



**INTERFERON ALFA’NIN ÇEŞİTLİ LÖSEMİK HÜCRELER ÜZERİNDE
GÖSTERDİĞİ ANTİTÜMÖR ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nilüfer GÜLMEN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

1997

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

INTERFERON ALFA'NIN ÇEŞİTLİ LÖSEMİK HÜCRELER ÜZERİNDE
GÖSTERDİĞİ ANTİTÜMÖR ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Nilüfer GÜLMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

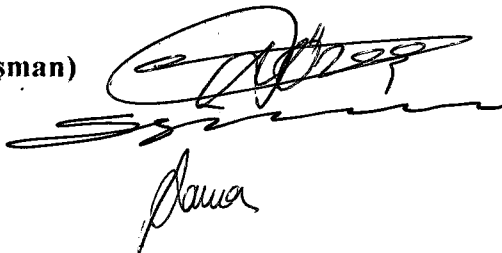
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 17/06/1997 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından not takdir edilerek
Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. O.Nidai ÖZEŞ (Danışman)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Burhan SAVAS



ÖZ

INTERFERON ALFA'NIN ÇEŞİTLİ LÖSEMİK HÜCRELER ÜZERİNDE GÖSTERDİĞİ ANTİTÜMÖR ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Nilüfer GÜLMEN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 1997, 57 + x Sayfa

Interferonlar, spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak viral replikasyonun inhibisyonu, hücre farklılaşmasının ve hücre çoğalmasının indüksiyonunda önemli rol oynarlar. Bu çalışmada, IFNalfa-con 1, 5-Flourourasil ve Hidroksiüre ile kombinasyonlarının çeşitli lökemik hücrelerde çoğalmayı durdurucu ve apoptosisi indükleyici aktivite gösterdiği bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: Lökemik hücre, Interferon, 5-FU, H.üre, sitotoksik etki, apoptosis, DNA fragmentasyonu.

Jüri: Doç. Dr. O.Nidai ÖZEŞ

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Burhan SAVAŞ

ABSTRACT

ANTITUMOR AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF INTERFERON ALPHA ON SEVERAL LEUKEMIC CELLS

Nilüfer GÜLMEN

M.S. in Biology

Adviser: Assoc. Prof. Dr. O.Nidai ÖZEŞ

June 1997, 57 + x pages

Interferons play an important roles in inhibition of viral replication, induction of cell differantiation and proliferation by binding to spesific cell surface receptors. In this study, it has been found that IFNalpha-con 1, 5-Florouracil, Hydroxyure and their combinations with each other show significant antiproliferative and apoptosis inducing activity on leukemic cells.

KEY WORDS: Leukemic cell, Interferon, 5-FU, H.ure, cytotoxic effect, apoptosis, DNA fragmentation.

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. O. Nidai ÖZEŞ

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Assist. Prof. Dr. Burhan SAVAŞ

ÖNSÖZ

Bu çalışma, lösemili hastalarda IFN α , 5-Florourasil ve Hidroksiüre'nin tedavide kullanılmasına katkı sağlaması amacıyla yapılmıştır. Çalışma sonucunda ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının tıp dünyasına faydalı olacağı ümit edilmektedir.

Çalışma konumu belirleyen ve çalışmalarım boyunca hiçbir yardımını esirgemeyen akademik danışmanım Sayın Doç. Dr. O. Nidai ÖZEŞ'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca Akdeniz Üniversitesi'ne de teknik donanımlarından ötürü teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. İnterferonlar ve Özellikleri	1
1.2. İnterferon Alfa Sinyal İletim Mekanizması	3
1.3. Kronik Myelogenik Lösemi ve İnsan Burkitt Lenfoma	5
1.3.1. Kronik Myelogenik Lösemi	5
1.3.2. İnsan Burkitt Lenfoma	7
1.4. Apoptosis Nedir, Nasıl Gözlenir ve Apoptosis İndükleyicileri ve İnhibitörleri	8
1.5. İnterferon Alfa'nın Terapide Kullanımı	13
2. MATERYAL ve METOD.....	16
2.1. Materyal	16
2.1.1. Hücreler ve Kültürasyonları.....	16
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Sitokin ve Kemoterapikler	17
2.2. Metod	18
2.2.1. PRO.ML Hücrelerinin İzolasyonu	18
2.2.2. Büyüme İnhibisyonunun Ölçülmesi.....	18
2.2.3. DNA İzolasyonu ve Jel Elektroforezi	20
3. BULGULAR	21
3.1. Büyüme İnhibisyonu	21
3.2. DNA Fragmentasyonu	41

4. TARTIŞMA	48
5. SONUÇ	50
6. ÖZET	51
7. SUMMARY	52
8. KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	57



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
kDa	Kilodalton
U	Unit
ml	Mililitre
mg	Miligram
ng	Nanogram
μ g	Mikrogram
$^{\circ}$ C	Derece Santigrat
nm	Nanometre
mAmp	Miliamper

Kısaltmalar

IFN	İnterferon
Tyk 2	Tirozin kinaz 2
Jak 1	Janus kinaz 1
STAT	Signal Transducer as well as Activators of Transcription
ISGF 3	Interferon Stimulated Gen Factor 3
ISRE	Interferon Stimulated Respond Element
mRNA	Messenger RNA
DNA	Deoksiribonükleikasit

TNF	Tumor Necrosis Factor
5-FU	5- Fluorourasil
H.U	Hidroksiüre
UV	Ultraviyole
PMA	Phorbol Myristat Asetat
HCL	Hairy Cell Leukemia (Saçlı hücre lösemisi)
NK	Naturel killer
B-CLL	B-Chronic Lymphoblastic Leukemia
PRO.ML	Promyelocyte
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
PBS	Phosphate Buffered Saline
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojen fosfat
KH ₂ PO ₄	Dihidrojen potasyum fosfat
CO ₂	Karbondioksit
Tris.HCl	Tris Hidroklorik asit
SDS	Sodyum Doedesil Sülfat
OD	Optik Densite
SF	Sulandırma Faktörü

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İnterferon Tipleri ve Özellikleri	2
Çizelge 1.2. Apoptotik Hücre Ölümü İçin Kuramsal Model	9
Çizelge 2.1. Daudi Hücreleri İçin Kullanılan Sitokin ve Kimyasalların Konsantrasyonları	18
Çizelge 2.2. K562 ve PRO.ML Hücreleri İçin Kullanılan Sitokin ve Kimyasalların Konsantrasyonları	19

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İnterferon Alfa Sinyal İletim mekanizması	4
Şekil 1.2 Kronik Myelogenous Lösemi	6
Şekil 1.3. Hücre Çoğalması ile Hücre Ölümü Arasındaki Denge	10
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan Daudi hücrelerinin inverted mikroskopta görünümü	16
Şekil 2.2. 5-FU'in kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.3. Hidroksiüre'nin Kimyasal Yapısı	17
Şekil 3.1. IFN α -con 1' in Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki.....	26
Şekil 3.2. 5-Florourasil'in Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki.....	27
Şekil 3.3. Hidroksiüre'nin Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki	28
Şekil 3.4. IFN α -con 1 + 5-Florourasil'in Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki	29
Şekil 3.5. IFN α -con 1 + Hidroksiüre'nin Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki	30
Şekil 3.6. IFN α -con 1'in K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki.....	31
Şekil 3.7. 5-Florourasil'in K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki.....	32
Şekil 3.8. Hidroksiüre'nin K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki	33
Şekil 3.9. IFN α -con 1 + 5-Florourasil'in K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki	34
Şekil 3.10. IFN α -con 1 + Hidroksiüre'nin K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki.....	35
Şekil 3.11. IFN α -con 1' in PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki.....	36
Şekil 3.12. 5-Florourasil'in PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki.....	37
Şekil 3.13. Hidroksiüre'nin PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki	38
Şekil 3.14. IFN α -con 1 + 5-Florourasil'in PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki.....	39
Şekil 3.15. IFN α -con 1 + Hidroksiüre'nin PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki.....	40

Şekil 3.16. Daudi Hücrelerinde IFN α -con 1'in Apoptosisi İndüksiyonu	43
Şekil 3.17. Daudi Hücrelerinde 5-Florourasil'in Apoptosisi İndüksiyonu	44
Şekil 3.18. Daudi Hücrelerinde Hidroksiüre'nin Apoptosisi İndüksiyonu.....	45
Şekil 3.19. IFN-con 1'in sabit dozunun 5-FU'in değişen konsantrasyonlarıyla Daudi Hücrelerinde Apoptosisi İndüksiyonu	46
Şekil 3.20. IFN-con 1'in sabi dozunun HU'nin değişen konsantrasyonlarıyla Daudi Hücrelerinde Apoptosisi İndüksiyonu	47



1.GİRİŞ:

1.1. İnterferonlar ve Özellikleri

İnterferonlar (IFN) ilk kez 1957 yılında Isaac ve Lindenmann tarafından antiviral bir molekül olarak tanımlandılar (Isaac ve Lindenmann 1957). Yaptıkları deneyde Isaac ve Lindenmann, tavuk yumurtasının korioallontoik membranını ısı kullanılarak inaktif edilmiş Influenza virüsü ile infekte ettiler. Daha sonra bu korioallontoik membranı canlı influenza virüsü ile infekte etmeye çalıştılar, ancak bunda başarılı olamadılar ve ilk olarak canlı influenza virüsü ile infekte edilen korioallontoik membranın virüs üremesini engelleyen bir madde yapmış olacağını düşünerek bu maddeyi **İnterferon** olarak tanımladılar (Isaac ve Lindenmann 1957). Bu tarihsel buluşun ardından, interferonlar bütün omurgalı hayvanların dokularında gösterilmiştir. Her ne kadar interferonlar başlangıçta antiviral bir molekül olarak tanımlandıysa da interferonların hücre metabolizmasının ve büyümesinin kontrolü ve immün sistemin aktive edilmesinde de etkili oldukları saptanmıştır (Baron vd. 1992).

İnterferonlar Tip I ve Tip II olmak üzere iki temel grupta toplanırlar. Tip I İnterferonlar IFN- α (alfa) ve IFN- β (beta), Tip II İnterferon ise IFN- γ (gama)'dır (Çizelge 1.1.1). IFN- α 20 dolayında bir gen ailesinden meydana gelir, bunların 14 tanesi aynı fizyolojik özelliğe sahip ancak birkaç aminoasit değişikliği gösteren IFN- α proteinlerini kodlarlar, diğer IFN- α genleri "pseudogen" durumundadır. Bütün IFN- α genleri 9. kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize olmuşlardır ve intron içermezler. IFN- β sadece bir gen tarafından kodlanır. Bu gen de 9. kromozomun kısa kolu üzerinde lokalize olmuştur ve intron içermez. IFN- α ve IFN- β 189 aminoasit uzunluğunda bir polipeptit olarak sentezlenirler, ancak bunların hücre dışına salınımı sırasında 23 aminoasitlik sinyal peptidi koparılır ve fonksiyonel olan 166 aminoasitlik protein dolaşım sistemine verilir. IFN- γ bir gen tarafından kodlanır ve bu gen 12. kromozomun uzun kolu üzerinde lokalize olmuştur ve üç intron içerir (Weissman ve Weber 1986, Roberts 1989).

İnterferonlar, sağlıklı bir insan vücudunda pikomolar konsantrasyonda devamlı olarak bulunurlar. Ancak vücuda giren bakteri, virüs, antijenler ya da vücutta gelişen tümörlere karşı bir cevap olarak miktarları arttırılır. Böyle bir durumda lökositler IFN- α 'yı, fibroblastlar IFN- β 'yı, monosit ve T-lenfositler de IFN- γ 'yı sentezleyerek kan dolaşım sistemine salarlar.

İnterferonlar etkinliklerini hücre yüzeyinde bulunan özgün reseptörlere bağlanarak gösterirler. Bu özellikleri bakımından bir hormon olarak kabul edilirler. IFN- α ve IFN- β aynı reseptöre bağlanarak aynı tip sinyalin yaratılmasına sebep olur. IFN- γ ise tamamen farklı bir reseptöre bağlanır ve farklı bir sinyalin yaratılmasını sağlar (Weissman ve Weber 1986, Branca ve Baglioni 1981). İnterferonların spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması, hücrelerde viral replikasyonun inhibisyonu, hücre farklılaşmasının ve hücre proliferasyonunun indüksiyonu gibi çeşitli fizyolojik cevaplar oluşturur (Xu, Grander, Sangfelt ve Einhorn, 1994).

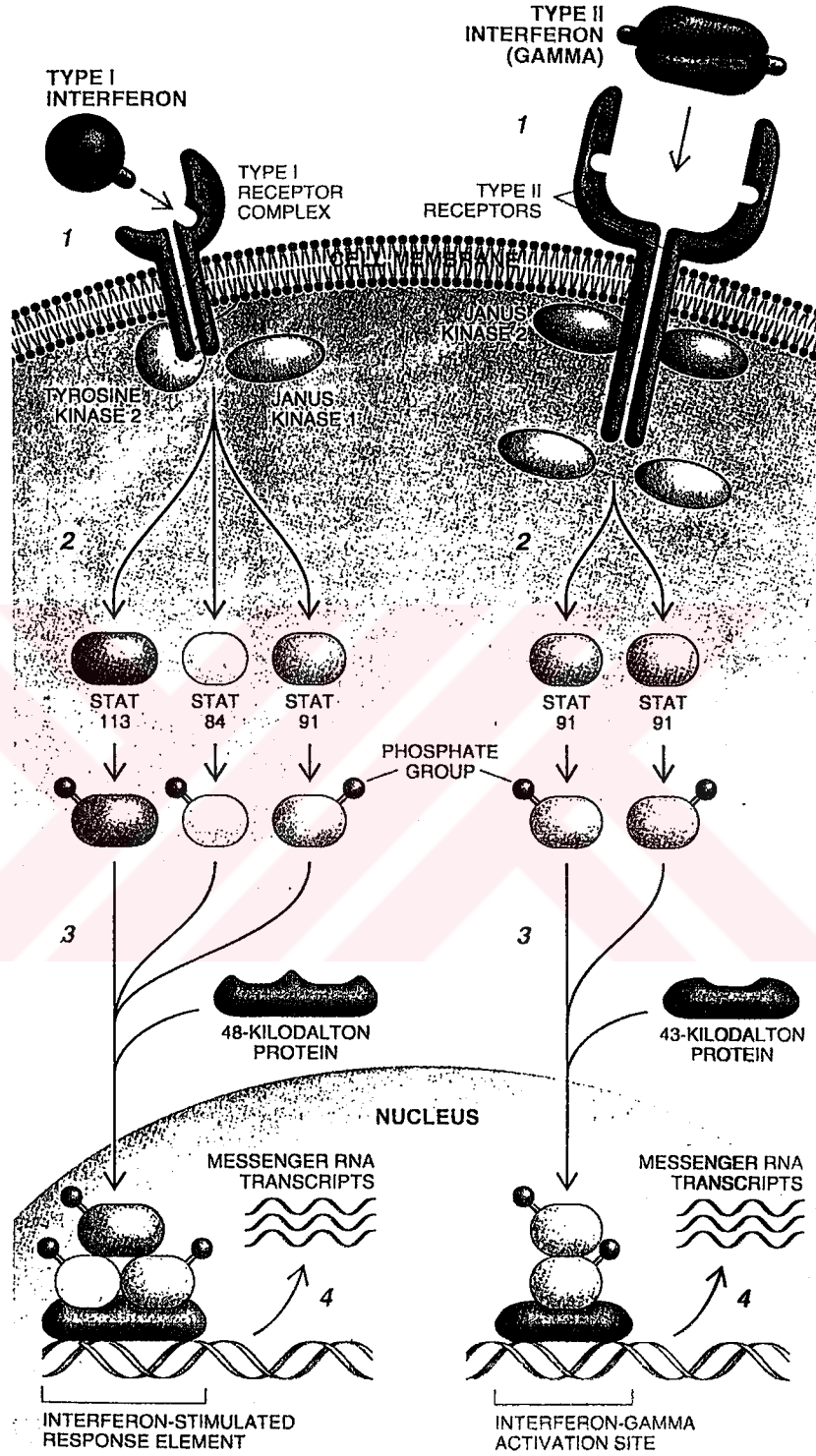
Çizelge 1.1 İnterferon Tipleri ve Özellikleri

	<u>IFN-α</u>	<u>IFN-β</u>	<u>IFN-γ</u>
Gen Sayısı	20...	1	1
Lokasyon	9.kromozomun kısa kolu	9.kromozomun kısa kolu	12.kromozomun uzun kolu
İntron Sayısı	-	-	3
Aminoasit Sayısı	189	189	146
Glikolizasyon	-	-	+
pH Dayanıklığı	+	+	-
Reseptör	Tip I	Tip I	Tip II
Molekül	15-20	20	20
Büyüklüğü (kDa)			

1.2. İnterferon Alfa Sinyal İletim Mekanizması

İlk keşfedildiklerinden günümüze kadar interferonlar üzerinde yapılan çalışmaların çoğu interferonların gen indüksiyonunu nasıl bir mekanizma ile yaptıkları konusunda olmuştur. Bu çalışmalar sonucunda TipI ve TipII interferonların gen indüksiyon mekanizmalarının farklı olduğu ortaya çıkarılmıştır (Şekil 1.2.1.).

Vücuda giren bakteri, virüs, antijenler ya da vücutta gelişen tümörlere karşı bir cevap olarak lökositler tarafından sentezlenip kan dolaşımına salınan IFN- α hücre yüzeyindeki TipI reseptör kompleksine bağlanır. Darnell ve grubu 1992’de, bu bağlanmanın reseptörün hücre içi bölgesine atak yapan “Tirozin kinaz 2” (Tyk 2) enziminin aktivasyonu sonucunda gerçekleştiğini göstermiştir (Pellegrini ve Schindler 1993). Bu çalışmanın ardından Londra’daki “Imperial Cancer Research Fund” laboratuvarından Ian M. Kerr, IFN- α ’nın reseptörüne bağlanması, Janus Kinaz 1 (JAK 1) enziminin aktivasyonunun da öncülük ettiğini göstermiştir (Johnson vd. 1994). Bu kinazlar, molekül ağırlığı 113, 91 ve 84 kilodalton olan STAT proteinlerini fosforile eder. Fosforile olan bu proteinler birleşerek ISGF3- α üçlü kompleksini oluştururlar ve daha sonra sitoplazmada hazır bulunan 48 kilodaltonluk proteinle (ISGF3- γ) birlikte ISGF3 (İnterferon Stimulated Gen Factor 3) transkripsiyon faktörünü oluştururlar. Bu faktör nukleusa geçerek buradaki bir genin (IFN ile indüklenebilen gen) promotor bölgesindeki “İnterferon Stimulated Respond Element” (IFN uyarısına cevap verebilen element) anlamına gelen **ISRE** dizisine bağlanarak bu genden transkripsiyonu başlatır. Transkripsiyon sonucu oluşan mRNA’lardan yaklaşık 30 yeni protein sentezi gerçekleşir. İnterferonlar antiviral ve antiproliferatif özelliklerini gösterme işini bu 30 yeni proteinin sentezini sağlayarak yaparlar (Johnson vd. 1994).



Şekil 1.1 Interferon Alfa'nın Sinyal İletim Mekanizmasının Şematik Görünümü

1.3. Kronik Myelogenik Lösemi ve İnsan Burkitt Lenfoma

Çalışma boyunca kullanılan hücrelerden K562 ve PRO.ML hücreleri Kronik Myelogenik Lösemi, Daudi hücreleri ise İnsan Burkitt Lenfoma kökenlidirler.

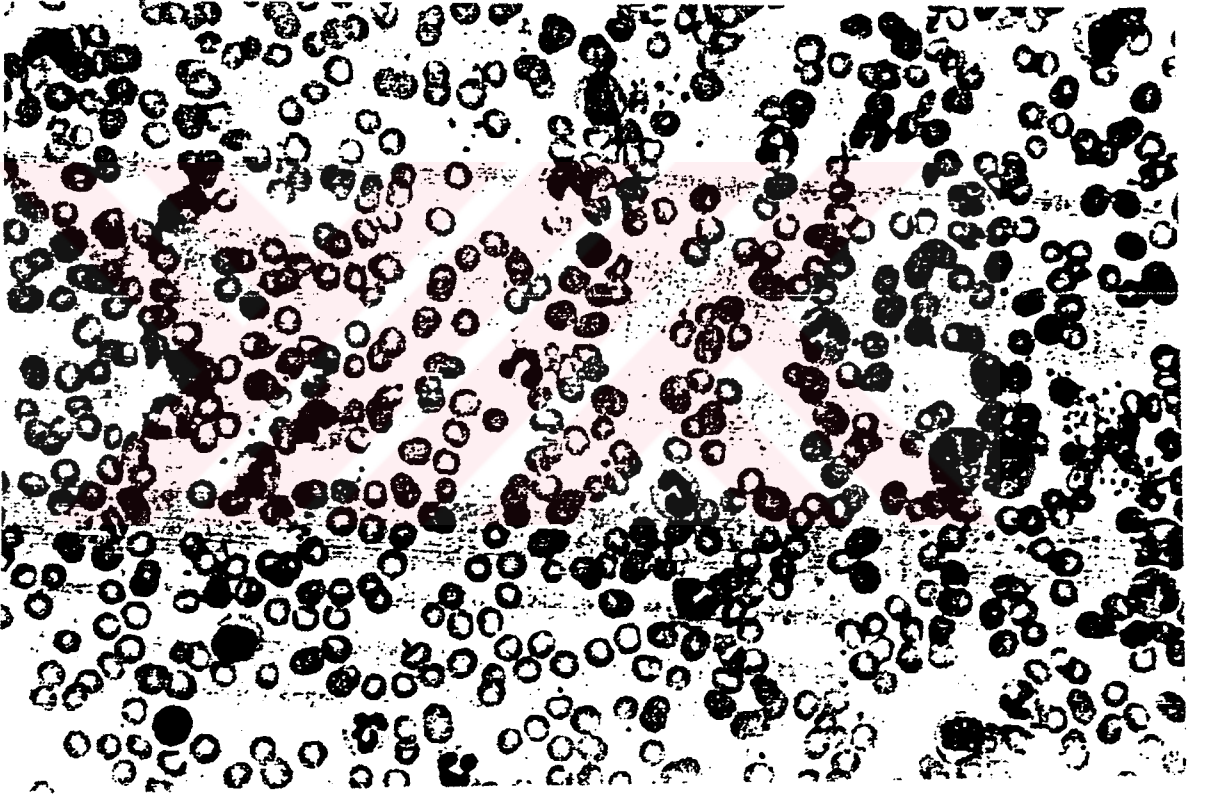
1.3.1. Kronik myelogenik lösemi (CML)

CML (Kronik Myelogenik Lösemi), ilk kez Virchow (1845), Craigie (1845) ve Bennett (1845) tarafından tanımlanmıştır (Şekil 1.3.1.1). Bu hastalığın önemli özelliklerini içeren en iyi tanımlama Craigie'nin yaptığı tanımlamadır: “neşesizlik,... sol epigastrik bölgede şişme ve sertleşme,... geceleri terleme,... kan damarlarının lenf ya da irin içeren pıhtı ile kaplanması”. Ayrıca, CML myeloid hiperplazi ve dalak büyümesi ile karakterize edilir ve son safhasında blast krizi olarak bilinen akut lösemiye dönüşür.

Lökemik hücrelerin sitogenetik analizlerinde olduğu gibi G6PD (Glikoz 6-Fosfat Dehidrojenaz)'a heterozigotluk gösteren CML'li kadınlarda yapılan izoenzim çalışmaları, tek bir pluripotent hematopoietic kök hücresinin neoplastik transformasyonu ile ortaya çıkan klonal bir hastalık olduğuna dair delilleri oluşturmuştur. 1960'larda Fialkow tarafından yapılan işaretleme çalışmaları G6PD'a heterozigotluk gösteren CML'li hastalardan izole edilen eritroid ve granulosit hücrelerinin sadece bir izoenzimi ekspres ettiklerini göstermiştir (Fialkow 1967). Ayrıca lökemik hastalardan alınan bazı B-lenfositler, kırmızı hücreler, granulositler, monositler, megakaryositler ve makrofajlar karakteristik olarak Ph kromozom içerme bakımından pozitifirler.

CML bir kronik myeloproliferatif hastalıktır ve farklılaşmış hücrelerin aşırı büyümesi ve genişlemesiyle de karakterize edilir. CML'li hastalarda granulositlerin ve eritrositlerin in vitro olarak çoğalması için büyüme faktörlerine ihtiyaç duyması, bu hastalıkta normal düzenleme mekanizmalarının kısmen işlememesini desteklemektedir (Metcalf 1974).

CML, ABD'deki tüm kanser hastalıklarının yaklaşık %0.4'ünü oluştururken Batı ülkelerinde sadece lösemilerin %20'sini oluşturmaktadır (Koeffler 1981, Spiers 1984). CML çocukluk devresinin hastalığı olarak rapor edilmesine rağmen yaş piki 50-60 arasındadır ve cinsiyet ayrımı yoktur.



Şekil 1.2 Kronik Myelogenous Lösemi (Chikkappa 1976)

1.3.2. İnsan burkit lenfoma

Lenfomalar, lenforetikular kök hücreleri, lenfositler, retikulum hücreleri ya da histiositler gibi lenfoid sistem hücrelerinin bir veya daha fazla tipinin aşırı çoğalmasıyla karakterize edilen birbirine yakın hastalıkları içeren bir gruptur. Hastalığın ilerlemesi sırasında malignant (tümör) hücreler kan dolaşımına girebilir. Bu giriş hastalığın lösemik fazını oluşturur.

Çoğu lenfomanın etiyolojisi (oluşma sebepleri) bilinmemesine rağmen immunolojik, çevresel ve genetik faktörleri açıklanmıştır. İnsan Burkitt lenfoma, Epstein-Barr virüs ve gençlerde görülen T-hücre lenfomalarının öğrenilmesindeki artış Hodgkin's hastalığını içeren diğer lenfomaların patojenesisinde bir virüsün potansiyel rolü hakkındaki gelecek spekülasyonları teşvik eder.

Burkitt lenfomanın sitogenetik analizlerinde, 14. kromozomun uzun kolunun sonunda ek bir bant olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra bu ek bant, 14. kromozomla 8. kromozom arasındaki bir translokasyon olarak ayırtedilmiştir. 8-14. kromozomlar arasındaki translokasyon diğer bazı lenfomalarda da görülmesine rağmen bu translokasyon özellikle Burkitt lenfomanın karakteristiği olarak düşünülmektedir (Turgeon 1988).

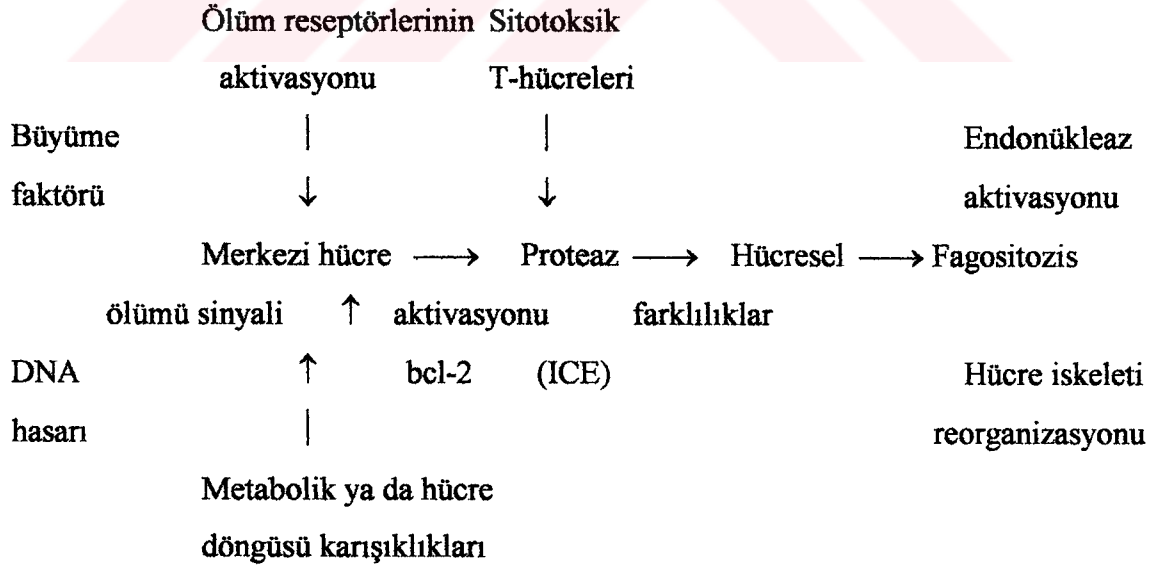
1.4. Apoptosis Nedir, Nasıl Gözlenir ve Apoptosis İndükleyicileri ve İnhibitörleri 1.4.1. Apoptosis nedir, nasıl gözlenir

Hücre ölümü şu anda üzerinde oldukça çalışılan bir saha durumundadır. Apoptosisin neden olduğu aktif hücresel yıkımın Wyllie ve ark. (1980), tarafından çalışılmasıyla programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptosis, hücre biyolojisinde özellikle immunoloji ve onkolojide ana konuların büyük bir parçası haline gelmiştir (Williams ve Smith 1993).

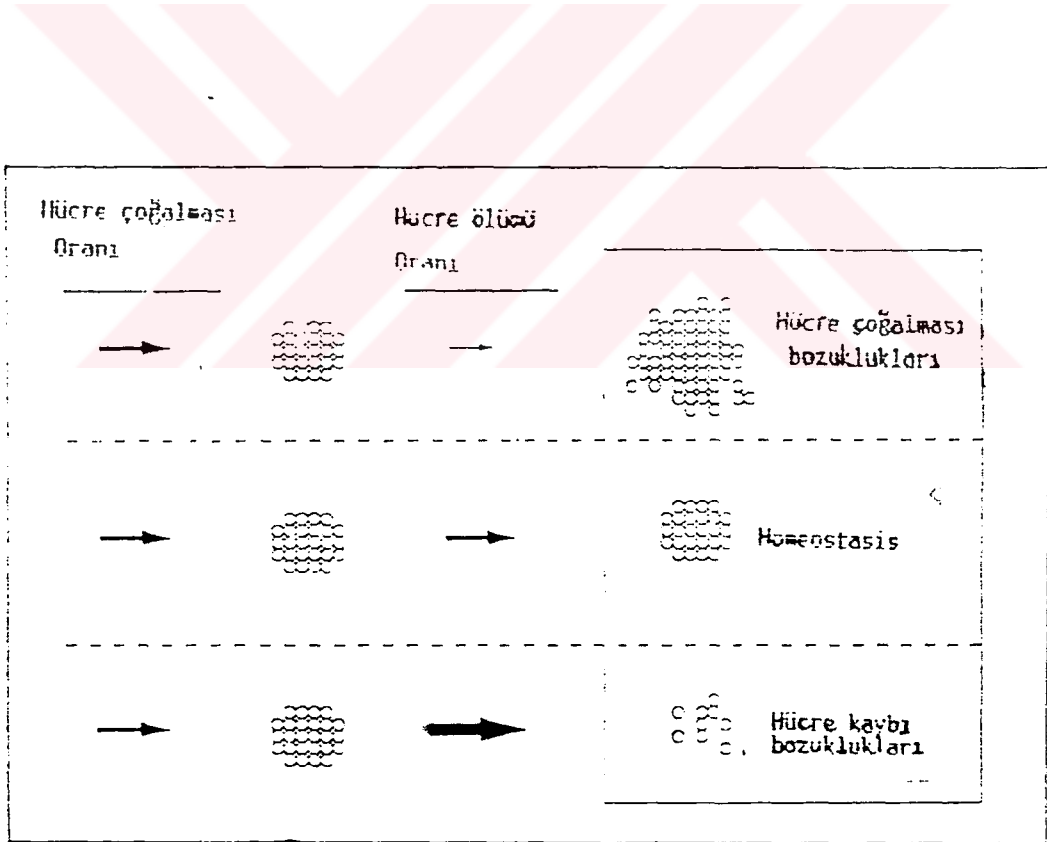
Apoptosis embriyogenesis, immün cevap, doku bağımlı hormon sentezi ve normal doku homeostasisi sırasında hücre sayısını kontrol eden hücre ölümünün normal fizyolojik prosesidir (Duvall ve Wyllie 1986, Walker vd. 1988). Necrosis'den farklı olarak apoptosis sırasında hücrede genomik DNA uzunluğu en az 180 nükleotit olan fragmentlere ayrılır (Cohen ve Duke 1984). Apoptotik hücre ölümü nekrotik hücre ölümünden ayırtedilebilmektedir. Nekrotik hücre ölümü hücrenin hızla şişmesi ve lizisi ile sonuçlanan hücre ölümünün patolojik bir formudur. Buna karşılık, apoptotik hücre ölümü hücrenin "oto sindirim" kontrolüyle karakterize edilir. Hücreler, hücre içi proteazların aktivasyonu ile kendi apoptotik ölümünü başlatmak için ortaya çıkarlar. Bu, hücre iskeleti bozuklukları, hücre kayıpları ve membranda kabarcıklarla sonuçlanır. Apoptosis çekirdekteki karakteristik değişiklikleri de içine alır. Çekirdek yoğunlaşmaya başlar ve endonukleazlar aktive olarak DNA'yı parçalamaya başlarlar. Çoğu hücre tiplerinde DNA, oligonukleozomlar halinde DNA fragmentlerine ayrılır (Wyllie vd. 1980). Gelişen deliller, immün defans mekanizmaları ya da doku spesifik homeostatik kontroller boyunca apoptosisin indüksiyonunun gelişmemiş tümör hücrelerinin elimine edilmesi için önemli bir yol olduğunu iddia eden teoriyi desteklemektedir. Böylece apoptosise resistantlığın kazanılması, oluşan tümörlere bir avantaj sağlayacaktır. Bu hipotez, apoptosisten korunabilen onkogenlerin ekspresyonu (örneğin, bcl-2) ve mutant tümör baskılayıcı genlerden p53'ün bulunmasıyla desteklenmiştir (Wright vd. 1994).

Ölmekte olan bir hücre kendi plazma membranının bütünlüğünü korur. Bununla birlikte apoptotik hücrelerin plazma membranındaki değişiklikler yakınındaki fagositik hücrelere onları içine almaları için bir sinyal oluşturur ve böylece hücresel yıkım başlar. Hücreler hemen fagosit olma, önce “Apoptotik bodies” denilen küçük membran-bound fragmentlerine ayrılırlar. Apoptosisin önemli bir özelliği de herhangi bir teşvik edici cevap olmaksızın ölmekte olan hücrenin eliminasyonu ile sonuçlanmasıdır. Çoğu dokularda hücre canlılığı, hücre dışı matriks ve komşu hücreler tarafından verilen canlılık sinyallerinin sürekli olarak sağlanmasına bağlı olarak görünmektedir (Raff vd. 1993). Birçok organdan alınan hücreler exogenous yaşamsal faktörlerin varlığında kültüre edildiğinde apoptosise maruz kalacaktır. Bu durumlarda ölüm, çoğu hücre tiplerinde apoptosis aracılığıyla express edildiği gösterilen yeni proteinlerin sentezinin varlığında bile ortaya çıkar. Bu sonuçların bir yorumu da çevreden sürekli olarak ya da uygun aralıklarla yaşamsal sinyaller alınmadığında çoğu hücrelerin toplu intihara programlanmış olmasıdır (Thompson 1995).

Çizelge 1.2 Apoptotik Hücre Ölümünün Regülasyonu İçin Kuramsal Model



Çok hücreli organizmalarda, homoestasis hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki bir denge ile sağlanmaktadır (Şekil 1.3). Hücre çoğalması hakkında çok şey bilinmesine rağmen hücre ölümü hakkında pek fazla şey bilinmemektedir. Fizyolojik hücre ölümü, başlangıçta hücre intiharının evrimsel korunmuş formu olarak ortaya çıkmış ve Apoptosis olarak adlandırılmıştır. Apoptosis, hücre büyümesinin sınırlandırıldığı şartlar altında veya dışarıdan hücre büyümesini olumsuz yönde etkileyecek müdahalelerin olduğu durumlarda hücrenin kendi büyümesini durdurarak bir tip ölüme karar vermesi halidir. Hücreyi apoptosise yönlendiren çok sayıda faktör bilinirken, apoptosisi inhibe eden pek çok faktör de bilinmektedir (Solary vd. 1993, Lowe vd. 1993).



Şekil 1.3 Hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki denge

1.4.2. Apoptosis indükleyicileri ve inhibitörleri

1.4.2.1. Hücreyi apoptosise yönlendiren faktörler:

A- Fizyolojik Aktivatörler

1- TNF ailesi

Fas ligand

TNF

2- Transforming(dönüştürücü) Büyüme Faktörü β

3- Nörotransmittler

Glutamat

Dopamine

N-metil-D aspartat

4- Büyüme faktörü

5- Matriks bağının kaybı

6- Kalsiyum

7- Glukokortikoidler

B- Zarar Yaratan İndükleyiciler

1-Isı şoku

2- Viral enfeksiyon

3- Bakteriyel toksinler

4- Onkogenler

c-myc, rel, E1A

5- Tümör baskılayıcılar

p53

6- Sitolitik T-hücreleri

7- Oksidanlar

8- Serbest radikaller

9- Besin kaybı-antimetabolitler

C- Terapik Ajanlar

1- Kemoterapik ilaçlar

Doxorubicin

Cytosine arabinoside

Vincristine

5-Florourasil

2- Gama radyasyon

3- UV radyasyon

D- Toksinler

1- Etanol

2- β -amiloid peptit

1.4.2.2. Apoptosisi inhibe eden faktörler:

A- Fizyolojik İnhibitörler

1- Büyüme faktörleri

2- Hücre dışı matriks

3- CD40 ligand

4- Nötral aminoasitler

5- Çinko

6- Östrojen

7- Androjenler

B- Viral Genler

1- Calpain inhibitörleri

2- Sistein proteaz inhibitörleri

3- Tümör promotorları

PMA(Phorbol Myristat Asetat)

Phenobarbital

α -Hekzaklorosiklo hekzan

1.5. Interferon Alfa'nın Terapide Kullanımı

Kemoterapide yaygın olarak kullanılan yukarıda isimleri geçen bu kimyasalların kanser hücreleri üzerinde yarattıkları ortak nokta apoptosisi indüklemeleridir. Bu gerçek son yıllarda ortaya çıkarılmış olmakla beraber bu gelişmenin ardındaki sebep henüz aydınlanmış değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kemoterapiye bir cevap olarak apoptosiz gösterebilmeleri için tümör hücrelerinin p53 gibi tümör baskılayıcı genleri veya E1A, c-myc gibi bazı onkogenleri aktif olarak ifade etmeleri gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Lowe vd. 1993). Bunun yanında son yıllarda bir proto-onkogen olan bcl-2'nin de apoptosisi baskıladığı gösterilmiştir (Caron-Leslie vd. 1994).

Yukarıda ifade edilen kimyasallarla muamele edilen bir hücre eğer bu maddelere cevap olarak apoptosisi seçiyorsa; bu hücrelerde çok çarpıcı ve kolayca saptanabilen

- a- hücre hacminin azaltılması,
- b- hücre çekirdeğinin daha kondanse hale gelmesi,
- c- hücre iskeletinin hücre membranından ayrılması ve
- d- hücre DNA'sının fragmentlere ayrılması

gibi morfolojik ve biyokimyasal değişimler ortaya çıkar. Bütün bunlar da Apoptosisin tanımlanmasında bir kriter olarak kabul görmüş parametrelerdir.

Rekombinant DNA teknolojisi ile bol miktarda sentezlenebilen sitokinler hızla malignant ve infeksiyon hastalıklarının tedavisinde bir terapik seçenek haline gelmiştir (von Wussow vd. 1991). Rekombinant IFN-alfanın etkisinin en canlı örneği, HCL (Hairy Cell Leukemia) hücrelerinin tedavisinde olmuştur. İstatistik çalışmalar, HCL'li hastaların %90'ının rekombinant IFN-alfa ile tedaviye cevap verdiğini göstermiştir; ki buna sistemik terapilerin diğer formlarına cevap vermeyen ve dalağı alınan hastalar da dahildir (Thompson vd. 1985, Golomb vd. 1988, Quesada vd. 1984). Sürekli cevaplar tipik olarak rekombinant IFN-alfa terapisinin devamlılığı ile oluşmaktadır ve cevabın ortalama süresi 3 yıldan fazladır. Bilinen tedaviye karşılık rekombinant IFN-alfa terapisi hemen hemen bütün hastalarda sitopeni'yi hafifletir. HCL'de rekombinant IFN-alfa ile

hayatın kazanılmasındaki ilerleme ve hayatta kalış süresinin artışı rekombinant IFN-alfayı biyolojik ajanların zaman içinde klinik kullanımının en başarılı örneği yapmıştır.

Doğal ve rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak elde edilen interferonlar içerisinde özellikle IFN-alfa hairy cell leukemia hücreleri üzerinde önemli bir antiproliferatif özellik göstermektedir (Quesada vd. 1986, Ratain vd. 1985, Ozes vd. 1992). Bundan dolayı son on yıldır IFN-alfa bu hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Jacobs vd. 1985, Ratain vd. 1985, Worman vd. 1985, Gibson vd. 1988, Nielsen vd. 1989). IFN-alfa muamelesi hairy cell leukemia hücrelerinde bazı onkogenlerin ekspresyonunun azaltılmasına (Sigaux vd. 1987), bu hücrelerin Natural Killer (NK) hücrelerine karşı daha duyarlı hale gelmesine (Reiter vd. 1992, Ozes vd. 1992) sebep olmaktadır. Ancak bu bulgular hala IFN-alfanın Hairy Cell Leukemia hücreleri üzerindeki direkt sitotoksik etkiyi açıklamaktan uzak görülmektedir, çünkü NK hücre aktivasyonu veya fos, myc gibi onkogenlerin ekspresyonunun azaltılması IFN-gama tarafından da yapılabilmektedir, ancak IFN-gamanın HCL hücreleri üzerinde hiçbir sitotoksik etkisi yoktur (Vedentham vd. 1992). Bu itibarla IFN-alfanın nasıl bir mekanizma ile HCL hücrelerini öldürdüğü henüz açıklık kazanmış değildir.

Interferon alfa immün sistemde hücre tipine ve kullanılan mitojenik sinyallere bağlı olarak hücre proliferasyonunda pozitif ve negatif modülasyon gösterebilir. İn vitro olarak IFN- α normal insan B hücreleri için bir B hücre büyüme faktörü olarak etki gösterir. İn vivo'da ise IFN- α Hairy Cell Leukemia (HCL) ve B-CLL hücrelerini içeren B-cell lenfoproliferatif hastalıklar için antitümoral ajan olarak kullanılmaktadır (Chauchi vd. 1994, Rodriguez vd. 1983).

Günümüzde IFN-alfa terapisine tabi tutulan lösemili hastaların çoğu bu terapiye cevap vermektedir. İn vivo olarak elde edilen sonuçlar IFN-alfa'nın bu tekinliğini immün sistemi aktive ederek yapmadığını göstermiştir (Vedentham vd. 1992). IFN-alfanın lösemi hücreleri üzerinde direkt sitotoksik etki göstererek hücre çoğalmasını yavaşlattığı veya durdurduğu düşünülmektedir, ancak bu etkinin mekanizması bilinmemektedir. Bu çalışmada IFN-alfanın çeşitli lösemik hücreleri Apoptosis

“programlanmış hücre ölümü” mekanizması ile mi öldürdüğünün cevabı araştırılacaktır. Çalışmada hem IFN-alfaya duyarlı hem de dirençli olan iki farklı lösemik hücre tipi kullanılacağından sonuçların karşılaştırmalı olarak değerlendirilebilmesi mümkün olacak ve IFN-alfaya dirençli olmanın bazı sebepleri tartışılabilecektir.



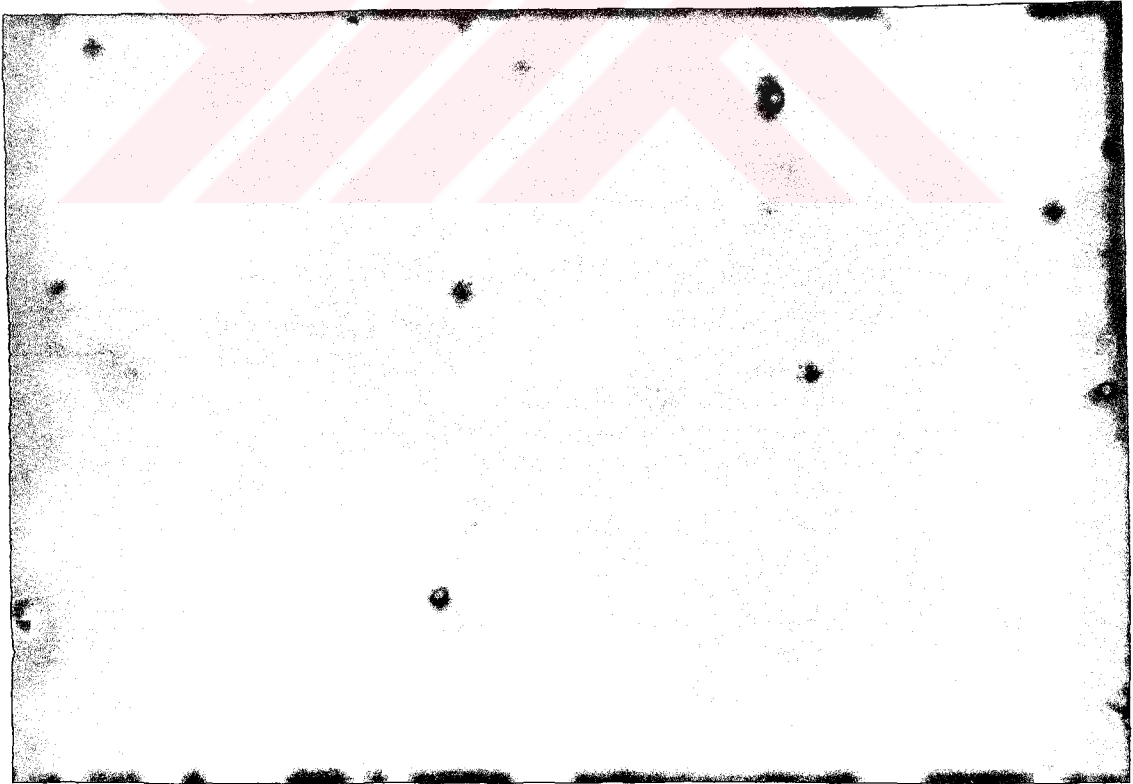
2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Hücreler ve kültürasyonları

Çalışmada kullanılan Daudi (İnsan Burkitt Lemfoma, ATCC CLL 213) ve K562 (İnsan Myelogenik Lösemi, ATCC CLL 243) hücreleri Dr. Milton W. Taylor - Indiana Üniversitesi, Bloomington INDIANA / ABD'den tedarik edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer hücre hattı olan PRO.ML (Promyelocyte) ise Akdeniz Üniversitesi Hematoloji Kliniğinden Prof.Dr. Levent Ündar tarafından lösemi teşhisi konan bir hastanın kanından izole edilmiştir.

Bütün hücreler % 10 Fetal Calf Serum ve % 1 Antibiyotik karışımı (Penicilin: 10.000 U/ml, Streptomycin: 10 mg/ml, Amphotericin B: 0.025 mg/ml) ihtiva eden RPMI-1640 (Sigma R-6504) besiyerinde 37°C' de % 5 karbondioksitli ortamda kültüre edilmişlerdir.

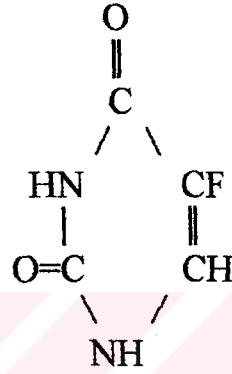


Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan Daudi hücrelerinin inverted mikroskopta görünümü

2.1.2. Çalışmada kullanılan sitokin ve kemoterapikler

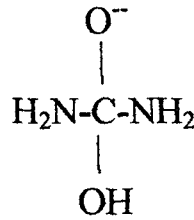
Interferon: Çalışma boyunca kullanılan Interferon α -con 1 AMGEN şirketinden tedarik edilmiştir.

5-Florourasil: Çalışmalarda Sigma F- 6627 nolu 5-FU ($C_4H_3N_2O_2F$) kullanılmıştır.



Şekil 2.2 5-FU'in Kimyasal Yapısı

Hidroksi Üre: Çalışmada kullanılan Hidroksi Üre Antalya Devlet Hastahanesinden Çocuk ve Kan Hastalıkları uzmanı Doç.Dr. Duran Canatan'dan tedarik edilmiştir.



Şekil 2.3 Hidroksi Üre'nin Kimyasal Yapısı

2.2. METOD

2.2.1. PRO.ML hücrelerinin izolasyonu

Hastadan alınan 10ml kan EDTA'lı tüpe konulmuştur. Bu kan 3 misli PBS (8gr/lt NaCl, 0.2gr/lt KCl, 1.15gr/lt Na₂HPO₄, 0.2gr/lt KH₂PO₄ ; pH:7.0) tamponu ile sulandırılıp karıştırılmıştır. Histopaque altta, kan üstte olmak üzere bire-bir oranda tüplere konmuştur. Daha sonra bu örnekler 1700-1900 rpm hızla 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonunda serum ve plazma proteinleri yukarıda kalır. Makrofaj ve eritrositler daha ağır oldukları için tüpün dibine çökerler. Ortada beyaz pamuğumsu bir kitle kalır ki; bunlar lenfositlerdir. Bu beyaz tabaka pastör pipeti yardımıyla bir tüpte toplanmıştır. Daha sonra bu tüpe toplanan lenfositler 2-3 kez serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ile 2500 rpm hızla santrifüj edilerek yıkanmıştır. Son santrifügasyondan sonra hücre kitlesi üzerine 5-10ml %10 fetal calf serum içeren RPMI-1640 besiyeri konarak 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre bırakılmıştır.

Tüm bu işlemler doku kültürü odasında steril şartlar altında yapılmıştır.

2.2.2. Büyüme inhibisyonunun ölçülmesi

Bütün hücreler 1×10^5 hücre/ml yoğunluğunda RPMI-1640 besiyerinde bir gece ön inkübasyona tutulduktan sonra Interferon-alfa con 1, 5-Florourasil, Hidroksiüre ve bunların kombinasyonları verilmiş ve bu hücreler 96 saat boyunca 37°C %5 karbondioksitli ortamda inkübe edilmiştir.

Çizelge 2.1 Daudi hücreleri için kullanılan sitokin ve kemoterapiklerin konsantrasyonları

<u>IFNα-con 1</u>	<u>5-Florourasil</u>	<u>Hidroksiüre</u>
0.01ng/ml	45ng/ml	50ng/ml
0.1ng/ml	90ng/ml	100ng/ml
0.2ng/ml	225ng/ml	200ng/ml
0.5ng/ml	450ng/ml	400ng/ml
1ng/ml	900ng/ml	800ng/ml

Çizelge 2.2 K562 ve PRO.ML hücreleri için kullanılan sitokin ve kemoterapiklerin konsantrasyonları

<u>IFNα-con 1</u>	<u>5-Florourasil</u>	<u>Hidroksi Üre</u>
50ng/ml	45ng/ml	50ng/ml
100ng/ml	90ng/ml	100ng/ml
250ng/ml	225ng/ml	200ng/ml
500ng/ml	450ng/ml	400ng/ml
1000ng/ml	900ng/ml	800ng/ml

96 saatlik inkübasyon süresi sonunda örneklerden 100'er mikrolitre alınmış ve 100 mikrolitre Trypan mavisi ile karıştırılmıştır. Daha sonra canlı hücreler hemositometre kullanılarak sayılmıştır. Elde edilen canlı hücre sayısı ve hücrelerin başlangıç zamanında 1ml'deki sayısı aşağıdaki formüle konularak çoğalma inhibisyonunun yüzdesi saptanmıştır.

$$\% \text{ Ölüm} = \frac{I_n - K_n}{K_n - K_o} \times 100$$

I_n = IFN, 5-FU ve HU) ile muamele edilmiş hücrelerin n. gündeki sayısı.

K_n =Kontrol hücrelerin n. gündeki sayısı.

K_o =Kontrol hücrelerin 0. gündeki sayısı.

2.2.3. DNA İzolasyonu ve Jel Elektroforezi

Daudi hücreleri 1×10^6 hücre/ml yoğunluğunda toplam 5 ml RPMI-1640 besiyerinde bir gece ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra Interferon alfa-con 1, 5-Florourasil, Hidroksi üre ve bunların kombinasyonlarından büyüme inhibisyonunun ölçülmesi kısmında kullanılan konsantrasyonlarda verilmiş ve bu hücreler 72 saat boyunca 37°C 'de %5 karbondioksitli ortamda inkübasyona bırakılmışlardır.

72 saat sonunda Daudi hücreleri santrifügasyonla çöktürüldükten sonra 3 kez PBS tamponu ile yıkanıp santrifüj edilmiştir. Son santrifügasyondan sonra hücreler 2 ml ekstraksiyon tamponu (10mM Tris.HCl pH: 8 ; 0.1M EDTA ; %5 SDS ; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A) içinde çözünmüş ve 37°C 'de su banyosunda bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon süresi sonunda örnekler üzerine 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteaz K eklenerek yine 37°C 'de su banyosunda bir gece inkübe edilmişlerdir. Bu inkübasyonun ardından örnekler 3-4 kez Fenol : Kloroform : İzamil alkol (25:24:1) ile ekstraksiyona tabi tutulmuş ve bu sayede proteinler uzaklaştırılmıştır. Ekstraksiyon sonunda örnekler üzerine içinde 0.3M konsantrasyonda olacak şekilde Amonyum asetat ilave edilmiş ve bunun üzerine toplam hacmin iki katı soğuk saf etanol konmuştur. Tuz ve alkol ilave edilen bu örnekler -20°C 'de 30 dakika bekletildikten sonra 10.000 rpm hızla $+4^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve DNA fragmentleri çöktürülmüştür. Çöktürülen bu peletler TE tamponu (10mM Tris.HCl ; 1mM EDTA , pH: 8) içinde çözülüş ve bunların spektrofotometrede 260nm'deki absorbansları okunup aşağıdaki formüle konarak DNA miktarları tayin edilmiştir.

$$\text{DNA Miktarı } (\mu\text{g}/\text{ml}) = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{SF}$$

OD_{260} = 260 nm'deki absorbans değeri.

SF = Sulandırma faktörü.

DNA miktarları hesaplandıktan sonra herbir örnekten 10 μg alınarak %1'lik Agaroz jel elektroferezine (150V:30mAmp) tabi tutulmuştur. Sonuçlar UV transüliminatörde gözlenmiş ve jellerin fotoğrafları çekilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Çoğalma İnhibisyonunun Ölçülmesi

Çalışmada kullanılan üç lösemik hücrenin IFN α -con 1'e karşı olan duyarlılıkları büyük farklılık göstermiştir. Bu hücreler içinde Daudi en duyarlı hücre olarak saptanmıştır. IFN α -con 1'in sadece 1ng/ml'lik konsantrasyonu bile Daudi hücrelerinde çoğalmayı % 83 nispetinde inhibe etmiştir (Şekil 3.1). Bu IFN konsantrasyonu diğer iki hücre üzerinde hemen hemen tamamen etkisiz kalmıştır. Interferon'un 0.01 ile 1 ng/ml arasındaki beş farklı dozu zamana bağlı olarak Daudi hücrelerinde artan bir büyüme inhibisyonu göstermiştir (Şekil 3.1). Diğer lösemik hücre hattı olan K562 ve PRO.ML hücrelerinde ise IFN α -con 1'in ancak 1 μ g/ml'lik konsantrasyonu K562 için % 83 (Şekil 3.6), PRO.ML için % 71 (Şekil 3.11) oranında inhibe etmiştir. Bu sonuçlara göre K562 ve PRO.ML hücreleri Daudi hücrelerine oranla IFN α -con 1'e oldukça büyük direnç göstermişlerdir. IFN α -con 1'in 50ng/ml ile 1 μ g/ml arasındaki 5 farklı dozu zamana bağlı olarak K562 ve PRO.ML hücreleri üzerinde artan bir çoğalmayı durdurucu etki gösterdiği gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan diğer bir kimyasal olan 5-Florourasil'in de çoğalmayı durdurucu etkisinin her üç lösemik hücre hattında da farklı olduğu görölmüştür. 5-Florourasil Daudi hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak artan, zamana bağlı olarak azalan bir çoğalma inhibisyonu göstermiştir. 5-Florourasil'in 45 ng/ml'lik dozu 24. saatte %42 çoğalma inhibisyonu gösterirken aynı dozun Daudi hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etki 72. saatte %24'e düşmüştür. 5-Florourasil'in 90 ng/ml'lik dozunun 24. saatteki sitotoksik etkisi %51 iken 900 ng/ml'lik dozu yine 24. saatte %72 çoğalma inhibisyonu göstermiştir (Şekil 3.2). 5-Florourasil K562 hücreleri üzerinde konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak artan bir çoğalma inhibisyonu göstermiştir. 5-Florourasil'in 45 ng/ml'lik dozunun K562 hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etki 24. saatte %25, 96. saatte ise %32 olmuştur. 5-Florourasil'in 900 ng/ml'lik dozu sözkonusu hücreler üzerinde 24. saatte %60 çoğalma inhibisyonu gösterirken 96. saatte %79'luk bir çoğalma inhibisyonu gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 3.7). 5-Florourasil

PRO.ML hücreleri üzerinde de konsantrasyona ve zaman bağlı olarak artan bir çoğalma inhibisyonu göstermiştir. 5-Florourasil'in 45 ng/ml'lik dozu 24. saatte PRO.ML hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etki %46 iken 96. saatteki sitotoksik etkisi ise %61 olmuştur. 5-Florourasil'in 450 ng/ml'lik dozunun ise 24. saatte %64'lük bir çoğalma inhibisyonu, 96. saatte %73'lük bir çoğalma inhibisyonu gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 3.12)

Çalışmada kullanılan üç lösemik hücrenin Hidroksi Üre'ye karşı olan duyarlılıkları da farklılıklar göstermiştir. Hidroksi Ürenin en farklı etkisi Daudi hücrelerinde görülmüştür. Hidroksi Ürenin 50ng/ml ile 800ng/ml arasındaki 5 farklı dozu K562 ve PRO.ML hücrelerinde hem konsantrasyona hem de zamana bağlı olarak artan bir çoğalma inhibisyonu gösterirken Daudi hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak artan, zamana bağlı olarak azalan bir çoğalma inhibisyonu göstermiştir. Hidroksi Üre'nin 50ng/ml'lik dozu söz konusu hücrelerde çoğalmayı 24. saatte % 47 inhibe ederken 72. saatte bu inhibisyon % 33'e inmiştir (Şekil 3.3). Hidroksi Üre'nin aynı dozu K562 hücrelerinde 24. saatteki çoğalmayı durdurucu etkisi % 4 iken 72. saatte % 36'ya kadar çıkmıştır (Şekil 3.8). Aynı şekilde PRO.ML hücrelerinde de 24. saatte % 27 iken 72. saatte % 46'ya çıkan bir artış görülmüştür (Şekil 3.13). Hidroksi Üre'nin diğer bir dozu olan 200ng/ml'lik dozuna bakıldığında Daudi hücreleri üzerinde gösterdiği 24. saatteki sitotoksik etkisi azalarak %59'dan 72. saatte %54'e düşmüş olduğu görülmektedir (Şekil 3.3). Aynı dozdaki Hidroksi Üre'nin K562 ve PRO.ML hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine baktığımızda her iki hücrede de 24. saatten 96. saate doğru gidildiğinde Hidroksi Üre'nin bu hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin arttığı gözlenmektedir. K562 hücrelerinde 24. saatte %22 olan inhibisyon, 96. saatte %47'ye çıkarken (Şekil 3.8) PRO.ML hücrelerinde Hidroksiüre'nin 200ng/ml'lik dozunun sitotoksik etkisi 24. saatte %34 iken 96. saatte bu etki %58'e çıkmıştır (Şekil 3.13). Hidroksiüre'nin en yüksek dozu olan 800ng/ml'lik dozunun Daudi hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin diğer dozlarında olduğu gibi zamana bağlı olarak azaldığı görülmektedir (Şekil 3.3). Şöyle ki; Hidroksiüre'nin bu dozu Daudi hücrelerinde 24. saatte %69 inhibisyon gösterirken 96. saatte bu inhibisyon %67'ye düşmüştür. Hidroksiüre'nin en yüksek dozunun K562 ve PRO.ML hücreleri üzerinde gösterdiği

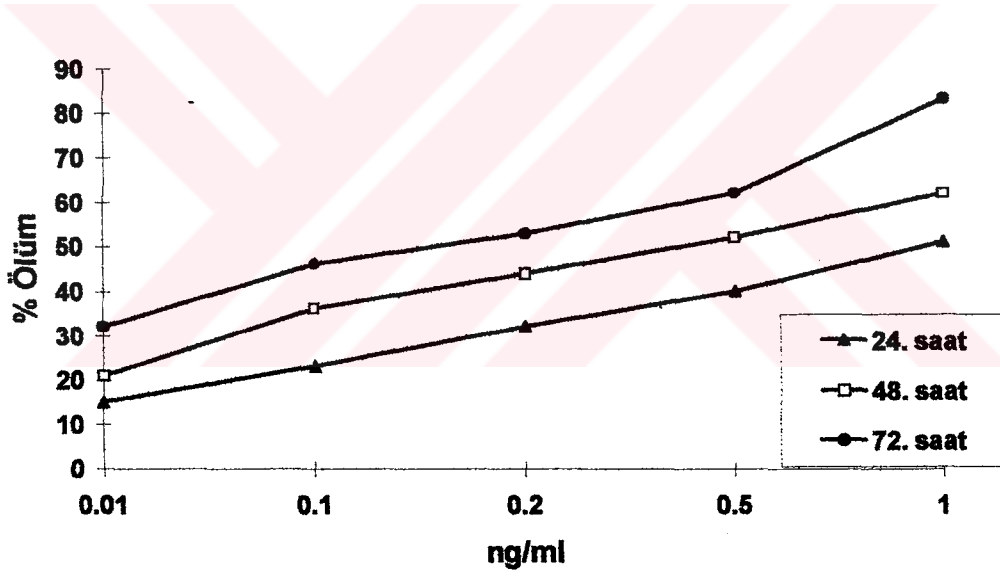
sitotoksik etki 24. saatle 96. saat arasında bir artış göstermektedir. K562 hücrelerinde 24. saatte %42'lik bir inhibisyon gösteren 800ng/ml'lik Hidroksiüre'nin 96. saatteki inhibisyonunun %66'ya çıktığı gözlenmiştir (Şekil 3.8). PRO.ML hücrelerinde de K562 hücrelerinde olduğu gibi Hidroksiüre'nin bu dozunda gösterdiği sitotoksik etkide konsantrasyon ve zamana bağlı olarak artış görülmektedir (Şekil 3.13). 24. saatte %61 olan sitotoksik etkisi 96. saatte %71 olarak artmıştır (Şekil 3.13). Aynı dozun farklı konsantrasyonlarına bakılacak olursa üç hücre hattında da sitotoksik etkinin konsantrasyon bağımlı olarak arttığı görülmektedir. Örneğin; Daudi hücrelerinde Hidroksiüre'nin 50ng/ml'lik dozunda %47 olarak görülen sitotoksik etki 200ng/ml'lik dozunda %59, 800ng/ml'lik dozunda ise %69 olarak görülmektedir (Şekil 3.3). Yine aynı şekilde K562 hücrelerinde Hidroksiüre'nin 50ng/ml'lik konsantrasyonunun gösterdiği sitotoksik etki %4 iken 200ng/ml'lik konsantrasyonunda %22, 800ng/ml'lik konsantrasyonunda ise %42 olarak görülmüştür (Şekil 3.8). Şekil 3.13'de görüldüğü gibi PRO.ML hücrelerinde konsantrasyon arttıkça Hidroksiüre'nin gösterdiği sitotoksik etki de artmaktadır.

Çalışmada IFN α -con 1'in 5-Florourasil ve Hidroksiüre ile birlikte gösterdiği sitotoksik etki de araştırılmıştır. IFN α -con 1'in sabit bir dozuyla (0.2ng/ml) 5-Florourasil'in 45ng/ml ile 900ng/ml arasında değişen dozları çalışmada kullanılan üç hücre hattında da farklı sitotoksik etki göstermiştir. IFN α -con 1'in 0.2ng/ml'lik, 5-Florourasil'in 45ng/ml'lik dozunun Daudi hücrelerinde birlikte gösterdikleri sitotoksik etki 4. saatte %43 iken 72. saatte %34'e kadar inmiştir (Şekil 3.4). 0.2ng/ml IFN α -con 1 ile 900ng/ml 5-Florourasil birlikte Daudi hücrelerinde 24. saatte %73'lük bir çoğalma inhibisyonu gösterirken 72. saatte bu inhibisyon %64'e inmiştir (Şekil 3.4). Bu verilere göre IFN α -con 1, 5-Florourasil ile birlikte Daudi hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak artan, zamana bağlı olarak ise azalan bir çoğalma inhibisyonu göstermiştir. 5-Florourasil'in tek başına daudi hücrelerinde gösterdiği sitotoksik etkiyle IFN α -con 1 ile birlikteyken gösterdiği sitotoksik etki karşılaştırılacak olursa bu iki kimyasalın birlikteyken sinerjik etki gösterdikleri söylenebilir. Şöyle ki; 5-Florourasil'in tek başına iken 900ng/ml'lik Daudi hücrelerinde 48. saatte %60 büyüme inhibisyonu gösterirken 5-Florourasil'in aynı dozu IFN α -con 1 ile birlikte iken yine 48. saatte %68 büyüme

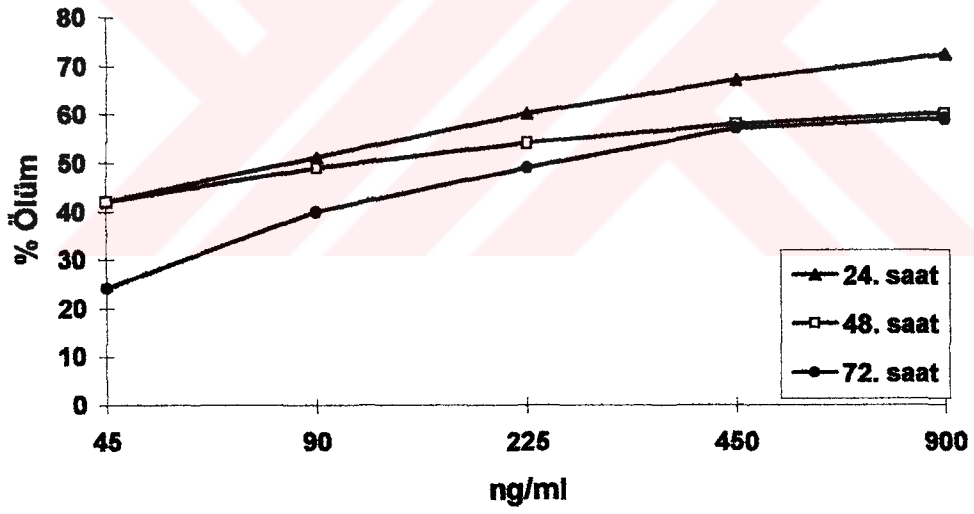
inhibisyonu göstermektedir. Aynı şekilde 900ng/ml'lik 5-Florourasil'in 72. saatte Daudi hücrelerinde gösterdiği sitotoksik etki %59 iken aynı dozun IFN α -con 1 ile birlikte gösterdiği sitotoksik etki %64'dür (Şekil 3.4). IFN α -con 1'in 250ng/ml'lik dozu ile 5-Florourasil'in 45-900 ng/ml arasında değişen 5 farklı dozu K562 hücrelerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak artan bir çoğalma inhibisyonu göstermiştir. 250ng/ml IFN α -con 1 ve 90 ng/ml 5-Florourasil ile muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte %37 olan büyüme inhibisyonu 96. saatte %73'e çıkmıştır. Aynı şekilde 900 ng/ml 5-Florourasil'in IFN α -con 1 ile birlikte gösterdiği sitotoksik etki 24. saatte %64 iken 96. saatte bu sitotoksik etki %86 olmuştur (Şekil 3.9). Bu sonuçlara göre, K562 hücrelerinde 5-Florourasil'in IFN α -con 1 ile birlikte verildiğinde gösterdiği sitotoksik etkisinin tek başına verildiğinde gösterdiği sitotoksik etkiden daha fazla olduğu görülmektedir. IFN α -con 1 ve 5-Florourasil'in aynı dozları PRO.ML hücrelerinde konsantrasyon ve zaman bağımlı çoğalma inhibisyonu göstermiştir. 250 ng/ml IFN α -con 1 ve 45 ng/ml 5-Florourasil'in PRO.ML hücreleri üzerinde 24. saatteki sitotoksik etkisi %54 iken aynı dozun 96. saatteki sitotoksik etkisi %66 olmuştur. Aynı şekilde 250 ng/ml IFN α -con 1 ve 450 ng/ml 5-Florourasil'in 24. saatteki sitotoksik etkisi %67, 96. saatteki sitotoksik etkisi ise %79'dur (Şekil 3.14).

Hidroksiüre'nin 50-800 ng/ml arasında değişen dozlarının IFN α -con 1'in sabit bir dozuyla birlikte muamelesi çalışmada kullanılan üç lösemik hücre hattında da farklı sitotoksik etki göstermiştir. Daudi hücrelerinde 0.2 ng/ml IFN α -con 1 ile Hidroksiüre'nin değişen dozları konsantrasyon bağılı olarak artan, fakat zamana bağlı olarak azalan bir çoğalma inhibisyonu göstermiştir. 24. saatte, 0.2 ng/ml IFN α -con 1 ile 50 ng/ml Hidroksiüre'nin birlikte gösterdiği sitotoksik etki %49 iken yine aynı doz IFN α -con 1 ile 800 ng/ml Hidroksiüre'nin birlikte gösterdiği sitotoksik etki %69'dur. Fakat sözkonusu dozun 24. saatte %49 olan sitotoksik etkisi 72. saatte %38'e düşmüştür. Hidroksiüre'nin Daudi hücrelerinde tek başına gösterdiği sitotoksik etki ile IFN α -con 1 ile birlikte gösterdiği sitotoksik etki arasında önemli derecede bir fark olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.3, Şekil 3.5). IFN-alfa'nın 250 ng/ml'lik dozu ile Hidroksiüre'nin 50-800 ng/ml arasında değişen 5 farklı dozu K562 hücreleri üzerinde

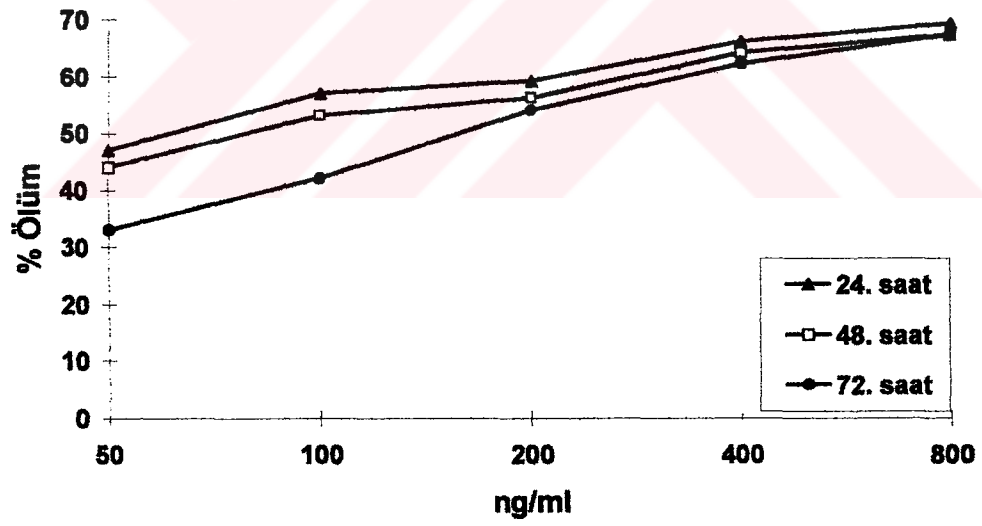
konsantrasyona ve zamana bağlı olarak artan bir çoğalma inhibisyonu göstermiştir. 250 ng/ml IFN α -con 1 ve 50 ng/ml Hidroksi re ile muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte %44 olan çoğalma inhibisyonu 96. saatte %92'ye kadar çıkmıştır. Aynı şekilde 200 ng/ml Hidroksiüre'nin IFN α -con 1 ile birlikte gösterdiği sitotoksik etki sözkonusu hücrelerde 24. saatte %50 iken 96. saatte bu sitotoksik etki %90 olmuştur (şekil 3.10). Hidroksiüre'nin K562 hücreleri üzerinde tek başına iken gösterdiği sitotoksik etki ile IFN α -con 1 ile birlikte iken gösterdiği sitotoksik etki karşılaştırılacak olursa Hidroksiüre'nin IFN α -con 1 ile birlikte verildiğinde daha fazla çoğalma inhibisyonu gösterdiği görülmektedir (şekil 3.8, şekil 3.10). IFN α -con 1'in 250 ng/ml'lik dozu ile Hidroksiüre'nin 50-800 ng/ml arasında değişen dozları PRO.ML hücrelerinde de konsantrasyon ve zamana bağlı olarak artan bir çoğalma inhibisyonu göstermiştir. 250 ng/ml IFN α -con 1 ile 50 ng/ml Hidroksiüre'nin PRO.ML hücreleri üzerinde birlikte gösterdikleri sitotoksik etki 24. saatte %53 iken bu etki 96. saatte %61'e çıkmıştır. Aynı şekilde 250 ng/ml IFN α -con 1 ve Hidroksiüre'nin en yüksek dozu olan 800 ng/ml'lik dozu 24. saatte %68 çoğalma inhibisyonu gösterirken 96. saatte %76 çoğalma inhibisyonu göstermiştir. Bu sonuçlar Hidroksiüre'nin PRO.ML hücreleri üzerinde tek başına iken gösterdiği sitotoksik etki ile karşılaştırıldığında, Hidroksiüre'nin bu hücrelerde IFN α -con 1 ile birlikte iken daha fazla sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir (şekil 3.13, şekil 3.15). Dolayısıyla bu iki kemoterapik ajanın sinerjik etki gösterdikleri söylenebilir.



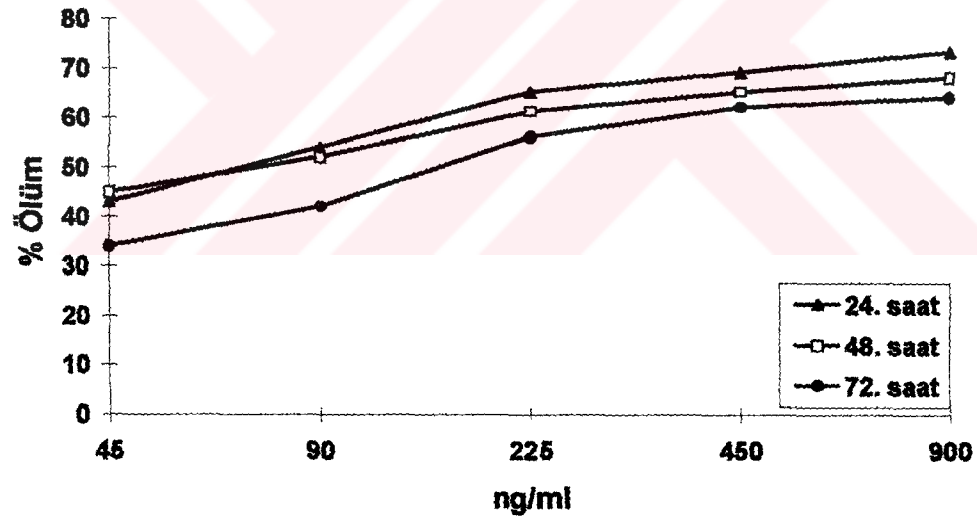
Şekil 3.1 IFN-alfa'nın Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 bağımsız deneyin ortalamasıdır)



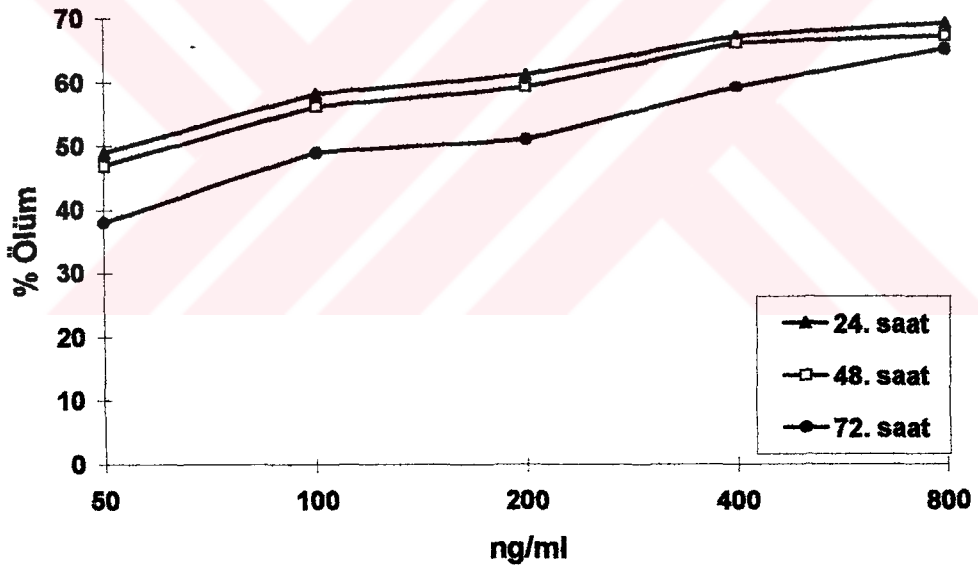
Şekil 3.2 5-FU'ın Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır)



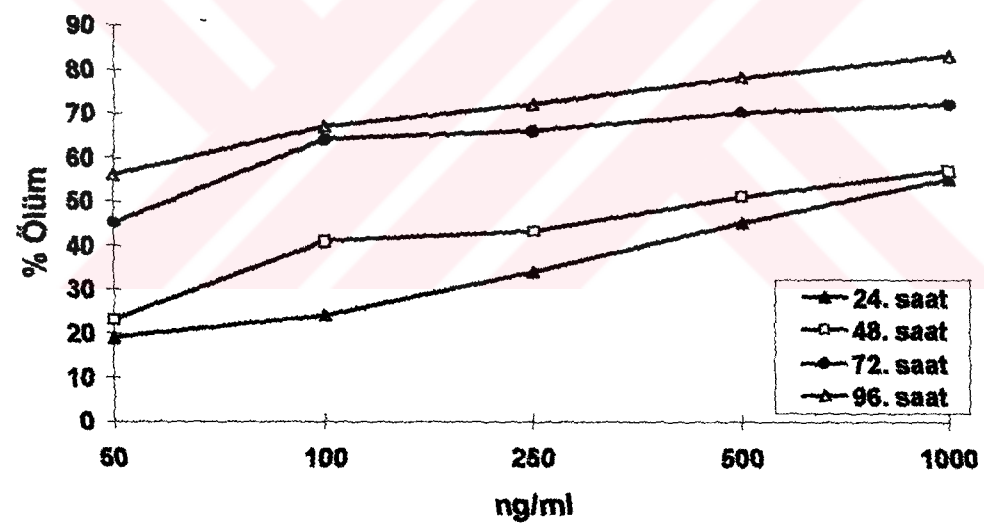
Şekil 3.3 H.Üre'nin Daudi Hücreleri Üzerinde gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır)



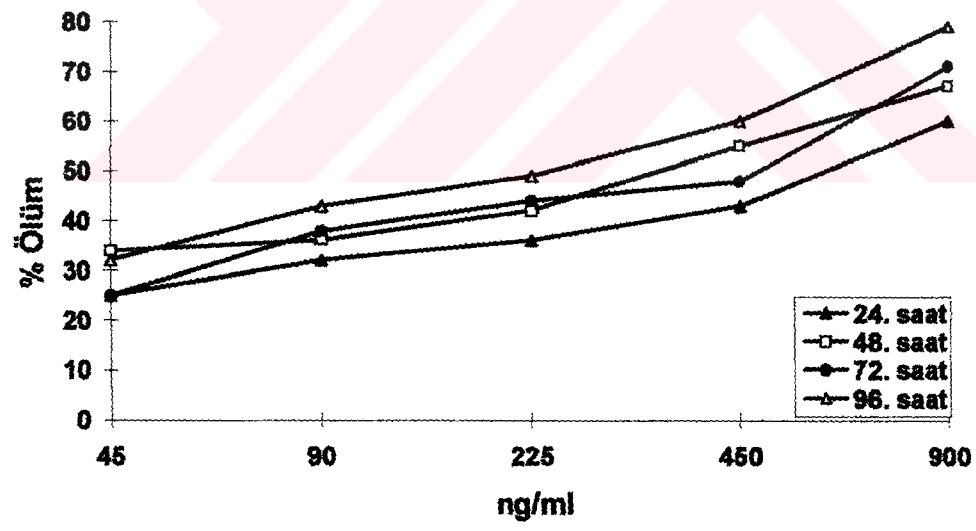
Şekil 3.4 IFN-alfa + 5-FU Kombinasyonunun Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır).



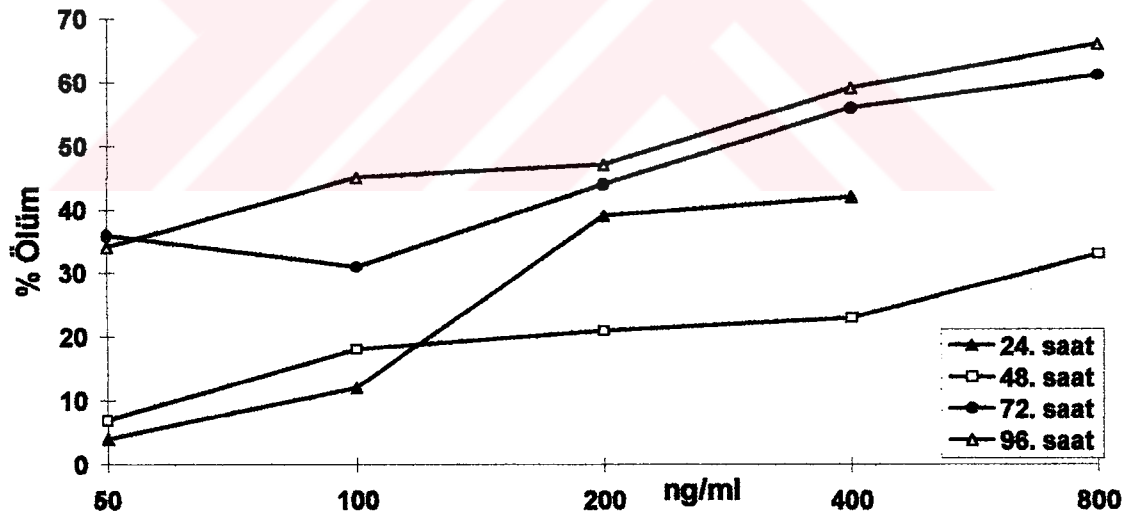
Şekil 3.5 IFN-alfa + H.Üre Kombinasyonunun Daudi Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır).



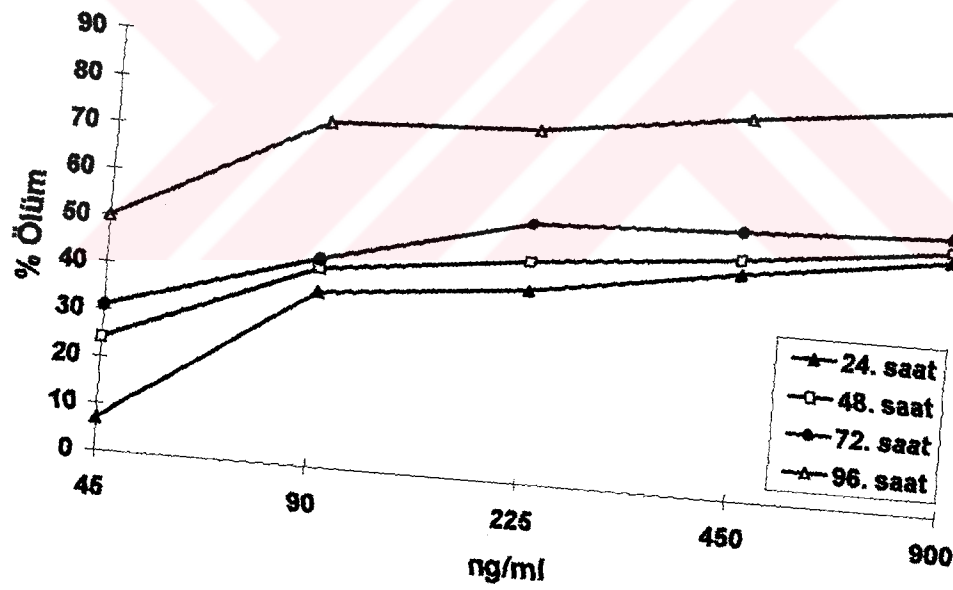
Şekil 3.6 IFN-alfa'nın K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır)



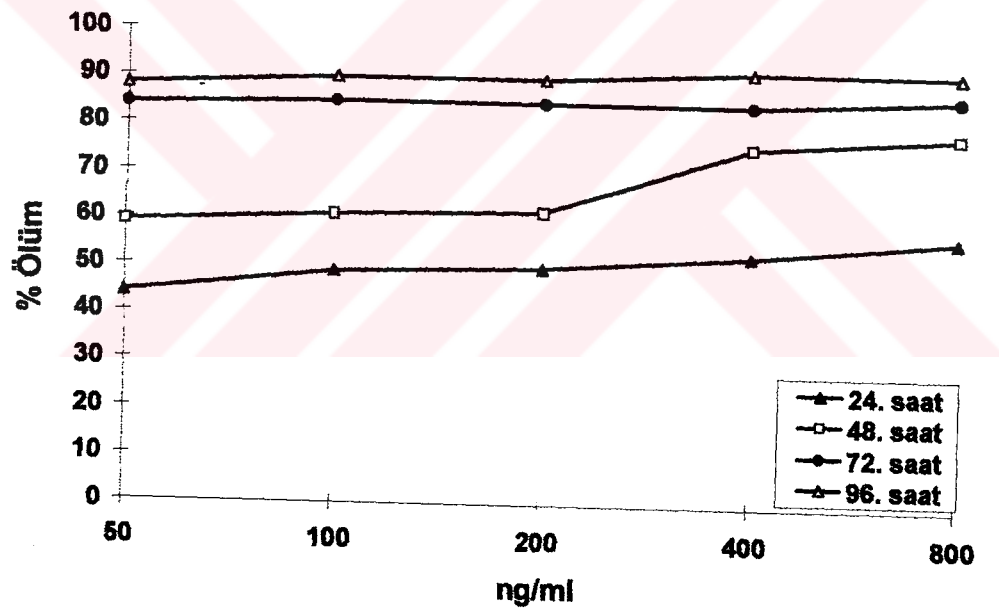
Şekil 3.7 5-FU'ın K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır)



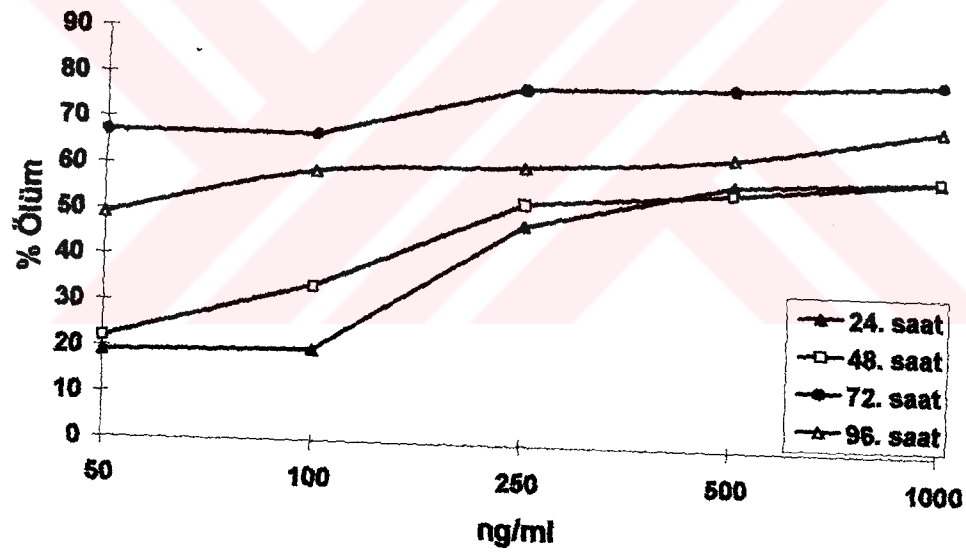
Şekil 3.8 H.Üre'nin K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır).



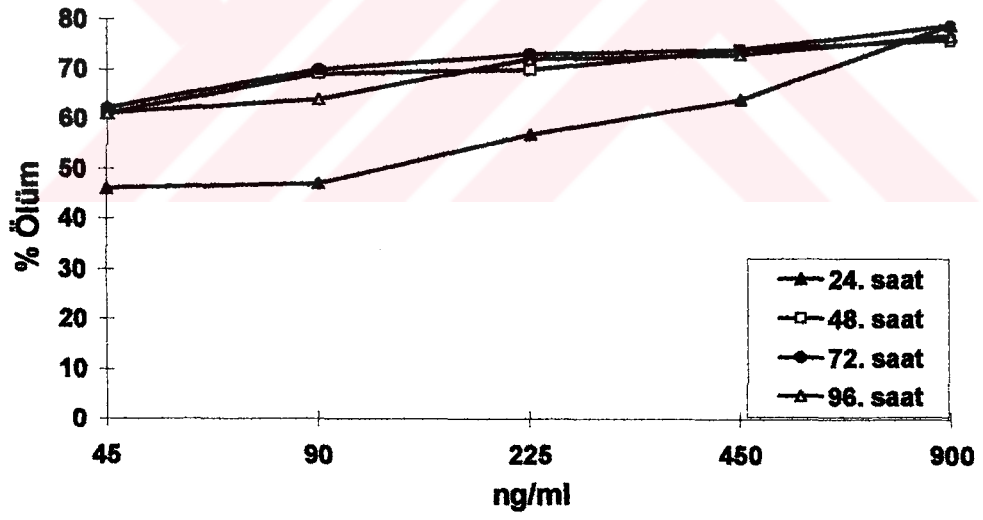
Şekil 3.9 IFN-alfa + 5-FU Kombinasyonunun K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sítotoksik Etki
(Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır).



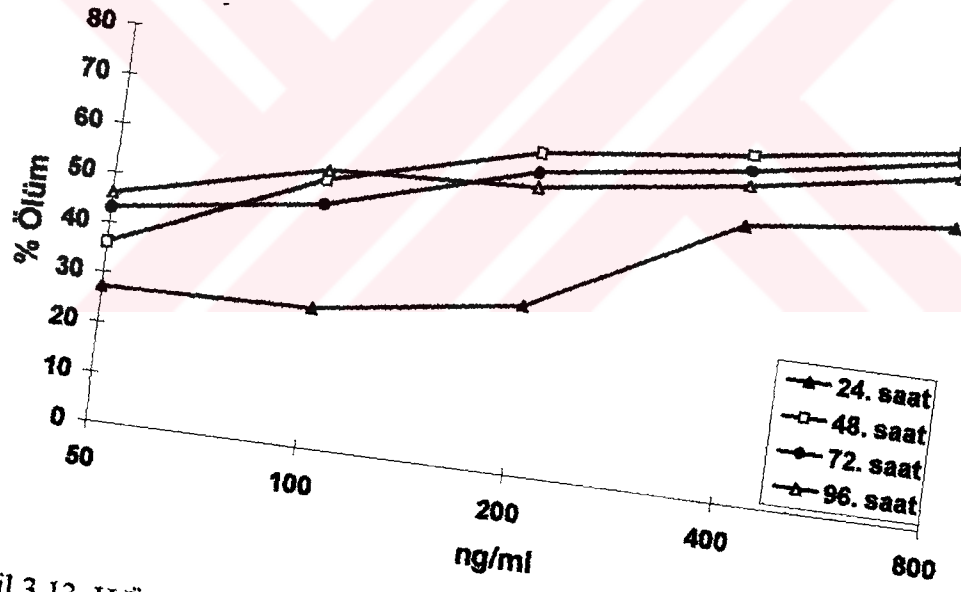
Şekil 3.10 IFN-alfa + H.Üre Kombinasyonunun K562 Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır)



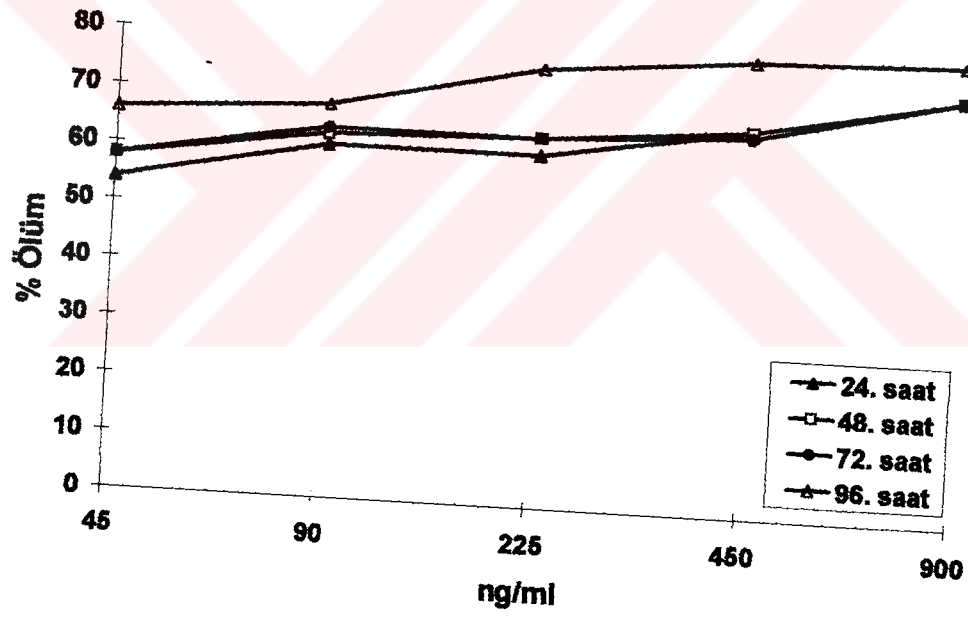
Şekil 3.11 IFN-alfa'nın PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır)



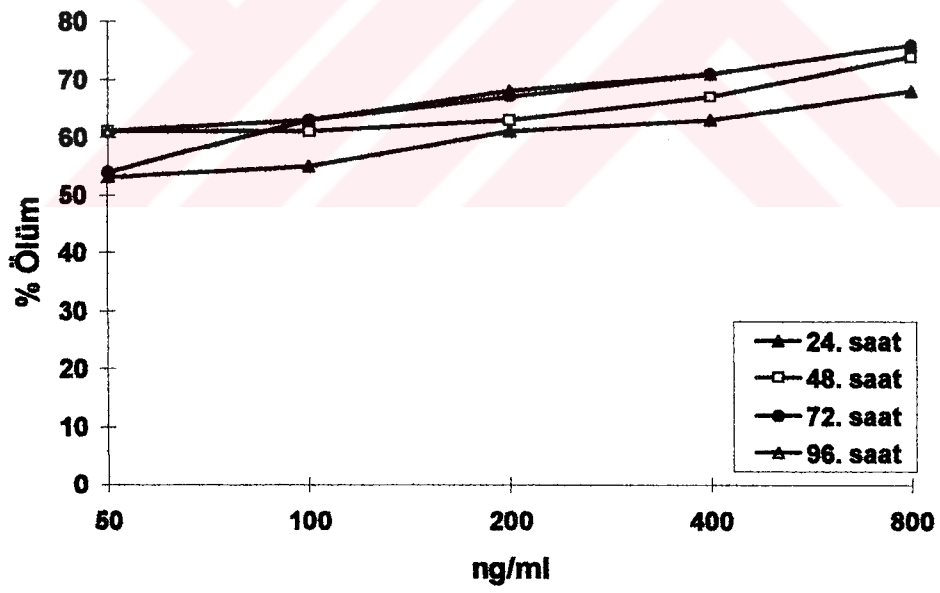
Şekil 3.12 5-FU'in PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır)



Şekil 3.13 H.Üre'nin PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 deneyin ortalamasıdır)



Şekil 3.14 IFN-alfa + 5-FU Kombinasyonunun PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır)



Şekil 3.15 IFN-alfa + H.Üre Kombinasyonunun PRO.ML Hücreleri Üzerinde Gösterdiği Sitotoksik Etki
(Sonuçlar 3 ayrı deneyin ortalamasıdır)

3.2. DNA Fragmentasyonu

Daudi hücrelerinde IFN α -con 1'in büyümeyi (çoğalmayı) durdurucu etkisi konsantrasyon bağımlı olarak ortaya çıkmıştır. Bu sonuca paralellik gösterecek şekilde artan IFN konsantrasyonu bu hücrelerde DNA fragmentasyonunun da artmasına neden olmuştur. 0.01 ng/ml IFN α -con 1 ihtiva eden ortamda bulunan hücre popülasyonunda genomik DNA'da kontrole oranla kısmi bir parçalanma söz konusu iken, genomik DNA'da gözlenen fragmentasyon artan IFN konsantrasyonlarında artmıştır. En fazla fragmentasyon 1ng/ml IFN α -con 1 ihtiva eden ortamda inkübe edilen hücrelerden izole edilen DNA'da gözlenmiştir (Şekil 3.16).

Daudi hücrelerinde 5-Florourasil'in (çoğalmayı) durdurucu etkisi IFN α -con 1'e oranla daha az olmuştur. 5-Florourasil'in bu büyümeyi durdurucu etkisi yine konsantrasyon bağımlı olarak ortaya çıkmıştır. Bu sonuca paralel olarak, 5-Florourasil'in konsantrasyonu arttıkça DNA fragmentasyonunun da arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.17).

Hidroksiüre'nin Daudi hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etki diğer kemoterapiklerin söz konusu hücrelerde gösterdiği sitotoksik etkiden farklı olarak konsantrasyona bağlı olarak artmış, ancak zamana bağlı olarak azalmıştır. Buna bağlı olarak Hidroksiüre'nin 50-800 ng/ml arasında değişen 5 farklı dozu konsantrasyona bağlı olarak artan bir DNA fragmentasyonu göstermiştir. DNA fragmentasyonu 50 ng/ml Hidroksi üre ihtiva eden ortamda inkübe edilen hücrelerden izole edilen genomik DNA'da başlamış ve artan Hidroksiüre konsantrasyonuyla birlikte genomik DNA'larda görülen parçalanma da artmıştır (Şekil 3.18).

IFN α -con 1 ve 5-Florourasil'in Daudi hücrelerinde birlikte gösterdikleri büyüme inhibisyonunda sinerjik etki gösterdikleri gözlenmiştir. Buna paralel olarak hem 5-Florourasil hem de IFN α -con 1 ihtiva eden ortamda bulunan Daudi hücrelerinden elde edilen genomik DNA'daki fragmentasyonun sadece 5- Florourasil bulunan ortamda

inkübe edilen Daudi hücrelerinde görülen DNA fragmentasyonundan daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.19).

IFN α -con 1 ve Hidroksiüre'nin Daudi hücreleri üzerinde birlikte gösterdiği büyümeyi durdurucu etkisiyle Hidroksiüre'nin tek başına iken sözkonusu hücreler üzerinde gösterdiği büyümeyi durdurucu etkisi arasında önemli derecede fark bulunmamıştır. Fakat her iki durumda da konsantrasyona bağlı olarak artan bir büyüme inhibisyonu gözlenmiştir. Buna paralel olarak IFN α -con 1 ve Hidroksiüre bulunan ortamda inkübe edilen hücrelerden izole edilen genomik DNA'lardaki fragmentasyonun da doz bağımlı olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.20).

