

Güncel *In Vitro* Sitotoksisite Testleri

Current *In Vitro* Cytotoxicity Tests

Pınar Erkekoğlu^{1*},
Terken Baydar¹

¹Hacettepe University, Faculty
of Pharmacy, Department of
Pharmaceutical Toxicology, 06100,
Ankara, Turkey

Corresponding author:

Pınar Erkekoğlu
Hacettepe University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Toxicology,
06100, Ankara, Turkey
E-mail: erkekp@yahoo.com
Tel: +90 312 305 21 78
Fax: + 90 312 311 47 77

Received date : 30.04.2020
Accepted date : 15.06.2020

ÖZET

Bir ilaç etkin maddesinin, kozmetik ürünün, çevresel bir kimyasalın (pestisitler, endokrin bozucular, ağır metaller, nanopartiküller gibi) ve fiziksel veya biyolojik ajanların *in vitro* olarak sitotoksik etkilerinin güncel yöntemlerle belirlenmesi son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Sitotoksisitenin veya hücre canlılığının belirlenmesi için birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler (i) boyama yöntemleri; (ii) kolorimetrik yöntemler; (iii) florometrik yöntemler; (iv) luminometrik yöntemler; (v) apoptozun belirlenmesi için kullanılan farklı teknikler ve (vi) oto-fajinin belirlenmesi için kullanılan farklı teknikler olarak sınıflandırılabilir. Bu yöntemlerin hangisinin en uygun yöntem olduğu araştırmacı tarafından tüm bilimsel veriler kullanılarak değerlendirilmelidir. Bu değerlendirme yapılırken test maddesinin fiziksel ve kimyasal özellikleri, maddenin hangi mekanizma ile hücre ölümüne yol açtığı, yöntemin özgünlüğü ve hassasiyeti dikkate alınmalıdır. Bu şekilde elde edilen sonucun güvenilirliği ve doğruluğu konusunda emin olunmalıdır. Bu derlemede, günümüzde *in vitro* olarak sitotoksisitenin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan güncel yöntemler ayrıntılı olarak ele alınmış ve bu yöntemlerin üstünlük ve dezavantajları değerlendirilmiştir.

Keywords: Sitotoksisite, hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, boyama yöntemi, kolorimetrik yöntem, florometrik yöntem, luminometrik yöntem

ABSTRACT

Determination of the *in vitro* cytotoxic effects of an active drug substance, cosmetic product, environmental chemical (pesticides, endocrine disruptors, heavy metals, nanoparticles, etc.), and physical and biological agents has gained importance and popularity in the recent years. There are many methods in order to determine cytotoxicity or cell viability. These methods can be classified as follows: (i) dye exclusion methods; (ii) colorimetric methods; (iii) fluorometric methods; (iv) luminometric methods; (v) determination of apoptosis by several techniques and (vi) determination of autophagy by different techniques. The researcher should evaluate all available methods using scientific data and select the most appropriate method. While making this evaluation, the physical and chemical properties of the test substance, the cell death mechanism by which the substance causes cytotoxicity and the specificity and sensitivity of the method

should be considered. By this way, the reliability and accuracy of the result must be assured. In this review, the most frequently used methods for the determination of *in vitro* cytotoxicity have been explained and the advantages and disadvantages of these methods have been discussed.

Anahtar Kelimeler: Cytotoxicity, cell viability, cell proliferation, colorimetric method, dye exclusion method, flourometric method, luminometric method

1. Giriş

İlaç etkin maddeleri, kozmetikler, kişisel bakım ürünleri, çevresel kimyasal maddeler, ağır metaller, fiziksel veya biyolojik ajanlar birçok farklı mekanizma ile sitotoksositeye yol açabilir (1-4):

- i. Hücreler çevrelerindeki diğer hücelere daha az hasar vererek **apoptoz** olarak ifade edilen programlanmış hücre ölümüne gidebilirler. Apoptozu tetiklediği bilinen en önemli mekanizmalardan biri oksidatif stres ve günümüzde hücre ölümü ve oksidatif stres üzerine on binlerce bilimsel yayın bulunmaktadır. Oksidatif stres lipid, protein ve DNA gibi makromoleküllerde hasara, DNA’da yapısal hasar oluşturarak genotoksik etkiye veya mitokondri hasarına yol açabilir. Ayrıca, immünolojik mekanizmaların tetiklenmesi ve immün sistemden bir takım sitokin ve mediyatörlerin salımı sonucu da hücreler apoptoza veya nekroza gidebilir.
- ii. Etmene bağlı olarak hücreler çevrelerindeki hücreleri de etkileyip onların da ölmesine yol açarak **nekroza** gidebilirler.
- iii. **Otofaji** (otofagositoz), hücrenin yaşlanmış ve bozulmuş yapılarının, hücrenin kendi lizozomu tarafından sindirilmesidir.
- iv. Apoptoz ve otofajinin dışında tanımlanmış farklı programlanmış **diğer programlanmış hücre ölüm** mekanizmaları (aponekrozis, nekroptozis, eriptozis, NET osis, paraptozis, piroptozis) da mevcuttur; ancak, hiçbirinin özellikleri henüz apoptoz ve otofaji kadar ayrıntılı bir şekilde belirlenmemiştir.

2. Sitotoksitenin Belirlenmesinde

Sıklıkla Kullanılan Yöntemler

Sitotoksitenin/hücre canlılığının belirlenmesi için kullanılan ve güncelliğini koruyan yöntemleri şu şekilde sınıflamak mümkündür (5-8):

Boyama yöntemleri: Bu yöntemler Tripan mavisi, Eozin, Kongo kırmızısı ve eritrosin B kullanılarak

gerçekleştirilebilir.

Kolorimetrik yöntemler: Bu yöntemler arasında en sık kullanılan testler, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre ölümü/proliferasyonu testleridir. Nötral kırmızısı alımı (NRU) testi, kristal viyole testi, 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testi, MTS testi, XTT testi, suda çözünen formazan 1 (WST-1) testi, suda çözünen formazan 8 (WST-8) ve sulforhodamin B (SRB) testi, testleri farklı boyalar kullanılarak spektrofotometrik okumalarla gerçekleştirilir. Diğer taraftan, farklı bir mekanizmanın kullanıldığı laktat dehidrogenaz (LDH) testi de spektrofotometrik olarak gerçekleştirilir.

Florometrik yöntemler: alamarBlue testi ve CFDA-AM testleri en sık kullanılan florometrik yöntemlerdir.

Luminometrik yöntemler: ATP testi ve gerçek zamanlı canlılık belirleme yöntemleri en sık kullanılan luminometrik yöntemlerdir.

Apoptozun belirlenmesi: Apoptozun belirlenmesi için kaspazların (3, 8 ve 9) düzey ve aktiviteleri ölçülebilir. Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP uç işaretleme (TUNEL) yöntemi kullanılabilir. Akış sitometrisi ile apoptotik ve nekrotik hücreler ve oranları belirlenebilir. Ayrıca, apoptozda rol alan proteinlerin [Bax, Bcl-2, p53, p21, pro-poli (ADP-riboz) polimeraz (pro-PARP) ve PARP parçalanması] ekspresyonları belirlenebilir.

Otofajinin belirlenmesi için kullanılan teknikler: Otofajide rol alan proteinlerin (Beclin 1, p62, LC-3 gibi) düzeylerinin/ekspresyonlarının belirlenmesinden sıklıkla yararlanılır.

(i) Boyama Yöntemleri

Boyama ile genelde canlı hücrelerin yüzdesini belirlemek mümkündür. Boyama yöntemleri ya da “boyayı dışarıda bırakma yöntemleri” olarak adlandırılan bu yöntemler Triphan mavisi, Eozin, Kongo kırmızısı ve Eritrosin B kullanılarak gerçekleştirilir (6, 9, 10). Bu yöntemler canlı hücrelerin hücre kültürü ortamına eklenen boyaları dışarıda bırakması, ölü hücrelerin

ise bu boyaları dışarıda bırakamayarak hücre içine alması üzerine kurulmuştur. Bu boyalar arasında en sıklıkla kullanılanı, Tripan mavisi'dir (9, 10).

Boyama yöntemlerinin üstünlükleri şunlardır (6, 9, 10):

- Yöntem çok basittir, uygulaması kolaydır.
- Süspande hücrelere doğrudan uygulanabilir.
- Kemosensitivitenin belirlenmesi için en hızlı sonuç veren yöntemlerdir.

Boyama yöntemlerinin dezavantajları şunlardır (6, 9, 10):

- Çok fazla sayıda hücreye uygulamak zordur ve zaman alır.
- Adheren hücrelere doğrudan uygulamak için uygun yöntemler değildir; adheren hücrelerin önce tripsinize edilip, süspansiyon haline getirilmeleri gerekir ve bu işlem zaman alır.
- Bazı kimyasal maddelerin veya fiziksel ve biyolojik ajanların hücre zarını parçalaması ve hücre zarının bütünlüğünü bozması uzun zaman alabilir; bu sürede hasarlı hücreler yaşamaya devam edebilir ve sitotoksik etki kesin olarak belirlenemez.
- Çok hızlı apoptoza yol açan ajanlar için uygun yöntemler değildir; bu nedenle bazı ajanlar çok hızlı apoptoza götürebilir ve hücre kısa bir sürede disintegre olabilir.

Tripan mavisi

Bu boya ilk olarak Alman bilim insanı Paul Ehrlich tarafından 1904'te sentezlenmiştir. "Niagara mavisi", "azidin mavisi" veya "diamin mavisi" olarak da adlandırılır. Tripan mavisi bir azo boyasıdır; pamuklu tekstilleri boyamak için de kullanılır. Biyolojik bilimlerde hücre canlılığının/sitotoksitenin belirlenmesi için en

sık kullanılan boyalardandır (9, 10). Kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.

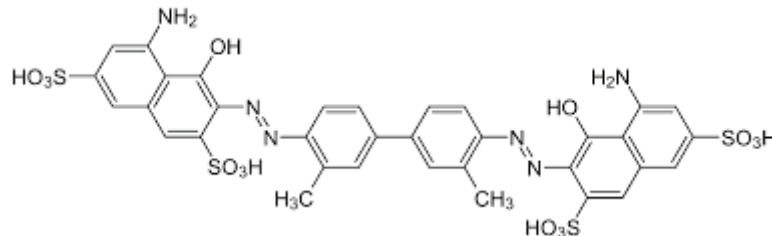
Tripan mavisi canlı hücrelerin zarlarından geçemez; çünkü canlı hücrelerin zarları bütündür ve yapısı bozulmamıştır. Ancak, ölü hücrelerin zarlarından geçebilir ve hücreyi boyayabilir. Tripan mavisiyle ölü hücreleri boyayabilmek için adheren hücrelerin önce tripsinize edilerek süspande hale getirilmesi gerekir. Süspande hücrelere doğrudan uygulanabilir. Ancak, her iki durumda da hücrelerin önceden uygun bir şekilde pipetlenerek, süspansiyonun içinde eşit halde dağılmalarını sağlamak gerekir. Takiben, hücre kültüründen alınan bir uygun bir miktar (5-10 µl) eşit miktarda tripan mavisiyle karıştırılır. Hücreler daha sonra uygun miktarlarda hemositometreye konur ve sayılır. Bu esnada boyayı içine alan hücreler ölü, almayan hücreler ise canlı kabul edilir. Böylece ölü hücrelerin süspansiyondaki toplam yüzdesi belirlenebilir (10-12).

Tripan mavisi ile boyama yönteminin üstünlükleri şunlardır (10-12):

- Basit ve ucuz bir yöntemdir.
- Hücre zarı bütünlüğü bozulmuş hücreler mikroskop altında hızlıca sayılabilir.

Tripan mavisi ile boyama yönteminin dezavantajları şunlardır (10-12):

- Duyarlılığı düşüktür.
- Uzun sürede toksisite oluşturan ajanlar için uygun değildir.
- Çok sayıda hücreyi saymak için uygun bir yöntem değildir.
- Süspande hücrelere uygulanabilir; adheren hücreleri önceden süspande hale getirmek gereklidir ve pipetleme doğru yapılmazsa, sayım doğru olarak gerçekleştirilemez.
- Sayım için hemositometre gereklidir; hemo-



Şekil 1. Tripan mavisinin kimyasal yapısı

sitometriyi kullanmak deneyim gerektirir. Bi-reyler arasında %10-20 arası sayım farklılıkları oluşabilir.

- Hemositometriyi doldururken, hava kabarcıkları kalırsa sayım doğru olarak gerçekleşemez.

Eozin

Eozin, bazik veya eozinofilik maddelere (örneğin proteinlerdeki arjinin ve lizin amino asit kalıntıları gibi) bağlanan tuz oluşturan floresan özellikli asidik bileşiklere verilen genel bir isimdir. Hücrelerdeki proteinleri boyamalarının yanı sıra, eozinler kollajeni ve kas liflerini de boyayabilirler. Eozin ile hızlı boyanan bileşikler "eozinofik" olarak adlandırılır. Histolojide Eozin Y "histolojik boya" olarak kullanılmaktadır (13, 14). Eozin B ise, Eozin Y yerine kullanılabilir ve kullanımları araştırmacının seçimine ve alışkanlıklarına göre değişebilir. Eozinler ayrıca kırmızı mürekkep üretiminde de kullanılmaktadır (15-17). Kimyasal yapıları Şekil 2'de gösterilmiştir. Eozinler, hematoksilin ile birlikte kullanılır ve ikisi birlikte "H&E boyası" olarak adlandırılır.

Eozin ile boyama yönteminin avantajları şunlardır (17, 18):

- Basit ve ucuz bir yöntemdir.
- Hücre zarı bütünlüğü bozulmuş hücreler

mikroskop altında hızlıca sayılabilir.

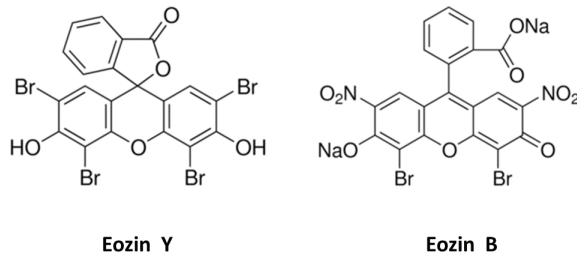
Eozin ile boyama yönteminin dezavantajları şunlardır (17, 18):

- Duyarlılığı düşüktür.
- Kullanan laboratuvar sayısı azdır.
- Özgün olmadığı için tercih edilmez.
- Doku boyamak için daha sıklıkla tercih edilir.

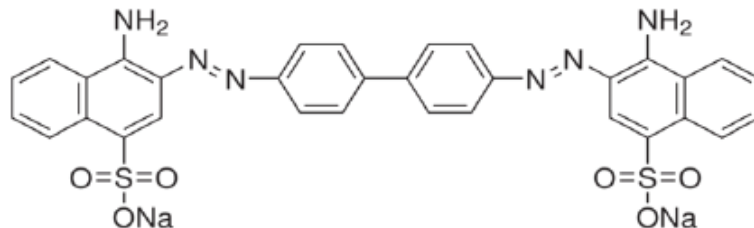
Kongo Kırmızısı

İlk olarak 1883'te Paul Böttiger tarafından sentezlenmiştir. Kongo kırmızısı organik yapıda bir bileşik olup 3,3'-([1,1'-bifenil]-4,4'-diyil) bis(4-aminonaftalen-1-sulfonik asit)'in sodyum tuzudur; bir azo boyasıdır. Suda ve organik çözücülerde çözünür. Suda kırmızı kolloidal bir çözelti oluşturur. Tekstil boyamak için de kullanılmıştır (19). Ancak, karsinojenik özelliğinden dolayı uzun zamandır tekstil boyamada kullanımı yasaktır. Diğer taraftan vasküler bozukluklara ve davranışsal sorunlara da yol açtığı bildirilmiştir (20-23). Kimyasal yapısı Şekil 3'de gösterilmiştir.

Kongo kırmızısı genel olarak doku boyamak için daha uygun bir bileşiktir. Amilodoziste boyamak amacıyla tercih edilir. Biyokimyasal ve histolojik analizlerde de tercih edilir. Özellikle sitoplazmayı ve alyuvarları boyar. Aynı zamanda bitki ve mantarların



Şekil 2. Eozin Y ve Eozin B'nin kimyasal yapıları



hücre duvarlarını ve Gram (-) bakterilerin dış zarlarını boyamak için kullanımı bulunmaktadır. Kongo kırmızısı, *Shigella flexneri* serotip 2a'nın lipopolisakkarit yapısına bağlandığı için bu bakterinin boyanmasında en sık tercih edilen boyadır. Özellikle akış sitometrisi deneylerinde *Acanthamoeba*, *Naegleria* ve diğer amoebal kistlerin belirlenmesinde boya olata kullanılır (19).

Kongo kırmızısı ile boyama yönteminin üstünlükleri şunlardır (20-23):

- Bitki ve mantar hücre kültürlerinde iyi bir boyama sağlar.

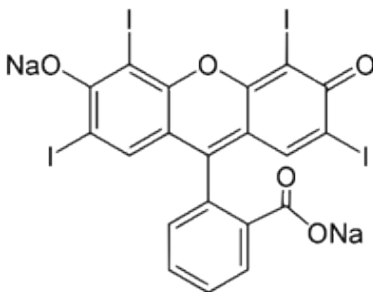
Kongo kırmızısı ile boyama yönteminin dezavantajları şunlardır (20-23):

- Duyarlılığı düşüktür.
- Karsinojenik olduğu bilinmektedir.
- Doku boyamak için daha uygundur.

Eritrosin B

2,4,5,7-tetraiyodofluoreskeinin disodyum tuzudur, ksanten yapısındadır ve "Eritrosin" veya "Red No. 3" olarak bilinen bir boyadır (24). Florenden türevlendirilen, organoiodin yapısında bir bileşiktir. Gıda boyamada da kullanılır. Saç boyalarının, kişisel bakım ürünlerinin ve pestisitlerin içinde de bulunmaktadır. Ancak, yüksek miktarlarda alındığında çocuklarda hiperkinezisi tetikleyebileceği bildirilmiştir. Ayrıca, deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda trioit tümörlerine yol açabileceği belirlenmiştir (25, 26). Kimyasal yapısı Şekil 4'de gösterilmiştir.

Eritrosin B ile boyama çok sıklıkla kullanılan bir yöntem değildir; eritrosin B ile boyamanın prensibi Tripan mavisiyle aynıdır. Canlı hücreler bu boyayı bütünlüğü bozulmamış hücre zarlarından içeri alamazken, boya bütünlüğü bozulmuş hücre zarlarından içeri girebilir. Sulu çözeltileri 530 nm'de maksimum



Şekil 4. Eritrosin B'nin kimyasal yapısı

absorbans verir. Ancak, fotodegradasyonu hızlı bir şekilde gerçekleşir (27- 29).

Eritrosin B ile boyama yönteminin üstünlükleri şunlardır (27- 29):

- Maliyeti düşüktür.
- Esnek bir yöntemdir.
- Biyogüvenliliği yüksektir.

Eritrosin B ile boyama yönteminin dezavantajları şunlardır (27- 29):

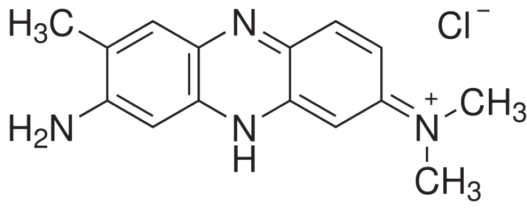
- Uzun zamanda gerçekleştirilebilir.
- Sayım için hemositometre gereklidir; hemositometreyi kullanmak deneyim gerektirmektedir. Bireyler arasında %10-20 arası sayım farklılıkları oluşabilir.
- Hemositometriyi doldururken, hava kabarcıkları kalırsa sayım doğru olarak gerçekleşemez.

(ii) Kolorimetrik Yöntemler

Nötral kırmızısı alımı (NRU) testi

Nötral kırmızısı (3-amino-7-dimetil-amino-2-metilfenazin hidroklorür) zayıf katyonik bir boyadır; örhodin yapısındadır ve "bazal kırmızısı" veya "toluen kırmızısı" olarak da bilinir. Nötral kırmızısının biyolojik pH'daki net yükü sıfırdır. Bu durum boyanın hücre zarını geçmesine olanak sağlar. Boya, hücre zarından sitozole non-iyonik difüzyonla geçebilir. Sonrasında lizozomlarda birikir. Lizozomların içinde sitozolden daha düşük bir pH oluşturmak için proton gradyanı bulunmaktadır. Lizozoma giren boya yükü hale gelir ve lizozomun içinde kalır. Hücre ölürse bu pH gradyanı düşeceği için boya lizozomların içinde tutulamaz. Ölü hücrelerin içinden dışarı çıkar ve böylece sitotoksitenin belirlenmesi için kullanılabilir. Bu nedenle "lizozomal bir boya" olarak bilinir. Nötral kırmızısının uygulanmasını takiben boyanın canlı hücrelerden ekstraksiyonu asitlendirilmiş etanol ile gerçekleştirilir (30-34). Nötral kırmızısının kimyasal yapısı Şekil 5'da gösterilmiştir.

Nötral kırmızısı alımı (NRU) testi ilk olarak 1984'te Ellen Borenfreund tarafından geliştirilmiştir ve spektroskopik olarak gerçekleştirilebilir. Testin prensibi, canlı hücrelerin nötral kırmızısını içlerine alabilme; ölü hücrelerin ise boyayı lizozomalarında biriktirmeme özelliğine dayanır. Dolayısıyla, NRU'nun düşük olması sitotoksisiyle paraleldir. Bu test, "In Vitro 3T3 NRU



Şekil 5. Nötral kırmızısı'nın kimyasal yapısı

Fototoksiste Testi" olarak bilinir ve OECD'nin test kılavuzu (TG) 432 olarak yayınlanmıştır (35). NRU testi kozmetiklerin fototoksik özelliklerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Fototoksiste, cildin UV ışığına ve fotoreaktif kimyasal maddelere aynı anda maruz kalması sonucu oluşan bir yanıttır. NRU *in vitro* fototoksiste testi, OECD Test Kılavuzu 432'ye göre gerçekleştirilir. 3T3 fare fibroblast hücrelerine kozmetikler belirli seyreltme ile veya doğrudan bir gece boyunca uygulanır. Takiben, hücreler 60 dakika 5 J/cm² ultraviyole A (UVA)'ya maruz bırakıldıkları solar simülatörde bekletilir. Bu test, ışığın varlığında (UV+) ve yokluğunda (UV-) kozmetik ürüne veya herhangi bir kimyasala maruz kalmış canlı hücrelerin nötral kırmızısını hücre membranlarından penetrasyon yolu ile intraselüler ortama alarak lizozomlarında biriktirmesi sonucu ortaya çıkan renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile gerçekleştirilir (35).

Nötral kırmızısı ile boyama yönteminin üstünlükleri şunlardır: (30,31):

- Lizozomal hasarın gösterilmesi için en uygun yöntemdir.
- Hızlı ve basit bir yöntemdir; 3 saatten kısa sürer.
- Hem primer hücrelerin, hem de hücre hatlarının boyanmasında iyi sonuç verir.
- Duyarlılığı yüksektir.
- Ucuz bir yöntemdir.
- Fototoksistenin belirlenmesinde de kullanılabilir.
- Ortamın sıcaklığından veya ortamda tuz olduğundan etkilenmez.

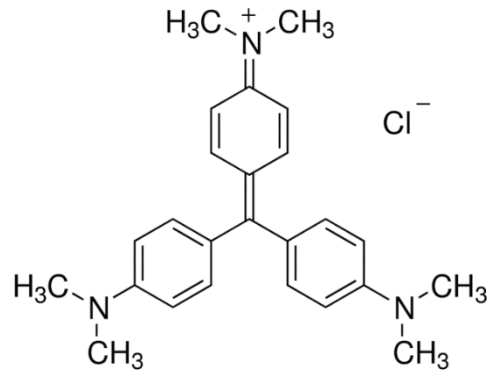
Nötral kırmızısı ile boyama yönteminin dezavantajları şunlardır (30,31):

- Bazı kimyasallar nötral kırmızısının hücre içinde kristaller oluşturmasına yol açabilir; bu da yöntemin doğru sonucu vermesini engelleyebilir.

Kristal viyole testi

Kristal viyole "gentian viyole", "metil viyole 10B" ve "hekzametil pararosanilin" klorür olarak da bilinir. Triaril metan yapısındadır. Topikal antiseptik olarak da kullanımı mevcuttur. Suda çözünür ve mavi-mor bir çözelti oluşturur. Doku boyaması için de kullanılır (36, 37).

Bu yöntemde kristal viyolenin canlı, adheren hücrelerin protein ve DNA'larına bağlanmasından yararlanır. Ölen hücrelerin adheren özelliklerini yitirmesinden dolayı kristal viyole bu hücrelerdeki protein ve DNA'ya bağlanamaz. Bu da renk şiddetindeki azalma ile sonuçlanır (37-39). Kristal viyole'nin kimyasal yapısı Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Kristal viyole'nin kimyasal yapısı

Kristal viyole ile boyama yönteminin üstünlükleri şunlardır (37-39):

- Hızlı ve esnek bir yöntemdir.
- Güvenilir sonuçlar verir.
- Özellikle kemoterapötiklerin hücre canlılığında oluşturduğu değişikliklerin belirlenmesi için kullanılır.
- Apoptoz inhibitörleri (örneğin kaspaz inhibitörleri) ve nekroz inhibitörleri deney ortamına eklenebilir. Böylece hücrenin hangi yol ile öldüğünün belirlenmesine olanak sağlar.
- Moleküler çalışmaların yapılması için uygundur.

Kristal viyole ile boyama yönteminin dezavantajları şunlardır (37-39):

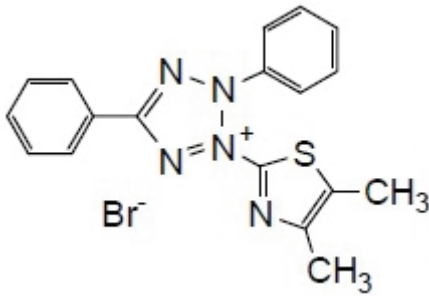
- Hücresel metabolik aktivite değişikliklerine hassas değildir. Hücrenin proliferasyon hızındaki düşüşü belirleyemez; bu nedenle, proliferasyon hızındaki değişikliklerin belirlenmesinde tercih edilmez.

- Uygun çözücüde çözülmezse veya boyanan hücreler yeteri kadar yıkanmazsa mikroskop altında çözünmemiş kristal viyole kristallerini görmek mümkündür; bu da deneyin sonuçlarını etkileyebilir.

MTT Testi

Günümüzde en yaygın kullanılan hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksosite belirleme yöntemlerinin başında MTT testi gelmektedir. Mosmann tarafından 1983'te geliştirilen yöntem, hücre canlılığı testlerinin "altın standardı" olarak adlandırılmaktadır. (40). MTT testi *in vitro* olarak sadece hücre değil doku kültürlerinde de kullanıma olanak verir ve deri irritasyon, deri korozyon ile göz irritasyon testlerinde de hücre canlılığının ölçümü için kullanılmaktadır (41-43).

MTT sarı renkli bir formazan tuzdur ve kimyasal yapısı Şekil 7'de gösterilmiştir. Proliferasiyona uğrayan hücreler artan mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesi ile MTT'yi mor renkli suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürür. Oluşan bu kristaller dimetil sülfoksit (DMSO)'da veya izopropil alkolde çözünür. Daha sonra hücre canlılığı spektrofotometrik olarak belirlenir ve uygulama yapılmayan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, uygulama yapılan hücrelerin canlılığı bu hücrelere göre yüzde (%) olarak belirlenir. MTT testinin yapılışı Şekil 8'da özetlenmiştir (40, 41).



Şekil 7. MTT'nin kimyasal yapısı

MTT yönteminin üstünlükleri şunlardır (40, 41):

- Güvenilir ve hızlı bir yöntemdir.
- Tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir.
- Hem sitotoksitenin hem de hücre proliferasyonunun belirlenmesi için kullanılabilir.

MTT yönteminin dezavantajları şunlardır (44, 45):

- MTT formazanlar suda çözülmez ve hücrelerde iğne şeklinde kristaller oluşturur; bu

nedenle, ölçümden hemen önce bu kristalleri çözmek gereklidir. İyi çözülme gerçekleşmezse kuyucuklar arasında ciddi absorbans farklılıkları görülebilir.

- MTT formazan kendisi de sitotoksiktir. MTT formazanlar nedeniyle gözlenen hücre ölümlü için mutlaka kontrol kullanmak gereklidir; böylece yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar önlenmiş olur.
- Hücreler MTT ile 2-4 saat kadar inkübe edilirler; bekletildikleri süre içinde MTT'nin hücre canlılığını ne kadar etkileyebileceği bilinmemektedir.
- Özellikle ölen hücrelerin hücre kültüründen uzaklaştırılması MTT formazan kristalleri nedeniyle zorlaşabilir.
- MTT testinde kullanılan kozmetik ürünün herhangi bir bileşeni ve uygulanan kimyasal madde MTT ile reaksiyona giriyorsa veya MTT'yi kendi indirgeyebiliyorsa, hücre canlılığının tespiti için farklı bir yöntem seçilmesi gereklidir.

MTS testi

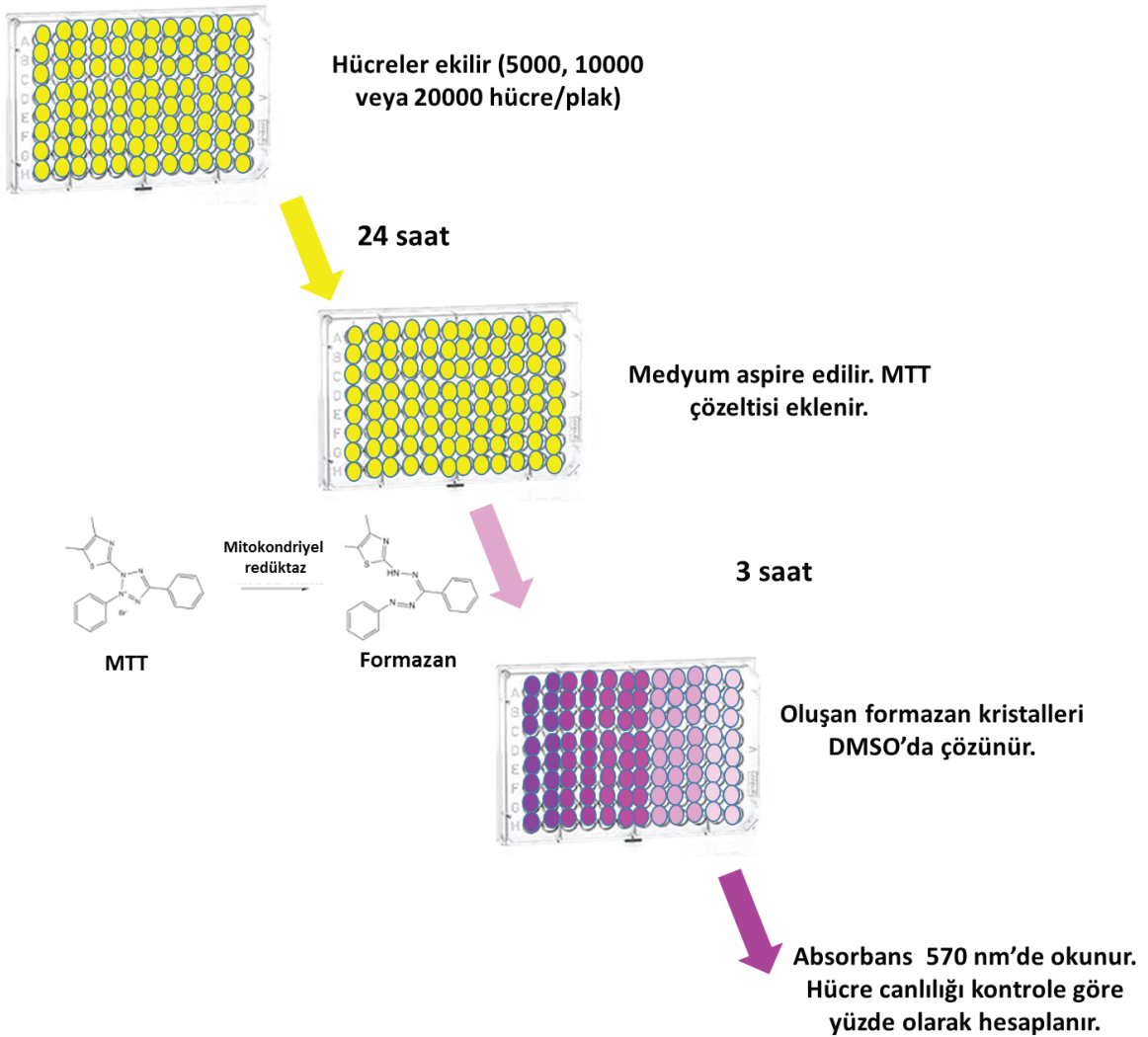
5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiyazolil)-3-(4-sülfofenil) tetrazolyum yapısında bir tetrazolyum tuzu (MTS) ile yapılan test, "iç tuz metodu" olarak da adlandırılır. MTS testinin esası MTT testi ile aynıdır; proliferasyona uğrayan hücreler artan mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesi ile MTS'yi koyu pembe-kırmızı formazan kristallerine dönüştürür ve oluşan formazanın verdiği absorbans 492 nm'de ölçülür (46-47).

MTS yönteminin üstünlükleri şunlardır (47, 48):

- Kolay uygulanabilir.
- Ucuzdur.
- Doğru, hızlı ve kesin sonuçlar verir.
- Performansı MTT veya XTT kadar iyidir.

MTS yönteminin dezavantajları şunlardır (46-48):

- Alınan sonuçlar hücrelerin inkübasyon zamanı, hücre tipi ve hücre sayısından çok fazla etkilenir.
- Elde edilen absorbans ile renk şiddeti arasındaki doğrusal ilişki en fazla 5 saate dek sürebilir; bu nedenle, MTS ile inkübasyon süresi 1-3 saat arası kısıtlandırılmalıdır.



Şekil 8. MTT testinin yapılışı

XTT ve WST Testleri

2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) ve suda çözünen tetrazolyum tuzları (Wst'ler) de MTT gibi tetrazolyum tuzlarıdır. Günümüzde en sıklıkla kullanılan (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H tetrazolyum yapısındaki Wst-1'dir. Sıklıkla kullanılan diğer bir WST bileşiği ise, 2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H tetrazolyum, monosodyum tuzu yapısındaki Wst-8'dir. Hücre canlılığının spektrofotometrik olarak belirlendiği bu testlerde de uygulama yapılmayan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, uygulama yapılan hücrelerin canlılığı bu hücrelere göre yüzde (%) olarak belirlenir (47-50).

XTT veya Wst ile boyama yönteminin üstünlükleri şunlardır (47, 50):

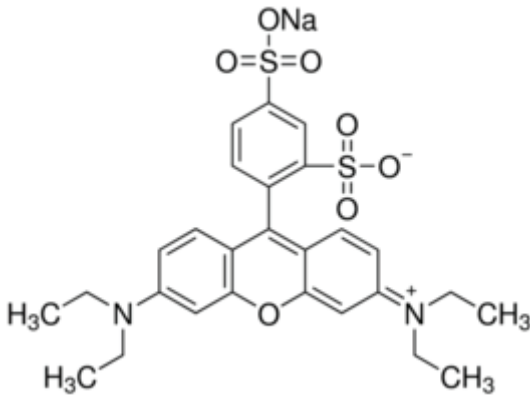
- Hızlı ve güvenilirlerdir.
- Basit ve kolay uygulanabilir testlerdir.
- Yüksek tekrarlanabilirliğe sahiplerdir.
- XTT ve Wst testlerinde hücrelerdeki mitokondriyel dehidrogenazların metabolik aktivitesi sonucu oluşan formazanlar suda çözünür olduğu için DMSO'da çözünme basamağını gerektirmez; bu da testin güvenilirliğini artırır.
- Medyumdaki fenol kırmızısı indikatörleri bu maddeler ile reaksiyona girmez.
- Her iki testin de MTT'ye göre hassasiyeti ve dinamik aralıkları daha yüksektir.

XTT veya Wst ile boyama yönteminin dezavantajları şunlardır (47, 50):

- XTT ve Wst MTT'ye göre daha pahalı testlerdir.
- Ortamın pH'sı, iyon konsantrasyonu (kalsiyum, potasyum, sodyum), çevresel faktörler (sıcaklık, nem) ve hücrelerin sikluslarının süreleri XTT testinin sonucunu etkileyebilir.
- Hücreler XTT ve Wst'ler ile ortalama 2 saat inkübe edilirler; bekletildikleri süre içinde XTT ve Wst'lerin hücre canlılığını ne kadar etkilebileceği bilinmemektedir.

SRB Testi

Sülforhodamin B (SRB, Kiton Red 620) testi Skehan ve ark. (1990) tarafından ilaçlarla indüklenen sitotoksite ve hücre proliferasyonunun belirlenmesi için geliştirilmiştir. SRB parlak pembe-kırmızı renkli ve suda çözünebilen bir boyadır (51). Testin prensibi bir protein boyası olan ve kimyasal yapısı Şekil 9'da gösterilen SRB'nin, trikloroasetik asit veya asetik asit ile fikse edilen hücrelerde amino asit kalıntılarına elektrostatik ve pH-bağımlı olarak bağlanmasına dayanır. Hafif asidik ortamda, boya hücrelerden ekstre edilip, çözücü ve boyanın verdiği renk şiddeti kolorimetrik olarak 540 nm'de ölçülebilir. Ayrıca, SRB ile florometrik ölçümler de $\lambda_{\text{eksitasyon}} = 565 \text{ nm}$ ve $\lambda_{\text{emisyon}} = 586 \text{ nm}$ 'de yapılabilir. SRB testi MTT'ye göre daha kısa sürede bitmesi, daha ucuz olması ve daha doğru sonuçlar vermesi nedeniyle son yıllarda bilimsel araştırmalarda daha sıklıkla tercih edildiği görülmektedir (52-54).



Şekil 9. Sülforhodamin B'nin kimyasal yapısı

SRB ile boyama yönteminin üstünlükleri şunlardır (54-57):

- Basit ve hızlıdır.
- Artan hücre sayısı ve uygulama süresiyle doğrusallığı artar.
- Hassasiyeti florometrik yöntemler kadar iyidir.
- Sinyal-gürültü oranı uygundur.
- Tekrarlanabilirliği yüksektir. Stabil sonuçlar verir.
- Çevresel faktörlerden (sıcaklık, nem gibi) çok düşük oranda etkilenir.

SRB ile boyama yönteminin dezavantajları şunlardır (54-57):

- Hücre süspansiyonunun homojen olması gereklidir. Sellüler agregat oluşumu engellenmelidir. Yoksa elde edilecek sonuçlar etkilenir.

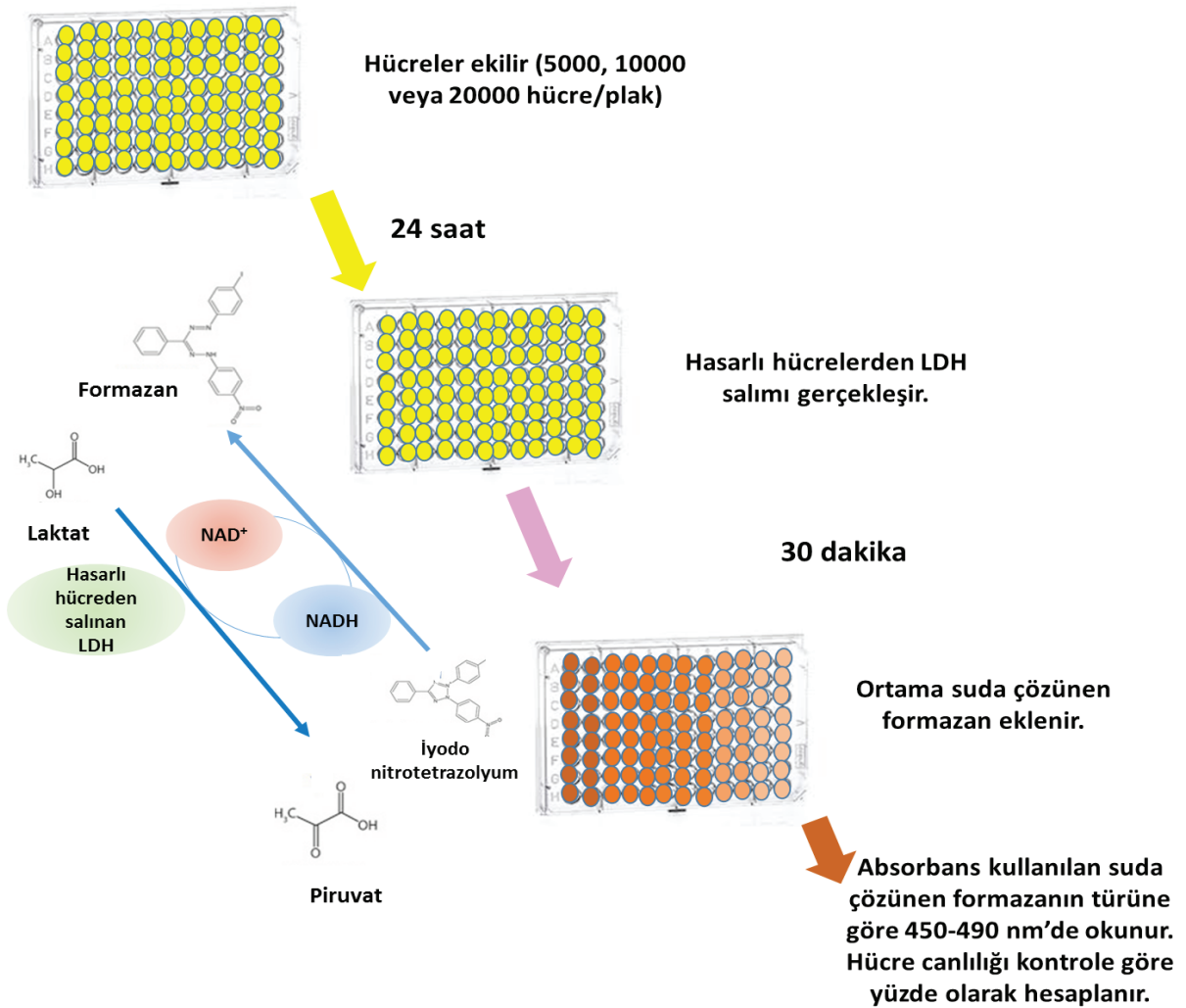
LDH Testi

Laktat dehidrojenaz (LDH) organizmadaki bütün hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Hücreler, toksik bir maddeye maruz kaldığında, plazma membran bütünlükleri bozulur ve LDH hücrelerden sızıp hücre medyumuna geçer ve bu geçiş spektrofotometrik olarak ölçülür. Kozmetik veya kişisel bakım ürünlerinin sitotoksitesite potansiyellerinin değerlendirilmesinde de LDH testi kullanılabilir (58-60). LDH testinin yapılışı Şekil 10'da gösterilmiştir.

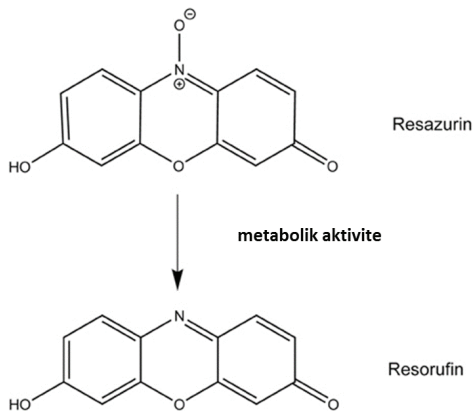
(iii) Florometrik Yöntemler

AlamarBlue Testi

İlk olarak 2000 yılında O'Brien ve ark. (61) tarafından kullanılan bu test, MTT testine iyi bir alternatiftir. AlamarBlue testinde non-toksik, hücre içine giren ve floresan mavi indikatör bir boya olan fenoksazin-3-on yapısındaki resazurin kullanılır ve yöntem aynı zamanda "resazurin redüksiyon yöntemi" olarak bilinir. AlamarBlue kantitatif olarak insan, hayvan, bakteri, mantar ve mikobakterilerde hücre proliferasyonunun belirlenmesi için kullanılabilir. Ayrıca, sitokin ölçüm yöntemlerinde ve hücre büyümesinin izlenmesinde de kullanımı bulunmaktadır (62, 63). Resazurin ve rezorufinin kimyasal yapıları Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 10. LDH testinin yapılışı



Şekil 11. Resazurin ve Resorufinin Kimyasal Yapıları

Resazurin hücre metabolik aktivite ile metabolik redüksiyona uğrayan bir redoks indikatördür. Redükte formu rezorufin olarak adlandırılır ve pembe renkli ve yüksek derecede floresan özellikli bir bileşiktir. Resazurin canlı ve oksidatif fosforilasyon yapabilen yani solunum yapabilen hücrelerde rezorufine mitokondriyel enzimler ve bazı diğer enzimlerle (örneğin, diaforaz) dönüştürülür. Dolayısıyla, oluşan floresansın şiddeti canlı ve solunum yapabilen hücre sayısıyla doğru orantılıdır. Solunum yapabilen hücrelerdeki rezorufin miktarının ölçülmesi hem hücrenin sağlığı hem de hücre canlılığı ve sitotoksitesite hakkında bilgi verir. Ölçümler $\lambda_{\text{eksitasyon}} = 560 \text{ nm}$ ve $\lambda_{\text{emisyon}} = 590 \text{ nm}$ 'de yapılır. Testin süresi hücre tipi, hücre miktarı ve medyuma göre 1-4 saat arasında değişir (64, 65). alamarBlue testinin yapılışı Şekil 12'de gösterilmiştir.

alamarBlue yönteminin üstünlükleri şunlardır (61-65):

- Ucuz bir yöntemdir.
- Hassasiyeti Wst yöntemlerinden bile daha yüksektir.
- Kaspazların aktivitesinin belirlenmesi gibi birçok farklı yöntemle kombine şekilde kullanılabilir.

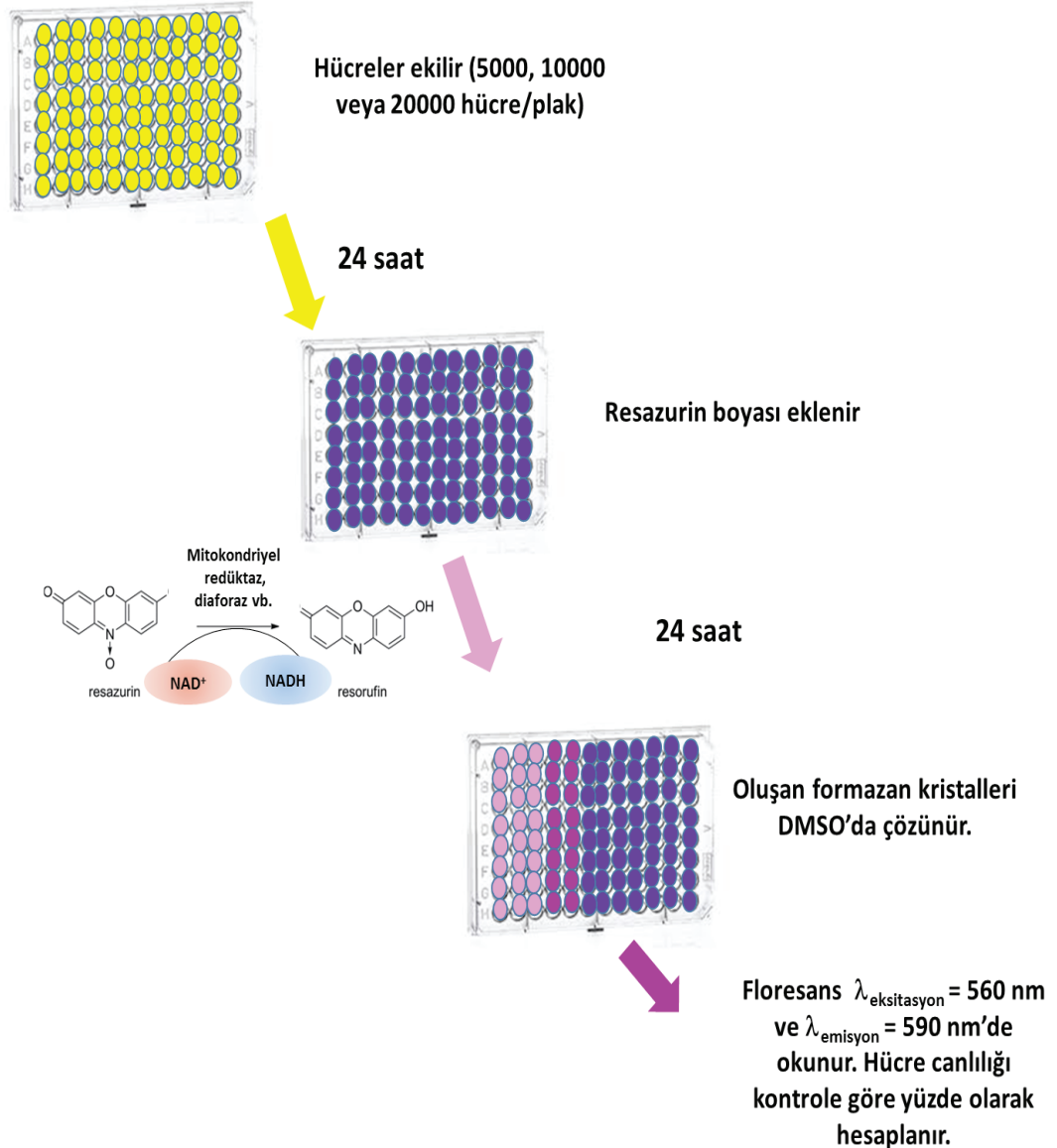
alamarBlue yönteminin dezavantajları şunlardır (61-65):

- Kültür ortamındaki bazı bileşiklerle resazurinin reaksiyona girmesi mümkündür.

- Resazurinin bilinmeyen bazı toksik etkilerinin olabileceği ifade edilmektedir.

CFDA-AM Testleri

5-karboksifluoreskein diasetat, asetoksimetil ester (CFDA-AM) sitotoksitenin ve hücre içi reaktif oksijen bileşikleri (ROS)'nin oluşumunun belirlenmesi için kullanılan nonpolar bir boyadır. CFDA-AM, canlı hücrelerde non-spesifik esterazlarla polar ve yeşil floresans veren bir boya olan karboksifluoreskein (CF)'ye dönüştürülür. CFDA-AM'nin CF'ye dönüşmesi plazma zarının bütünlüğünün gösterilmesi için



Şekil 12. alamarBlue testinin yapılışı

iyi bir indikatördür. Ölçümler $\lambda_{\text{eksitasyon}} = 485 \text{ nm}$ ve $\lambda_{\text{emisyon}} = 535 \text{ nm}$ 'de yapılır. Testin süresi hücre tipi, hücre miktarı ve medyuma göre 1-4 saat arasında değişebilir (66-69). CFDA-AM'nin CF³'ye dönüşümü Şekil 13'de gösterilmiştir.

CFDA-AM yönteminin üstünlükleri şunlardır (67, 69):

- Basit bir yöntemdir.
- Hassasiyeti yüksektir.
- Non-toksiktir.

alarBlue yöntemiyle paralel olarak yürütülebilir.

CFDA-AM yönteminin dezavantajları şunlardır (67, 69):

- Test bileşiklerinin floresan özellikte olması deneyde yanlış pozitif sonuçlar görülmesine yol açabilir.

(iv) Luminometrik Yöntemler

Son yıllarda sıklıkla tercih edilen luminometrik yöntemler, hücre proliferasyonu ve sitotoksitenin hızlı ve basit bir şekilde tayin edilmesini sağlar. 96 veya 384 kuyucuklu plaklarda yapılabilir ve oluşan luminesansın şiddeti luminometrik bir mikropalak oluyucu ile belirlenir. Son reaktifin eklenmesinde sonra luminesansın kalıcı ve stabil olması aynı kuyucuk için hem hücre canlılığının hem de sitotoksitenin belirlenmesine olanak tanır (18, 69, 70).

ATP Yöntemi

Bilindiği üzere adenosin trifosfat (ATP) memeli hücrelerinde oksidatif fosforilasyon ile üretilen ve biyosentez, sinyalleşme, taşıma ve hareket gibi birçok biyolojik işlevin yürütülmesini sağlayan kimyasal enerji rezervuarıdır. Apoptoz veya nekrozla ölen hücrelerde ATP düşer ve bu düşüş nekrozda çok hızlı

gerçekleşirken, apoptozda nekroza oranla daha yavaş ilerler. Bu nedenle, hücrelerdeki toplam ATP miktarının ölçülmesi hücrenin canlılığı hakkında bilgi verir. Günümüzde gerçekleştirilen ATP ölçüm yöntemlerinde genelde Mg⁺² iyonlarının varlığında lusiferinin oksilüsiferine dönüşmesi reaksiyonundan yola çıkılır. Oluşan luminesans sinyali ile ATP konsantrasyonu; ATP konsantrasyonu ile de hücre canlılığı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Bu yöntemde genelde 1536 kuyucuklu plaklar kullanılır ve her küçük kuyucuğa 10 hücre ekilir. En son reaktifin eklenmesinden sonra luminesans sinyali 10 dakika içinde sabit bir düzeye ulaşır ve takiben de luminesans şiddeti ölçülür (71-73).

ATP yönteminin üstünlükleri şunlardır (71-73):

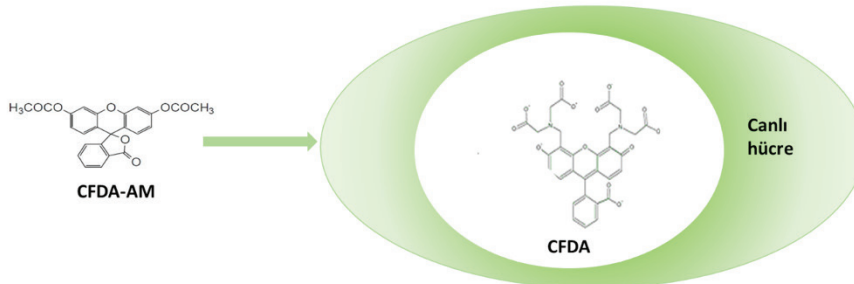
- Çok hassastır.
- Bir inkübasyon süresi gerektirmez ve hücre canlılığını en hızlı belirleyen yöntemdir.

ATP yönteminin dezavantajları şunlardır (71-73):

- Hücrelerin çok doğru bir şekilde sayılması ve kuyucuklara eklenmesi gerekir. Aksi takdirde tekrarlanabilirlik azalır.

Gerçek Zamanlı Canlılık Belirleme Yöntemleri

Son yıllarda gerçek zamanlı olarak hücre canlılığının ve sitotoksitenin belirlenmesi yöntemleri çok kullanılmaktadır. Bu güncel yöntemlerde genellikle deniz karidesinden derive edilen bir lusiferaz ve küçük moleküllü bir prosubstrat kullanılmaktadır. Bu prosubstrat doğrudan lusiferaz tarafından kullanılamaz. Lusiferaz ve prosubstrat hücre kültürü ortamına eklenir. Canlı hücreler prosubstratı lusiferazın kullanılabileceği bir substrata dönüştürürler ve oluşan substrat bir luminesans sinyali oluşturur (74, 75). Şekil 14'te esas gösterilen güncel gerçek zamanlı canlılık belirleme yöntemleri, "sürekli izleme" veya "son nokta



Şekil 13. CFDA-AM'nin CF³'ye dönüşümü

okuma” şeklinde iki yol ile gerçekleştirilebilir; sürekli izleme yönteminde, oluşan luminesans sinyali gerçek zamanlı olarak uzun bir süre içinde takip edilir.

Gerçek zamanlı canlılık belirleme yöntemlerinin üstünlükleri şunlardır (74-78):

- Hem sitotoksiste hem de hücre canlılığını belirlemeye olanak sağlarlar.
- Luminesans sinyalindeki artış ve stabil hale gelmesi oldukça kısa bir süre alır. Böylece bu yöntemler diğer yöntemler ile birlikte kullanılabilir.

Gerçek zamanlı canlılık belirleme yöntemlerinin dezavantajları şunlardır (74-78):

- Sürekli izleme yapıldığında, prosubstrat bittiği zaman canlı ve metabolik aktivitesi olan hücrelerin prosubstrattan substrat oluşturması mümkün olmaz. Bu durumda, bir süre sonra luminesans şiddetinde sabit kalma ile sonuçlanabilir ve alınan doğrusal sinyal bozulur. Bu nedenle, eklenecek prosubstrat miktarı hücre tipine göre doğru olarak seçilmeli ve izleme yapılacak süre çok doğru olarak belirlenmelidir.

(v) Apoptozun Belirlenmesi İçin

Kullanılan Farklı Teknikler

Apoptozun ve/veya nekrozun belirlenmesi için Annexin V/propidyum iyodür boyama yöntemi kullanılabilir. Apoptozun belirlenmesinde aynı zamanda

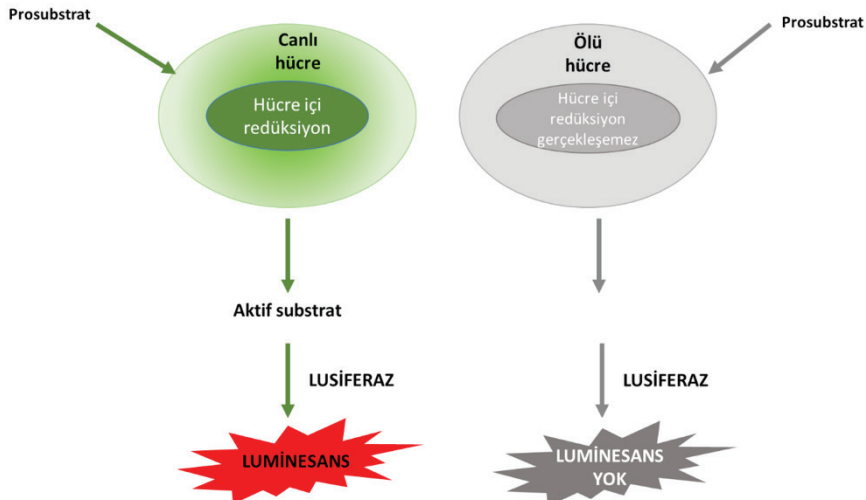
kaspazların (-3, -8 ve -9) düzey ve aktiviteleri ölçülebilir; terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP uç işaretleme (TUNEL) yöntemi kullanılabilir. Akış sitometrisi ile apoptotik ve nekrotik hücreler ve oranları belirlenebilir. Ayrıca, apoptozda rol alan proteinlerin [Bax, Bcl-2, p53, p21, pro-poli (ADP-riboz) polimeraz (pro-PARP) ve PARP parçalanması] ekspresyonları da hücrenin apoptoza gittiğini gösteren iyi biyogöstergelerdir. Ancak, akış sitometrisi hariç bu tip ölçümlerle canlı/ölü hücre bilgisi ve/veya kontrole göre yüzdesini belirlemek mümkün değildir. Sadece, apoptoz veya nekroz gibi hücre ölümü mekanizmalarını aydınlatmak için kullanılabilirler (78-81).

Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Belirlenmesi

İçin Annexin V/Propidyum İyodür Boyama

Yöntemi

Annexin V (VAC alfa) kalsiyum bağımlı bir şekilde fosfatidilserin (PS)'ye bağlanır. PS normalde plazma zarının ekstrasellüler bölgesinden dışarı atılır. Ancak, apoptoz başladığında, PS zarın iç ve dış bölgeleri arasında taşınır. Bu nedenle, floresan olarak işaretlenmiş Annexin V apoptotik hücrelerin belirlenmesi için kullanılabilir. Ancak, bazen nekrotik hücrelerde de bu durum ortaya çıkabilir ki bu da yanlış pozitif yanıtların oluşmasına yol açar. Bu durumu önlemek için nekrotik hücreler sonrasında propidyum iyodür ile boyanarak, yanlış pozitif sonuçların önüne geçilebilir (82-84).



Şekil 14. Gerçek zamanlı canlılık belirleme yöntemlerinin esası

Kaspaz 3 Aktivitesinin ve/veya Düzeyinin

Belirlenmesi

Kaspaz 3 terminal apoptoz kaskadında prokaspazın 3'ün parçalanmasıyla aktive olan bir proteazdır. Apoptozun belirlenmesinde prokaspaz düzeyinin veya kaspaz 3 düzeyi ve/veya aktivitesinin belirlenmesinden sıklıkla yararlanır. Kaspaz 3 aktive olmaz, hücre ölümü kaçınılmazdır. Aktive kaspaz 3'ün düzey ve/veya aktivitesini belirlemek için kaspaz 3 substratlarına bir kromofor [p-nitroanilid (p-NA)] veya florofor [7-amino-4-triflorometilkumarin (AFC), 7-amino-3-metilkumarin (AMC)] takılır ve bu kromofor veya floroforun kaspaz 3 ile asıl substrattan ayrılmasıyla oluşan ışık şiddeti veya floresans şiddeti ölçülür. Ayrıca, Western blot ile de prokaspaz veya kaspaz 3'ün ekspresyonlarının belirlenmesi ve ileri izleme teknikleri (örneğin kemilüminesans gibi) ile düzeylerinin belirlenmesi mümkündür (85, 86).

Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Aktivitelerinin ve/veya

Düzeylerinin Belirlenmesi

Kaspaz 8 aktivitesinin belirlenmesinde bu proteazın IETD (Ile-Glu-Thr-Asp) amino asit sekansını tanımasından yararlanır. Önce substrata pNA kromoforu takılır ve IETD-p-NA yapısı oluşturulur. Sonrasında bu kromoforun asıl substrat (IETD)'den ayrılmasıyla oluşan ışık şiddeti 400-405 nm'de ölçülür. Kaspaz 9 aktivitesinin tayininde ise, bu proteazın LEHD (Ac-Leu-Glu-His) amino asit sekansını tanımasından yararlanır. Önce substrata pNA kromoforu takılır ve LEHD-p-NA yapısı oluşturulur. Sonrasında bu kromoforun asıl substrat (LEHD)'den ayrılmasıyla oluşan ışık şiddeti 400-405 nm'de ölçülür. Ayrıca, Western blot ile de kaspaz 8 veya kaspaz 9'un ekspresyonlarının belirlenmesi ve ileri izleme teknikleri (örneğin kemilüminesans gibi) ile düzeylerinin belirlenmesi mümkündür (85, 86).

Terminal Deoksiniükleotidil Transferaz Dntp

Çentik Uç İşaretleme (Tunel)

TUNEL yöntemi temel olarak apoptozda oluşan çift sarmal DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar ve diğer apoptoz belirleme yöntemleriyle birlikte kullanılır. Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilir. Ancak, asıl olarak deoksiniükleotidlerin bağlanmasından sorumlu bir enzim olan terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yön-

tem olarak bulunmuştur. Yöntemde, bir florofor veya başka bir marköre takılan TdT'nin çift sarmal DNA kırıkları ile oluşan 3'-hidroksi terminal bölgelerine bağlanmasından yararlanır. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan *in situ* işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır (85-87).

Akış Sitometrisi

Akış sitometrisi genelde lazer veya akustik temele dayanan bir tekniktir. Hücrelerin sayılması, sınıflandırılması, biyogösterge belirlenmesi ve protein mühendisliğinde kullanılır. Temeli süspand hücrelerin bir elektron deteksiyon aparatından geçirilmesi esasına dayanır. Bu teknikle saniyede binlerce partikülün fiziksel ve kimyasal karakteristikleri simultan olarak multi-parametrik şekilde analiz edilebilir. Floresans ile aktive edilen hücre sıralama (FACS) hızlı, objektif ve özelleştirilmiş bir akış sitometresidir. FACS, hücrelerin ışığı dağıtma ve floresan özelliklerinden yararlanılarak fiziksel özelliklerini kantitatif olarak belirlemek için çok iyi bir tekniktir. FACS ile kantifikasyon, DNA degradasyonunun ölçümü, mitokondriyel membran potansiyelinin belirlenmesi, geçirgenlik değişimleri, kaspaz aktivitesinin belirlenmesi gibi birçok farklı şekilde apoptoz, nekroz ve patojen-konak adherensi gibi hücre adherenslerini belirlemek mümkündür (85, 86, 88).

Apoptozda Rol Alan Proteinlerin

Ekspresyonları

Apoptozda rol alan proteinlerin ekspresyonları [Bax, Bcl-2, p53, p21, pro-poli (ADP-riboz) polimeraz (pro-PARP) ve PARP parçalanması] genel olarak Western blot ile belirlenir ve ileri izleme teknikleri (örneğin, kemilüminesans gibi) ile düzeylerinin belirlenmesi mümkündür (78-81).

(vi) Otofajinin Belirlenmesi İçin

Kullanılan Teknikler:

Otofaji, lizozomal bir hücre ölümü mekanizmasıdır ve genelde besin kısıtlaması, gelişme ve hücre farklılaşması gibi fizyolojik durumlarda veya patolojik olaylarda (nörodejeneratif hatalıklar, stres, kanser gibi) aktive olan programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Memeli hücrelerinde besin yokluğu

gibi bir uyarandan sonra, otofagozom yapımı başlar ve takiben endoplazmik retikulum (ER) zarında ome-gazom oluşur ve ardından fagofor (izolasyon zarı) bü-yümesi görülür (89, 90).

Otofaji, çekirdeklenme (izolasyon membranının olu-şumu), uzama (izolasyon membranının uzaması), ol-gunlaşma (otofagozomun tamamlanması ve taşınma-sı), birleşme (otofagozom ile lizozomun kaynaşması ve birleşimi) ve parçalanma (kargoların otolizozom içinde yıkımı) aşamalarından oluşur (91). Otofajinin belirlenmesinde sıklıkla otofajide rol alan proteinle-rin düzeylerinin/ekspresyonlarının belirlenmesinden yararlanır. Bu proteinler içinde en sıklıkla Beclin-1, LC-3 ve p62 düzeylerindeki değişimler belirlenir. Beclin 1 ve LC-3 gibi proteinlerin düzeylerindeki ar-tışlar ve p62'nin düzeyindeki azalışlar otofajinin tetik-lendiğinin belirlenmesinde güncel iyi biyogöstergeler olarak bildirilmektedir.

3. Sonuç

Sitotoksitenin belirlenmesi fiziksel, kimyasal ve bi-yolojik ajanların toksik etkilerinin değerlendirilmesi için ilk basamak *in vitro* toksikolojik verilerin elde edil-mesini sağlar. Bu nedenle artık birçok hücre kültürü çalışmasında ilk olarak ajanların sitotoksiste potan-siyelleri değerlendirilmekte, takiben ise elde edilen inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀, hücrelerin %50'nin öldüğü konsantrasyon), inhibitör konsantrasyon 30 (IC₃₀, hücrelerin %30'nin öldüğü konsantrasyon) veya inhibitör konsantrasyon 20 (IC₂₀, hücrelerin %20'nin öldüğü konsantrasyon) değerleri kullanılarak toksis-te değerlendirmesine farklı analizlerle devam edil-mektedir.

Günümüzde sitotoksiste, hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunun belirlenmesi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin birbirlerine göre üstünlükleri ve dezavantajları bulunmaktadır. En çok tercih edilen kolorimetrik yöntemler ucuzdur, güvenilirlikleri yüksektir, tekrarlanabilir sonuçlar ve-rir ve hızlıdır. Diğer taraftan, florometrik yöntem-lerin hassasiyetleri ise kolorimetrik yöntemlere göre yüksektir. Bu durumda, araştırmacı kullanacağı hücre tipi (adheren, süspande, primer hücre kültürü, hücre hattı gibi), uygulayacağı test maddesinin, fiziksel ve biyolojik ajanın dozu ve özellikleri ile hangi meka-nizma aracılığıyla hücre ölümüne yol açtığı (apoptoz, nekroz, otofaji gibi), deneyin süresi, ölçmek istediği son nokta (sitotoksiste, proliferasyon, canlılık gibi)

ve yöntemin özgünlüğü ve hassasiyetini dikkate alarak, araştırması için en doğru yöntemi seçmelidir.

Günümüzde sitotoksiste testleri sadece hücre kül-türlerinde değil, doku kültürlerinde de uygulanmaya başlamıştır. Özellikle deri ve göz iritasyon ve ko-rozyon testlerinde de ölçülen son nokta uygulanan ajanın neden olduğu sitotoksistedir. Bu amaçla kul-lanılan doku kültürlerine her yıl yeni doku modelleri de eklenmekte ve özellikle dermal veya oküler olarak uygulanan ürünlerin güvenliliğinin belirlenmesinde si-totoksistenin ölçülmesi büyük önem kazanmaktadır.

Gelecekte ilaçlar dahil tüm kimyasal ajanların toksisi-te testlerinin *in vitro* olarak yapılması planlanmaktadır. Bu nedenle, *in vitro* sitotoksik analizler büyük önem kazanacaktır. Varolan yöntemlerin daha da geliştiri-lmesi veya yeni, kolay uygulanabilir, hızlı ve kesin sonuç veren testlerin geliştirilmesi başta ilaç toksisi-tesi üzere tüm ajanların sitotoksik özelliklerinin daha doğru değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Fawthrop DJ, Boobis AR, Davies DS. Fawthrop DJ: Mechanisms of cell death. Arch Toxicol 1991, 65(6):437-44.
2. Boobis AR, Fawthrop DJ, Davies DS. Boobis AR: Mechanisms of cell death. Trends Pharmacol Sci 1989, 10(7):275-80.
3. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, García-Sáez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitsis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkentin JD, Moll

- UM, Muñoz-Pinedo C, Nagata S, Nuñez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G: Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018, 25(3):486-541.4.
4. Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B: Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology. *Toxicol Sci* 2011, 119 (1): 3–19.
 5. Stoddart M: Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol* 2011;740:1-6.
 6. Adan A, Kiraz Y, Baran Y: Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol* 2016, 17(14):1213-1221.
 7. Johnson S, Nguyen V, Coder D: Assessment of cell viability. *Curr Protoc Cytom* 2013; Chapter 9:Unit 9.2.
 8. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [updated 2016 Jul 1]: In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, Baell J, Bejcek B, Caaveiro JMM, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanaryan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Haas JV, Hoare SRJ, Inglese J, Iversen PW, Kahl SD, Kales SC, Kirshner S, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Saradjian P, Trask OJ Jr., Weidner JR, Wildey MJ, Xia M, Xu X, editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> [Website]
 9. Strober W: Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 2015;111:A3.B.1-A3.B.3.
 10. Strober W: Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 200, Appendix 3:Appendix 3B.
 11. Louis KS, Siegel AC: Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. *Mamm Cell Viabil*, 2011, 7-12.
 12. Louis KS, Siegel AC, Levy GA: Comparison of Manual versus Automated Trypan Blue Dye Exclusion Method for Cell Counting. 2007. Available from: <http://www.ibdl.ca/Application%20Notes/Application%20Note%20-%20Vi-CELL1.pdf>. [Website]
 13. Ralph Dougall L H J: *Conn's Biological Stains* 9th ed. Williams & Wilkins; Baltimore, 1977. 692 p.
 14. Bancroft J, Stevens A: *The Theory and Practice of Histological Techniques* (2nd ed.). Longman Group Limited, USA, 1982.
 15. Weisenthal LM, Marsden JA, Dill PL, Macaluso CK: A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res* 1983, 43(2):749-757.
 16. von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N: The Cell: Basic Structure and Function. In: Bibbo M, Wilbur DC (eds), *Comprehensive Cytopathology* (Third Edition), 2008. Saunders/Elsevier; Philadelphia, USA. 2008. pp. 3-22.
 17. Dooley MP: The use of eosin B to assess the viability and developmental potential of rat embryos. *Retrospective Theses and Dissertations. Iowa State University Capstones, Theses and Dissertations. Iowa State University Repository*. 1988. Available from: <https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=9838&context=rttd> [Website]
 18. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: Larramendy M, Soloneski S (eds), *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, InTech, Croatia. 2018. pp. 1-17.
 19. Hunger K, Mischke P, Rieper W, Raue R, Kunde K, Engel A: *Azo Dyes*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2005.
 20. Yakupova EI, Bobyleva LG, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG: Congo Red and amyloids: history and relationship. *Biosci Rep* 2019;39(1). pii: BSR20181415.
 21. Yip DK, Auersperg N: The dye-exclusion test for cell viability: persistence of differential staining following fixation. *In Vitro* 1972, 7(5):323-329.
 22. McDonald JE, Rooks DJ, McCarthy AJ. Chapter nineteen - Methods for the Isolation of Cellulose-Degrading Microorganisms. *Methods in Enzymol* 2012, 510, 349-374.
 23. Steensma, DP: Congo Red: Out of Africa? *Arch Pathol Lab Med* 2001, 125 (2):250–252.
 24. Al-Shabib NA, Khan JM, Malik A, Alsenaidy AM, Alsenaidy MA, Husain FM, Shamsi MB, Hidayathulla S, Khan RH. Negatively charged food additive dye “Allura Red” rapidly induces SDS-soluble amyloid fibril in beta-lactoglobulin protein. *Int J Biol Macromol* 2018, 107(Pt B):1706-1716.
 25. Gurr E: *Synthetic Dyes in Biology, Medicine And Chemistry*. 2012, Academic Press, London, New York.
 26. Kim SI, Kim HJ, Lee HJ, Lee K, Hong D, Lim H, Cho K, Jung N, Yi YW: Application of a non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters. *Anal Biochem* 2016, 492:8-12.
 27. Franke JD, Braverman AL, Cunningham AM, Eberhard EE,

- Perry GA: Erythrosin B: a versatile colorimetric and fluorescent vital dye for bacteria. *Biotechniques* 2020, 68(1):7-13.
28. Fuentes M. Home /Viability dyes: Trypan blue vs Erythrosin B. Available from: <https://www.hemocytometer.org/viability-dyes-trypan-blue-vs-erythrosin-b/> [Website]
 29. Krause AW, Carley WW, Webb WW: Fluorescent erythrosin B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture. *J Histochem Cytochem* 1984, 32(10):1084-1090.
 30. Zuang V: The neutral red release assay: a review. *Altern Lab Anim* 2001, 29:575-599.
 31. Repetto G, del Peso A, Zurita JL: Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008, 3(7):1125-1131.
 32. Ates G, Vanhaecke T, Rogiers V, Rodrigues RM: Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. *Methods Mol Biol* 2017, 1601:19-26.
 33. The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). Test Method Protocol for the NHK Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay. Phase III - Validation Study: November 4, 2003. A Test for Basal Cytotoxicity for an In Vitro Validation Study Phase III. Available from: <https://ntp.niehs.nih.gov/icevam/methods/acute/invidocs/phiiprot/nhkphiii.pdf> [Website]
 34. G-Biosciences. Viability Assays: Different Types and Their Use in Cell Death Research. Available from: <https://info.gbiosciences.com/blog/how-and-when-to-use-viability-assays>. [Website]
 35. OECD TG GUIDELINE 432. In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. 2018. Available from: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/TG432-TC-4dec-clean.pdf> [Website]
 36. Erdely H, Sanders P: 5. Residues in food and their evaluations - Conditions of use. Gentian violet. Food and Agriculture Organization. 2017. Available from: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/15-2013-gentian-violet.pdf [Website]
 37. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M: Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc* 2016, 2016(4):pdb.prot087379.
 38. Berry JM, Huebner E, Butler M: The crystal violet nuclei staining technique leads to anomalous results in monitoring mammalian cell cultures. *Cytotechnology* 1996, 21(1):73-80.
 39. Silva EJNL, Rollemberg CB, de Souza Coutinho-Filho T, Krebs RL, Zaia AA: A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of different storage media for avulsed teeth. *Braz. J Oral Sci* 2013, 12(2):90-94.
 40. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65:55-63.
 41. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD: Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018, 2018(6).
 42. OECD TG 439. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. 28 July 2015. Available from: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9715291e.pdf?expires=1482489462&id=id&accname=guest&checksum=BBD9677ED6B5DAFABBB00380CC70332D>. [Website]
 43. OECD TG 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. 28 July 2015. Available from: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9715211e.pdf?expires=1482490212&id=id&accname=guest&checksum=5A6054E03ECCBF6C51DFAF39D9E807D1>. [Website]
 44. Lindl T, Lewandowski B, Schreyögg S, Stäudte A: An evaluation of the in vitro cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the neutral red uptake and MTT assays. *Altern Lab Anim* 2005, 33(6):591-601.
 45. Stepanenko AA, Dmitrenko VV: Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* 2015, 574(2):193-203.
 46. Creative Proteomics. MTS Cell Proliferation Assay. Available from: <https://www.creative-proteomics.com/services/mts-cell-proliferation-assay.htm> [Website]
 47. Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation. Merck. 2020. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html> [Website]
 48. Wang P, Henning SM, Heber D: Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One* 2010, 5(4):e10202.
 49. Merck. Protocol Guide: XTT Assay for Cell Viability and Proliferation. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-xtt-assay.html> [Website]
 50. Merck. Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-reagent-wst-1.html> [Website]
 51. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990, 82(13):1107-1112.
 52. da Costa AO, de Assis MC, Marques Ede A, Plotkowski MC. Comparative analysis of three methods to assess viability of mammalian cells in culture. *Biocell* 1999, 23(1):65-72.

53. kehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990, 82(13):1107–1112.
54. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD: Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes* 2015, 8:47.
55. Orellana EA, Kasinski AL: Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio Protoc* 2016, 6(21). pii: e1984.
56. Vichai V, Kirtikara K: Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocol* 2006, (3):1112-1116.
57. Vajrabhaya L, Korsuwannawong S: Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. *J Anal Sci Technol* 2018, 9, 15.
58. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD: Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018, 2018(6).
59. Fotakis G, Timbrell JA: In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006, 160(2):171-177.
60. Han X, Gelein R, Corson N, Wade-Mercer P, Jiang J, Biswas P, Finkelstein JN, Elder A, Oberdörster G: Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology* 2011, 287(1-3):99-104.
61. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F: Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity *Eur. J. Biochem* 2000, 267(17):5421-5426.
62. Eilenberger C, Kratz SRA, Rothbauer M, Ehmoser EK, Ertl P, Küpcü S: Optimized alamarBlue assay protocol for drug dose-response determination of 3D tumor spheroids. *MethodsX* 2018, 5:781-787.
63. Vega-Avila E, Pugsley MK: An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc* 2011, 54:10-14.
64. Rampersad SN: Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* 2012, 12(9):12347-12360.
65. Eilenberger C, Kratz SRA, Rothbauer M, Ehmoser EK, Ertl P, Küpcü S. Optimized alamarBlue assay protocol for drug dose-response determination of 3D tumor spheroids. *MethodsX.* 2018;5:781–787.
66. Schreer A, Tinson C, Sherry JP, Schirmer K: Application of Alamarblue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxyethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Anal Biochem* 2005, 344(1):76-85.
67. Bopp SK, Lettieri T: Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol* 2008, 8:8.
68. Schirmer K. Application of fluorescent indicator dyes to monitor hepatocyte viability in studies on gene expression. Junior Research Group - Molecular Animal Cell Toxicology UFZ Centre for Environmental Research. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.520.9740&rep=rep1&type=pdf> [Website]
69. Gorokhova E, Mattsson L, Sundström AM: A comparison of TO-PRO-1 iodide and 5-CFDA-AM staining methods for assessing viability of planktonic algae with epifluorescence microscopy. *J Microbiol Methods* 2012, 89(3):216-221.
70. Corey MJ, Kinders RJ, Brown LG, Vessella RL: A very sensitive coupled luminescent assay for cytotoxicity and complement-mediated lysis. *J Immunol Methods* 1997, 207(1):43-51.
71. Maehara Y, Anai H, Tamada R, Sugimachi K: The ATP assay is more sensitive than the succinate-dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. *Eur J Cancer Clinical Oncol* 1987, 23:273-276.
72. Mueller H, Kassack MU, Wiese M: Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J Biomol Screening* 2004, 9:506-515.
73. Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM, Hartmann DM, Linder D, Harel G, Gleiberman I, Caruso PA, Ricks SH, Untch M, Sartori C, Bruckner HW: Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: Clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian cancer. *Cancer Res* 1995, 55:5276-5282.
74. Fan F, Wood KV: Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 2007, 5(1):127-136.
75. Duellman SJ, Zhou W, Meisenheimer P, Vidugiris G, Cali JJ, Gautam P, Wennerberg K, Vidugiriene J: Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening. *Assay Drug Dev Technol* 2015, 13(8):456-465.
76. Schäfer H, Schäfer A, Kiderlen AF, Masihi KN, Burger R: A highly sensitive cytotoxicity assay based on the release of reporter enzymes, from stably transfected cell lines. *J Immunol Methods.* 1997, 204(1):89-98.
77. Jondeau A, Dahbi L, Bani-Estivals MH, Chagnon MC: Evaluation of the sensitivity of three sublethal cytotoxicity assays in human HepG2 cell line using water contaminants. *Toxicology.* 2006, 226(2-3):218-228.
78. Ward TH, Cummings J, Dean E, Greystoke A, Hou JM, Bac-

- ken A, Ranson M, Dive C: Biomarkers of apoptosis. *Br J Cancer* 2008, 99(6):841-846.
79. Holdenrieder S, Stieber P: Apoptotic markers in cancer. *Clin Biochem* 2004, 37(7):605-617.
80. Zarcone D, Tilden AB, Cloud G, Friedman HM, Landay A, Grossi CE: Flow cytometry evaluation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1986, 94(1-2):247-255.
81. Sarkar FH, Li Y: Markers of apoptosis. *Methods Mol Med* 2006, 120:147-160.
82. Demchenko AP: The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. *Exp Oncol* 2012, 34(3):263-268.
83. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P: Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 2008, 44(3):205-221.
84. Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC: Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol* 2008, 129(1):33-43.
85. Maurya SK, Tewari M, Sharma B, Shukla HS: Expression of procaspase 3 and activated caspase 3 and its relevance in hormone-responsive gallbladder carcinoma chemotherapy. *Korean J Intern Med* 2013, 28(5):573-578.
86. Aziz G, Akselsen ØW, Hansen TV, Paulsen RE: Procaspase-activating compound 1 induces a caspase-3-dependent cell death in cerebellar granule neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010, 247(3):238-242.
87. Archana M; Bastian, Yogesh TL, Kumaraswamy KL. Various methods available for detection of apoptotic cells--a review. *Indian J Cancer* 2013, 50(3):274-283.
88. Tuchin VV, Tárnok A, Zharov VP: In vivo flow cytometry: a horizon of opportunities. *Cytometry A* 2011, 79(10):737-745.
89. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT: Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 2008, 182(4):685-701.
90. Biazik J, Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL: Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy* 2015, 11(3):439-451.
91. Chen Y, Yu L: Autophagic lysosome reformation. *Exp Cell Res* 2013, 319(2):142-146.