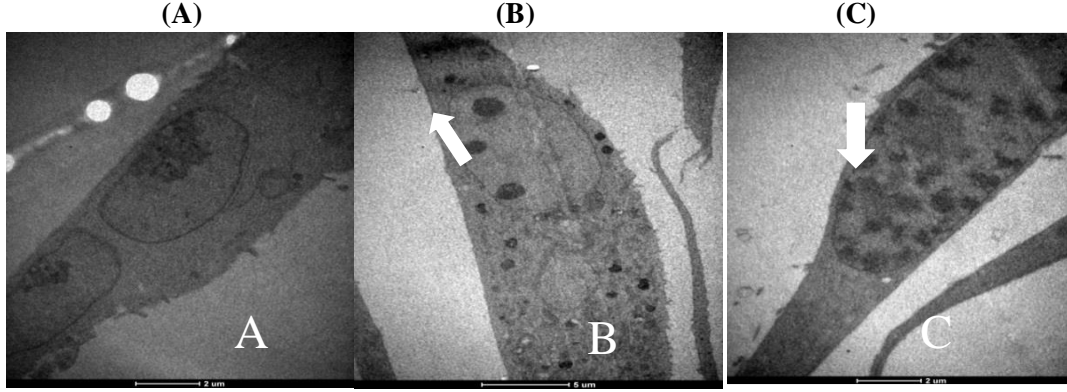
Konfokal mikroskopisi kullanılarak apoptotik morfoloji incelendi. Apoptozun morfolojik görünümü, hücre haciminde azalma, membran bütünlüğünün korunması, pseudopodların geri çekilmesi ile çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve nükleer fragmentasyondur [16]. Sisplatin (IC₅₀ konsantrasyon: 3 µM) ve titanyum dioksit (IC₃₀ konsantrasyon: 50 µM) bileşiklerinin A549 hücrelerindeki 72 saatlik tedavisi konfokal mikroskopu ile görüntülendi ve apoptotik yapılar gözlemlendi (Şekil 4). Sisplatinin, 72 saat süre sonunda A549 hücrelerinde kontrol hücrelerine (Şekil 4A ve B) kıyasla nükleer fragmentasyona ve hayalet hücre denilen apoptotik yapılara neden olduğu gözlemlendi (Şekil 4C ve D). Titanyum dioksitin 72 saat süre sonundaki apoptotik etkisi, nükleer fragmentasyon ve membran bütünlüğünün kaybı olarak gözlemlendi (Şekil 4E ve F).



Şekil 4. A549 hücrelerinin tedavi edilmesi sonucu anneksin FITC (yeşil boya), akridin oranj (kırmızı boya) boyaları kullanılarak konfokal mikroskopi ile görüntülenmesi (40×). A-B) Kontrol. C-D) Sisplatin (IC_{50} konsantrasyon: 3 μ M). E-F) TiO_2 (IC_{30} konsantrasyon: 50 μ M). Oklar apoptotik yapıları göstermektedir. A-B: bozulmamış çekirdek morfolojisi. C: nükleer fragmentasyon. D: kromozom yoğunlaşması ve hayalet hücre. E: nükleer fragmentasyon. F: membran bütünlüğünün kaybı.

4.7. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM) ile İnceleme

Geçirimli elektron mikroskopisi kullanılarak apoptozu gösteren ultrastruktural değişiklikler incelendi (Şekil 5). Sisplatin (IC_{50} konsantrasyon: $3 \mu M$) ve TiO_2 (IC_{30} konsantrasyon: $50 \mu M$) bileşiklerinin A549 hücrelerindeki 72 saatlik tedavisi geçirimli elektron mikroskobu ile görüntüledi ve ultrastruktural değişiklikler gözlemlendi (Şekil 5). Bu değişiklikler kontrol hücrelerinde normal çekirdek yapısı (Şekil 5A) olarak görüntülenirken, tedavi edilen hücrelerde kromozom yoğunlaşması olarak görüntüledi (Şekil 5B ve C).



Şekil 5. A549 hücrelerinin tedavi edilmesi sonucu geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi. A) Kontrol ($\times 8200$). B) Sisplatin (IC_{50} konsantrasyon: $3 \mu M$) ($\times 4200$). C) TiO_2 (IC_{30} konsantrasyon: $50 \mu M$) ($\times 8200$). Oklar apoptotik yapıları göstermektedir. A: Tedavi edilmeyen A549 hücrelerinin ultrastruktural yapısı. B: Apoptotik çekirdek ve kromozom yoğunlaşması. C: Kromozom yoğunlaşması ve parçalara ayrılması.

5. TARTIŞMA

Titanyum, biyomedikal uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [30-31]. Titanyumun, titanosen diklorür ve türevleri çok sayıda tümör hücre tiplerinde araştırılmıştır. Titanyum bileşiklerinin aktivite mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. [32]. Titanyumun en önemli endüstriyel bileşiği titanyum dioksittir [7]. TiO_2 'in UV'den koruyucu etkileri araştırılmıştır [33]. TiO_2 , dezenfektan, antibiyotik, biyolojik sensör, tümör hücre-ölüm ajanı ve gen hedefleme ajanı olarak araştırmalarda kullanılmaktadır [12, 34]. Son yıllarda TiO_2 kanser hücrelerinde uygulanmıştır[35]. Hela hücreleri (insan servikal karsinoması) üzerine titanyum dioksit denenmiştir ve hücre ölümü gözlenmiştir. Aynı zamanda T-24 insan mesane kanser hücreleri üzerinde de çalışılmıştır ve T-24 hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiler göstermiştir [12]. Yamaguchi ve ark. (2010) göre TiO_2 kanser hücrelerini öldürme yeteneğine sahiptir. Buna ek olarak TiO_2 , deney sıçanlarına enjekte edilmiştir ve önemli bir toksisite gözlenmemiştir. Özellikle tümör tedavisinde TiO_2 , tümör hücrelerini öldüren güçlü oksidatif reaksiyonlar gibi özelliklere sahiptir [36-37]. Kubota ve ark.'ları ve Gai ve ark.'ları TiO_2 'in malignant hücre çoğalmasını inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Buna ek olarak in vivo çalışmalarda TiO_2 deneysel hayvanlar üzerinde toksik etki göstermemiştir. Chihara ve ark.'ları titanyum dioksitin antitümör etkilerini rat mesane hücre hatlarında araştırmışlardır ve oksidatif etkilere bağlı olarak apoptotik indeks artışını belirlemişlerdir [38]. Murugan ve ark.'ları titanyum dioksit nanopartiküllerinin antikanser aktivitelerini MCF7 insan meme kanseri hücreleri ve HBL-100 meme kanser hücreleri üzerinde sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Titanyum dioksitin doza bağlı olarak sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik etkilerini gözlemlemişlerdir [39].

Bu çalışmada titanyum dioksitin, A549 adenokarsinoma insan alveolar bazal epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik etkileri araştırıldı. TiO_2 , A549 adenokarsinoma insan alveolar bazal epitel hücreleri üzerinde sitotoksik ve antiproliferatif etkiler gösterdi. Ancak titanyum dioksit

uygulanan A549 hücrelerinde, sisplatin uygulanan hücelere kıyasla daha az antiproliferatif ve sitotoksik etkiler gözlemlendi. TiO_2 1, 5, 10, 25, 50, 100, 125, 250, 500 ve 1000 μM konsantrasyon aralığında denendi ve 72 saat sonundaki IC_{30} değeri belirlendi ve IC_{30} değeri (50 μM) diğer analizlerde uygulandı. TiO_2 'in IC_{30} konsantrasyon değeri (50 μM) A549 hücrelerine uygulandığında Anneksin V-FITC/PI boyaması sonucu erken ve geç apoptotik etkiler saptandı. Erken ve geç apoptotik (Q2+Q4) etkiler toplamda % 19.7 olarak belirlendi. Nekrotik etki (Q1) % 0.5 oranında görüldü. Kontrol hücrelerine kıyasla titanyum dioksit, % 14.7 apoptotik etki ve % 0.3 nekrotik etki göstermiştir. Sisplatinin IC_{50} (3 μM) konsantrasyonu A549 hücrelerine uygulandığında erken ve geç apoptotik (Q2+Q4) etkiler toplamda % 36 olarak saptandı. Anneksin V- FITC/PI boyaması sonuçlarına göre sisplatin A549 hücreleri üzerinde daha fazla apoptotik ve nekrotik etki gösterdi. TiO_2 IC_{30} doz değeri (50 μM) uygulanan A549 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi gözlemlenmedi. Sisplatin uygulanan A549 hücrelerinde % 40.7 kaspaz-3 aktivitesi belirlendi. TiO_2 'in, kaspaz-3 aktivitesini artırıcı etkisi gözlemlenmedi. Ancak sisplatin kaspaz-3 aktivitesini büyük oranda arttırdı. Bu bulgular sisplatinin kaspaz-3 aktivitesini artırarak apoptozu tetiklediğini göstermektedir. Buna rağmen titanyum dioksit kaspazdan bağımsız bir yol izleyerek apoptozu tetiklemiştir diyebiliriz. TiO_2 , mitokondri aktivitesini % 8.9 azaltmıştır. Ancak kontrole kıyasla titanyum dioksit IC_{30} (50 μM) dozu uygulanan hücrelerde mitokondri aktivitesi % 4.8 azalmıştır. Pozitif sisplatin uygulanan hücrelerde mitokondri aktivitesi % 22.3 azalmıştır. Bulgular sisplatinin mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasında titanyum dioksitten daha etkili olduğunu göstermektedir. İmmünohistokimyasal boyamalarda, titanyum dioksit IC_{30} konsantrasyon değerinin (50 μM) 72 saat süre sonundaki etkisi, sisplatinin IC_{50} (3 μM) konsantrasyon değerinin 72 saat süre sonundaki etkisi kadar apoptotik indeksi arttırdı. Konfokal ve TEM mikroskopi analizleri sonucunda sisplatin ve titanyum dioksit uygulanmış hücrelerde çeşitli apoptotik yapılar belirlendi.

Sonuç olarak TiO_2 , A549 adenokarsinomik alveolar epitelial hücreleri üzerinde çeşitli apoptotik etkiler gösterdi ve sisplatine alternatif bir kemoterapötik ajan olma özelliği taşıdığı söylenebilir. Bunun yanı sıra A549 adenokarsinomik alveolar epitelial hücrelerinde TiO_2 'in sisplatinden farklı bir apoptotik yolak kullanarak apoptozu tetiklediği söylenebilir. Bu çalışma metal içerikli bileşiklerin, gelecekteki kanser tedavisindeki araştırmalarına katkı sağlayabilir.

KAYNAKÇA

- [1] Desoize B. Cancer and metals and metal compounds. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 42, 213–215.
- [2] Warra AA. Transition metal complexes and their application in drugs and cosmetics. *J Chem Pharm Res* 2011; 3(4):951-958.
- [3] Rafique S, Idrees M, Nasim A, Akbar H, Athar A. Transition metal complexes as potential therapeutic agents. *Biotechnol. Mol Biol Rev* 2010;5(2), pp. 38-45.
- [4] Florea AM, Büsselberg, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 2011;3, 1351-1371.
- [5] Laine AL, Passirani C. Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery. *Curr Opin Pharmacol* 2012;12:420–426.
- [6] Devanand Venkatasubbu G, Ramasamy S, Ramakrishnan V, Kumar J. Folate targeted PEGylated titanium dioxide nanoparticles as a nanocarrier for targeted paclitaxel drug delivery. *Adv Powder Technol* 2013, xxx, xxx-xxx.
- [7] Lazau C, Mocanu L, Miron I, Sfirloaga P, Tanasie G, Tatu C, Gruia A, Grozescu I. Consideration regarding the use of TiO_2 doped nanoparticles in medicine. *Dig J Nanomater Bios* 2007; 2, 3, p. 257 – 263.

- [8] Subbarayan Periasamy V, Athinarayanan J, Al-Hadi AM, Juhaimi FA, Mahmoud MH, Alshatwi AA. Identification of titanium dioxide nanoparticles in food products: Induce intracellular oxidative stress mediated by TNF and CYP1A genes in human lung fibroblast cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015;39, 176-186.
- [9] Chen T, Yan J, Li Y. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *J Food Drug Anal* 2014; 22, 95-104.
- [10] Fujishima A, Honda K. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature*,1972; 238, 37.
- [11] Lai TY, Lee WC. Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles. *J Photochem Photobiol A Chem* 2009;204, 148–153.
- [12] Kubota Y, Shuin T, Kawasaki C, Hosaka M, Kitamura H, Cai R, Sakai H, Hashimoto K, Fujishima A. Photokilling of T-24 human bladder cancer cells with titanium dioxide. *Br J Cancer* 1994;70, 1107 - 1111.
- [13] Xu J, Sun Y, Huang J, Chen C, Liu G, Jiang Y, Zhao Y, Jiang Z. Photokilling cancer cells using highly cell-specific antibody-TiO₂ bioconjugates and electroporation. *Bioelectrochemistry* 2007;71(2):217-22.
- [14] Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 2008;34, 737– 749.
- [15] Gopinath P, Kumar Gogoi S, Sanpui P, Paul A, Chattopadhyay A, Sankar Ghosh S. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;77, 240–245.
- [16] Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2011;1807,735–745.
- [17] Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:87.
- [18] Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973;51 (5): 1417–23.
- [19] Çiftçi Akalın G, İşcan A, Kutlu HM. Escin reduces cell proliferation and induces apoptosis on glioma and lung adenocarcinoma cell lines. *Cytotechnology* 2015;67:893–904.
- [20] Kaplan A, Çiftçi Akalın G, Kutlu HM. Melatonin induces antiproliferative activity through modulation of apoptotic pathway in H-ras oncogene transformed 5RP7 cells. *Turk J Biol* 2015;39: 879-887.
- [21] Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005;11. 127-152.
- [22] Chiba K, Kawakami K, Tohyama K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol In Vitro* 1998;12, 251-258.

- [23] Hingorani R, Deng J, Elia J, McIntyre C, Mittar D. Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerserTM System, BD Biosciences.2011.
- [24] Jiang C, Wang Z, Ganther H, Lu J. Caspases as key executors of methyl selenium-induced apoptosis (anoikis) of DU-145 prostate cancer cells. *Cancer Res* 2001;61, 3062–3070.
- [25] Ly JD, Grubb DR and Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 2003;8, 115–128.
- [26] Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defossez A, Formstecher P, Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod* 2004;19, 10 pp. 2267–2276.
- [27] Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Basic Methods in Microscopy*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2006.
- [28] Plastina P, Bonofiglio D, Vizza D, Fazio A, Rovito D, Giordano C, Barone I, Catalano S, Gabriele B. Identification of bioactive constituents of Ziziphus jujube fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells. *J Ethnopharmacol* 2012;140, 325– 332.
- [29] Santini D, Tonini G, Vecchio FM, Borzomati D, Vincenzi B, Valeri S, Antinori A, Castri F, Coppola R, Magistrelli P, Nuzzo G, Picciocchi A. Prognostic value of Bax, Bcl-2, p53, and TUNEL staining in patients with radically resected ampullary carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58:159–165.
- [30] Lagopati N, Kitsiou PV, Kontos AI, Venieratos P, Kotsopoulou E, Kontos AG, Dionysiou DD, Pispas S, Tsilibary EC, Falaras P. Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution. *J Photochem Photobiol A Chem* 2010; 214, 215–223.
- [31] Stefanou E, Evangelou A, Falaras P. Effects of UV-irradiated titania nanoparticles on cell proliferation, cancer metastasis and promotion. *Catal Today* 2010;151(1–2):58–63.
- [32] Shavit M, Peri D, Melman A, Tshuva EY. Antitumor reactivity of non-metallocene titanium complexes of oxygen-based ligands: is ligand lability essential. *J Biol Inorg Chem* 2007;12:825–830.
- [33] Cengiz E, Wissing SA, Müller RH, Yazan Y. Sunblocking efficiency of various TiO₂- loaded solid lipid nanoparticle formulations. *Int J Cosmet Sci* 2006;28, 371-378.
- [34] Thurn KT, Arora H, Paunesku T, Wu A, Brown EMB, Doty C, Kremer J, Woloschak G. Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomed Nanotechnol Bio Med* 2011;7, 123–130.
- [35] Harada Y, Ogawa K, Irie Y, Endo H, Ferik LB, Uemura T, Tachibana K. Ultrasound activation of TiO₂ in melanoma tumors. *J Control Release* 2011;149, 190–195.
- [36] Yamaguchi S, Kobayashi H, Narita T, Kanehira K, Sonezaki S, Kubota Y, Terasaka S, Iwasaki Y. Novel photodynamic therapy using water-dispersed TiO₂-polyethylene glycol compound: evaluation of antitumor effect on glioma cells and spheroids in vitro. *J Photochem Photobiol* 2010;86: 964-971.
- [37] Islam Md. S, Kusumoto Y, Abdulla- Al-Mamun Md, Horie Y. Photocatalytic and AC magnetic-field induced enhanced cytotoxicity of Fe₃O₄-TiO₂ core-shell nanocomposites against HeLa cells. *Catal Commun* 2011;16, 39–44.

[38] Chihara Y, Fujimoto K, Kondo H, Moriwaka Y, Sasahira T, Hirao Y, Kuniyasu H. Anti-Tumor effects of liposome-encapsulated titanium dioxide in nude mice. *Pathobiology* 2007;74:353-358.

[39] Murugan K, Dinesh D, Kavithaa K, Paulpandi M, Ponraj T, Alsalhi MS, Devanesan S, Subramaniam J, Rajaganesh R, Wei H, Kumar S, Nicoletti M, Benelli G. Hydrothermal synthesis of titanium dioxide nanoparticles: mosquitocidal potential and anticancer activity on human breast cancer cells (MCF-7). *Parasitol Res* 2016;3, 1085-1096.