

Alfa Tokoferol ve Diğer Güncel Antifibrotiklerin, Tek ve Kombine Kullanımda İnsan Endotel Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkilerinin İn Vitro İncelenmesi*

In Vitro Evaluation of Apoptotic Effects of Single and Combined Use of Alpha Tocopherol and Current Antifibrotics, in Human Endothelium Cells

Kaya N. ENGİN¹, Serap ERDEM KURUCA², Gül ÖZCAN ARICAN³, Beyza ÇETİN⁴, Ercan ARICAN⁵, Uğur SERBES⁶, Kadriye AKGÜN DAR⁷, Sabriye KARADENİZLİ², Ayşegül KAPUCU⁶

Klinik Çalışma

Original Article

ÖZ

Amaç: Glukom cerrahisinde, fibroselüler skar formasyonunu önlemek için kullanılan güncel drogların endotel üzerine etkileri kullanımını sınırlamaktadır. α -tokoferolün ise, doğal bir antioksidan olmanın ötesinde, tenon fibroblast proliferasyonunu ve fibroselüler skar formasyonunu engelleyen, diğer antifibrotiklerin kullandığı yollara etkili bir nöromedyatör olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, α -tokoferol ve diğer antifibrotiklerin insan endotel hücreleri üzerine in vivo kullanıma uygun dozlardaki apoptotik etkileri farklı kombinasyon ve sürelerde in vitro incelendi.

Gereç ve Yöntem: ECV304 İnsan ulimbikal ven endotel hücre kültürlerinde antifibrotik ajanların etkileri; 5 dakikalık tek uygulama, ve 10 gün boyunca α -tokoferol ilavesiyle kombine olarak incelendi. Antifibrotik ajan olarak paklitaksel, mitomisin, 5-FU ve α -tokoferol kullanıldı. DAPI boyama ile floresans mikroskopunda apoptotik indeks tayin edildi. İmmünohistokimyasal yöntem ile hücrelerin kaspaz aktivitelerini incelemek için stoplazmik komponent değerlendirildi ve Reverse Transkriptaz-Polymerase Chain Reaction (PCR) tekniği kullanılarak bcl-2 ve bax gen ekspresyonları araştırıldı. Mitotik indeks tayini yapılarak hücrelerin proliferasyon eğilimleri belirlendi.

Bulgular: Kısa ve uzun dönem apoptotik indeks değerleri mitomisin ve özellikle paklitakselde anlamlı yüksek bulundu. Mitomisin etkisinin uzun dönemde tokoferol ilavesi ile anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Bcl-2/Bax oranlarında artış ve kaspaz 3 aktivitesi de sadece mitomisin grubunda görüldü. Uzun dönem örneklerinde ise kaspaz 3 aktivitesi mitomisine ek olarak paklitaksel grubunda da görüldü. Kısa dönem mitotik indeks sonuçlarında α -tokoferol, uzun dönemde ise paklitaksel+Tokoferol gruplarında anlamlı artış bulundu.

Sonuç: α -tokoferol'ün kombine kullanımı antifibrotiklerin endotel hücrelerindeki apoptotik etkilerini azaltmamıştır. Özellikle paklitaksel ve mitomisin ile olan additif etkisi incelenebilir. α -tokoferol'ün ve 5-FU'ün tek başına ve kombine uzun ve kısa süreli etkileri kontrol grubuna yakın olduğundan, kullanımları endotel toksisitesi açısından daha güvenlidir.

Anahtar Kelimeler: Alfa-tokoferol, mitomisin, 5-FU, antifibrotik, apoptozis.

ABSTRACT

Purpose: Side effects current antifibrotics on endothelium, limits their use in glaucoma surgery. The natural antioxidant, α -tocopherol is also a neuromediator, and it not only prevents tenon's fibroblast proliferation and fibrocellular scar formation, but effects similar pathways with those of other antifibrotics as well. In this study, apoptotic effects of α -tocopherol and other antifibrotics -in concordant doses with their in vivo uses, on human endothelial cells were examined in vitro in various combinations and durations.

Materials and Methods: Effects of antifibrotic agents in ECV304 Human Umbilical Vein Endothelial Cell Cultures were evaluated in single 5 minutes applications and in combination with 10 days of α -tocopherol additions. Paclitaxel, mitomycin, 5-FU and α -tocopherol were used as antifibrotic agents. Apoptotic indexes were found with DAPI staining in fluorescence microscope. Apoptotic cells were demonstrated immunohistochemically in preperates stained with peroxidase labeled caspase 3 monoclonal antibodies and bcl-2 ve bax gene expressions were evaluated with PCR. Mitotic indexes were determined to evaluate the proliferative trends.

Results: Mitomycin and paclitaxel groups demonstrated a significant AI increase, which were augmented by α -tocopherol addition. Either bcl-2/bax ratio decrease, or caspase activity were found only in Mitomycin group and further augmentation was achieved with α -tocopherol addition. High proliferation was observed in tocopherol and paclitaxel+ tocopherol groups.

Conclusion: Combination with α -tocopherol did not reduce the apoptotic effects of antifibrotics on human endothelial cells. Single and combined uses of 5-FU and α -tocopherol have been found to be safe for their long and short term effects were not statistically different from controls.

Key Words: Alpha-tocopherol, mitomycin, 5-FU, antifibrotic, apoptosis.

Glo-Kat 2009;4:93-99

Geliş Tarihi : 04/02/2009

Kabul Tarihi : 21/05/2009

Received : February 04, 2009

Accepted : May 21, 2009

- * TOD 42. Ulusal Oftalmoloji Kongresinde sunulmuştur.
- 1- Bağcılar E.A. Hastanesi, Göz Kliniği, İstanbul, Uzm. Dr.
 - 2- İ.Ü., İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D., İstanbul, Prof. Dr.
 - 3- İ.Ü., Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul, Uzm. Dr.
 - 4- İ.Ü., İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D., İstanbul, Asist. Dr.
 - 5- İ.Ü., Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Uzm. Dr.
 - 6- İ.Ü., Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul, Asist. Dr.
 - 7- İ.Ü., Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul, Doç. Dr.

- 1- M.D., Bağcılar Training and Research Hospital, Eye Clinic İstanbul / TURKEY
ENGİN K.N., kayanengin@hotmail.com
- 2- M.D. İstanbul University Faculty of Medicine, Department of Physiology
İstanbul/TURKEY
KURUCA S.E., ÇETİN B., KARADENİZLİ S.,
- 3- M.D. İstanbul University Faculty of Science, Department of Biology İstanbul/TURKEY
ARICAN G.O., SERBEST U., DAR K.A., KAPUCU A.,
- 4- M.D. İstanbul University Faculty of Science, Department of Molecular Biology and
Genetic İstanbul/TURKEY
ARICAN E.,

Correspondence: M.D.,Kaya N. ENGİN

Bağcılar Training and Research Hospital, Eye Clinic İstanbul / TURKEY

GİRİŞ

E vitamini insan organizmasındaki majör antioksidanlardandır. Bu jenerik terim iki halka ve bir hidrokarbon zincirden oluşan tokoferol ve tokotrienollerini ifade eder. Doğal E vitaminleri, benzen halkalarına bağlı metil (CH₃) veya proton (H) guruplarına göre α , β , γ ve δ olarak adlandırılırlar ve içlerinde biyolojik olarak en aktif olanı ise α -tokoferoldür.¹ Sentetik yoldan üretildiklerinde ise 8 izomerden oluşurlar ve biyolojik aktivitesi en yüksek olan RRR- α -tokoferoldür.²

E vitamininin önemli bir özelliği de doku düzeylerini ayarlayıcı hassas mekanizmaların varlığıdır.^{3,4} Tokoferol transfer protein,^{5,6} α -tokoferol özgün membran reseptörleri⁷ ve sitozolik transfer proteinlerinin keşfi E vitamininin antioksidan fonksiyonlarının ötesinde etkilerinin olabileceği tezini doğrulamaktadır.³ E vitamininin, gen regülasyonu da dahil olmak üzere özgün etkileri,^{3,8} özellikle antiproliferatif etkileri^{3,8,9} literatürde sıkça gözlenmektedir.

E vitamininin olası kullanım alanlarından birisi de glokom cerrahisidir. Tenon kapsül kaynaklı fibroblastların neden olduğu fibrosetüler skar formasyonu filtran cerrahide başarısızlığın ana nedeni olarak gösterilmektedir ve d- α -tokoferol ile insan tenon fibroblast proliferasyonunun inhibe edildiği in vitro gösterilmiştir.¹¹ Bunu, bu bulguların in vivo hayvan deneylerinde, glokom cerrahisinde doğrulandığı çalışmalar takip etmiştir.^{12,13} Gerek bu etkinin mekanizmasını açığa kavuşturmak, gerekse diğer antimetabolitler ile karşılaştırmaya yönelik hücre kültür çalışmaları ise sürmektedir.¹⁴

Bugüne dek, fibroblast proliferasyonunu önlemek amaçlı hücre içi sinyal ileti yollarını kontrol edebilecek birçok drog denenmiş ve denenmektedir. Kullanılan droglar arasında bu gün için en popüler olanları ise mitomisin-C,^{15,16} 5-FU^{17,18} ve son günlerde üzerinde yeniden çalışılmakta olan mikrotübül stabilizatörü paklitaksel^{19,20} dir. Fotorefraktif keratektomi²¹ ve pterijum cerrahisi²² antimetabolitlerin diğer güncel kullanım alanlarıdır. Ancak gerek reseptör ve iyon kanal subtiplerinin çeşitliliği, gerekse potansiyel blokerlerin değişken bölgelere durum-bağımlı bağlanmaları uygun bölgeye uygun şekilde bağlanacak teropatiklerin üretilmesine engel teşkil etmektedir. Bu maddelerin yan etkileri ise klinik kullanımlarını ciddi biçimde sınırlamaktadır.¹⁷ Yan etkiler arasında en önemlileri ise filtran bleb infeksiyonları²³ ve endoftalmi,²⁴ korneal endotel hasarı,²⁵ hipotoni ve nadiren eşlik eden retinal kanamalarıdır.²⁶ Tüm bu komplikasyonlarda endotel hasarı önemli rol oynar.²⁴⁻²⁶

E vitamininin topikal kullanım ile humor aközde terapotik konsantrasyonlara ulaşabildiği, oral veya paranteral kullanımında ise öncelikle retinada toplandığı bilinmektedir.²⁷ Araştırılan etki uzun vadeli olduğundan oral kullanımda bir sakınca yoktur ve çok yüksek dozların güvenli bir şekilde hastalara verilebileceği bir gerçektir.²⁸ Ayrıca diğer antioksidanlar ile yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, aşırı doz alımında oküler toksisitesi düşük bulunmuştur.²⁹ Ancak E vitamininin endotel hücreleri üzerine etkileri, ayrıca diğer antimetabolitler ile etkileşimleri özellikle apoptozis modeli üzerinde henüz çalışılmamıştır.

Değişik patolojilerde kilit rol oynayan apoptozis, aslında organizma dengelerinin idamesinde gerekli mekanizmalardır. Bu sürecin mitokondriyal ayağında yer alan *Bcl-2* gen ailesine üye genler, insan foliküler lenfomada transloke olan genlerdir. Bu gen ailesinin apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Buna karşın *Bax* homodimerleri baskın olduğunda hücrelerin apoptoza duyarlılığı artar. *Bcl-2/Bax* arasındaki denge ile apoptozis düzenlenir. Bu sürecin diğer 2 anahtar bileşeni ise stoplazmada bulunan kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteindir.³⁰

Bu çalışmada, α -tokoferol ve diğer güncel antifibrotiklerin tek ve α -tokoferol ile uzun süreli kombine kullanımlarında endotel hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini in vitro değerlendirerek, bu hücreler üzerine güvenli bir tek veya kombine tedaviyi önerebilmeyi ve bu alanda yapılacak diğer çalışmalara ışık tutmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

ECV 304 insan umbilikal kord endotel hücre serisinden (tablo) kültür yapılarak çoğaltılan hücrelerde ilaçsız kontrol flaskına ilaveten 0.1 mM α -tokoferol, 0.4 mg/ml 5 dk mitomisin C, 0.2 mg/ml 5 dk 5-FU ve 10 (-5) M 5 dk paklitaksel içeren kültür flaskları hazırlandı. Flasklardan 24 saatlik kısa dönem incelemeler için gerekli numuneler alındıktan sonra, uzun dönem incelemeler için her flask 10 gün boyunca, gūnaşırı 0.1 mM α -tokoferol ile muamele edildi. Deney grupları ilaç uygulama süreleri sonunda toplanarak 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra %70'lik soğuk etanol ilave edilerek 24 saat 4 °C de fikse edildikten sonra tekrar santrifüj edilip, mavi immunofluoresan boya olan DAPI (Diaminophenyliodide) ile boyandı. Deney gruplarına göre hazırlanan preparatlar fluoresan mikroskop altında incelenerek, normal nukleus, mitozda duraklayan nukleus ve apoptotik

Tablo: Kısa ve uzun dönem sonuçların eldesi için hazırlanan 9 deney gurubunun düzenlenmesi.

Kontrol	Kısa Dönem Flask	Uzun Dönem Flask
Medyum	1 mM 5 dk α -tokoferol 0.4 mg/ml 5 dk Mitomisin C 0.2 mg/ml 5 dk 5-FU 10 (-5) M 5dk paklitaksel	1 mM 5 dk α -tokoferol+1mM 10 gün α -tokoferol 0.4 mg/ml 5 dk Mitomisin C+1mM 10 gün α -tokoferol 0.2 mg/ml 5 dk 5-FU+1mM 10 gün α -tokoferol 10 (-5) M 5dk paklitaksel+1mM 10 gün α -tokoferol

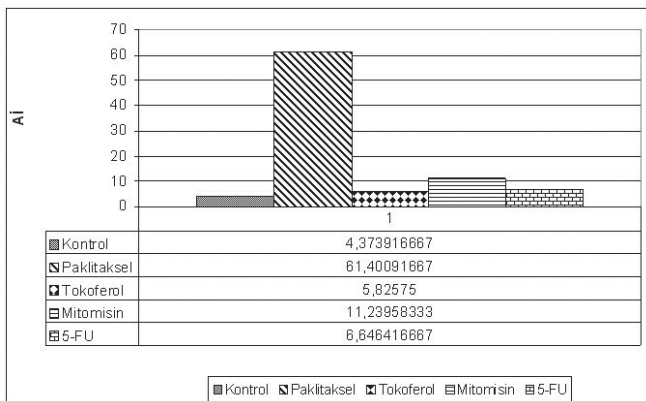
nukleus sayımları yapılarak, apoptotik indeks (AI) değerleri saptandı. Apoptoza girmiş olan hücrelerin moleküler düzeyde belirlenebilmesi için ilk aşamada kontrol ve deney gruplarından total RNA izolasyonları RNA izolasyon kiti (Total RNA Kit, Renogen) kullanılarak gerçekleştirildi. *Bcl-2* anlatımı ve genin RT-PCR kullanılarak çoğaltılması için, izole edilen total RNA'lar kullanılarak Apo Primer Set (*Bcl-2* ailesi) kiti (ApoPrimer Set *Bcl-2* family, TAKARA) yardımıyla *Bcl-2* gen ailesine ait 7 gen (*mcl-1*, *bfl-1*, *bax-α*, *bcl-2*, *bak*, *bik* ve *bcl-x*) RT-PCR (RT-PCR Kit, Promega) ile çoğaltılarak apoptozun engellenip engellenmediği moleküler düzeyde belirlendi. Sonuçlar *Bcl-2/Bax* oranı olarak ifade edildi. PCR sonuçlarında numerik bir değer verilmediğinden, bazçifti şeklinde ekspresyon seviyesi görsel olarak yazıldı.

İmmunohistokimyasal yöntem ile hücrelerin kaspaz aktivitelerinin incelenebilmesi için, ilk önce endotel hücreleri lam üzerinde fiksatif ile fiske edildi. Fiksasyondan sonra çıkıcı alkol serilerinden geçirilerek hücrelerden suyun çekilmesi sağlandı. Daha sonra kaspaz 3 işaretlenmesi için anti-caspase antikorlar eklendi. Lamlar bir gece 56°C'de tutulduktan sonra, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek suya kadar getirildi. Lamlardaki hücreler, iyileştirme amaçlı sitrat tamponu içerisinde mikrodalgada iki kez beşer dakika olmak üzere 700 W'da tutulduktan sonra, 20 dakika oda ısısında soğutulmaya bırakıldı. Etanol muamelesinden sonra oluşan oksidatif stresi araştırmak için lipit peroksidasyonu ve nitrik oksit miktarına bakıldı. Soğutma işleminden sonra saf su ile yıkanan preparatların üzerindeki hücrelerin etrafı, pap pen

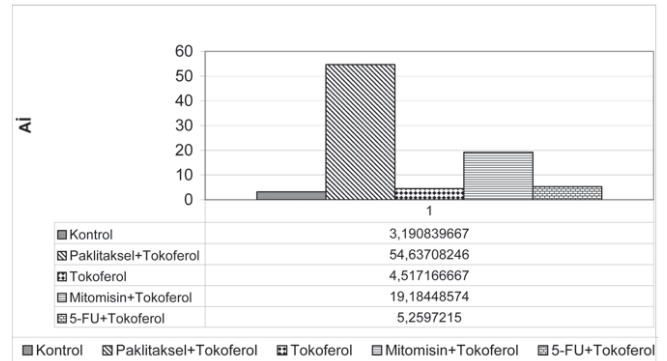
ile işaretlendi. Endojen peroksidaz aktivitesi, %3 H₂O₂ ile 10 dakika oda ısısında tutularak blokladı. Lamlar, distile sudan geçirildikten sonra fosfatlı tampon solusyon (PBS) ile 10 dakika yıkandı. Yıkamadan sonra lamlara, oda ısısında 5 dakika ultraviyole blokladı. Lamlar anti-caspase antikorlar ile oda ısısında, +4 °C'de veya etüvde inkübe edildi. PBS ile yıkanarak ikinci antikorla işaretli goat anti rabbit ile oda ısısında 30 dakika bekletildi. PBS ile tekrar yıkanarak DAB ile muamele edildi. Beş dakika inkübasyondan sonra reaksiyon ürünü sağlandı. Lamlar distile su ile yıkandıktan sonra, Mayer hemotoksilen ile zıt boyama yapılarak gliserol jelatin ile kaplandı. Preparatların santralinden 4er alan çalışılarak apoptotik hücre sayımları yapıldı.

Mitotik indeks (MI) tayini için deney gruplarına göre hazırlanan preparatlar önce oda sıcaklığındaki 1 NHCl ile 1 dk daha sonra 60°C deki 1 N HCl ile 10.5 dk hidroliz edildi. Hidroliz işleminden sonra preparatlara 1 saat boyunca Feulgen metodu uygulandı. Bu preparatların her birinden ortalama 30 alan ve en az 100 hücre değerlendirilerek, metafaz, anafaz ve telofaz evreleri sayıldı.

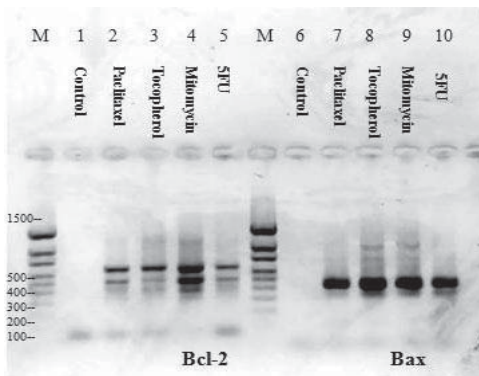
İstatistiksel analizde Mann Whitney u ve Fischer exact testleri kullanıldı. Kullanılan testler nonparametrik olduğundan 0.001'den düşük p değerleri istatistiksel açıdan anlamsız, yüksek olanlar ise anlamlı kabul edildi. PCR ile numerik değer verilemediğinden, *Bcl-2/Bax* oranları istatistiksel olarak değerlendirilmedi.



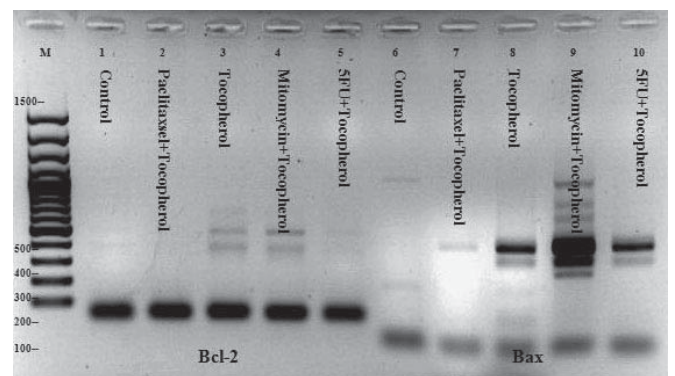
Resim 1a: 24 saat AI sonuçları.



Resim 1b: Uzun dönem kombine AI sonuçları.



Resim 2a: 24 saat PCR sonuçları.

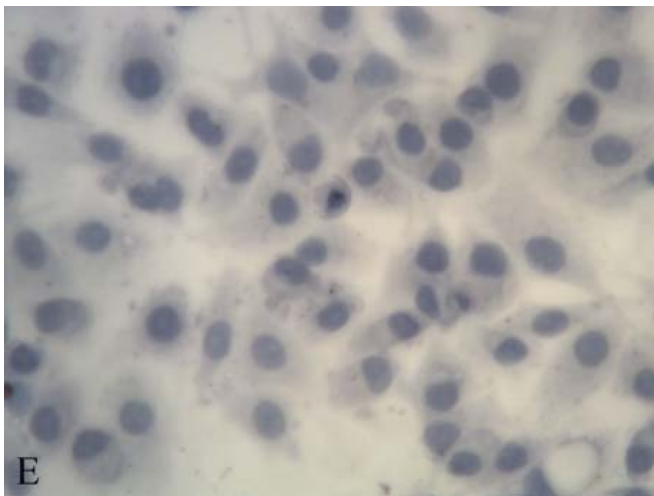
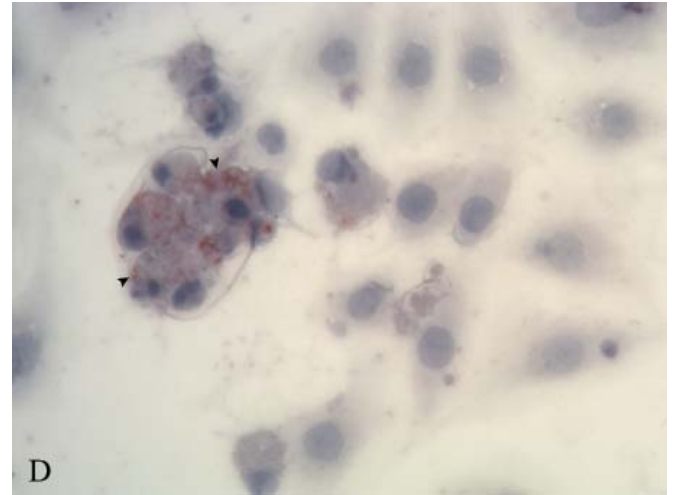
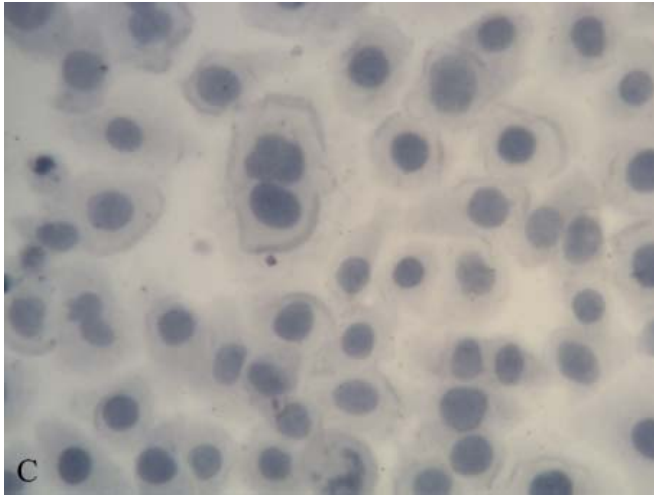
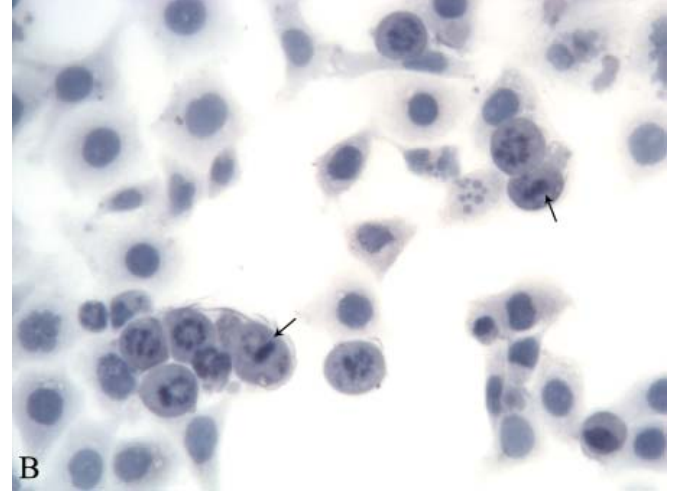
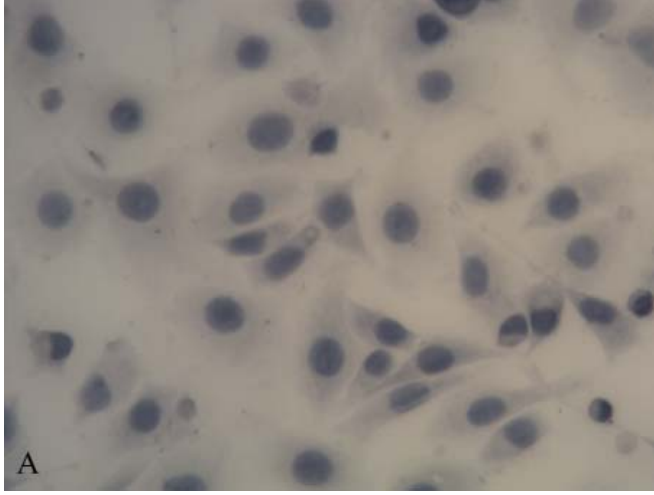


Resim 2b: Uzun dönem kombine PCR sonuçları.

BULGULAR

Tokoferol ve 5-FU e ait 24 saat Aİ değerleri kontrole göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmezken, mitomisin ve özellikle paklitakselde anlamlı yüksek bulundu (Resim 1A). Uzun

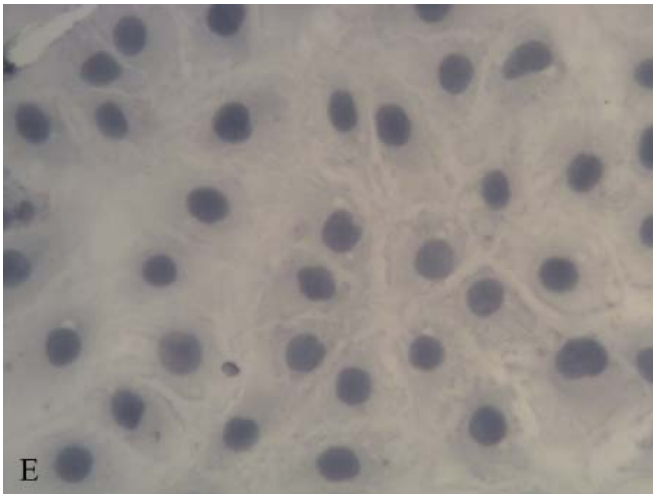
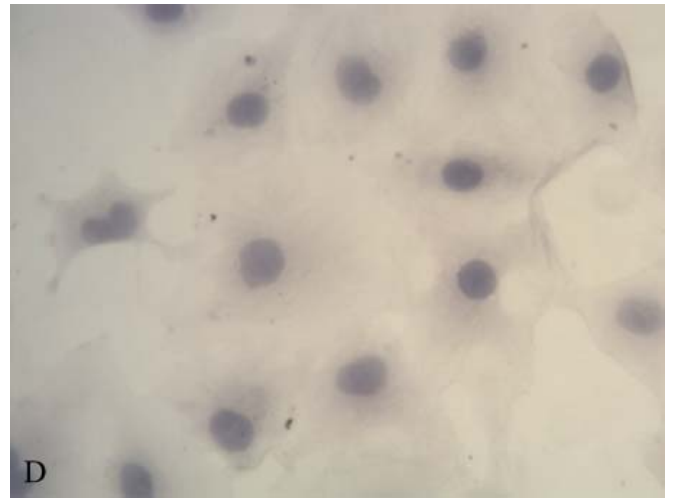
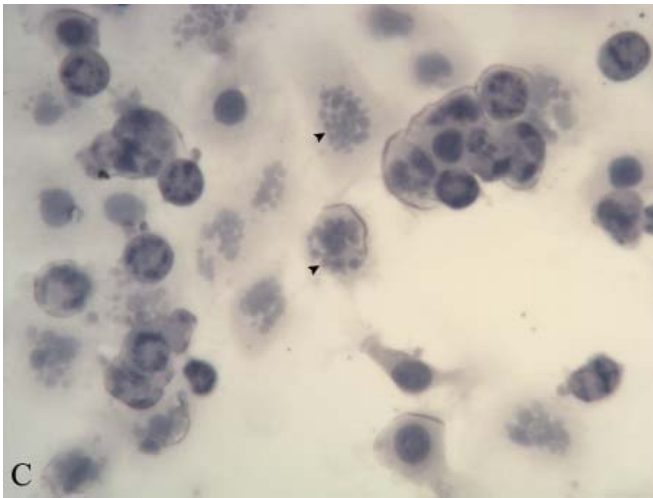
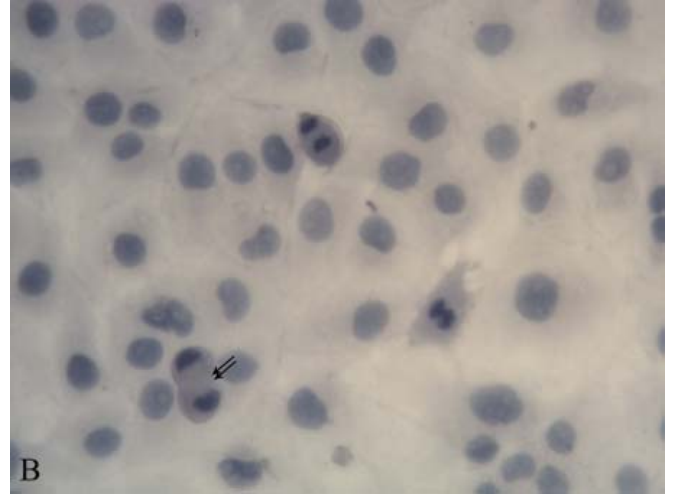
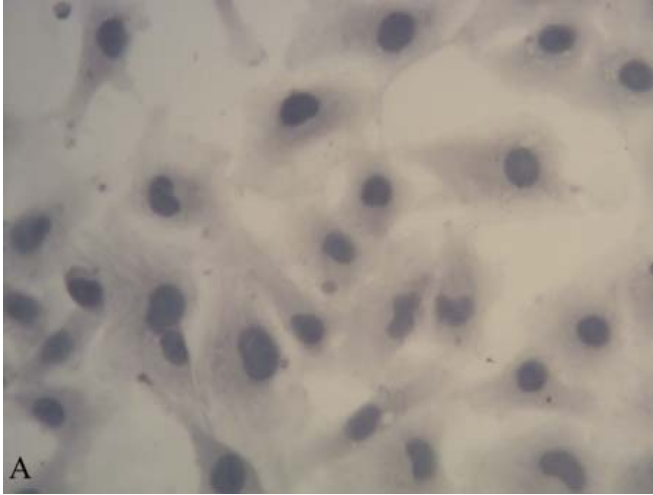
dönem sonuçlarında da aynı tablo gözlenirken, kısa ve uzun dönem sonuçları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Buna karşın, mitomisin endotel hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin uzun dönemde tokoferol ilavesi ile anlamlı derecede arttığı gözlemlendi (Resim 1B).



Resim 3A: Kısa süreli (5 dak.) inhibitör uygulandıktan 24 saat alınan örneklerde sadece Mitomisin C grubunda Cas 3 aktivitesi (▲) görülmektedir. Ayrıca alfa-tokoferol grubunda mitoz fazında oldukça fazla hücre (özellikle metafaz, →) dikkati çekmektedir : A-Kontrol, B-alfa tokoferol, C-Paklitaksel, D-Mitomisin, E- 5-FU. Büyütme, X200.

Diğer taraftan, paklitaksel Aİ açısından en toksik olmasına karşın, 24 sat ilaç uygulamasında ve uzun süreli sonuçlarda tıpkı Tokoferol ve 5-FU gibi, *Bcl-2/Bax* oranında bir artış sergilemedi. Buna karşın, mitomisin ile 24 saat ilaç uygulamasında overexpression gözlenirken bu duyarlılık artışının uzun süreli sonuçlarda daha da arttığı görüldü (Resim 2A,B).

Kısa süreli (5 dak.) inhibitör uygulandıktan 24 saat alınan örneklerde sadece mitomisin grubunda kaspaz aktivitesi görüldü. Ayrıca tokoferol grubunda da mitoz fazında oldukça fazla hücre (özellikle metafaz) gözlemlendi (Resim 3A). 10 gün sonra alınan örneklerde ise kaspaz aktivitesi mitomisine ek olarak paklitaksel grubunda da görüldü. Gene alfa-tokoferol grubunda mitoz fazında oldukça fazla normal endotel hücresi (özellikle anafaz, telefaz) gözlemlendi (Resim 3B). Kısa dönem MI sonuçlarında (Resim 4A) Mitomisin ve 5-FU guruplarında mito-



Resim 3B: K10 gün sonra alınan örneklerde Paklitaksel ve Mitomisin C grubunda apoptoza uğrayan hücreler (\blacktriangle) net olarak görülmektedir. Gene alfa-tokoferol grubunda mitoz fazında oldukça fazla hücre (özellikle anafaz, telefaz, $\uparrow\uparrow$) dikkati çekmektedir : A-Kontrol, B-alfa tokoferol, C-Paklitaksel + alfa-tokoferol, D-Mitomisin + alfa-tokoferol, E- 5-FU + alfa-tokoferol. Büyütme, X200.

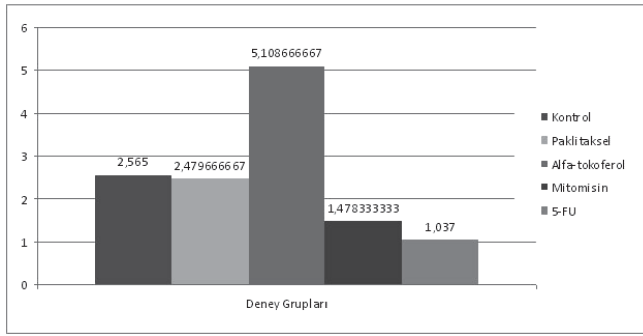
zun belirgin azaldığı gözlenmiş olmakla birlikte bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Buna karşın α -tokoferol uygulanan endotel hücrelerinde mitoz hızı anlamlı artmış bulundu. Bu guruplara 10 gün α -tokoferol uygulandığında ise paklitaksel hariç tüm guruplarda mi-

toz istatistiksel anlamlı biçimde düşerken, paklitaksel + α -tokoferol grubunda ise yine istatistiksel anlamlı bir artış gözlemlendi (Resim 4B).

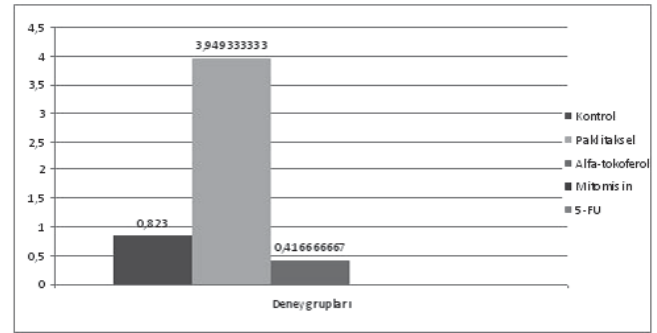
TARTIŞMA

Başta Glokom cerrahisi olmak üzere, oküler cerrahide antifibrotik kullanımı oftalmoloji disiplininin güncel konularından biridir. Her ne kadar fibroblastlar skar formasyonunun engellenmesi cerrah ve hasta için yüz güldürücü sonuçlar doğurmakta ise de, bu maddelerin yan etkileri ise klinik uygulamalarını ciddi biçimde sınırlamaktadır.¹⁷ Tümü korkutucu olan bu komplikasyonlarda endotel hasarı önemli rol oynar.²⁵ Bunun da ötesinde oluşan antiproliferatif etki kalıcı olmadığı gibi süreç içinde sabit de değildir.³¹ Uygulama sonrası dakikalar içinde humör aköz içinde gerekli konsantrasyonlara ulaşan antimetabolitler, buradaki büyüme faktörleri ile de temas geçerler. Postoperatif dönemde filtrasyon alanı humör aköz ve içindeki faktörler ile yıkanmaya başlarlar. Ve antimetabolitlerin antiproliferatif etkilerinin bu faktörlerce baskılandığı gösterilmiştir.³²

Glokom cerrahisindeki antifibrotik etkisi in vitro ve in vivo gösterilmiş olan²⁴ E vitamininin oftalmolojideki koruyucu etkileri ise, her ne kadar antioksidan özellikleri üze-



Resim 4a: Kısa dönem MI sonuçları.



Resim 4b: Uzun dönem MI sonuçları.

rinde durulmuş ise de, göz dokularının hemen tümünde gösterilmiştir.^{33,34} Tavşan kornea endotelinin yaşam süresini 2 kat artırması bunlardan biridir.³⁵ Ancak E vitamini endotel hücreleri üzerindeki olası apoptotik etkileri üzerine yapılmış bir çalışma literatürde yoktur.

Kapiller endotel hücreler, glokom cerrahisinde anti-metabolit kullanımı hakkında in vitro çalışmalarda sitotoksitesite modeli olarak kullanılabilir.³⁶ Çalışmamız ise insan kaynaklı ven endotel hücreleri üzerinde yapılmıştır.

Bu çalışmada mitomisin ve paklitakselin apoptotik indeksi anlamlı bir biçimde artırması literatür ile uyumludur. Mitomisin^{37,38} ve paklitakselin^{22,39} kornea endotelinde gösterdikleri apoptotik etki bilinmektedir. 5-FU in endotel üzerine toksisitesi mitomisininden daha düşüktür.³⁶

Çalışmamızda, mitomisin endotel hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin uzun dönemde tokoferol ilavesi ile anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. E vitamini kemoterapide mitomisin etkinliğini artırıcı etkiye sahiptir.⁴⁰ Alfa tokoferolün kanser hücrelerinde apoptotik etki gösterdiği bilinmektedir.⁴¹⁻⁴³ Bunun ölüm reseptörü (DR5) yolu ile olduğu bildirilmiş olmakla birlikte,⁴² yayınların çoğunda normal⁴⁴ ve neoplastik⁴³ hücrelerde bu etkiden lipid peroksidasyonu bağlantılı pro-apoptotik Bax protein up-regülasyonu sorumlu tutulmuştur. Paradoxal olarak, Shah ve Sylvester⁴⁵ neoplastik meme epitelyum hücrelerinde apoptosisin geliştiğini, ancak pro-apoptotic proteinler Bid, Bax ve Bad'ın mitochondrial düzeyleri azalırken, anti-apoptotic proteinler Bcl-2 ve Bcl-xL de ise artma olduğunu göstermişler ve bundan hareketle Alfa tokoferol ve tokotrienole bağlı apoptotic etkinin mitochondrial stressden bağımsız olması gerektiğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda, Alfa-tokoferole bağlı anlamlı bir apoptotic etki gözlenmediği gibi, Bcl2/Bax oranları ve kaspaz aktivitelerinde de anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Buna karşın endotel hücre preparatlarında anlamlı bir proliferasyon gözlenmiştir ancak, bunu destekleyen veya aksi veri bildiren bir çalışma literatürde bulunamamıştır. Diğer taraftan, α -tokoferolün damar düz kas hücreleri üzerinde özgün antiproliferatif etki gösteren bir antiaterojen olduğu çok yönlü çalışmalar ile gösterilmiştir.⁴⁶

Mitomisin ile kısa ve uzun süreli sonuçlarda gözlenen duyarlılık artışını literatür ile uyumludur.⁴⁷ Paklitaksel Aİ açısından en toksik olmasına karşın, 24 saat ilaç uygulamasında ve uzun süreli sonuçlarda tıpkı Tokoferol ve 5-FU gibi, Bcl-2/Bax oranında bir artış sergilememesi ise, paklitakselin konfluent endotel hücre kültürlerinde Bcl2 suprese etkisine resistans görülmesi ile açıklanabilir.⁴⁸

Kısa dönem MI sonuçlarında mitomisin ve 5-FU gruplarında mitozun belirgin azaldığı gözlenmiş olmakla birlikte bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Bu bulgu literatürde mitomisin ile yapılan çalışmalar ile uyumludur. İnsan korneasında operasyon sırasında uygulanan %0.02 mitomisin ile corneal endotel veya limbal yara iyileşmesinde artma gözlenmemiş,⁴⁹ bu hücrelerde in vitro olarak da insan korneal endotel dansitesinde %61 azalma gözlenmiştir.⁵⁰ Ayrıca, lokal paklitaksel uygulanan insan safenöz ven kültürlerinde endotel kaynaklı neointimal hiperplazide azalma bildirilmiştir.³⁶

Antioksidan probukol üzerinde yapılan bir çalışmada 5-FU kaynaklı endotel hasarını azalttığı bildirilmiştir.⁵¹ Ancak α -tokoferol antioksidan olmanın ötesinde etkilere sahip bir molekül olduğundan,³ beklenildiği üzere daha komplike ve değişken sonuçlar elde edilmiştir. α -tokoferolün kombine kullanımının antifibrotiklerin endotel hücrelerindeki apoptotik etkilerini azaltmadığı görülmüştür. Özellikle paklitaksel ile daha fazla, mitomisin ile ise daha az olan apoptotik etki artışı araştırılmaya değerdir. 5-FU ve α -tokoferolün tek başına ve kombine uzun ve kısa süreli etkileri kontrol grubuna yakın olduğundan, endotel toksisitesi açısından kullanımları daha güvenlidir.

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Brigelius-Flohe R, Traber MG.: Vitamin E: Function ve metabolism. FASEB J. 1999; 13:1145-1155.
2. Sies H, Murphy ME.: Role of tokoferols in the protection of biological systems against oxidative damage. J Photochem Photobiol. 1991;8:211-218.
3. Traber MG, Packer L.: E vitamini beyond antioksidan function. Am J Clin Nutr. 1995; 62:1501-1509.
4. Kayden HJ, Traber MG.: Absorbtion, lipoprotein transport ve regulation of plasma concentrations of E vitamini in humans. J Lipid Res. 1993;34:343-358.

5. Nalecz K, Nalecz M, Azzi A: Isolation of α -tokoferol binding proteins from the cytosol of smooth muscle A7r5 cells. *Eur J Biochem.* 1992;209:37-42.
6. Traber MG: Determinants of plasma E vitamini concentrations. *Free Radic Biol Med.* 1994;16:229-239.
7. Urano S, Inomori Y, Sugawara T: Vitamin E: Inhibition of retinol induced hemolysis ve membrane stabilizing behavior. *J Biol Chem.* 1992; 267:18365-18370.
8. Suzuki YJ, Packer L: Inhibition of NF κ B activation by E vitamini derivatives. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;193:277-283.
9. Chatelain E, Boscobionik DO, Bartoli GM, et al.: Inhibition of smooth muscle cell proliferation ve protein kinase C activity by tokoferol s ve tocotrienols. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1176:83-89.
10. Tran K, Chan A: RRR-alpha tokoferol potentiates prostacyclin release in human endothelial cells. Evidence for structural specificity of tokoferol molecule. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1043:189-197.
11. Haas AL, Boscoboinik D, Mojon DS, et al.: E vitamini inhibits proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in vitro. *Ophthalmic Res.* 1996; 28:171-175.
12. Larrosa JM, Polo V, Ramirez T, et al.: alfa-tokoferol derivatives ve wound healing in an experimental model of filtering surgery. *Ophthalmic Surg Lasers.* 2000;31:131-135.
13. Pinilla I, Larrosa JM, Polo V, et al.: alfa-tokoferol derivatives in an experimental model of filtering surgery. *Ophthalmic Res.* 1999; 31:440-445.
14. Meyenberg A, Goldblum D, Zingg JM, et al.: Tocotrienol inhibits proliferation of human Tenon's s fibroblasts in vitro: a comparative study with E vitamini forms ve mitomycin C. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243:1263-1271.
15. Akyol N, Demir T, Kukner A, et al.: Effects of systemic octreotide, local mytomycine-C ve local corticosteroids on wound-healing reaction after glaucoma surgery. *Int Ophthalmol.* 2001;24:235-241.
16. Wilkins M, Indar A, Wormald R: Intra-operative mitomycin C for glaucoma surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; 19:CD002897.
17. Loon SC, Chew PT: A major review of antimetabolites in glaucoma therapy. *Ophthalmologica.* 1999;213:234-245.
18. Crowston JG, Akbar AN, Constable PH, et al.: Antimetabolite-induced apoptosis in Tenon's capsule fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:449-454.
19. Joseph J, Grierson I, Hitchings RA: Taxol, cytochalasin B ve colchicine effects on fibroblast migration ve contraction: a role in glaucoma filtration surgery? *Curr Eye Res.* 1989;8:203-215.
20. Jampel HD, Moon JI: The effect of paclitaxel powder on glaucoma filtration surgery in rabbits. *J Glaucoma.* 1998;7:170-177.
21. Goldsberry DH, Epstein RJ, Majmudar PA, et al.: Effect of mitomycin C on the corneal endothelium when used for corneal subepithelial haze prophylaxis following photorefractive keratectomy. *J Refract Surg.* 2007;23:724-727.
22. Avisar R, Avisar I, Bahar I, et al.: Effect of mitomycin C in pterygium surgery on corneal endothelium. *Cornea.* 2008;27:559-561.
23. Mac I, Soltau JB: Glaucoma-filtering bleb infections. *Curr Opin Ophthalmol.* 2003;14:91-94.
24. Lehmann OJ, Bunce C, Matheson MM, et al.: Risk factors for development of post-trabeculectomy endophthalmitis. *Br J Ophthalmol* 2000;84:1349-1353.
25. Mattox C: Glaucoma filtration surgery ve antimetabolites. *Ophthalmic Surg Lasers.* 1995;26:473-480.
26. Suzuki R, Nakayama M, Satoh N: Three types of retinal bleeding as a complication of hypotony after trabeculectomy. *Ophthalmologica.* 1999;213:135-138.
27. Nagata M, Kawazu K, Midori Y, et al.: Intracameral ve lenticular penetration of locally applied stable isotope-labeled vitamin E. *Jpn J Ophthalmol.* 2001;45:125-127.
28. Packer L: Protective role of E vitamini in biological systems. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1050-1055.
29. Takahashi O: Haemorrhagic toxicity of a large dose of α -, β -, γ - ve α tokoferol s, ubiquinone, β carotene, retinol acetate ve L-ascorbic acid in the rat. *Food Chem Toxicol.* 1995;33:121-128.
30. Werner AB, de Vries E, Tait SWG, et al.: Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with proapoptotic bak or bax. *J Biol Chem.* 2002;277: 22781-22788.
31. Seah SK, Prata JA Jr, Minckler DS, et al.: Mitomycin-C concentration in human aqueous humour following trabeculectomy. *Eye.* 1993;7:652-625.
32. Crowston JG, Wang XY, Khaw PT, et al.: Human serum reduces mitomycin-C cytotoxicity in human tenon's fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:946-952.
33. Aonuma H, Koide K, Masuda K, et al: Retinal light damage: protective effect of α -tokoferol. *Jpn J Ophthalmol.* 1997;41:160-167.
34. Fryer MJ: Evidence for the photoprotective effects of vitamin E. *Photochem Photobiol.* 1993; 58:304-312.
35. Neuwirth-Lux O, Billson F: Vitamin E and rabbit corneal endothelial cell survival. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1987;15:309-314.
36. Smith S, D'Amore PA, Dreyer EB: Comparative toxicity of mitomycin C ve 5-fluorouracil in vitro. *Am J Ophthalmol.* 1994; 118:332-337.
37. Chang SW: Early corneal edema following topical application of mitomycin-C. *J Cataract Refract Surg.* 2004;30:1742-1750.
38. Panda A, Pe'er J, Aggarwal A, et al.: Effect of topical mitomycin C on corneal endothelium. *Am J Ophthalmol.* 2008;145:635-638.
39. Schachner T, Steger C, Heiss S, et al.: Paclitaxel treatment reduces neointimal hyperplasia in cultured human saphenous veins. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007;32:906-911.
40. Kammerer C, Czermak I, Getoff N, et al.: Enhancement of mitomycin C efficiency by vitamin C, E-acetate ve beta-carotene under irradiation. A study in vitro. *Anticancer Res.* 1999;19:5319-5321.
41. Swettenham E, Witting PK, Salvatore BA, et al.: alfa-tocopheryl succinate selectively induces apoptosis in neuroblastoma cells: potential therapy of malignancies of the nervous system? *J Neurochem.* 2005;94:1448-1456.
42. Yu W, Park SK, Kline K et al.: RRR-gamma-tokoferol induces human breast cancer cells to undergo apoptosis via death reseptör 5 (DR5)-mediated apoptotic signaling. *Cancer Lett.* 2008; 259:165-176.
43. Khveuja KL, Kumar S, Varma N, et al.: Enhancement in alfa-tokoferol succinate-induced apoptosis by all-trans-retinoic acid in primary leukemic cells: role of antioksidan defense, Bax ve c-myc. *Mol Cell Biochem.* 2008;319:133-139.
44. Ronco MT, deAlvarez ML, Monti J, et al.: Modulation of balance between apoptosis ve proliferation by lipid peroxidation (LPO) during rat liver regeneration. *Mol Med.* 2002;8:808-817.
45. Shah SJ, Sylvester PW: Tocotrienol-induced cytotoxicity is unrelated to mitochondrial stress apoptotic signaling in neoplastic mammary epithelial cells. *Biochem Cell Biol.* 2005;83:86-95.
46. Özer NK, Şirikçi Ö, Taha S, Engin KN, et al.: Prevention of atherosclerosis by α tokoferol in smooth muscle cells by a mechanism involving signal transduction modulation. In: Özben T: Free radicals, oxidative stress ve antioksidans. NATO ASI Series A. Plenum press, New York, 1998:333-342.
47. Seki Y, Toba K, Fuse I, Sato N, et al.: In vitro effect of cyclosporin A, mitomycin C ve prednisolone on cell kinetics in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Res.* 2005; 115:219-228.
48. Mailloux A, Grenet K, Bruneel A, et al.: Anticancer drugs induce necrosis of human endothelial cells involving both oncosis and apoptosis. *Eur J Cell Biol.* 2001;80:442-449.
49. Liu CJ, Tsei CC, Chou JC, et al.: Combined trabeculectomy ve extracapsular cataract extraction with mitomycin C. 1997; 60:205-212.
50. Garweg JG, Wegmann-Burns M, Goldblum D: Effects of daunorubicin, mitomycin C, azathioprine ve cyclosporin A on human retinal pigmented epithelial, corneal endothelial ve conjunctival cell lines. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006;244:382-389.
51. Kinhult S, Albertsson M, Eskilsson J, et al.: Effects of probrucol on endothelial damage by 5-fluorouracil. *Acta Oncol.* 2003; 42:304-308.