

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**IN VITRO ORTAMDA, ERİŞKİN VE ÇOCUK  
KANSERLERİ SAĞALTIM MODELİNDE,  
MİKRO ÇEVRENİN APOPTOTİK YOLAK  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

YASEMİN BASKIN

TEMEL ONKOLOJİ

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2006

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**IN VITRO ORTAMDA, ERİŞKİN VE ÇOCUK  
KANSERLERİ SAĞALTIM MODELİNDE,  
MİKRO ÇEVRENİN APOPTOTİK YOLAK  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

TEMEL ONKOLOJİ

DOKTORA TEZİ

YASEMİN BASKIN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Nur Olgun

Bu araştırma DEU Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 03.KB. SAĞ.001 sayı ile desteklenmiştir.

**TEZİN TESLİM EDİLDİĞİ ENSTİTÜ VE ÜNİVERSİTE:**

T.C.DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TEZ BAŞLIĞI:** IN VITRO ORTAMDA, ERİŞKİN VE ÇOCUK KANSERLERİ SAĞALTIM MODELİNDE, MİKRO ÇEVRENİN APOPTOTİK YOLAK ÜZERİNE ETKİLERİ

**TEZİ TESLİM EDEN:** DR YASEMİN BASKIN

**TEZ SAVUNMA TARİHİ:** 30.06.2006

**TEZ DANIŞMANI:** Prof. Dr. Nur Olgun

**TEZ JÜRİSİ:**

Başkan:

Prof. Dr. Nur OLGUN

Üye:

Prof. Dr. Meral SAKIZLI

Üye:

Prof. Dr. Nazan ÇETİNGÜL

Yedek Üye:

Doç. Dr. İlhan ÖZTOP

Yedek Üye:

Doç. Dr. Fatih Demirkan

Üye:

Prof. Dr. Uğur YILMAZ

Üye:

Doç. Dr. Mehmet Ali ÖZCAN

Yedek Üye:

Doç. Dr. Mehmet KANTAR

## İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	ii
Şekil Listesi	iii
Kısaltmalar	iv
Teşekkür Yazısı	vi
Türkçe Özet	1
İngilizce Özet	3
Giriş ve Amaç	5
Genel Bilgiler	6
Gereç ve Yöntemler	14
Bulgular	45
Tartışma	80
Sonuç ve Öneriler	87
Kaynaklar	89
Ekler	
Ek 1. Etik kurul Raporu	102
Ek 2. Acta Veterinaria Hungarica, 2004;52(3): 287–297	103
Ek 3. Acta Veterinaria Hungarica,2005; 53(4): 479–491	104
Ek 4. TPOG-NBL 2003 protokolü (bölüm 9 ve 13)	105

## **TABLO LİSTESİ**

Tablo 1.Sağaltım ve mikro çevre bileşenlerinin HeLa hücrelerindeki IC <sub>50</sub> dozları	48
Tablo 2. Sağaltım bileşenlerinin SHSY5Y ve Kelly hücrelerindeki IC <sub>50</sub> dozları	65
Tablo 3. Apoptotik kimyasal bileşenlerin SHSY5Y ve Kelly hücrelerindeki IC <sub>50</sub> dozları.	67

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Sağaltım ve mikroçevre etmenlerinin doz-yanıtları	47
Şekil 2. HeLa hücrelerinde görülen morfolojik değişimler	49
Şekil 3. Mikroçevrede yer alan serbest radikallerin staurosporine'in neden olduğu apoptotik hücre ölümü ve hücre dışı NO salınımı üzerine etkileri	51
Şekil 4. MDBK hücrelerinde BHV-1'in büyüme kinetiği	53
Şekil 5. BHV-1 bulaşının MDBK hücrelerinde oluşturduğu apoptotik etkiler	54
Şekil 6. SS ile uyarılmış MDBK hücrelerinde, BHV-1'in antiapoptotik etkisi	55
Şekil 7. SS ile uyarılmış MDBK hücrelerinde görülen morfolojik değişimler	56
Şekil 8. MDBK hücrelerinde BHV-1 bulaşının neden olduğu nitrik oksit yanıtları	57
Şekil 9. HEp-2 hücrelerinde BHV-1'in büyüme kinetiği	58
Şekil 10. BHV-1 ile HEp-2 hücrelerinde oluşan apoptotik yanıtlar	59
Şekil 11. BHV-1 bulaşının Hep-2 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimler	60
Şekil 12. BHV-1 bulaşının Hep-2 hücrelerinde oluşturduğu apoptotik etkiler	61
Şekil 13. BHV-1 ile bulaşmış Hep-2 hücrelerinde kaspaz baskılayıcı peptidlerin etkileri	62
Şekil 14. HEp-2 hücrelerinde BHV-1 ile oluşan NO yanıtları	63
Şekil 15. Apoptozu uyaran kimyasalların SHSY5Y ve Kelly hücrelerinde gösterdikleri <i>in vitro</i> sitotoksik etkiler	66
Şekil 16. Nöroblastoma hücreleri üzerine mikroçevre bileşenlerinin <i>in vitro</i> etkisi	69
Şekil 17. Mikroçevrede yer alan radikallerin sağaltım süreçlerine etkileri	71
Şekil 18. Nöroblastoma hücrelerinde etoposide'in apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi	72
Şekil 19. Etoposide kaynaklı apoptotik hücre ölümü üzerine farklı serbest radikallerin etkileri	74
Şekil 20. Etoposide ve serbest radikallerin apoptozun erken döneminde görülen etkileri	75
Şekil 21. Etoposide ve serbest radikallerin apoptozun geç döneminde görülen etkileri	76
Şekil 22. Nöroblastoma hücrelerinde etoposide kaynaklı apoptotik ölümün kaspaz yolağı ile olan etkileşimi	77
Şekil 23. Nöroblastoma hücrelerinde Etoposide'in neden olduğu apoptozun morfolojik özellikleri	79

## **KISALTMALAR**

°C	centigrade degree
μM	mikro molar
ACD	Actinomycin D
ADR	Adriamycin
AG	Aminoguanidine.bicarbonat
ATCC	American tissue culture collection
BHV-1	Bovine Herpes virus 1
CAMP	Camptothecin
CARBO	Carboplatin
CIS	Cisplatin
CO <sub>2</sub>	Carbondioxide
CYH	Cycloheximide
DEX	Dexamethasone
DMEM	Dulbecco' minimum essential medium
DOXO	Doxorubicin
DSMZ	Alman doku kültür koleksiyonu
Eb	Ebselen
EMEM	Eagle's minimum essential medium
ETOP	Etoposide
FCS	Fötal calf serum
GSNO	S-Nitroso-L-Glutathione
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen Peroxide
HeLa	Human cervix carcinoma cell line
Hep-2	epidermoid carcinoma of the larynx
HOE/PI	Hoechst 33342 ve Propidium Iodide
IC <sub>50</sub>	Inhibiting cellular proliferation by 50%
Kelly	Neuroblastoma cell line
L-Arg	L-Arginine
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginine-methyl ester.HCl

MDBK	Madin and Darby's Bovine kidney cells
mg	miligram
mL	mililitre
mM	milimolar
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum bi karbonat
nM	nanomolar
NO	Nitrik Oksit
O <sub>2</sub>	Oksijen
O <sub>2</sub> <sup>·</sup>	Süperoksit
PBS	Phosphate buffer saline
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
SHSY5Y	Neuroblastoma cell line
SIN-1	3-Morpholinosydnonimine. HCl
SOD	Cu/Zn Superoxide Dismutase
SS	Staurosporine
TUNEL	in situ TdT-mediated dUTP nick end labeling technique
VCR	Vincristine



## **TEŞEKKÜR YAZISI**

Temel Onkoloji Doktora tezimi oluşturmamda ve çalışmalarımda buyk desteğini gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Nur Olgun'a;

Tez izlem dönemlerinde beni yönlendirerek etkin çalışmamı sağlayan diğer tez izlem danışmanlarım Prof. Dr. Meral Sakızlı ve Prof Dr. Uğur Yılmaz'a;

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerini paylaştığım, Doç. Dr. A. Hüseyin Baskın, Yard. Doç. Dr. Zafer Yazıcı ve Prof. Dr. Aykut zkuľ' a;

Deneylerim için gerekli laboratuvar olanaklarını sağlayan Prof. Dr. Uğur Yılmaz'a, Onkoloji, Hematoloji laboratuvarı ve Hıfzıssıhha Enstitüsü alışanlarına;

Tüm öğrencilik işlemlerimde gleryzleri ve yardımlarından dolayı Dokuz Eyll Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Sekreteri Sn. şenay Aıkalkın ve personeline;

Kendilerine ait zamanları çalışmalarım için kullanmama razı olan çocuklarım ve eşime;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Bu tez D.E.. Araştırma Fon Saymanlığı tarafından Proje Numarası: 03.KB. SAğ.001 ile desteklenmiştir.

## **TÜRKÇE ÖZET**

### **IN VITRO ORTAMDA, ERİŞKİN VE ÇOCUK KANSERLERİ SAĞALTIM MODELİNDE, MİKRO ÇEVRENİN APOPTOTİK YOLAK ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dr. Yasemin Baskın, İzmir Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsü, 35340 Göztepe, İZMİR.**

**Amaç ve Hipotez:** Yeni sağaltım stratejilerinin geliştirilmesi ve uygulanan kemoterapi stratejilerinin daha etkin kılınması amacıyla yapılan çalışmalarda önemli hedeflerden biri de tümör mikro çevresi ve doğal anti tümör sistemlerdir. Tümör hücresi ile mikro çevresi arasında çok sayıda etkileşmenin, tümör hücresinin yaşamında etkin rol aldığını düşünülmektedir. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerini kapsayan mikro çevrenin, farklı metabolitler oluşturarak hücresel süreçlerde farklı yolları etkileyebileceği bilinmektedir. Sağaltım süreçlerinde, apoptotik yolda, RNS ve ROS temelli mikro çevre bileşenlerinin etkileri, sağaltım stratejilerinin gelişmesini ve kemoterapi sağaltımının daha uygun kompozisyonda kullanılmasını amaçlayan yeni bir çalışma alanıdır. Bu çalışmanın amacı *in vitro* bir kanser sağaltım modeli oluşturarak, reaktif oksijen ve nitrojen temelli bir mikro çevrenin apoptotik yolağı ve sağaltım süreçlerini nasıl etkilediğini göstermektir.

**Yöntem:** SHSY5Y, Kelly HeLa ve HEp-2 hücre hatlarında *in vitro* sağaltım modeli oluşturuldu. ROS ve RNS temelli mikro çevre modellerinin deneysel tasarımında; L-Arg, GSNO, SIN-1, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, baskılayıcı olarak L-NAME, SOD, Ebselen, Aminoguanidine. Bicarbonate, viral enfeksiyon modeli olarak BHV-1 kullanıldı. Hücreler üzerine oluşan sitotoksik etkiler MTT ve XTT yöntemleri ile değerlendirildi. Apoptotik hücre ölümü için, Hoechst 33342 / Propidyum iyodid çekirdek boyaması, (in situ TdT-mediated dUTP nick end labeling technique) TUNEL tekniğı, apoptozun erken dönemde saptanması için Annexin V işaretlemesi uygulandı. Nitrik oksit yanıtları Griess Ayırıcı ile total nitrit olarak değerlendirildi.

**Bulgular ve sonuç:** Servikal karsinoma hücre hattında mikro çevre değişikliğine yanıtın araştırıldığı deneylerde, L-Arg (endojen NO donörü), doza bağımlı olarak, apoptotik yolağı uyarmıştır. Ortamda süperoksit bulunduğu durumlarda, NO uyarıldığında, hücresel ölüm

sinerjik olarak artmıştır. Endojen NO uyarımı ile oluşan hücreölüm apoptotik ölümken, süperoksit ve NO'nin birlikte bulunduğu durumlarda baskın olan ölüm şekli nekrotik ölüm olmuştur. Bu sonuçlar, NO'nin hücreölüm şeklini (ortamda baskın olan radikale bağlı olarak) yönlendirmede temel bir rol oynadığını göstermiştir.

BHV-1'de ya normal hücreölüm mikro çevrede ya da kanser hücrelerinde "E" döneminden "L" dönemine geçiş sırasında sunulan proteinler, staurosporin ile uyarılmış apoptozu bile baskılamaktadırlar. Tersine normal bir hücreölüm mikro çevrede (MDBK) BHV-1 "E" genleri sunulurken apoptoz en fazla uyarılırken, kanser hücrelerinde (HEp-2) "IE" genleri sunulurken apoptoz uyarılmıştır. BHV-1 apoptozunun kaspaz-8 yolağı ile yani "dış membran reseptör" yolağından oluştuğunu göstermiştir.

SHSY5Y hücrelerinde; ekzojen NO (GSNO), peroksinitrit (SIN-1) radikalinin baskın olduğu mikroçevrede, DOXO, CIS, ETOP sağaltım modellerinde, CARBO+ETOP uygulamasında, peroksinitrit ve süperoksit; CIS+ETOP uygulamasında ekzojen NO ve süperoksit hücre ölümünü arttırmışlardır.

Kelly hücrelerinde; ekzojen NO (GSNO), peroksinitrit (SIN-1) ve süperoksit ve hidroksil radikalleri (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) radikalinin baskın olduğu mikro çevrede, DOXO, CIS, ETOP sağaltım modellerinde CARBO peroksinitrit ve süperoksit, CIS+ETOP uygulaması, ekzojen NO ile birlikte, CARBO+ETOP uygulamasında hem ekzojen NO hem de süperoksit hücre ölümünü arttırmıştır. Sağaltım sürecindeki nöroblastoma hücrelerinde gözlenen apoptotik hücre ölümü, ortamda peroksinitrit bulunduğu 2.74 kat; ekzojen NO bulunduğu 2.18 kat; ROS baskın bir ortamda 3.45 kat artmıştır.

Bu sonuçlar, mikro çevrede bulunan serbest radikal cinsine bağlı olarak sağaltım süreçlerinin etkilendiğini desteklemektedir.

## **TÜRKÇE ANAHTAR KELİMELELER**

Nöroblastoma, tümör mikro çevresi, in vitro sağaltım modeli, ROS, RNS, apoptotik yolak.

## **İNGİLİZCE ÖZET**

### **EFFECTS OF MICROENVIRONMENT ON APOPTOTIC PATHWAY IN ADULT AND CHILDREN CANCERS THERAPY MODELS, IN IN VITRO ENVIRONMENT.**

**Yasemin Baskın, M.D., Ph. D., Regional Institute of Hygiene, 35340 Göztepe, İZMİR.**

#### **SUMMARY**

**Aim and Hypothesis:** One of the main targets of the studies which aim to optimize applied chemotherapy strategies more effectively and to develop new therapy strategies is the tumor microenvironment and natural anti tumor systems. It is thought that many interactions between tumor cell and its microenvironment play an effective role in the survival of the tumor cell. It is known that a microenvironment including reactive oxygen and nitrogen products, may affect distinct pathways by producing distinct metabolites in cellular processes. Effects of the RNS and ROS based microenvironment components on therapy processes; apoptotic pathways are new study areas which are aimed to develop therapy strategies and chemotherapy therapy in more appropriate compositions. The aim of this study is to show how a reactive oxygen and nitrogen based microenvironment may affect the apoptotic pathway and therapy processes by forming an in vitro cancer therapy model.

**Method:** An *in vitro* therapy model was formed in SHSY5Y, Kelly, HeLa and HEp -2 cell lines. In experimental design of ROS and RNS based microenvironment L -Arg, GSNO, SIN -1, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and L -NAME, SOD, Ebselen, Aminoguanidine, Bicarbonate (as inhibitors) were used. BHV -1 was used as a viral infection model. Cytotoxic effects on cells were determined by MTT and XTT methods. For apoptotic cellular death; Hoechst 33342 / Propidium iodide nuclear staining, in situ TUNEL technique (TdT-mediated dUTP nick end labeling technique), and for early determination of the apoptosis; Annexin V labeling were used. Nitric oxide responses were determined as total nitrite by Griess Reagent.

**Results and Conclusion:** In experiments which the responses against microenvironment changes in cervical carcinoma cell line are searched, L –Arg (endogen NO donor) stimulated

the apoptotic pathway in a dose – response manner. Cellular death increased synergistically when NO was stimulated in conditions which superoxide was in the microenvironment. Endogen NO stimulated cellular death type was apoptotic, but dominant cellular death type was necrotic when superoxide and NO were together. These results showed that NO played an essential role in mediating the cellular death according to the dominant radical in the microenvironment.

The proteins expressed during the transition from “E” stage to “L” stage either in normal or in cancer microenvironment in BHV -1 infection; also inhibit the staurosporin stimulated apoptosis. On the contrary, apoptosis was stimulated at most in a normal microenvironment (MDBK cells) when BHV -1 “E” genes are expressed whereas when “IE” genes were expressed in a cancer (HEp -2 cells) microenvironment. It was shown that BHV -1 stimulated apoptosis was through caspase-8 pathway (means through “outer membrane receptor”).

In DOXO, CIS and ETOP therapy protocols in SHSY5Y cells, cell death was increased. When exogenous NO (GSNO) and peroxynitrite (SIN -1) were dominant in microenvironment, In CARBO + ETOP therapy protocols in SHSY5Y cells; cell death was increased when peroxynitrite and superoxide were dominant in microenvironment.

And in CIS+ETOP therapy protocols in SHSY5Y cells, cell death was increased when exogenous NO and superoxide were dominant.

In DOXO, CIS, ETOP therapy protocols in Kelly cells, cell death was increased when ROS and RNS were dominant in microenvironment. In CARBO application, peroxynitrite and superoxide radicals; in CIS+ETOP application, exogenous NO; in CARBO+ETOP application both exogenous NO and superoxide increased the cellular death.

Apoptotic cellular death in neuroblastoma cells during therapy process was increased 3,45 times when ROS was dominant; 2,18 times when exogenous NO was dominant; and 2,74 times when peroxynitrite was dominant in the microenvironment.

These results support that therapy processes are affected by the type of free radical in the microenvironment.

### **KEY WORDS**

Neuroblastoma; tumor microenvironment; in vitro therapy model; ROS; RNS; apoptotic pathway

## **GİRİŞ VE AMAC**

Kanserin sağaltım sürecinde, hücrelerin apoptotik yolla ölmeleri yeğlenir. Bu gerek immun mekanizmalar gerek çevredeki sağlam hücrelerin korunması için önemlidir. Ancak kanser hücreleri apoptoza girmeyebilir ya da yüksek apoptotik indekse karşı daha yüksek bir proliferasyon gösterebilir. Bu sağaltım başarısını düşüren önemli bir etkidir. Apoptotik sürecin tanınması ve kontrolü, kansere karşı yeni sağaltımların geliştirilmesinde önemlidir.

Günümüzde sağaltım yaklaşımları giderek kansere özgüden, bireye özgüye değişmektedir. Bu değişimin temelinde, giderek daha özgün ve daha çok parametre ile bireyin kanserini değerlendirebilecek yöntemlere sahip olmamız ve insan genom projesindeki bilgi birikimimiz yatmaktadır. Bu bilgiler ışığında hem kanserin değiştii ortamın hem de sağaltım sürecinde kanser hücresinin mikroçevresi önem kazanmıştır ve önemli bir araştırma alanı olmaya adaydır.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, fizyolojik bazı süreçlerde aynı proteinin farklı mikroçevrelerde ( redoks potansiyeli, serbest radikaller, pH, sitokin kompozisyonu) farklı yolları uyardığı gösterilmiştir. Nitrik oksit ve süper oksit, çevresel etkenlerle farklı metabolitler oluşturarak hücrel süreçlerde farklı yolları etkileyebilirler. Hem nitrik oksit hem de hidrojen peroksitin kronik etkileri, bazı genlerin ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerini kapsayan mikroçevrenin, hücrel süreçlere etkilerinin hala tartışmalı olması, bu çalışmanın çıkış kaynağını oluşturmuştur.

Bu çalışmanın amacı, çocukluk çağı için nöroblastomada; yetişkinlerde epitelyal karsinomalarda invitro bir kanser sağaltım modeli oluşturarak, reaktif oksijen ve nitrojen temelli bir mikroçevrenin apoptotik yolağı ve sağaltım süreçlerini nasıl etkilediğini göstermektir.

## **GENEL BİLGİLER**

Bir malign neoplazma farklı hücre gruplarından oluşur. Bunların biyolojik karakterleri birbirlerinde farklıdır. Antijenik özellikleri, metabolizmaları, ilaç duyarlılıkları hücre yüzey bileşenleri, büyüme hızları, karyotipleri birbirinden farklı hücreler aynı kanserde bulunabilirler. Ancak bu hücreler ağırlıklı olan gruba özgün olarak tek şekilde sağaltılırlar. Bu sonuç olarak hem farklı sağaltım yanıtlarını açıklar, hem de medikal onkoloğu daha agresif hücreleri yaşatacak bir sağaltım seçeneği ile karşı karşıya bırakır [1].

Günümüzde sağaltım yaklaşımları giderek “kansere özgü”den “bireye özgü”ye değişmektedir. Bu değişimin temelinde giderek daha çok, daha özgün, daha özgül, daha duyarlı, daha hızlı bir şekilde moleküler düzeyde bireyin kanserini değerlendirecek yöntemlere sahip olmamız ve insan genom projesindeki bilgi birikimimizin artması yatmaktadır.

Kanser sağaltımı günümüzde ve yakın gelecekte üç temel bileşene sahiptir; kemoterapi, radyoterapi, cerrahi. Bir yandan yeni sağaltım alanları araştırılırken bir yandan da elimizde olanların bireye özgü bir şekilde daha uygun kompozisyonlarda kullanımı gündeme gelmektedir.

Yeni sağaltım stratejilerinin geliştirilmesinde ve uygulanan kemoterapi stratejilerinin daha etkin kılınması amacıyla yapılan çalışmalarda önemli hedeflerden biri de tümör mikro çevresi ve doğal anti tümör sistemlerdir.

DeneySEL tümör çalışmaları ve çok sayıda klinik gözlem; kanser hücrelerinin farklı mikroçevrelerde yaşama olasılığının farklı olduğunu göstermiştir. Bu durum sıklıkla metastatik tümör hücrelerinin yaşama şansı ve büyümelerinin organlara göre değişmesinde karşımıza çıkar [2, 3].

Bu bulgular tümör hücresi ile mikroçevresi arasında çok sayıda etkileşmenin, tümör hücresinin yaşamında etkin rol aldığını gösterir [4, 5].

Kanserin sağaltım sürecinde, hücreslerin apoptotik yolla ölmeleri yeğlenir. Bu gerek immun mekanizmalar gerek çevredeki sağlam hücreslerin korunması için önemlidir. Ancak kanser hücresleri apoptoza girmeyebilir, ya da yüksek apoptotik indekse karşı daha yüksek proliferasyon gösterebilir. Bu sağaltım başarısını düşüren önemli bir etkidir. Apoptotik sürecinin daha iyi tanınması ve kontrolü, var olan sağaltımların geliştirilmesi ve kansere karşı yeni sağaltım tasarımlarının geliştirilmesinde önemlidir.

Çok hücreli organizmalarda doku homeostasisinin sağlanması hücre ölümü ile hücre artışı arasında bir denge olmalıdır. Bu önemli fonksiyonu nedeniyle, programlı hücre ölümü olarak adlandırdığımız apoptoz, evrimsel olarak korunmuş bir süreçtir. Embriyonik gelişim sürecinde ve yetişkin dokularında işlevini tamamlamış hücreslerin yok edilmesinde; sitotoksik immunolojik reaksiyonlar ya da genetik hasara yol açan, fizyolojik aktivatörler, *heat shock*, bakteri toksinleri, onkogenler, kemoterapi ilaçları, ultraviyole ve gama radyasyonu gibi bir çok uyarana karşı gerekli bir hücresele yanıtıdır. Apoptotik hücre ölümü aktif, enerji gerektiren bir hücresele olaydır [6].

Apoptoz olayında; hücre iskeletinin bozulması, hücresele büzülme, kromatin yoğunlaşması, hücre membranının kabarcıklaşması, çekirdek DNA' sının oligonükleozomal parçacıklara ayrılması olarak tanımlanan, yapısal ve biyokimyasal süreçler gözlenir. Çekirdek ve sitoplazma içeriği, apoptotik cisimcikler içinde olduğundan ve membran bütünlüğü bozulmadığı için hücre çevresinde bir inflamatuvar yanıt gelişmez. Apoptotik cisimcikler, komşu hücreslerce fagosite edilirler [7].

Apoptotik yolak, sistein içeren, aspartik asite özgün proteazlar olarak bilinen kaspazlarla ilişkilidir. Kaspazlar, zimogen olarak tüm hücreslerin plazmasında, mitokondri intermembran alanında, çekirdek matriksinde çözünür halde bulunurlar [8].

Kaspazların aktivasyonu için birkaç model önerilmiştir. Bunlardan biri, apoptozun "ölüm reseptörleri" yoluyla uyarılmasıdır. Bu apoptotik yolak, temel olarak kaspazlar tarafından kontrol edilir. Hücre dışında bir ligantın, ölüm reseptörüne bağlanması ile ilişkili olduğu DISC "death-induced signaling complex" protein grubu yoluyla başlangıç kaspaz olan pro-kaspaz 8 uyarılır. Kaspaz 8'in uyarılması ile önce kaspaz 3, daha sonra kaspaz kaskadı



uyarılır. Böylece pek çok kaspaz substratı yıkılır. Bunlardan biri olan kaspaz bağımlı endonükleaz serbest kalarak çekirdeğe girebilir ve DNA' yı yaklaşık 180 bp uzunluğunda oligonükleotidlere parçalar [9, 10].

Bir diğer modelde apoptoz mitokondriyal bozukluk nedeniyle uyarılır. Mitokondri içinde bulunan sitokrom c sitozole çıkar ve Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) ile bağlanır. Bir dATP molekülü ile oligomerize olan yapı, CARD "caspase recruitment domain" bölgesi ile pro-kaspaz 9' a bağlanır ve onu keserek aktive eder. Kaspaz 9, uç kaspazlardan kaspaz 3 ve kaspaz 7' yi aktive eder [11, 12].

Sitotoksik hücrelerin kaspazları uyardıkları bir başka yolda, özellikle tümör hücreleri ve hücre içi patojenlerle infekte hücrelerden kaynaklanan perforin ve granzyme B apoptoza neden olurlar. Perforin yoluyla hücre membranı granzyme B' ye geçirgen hale gelir. Bu enzim kaspaz 3'ü aktive ederek kaspaz kaskatını uyarır [13].

Buna karşın, nekrotik hücre ölümü, toksik maddeler ya da güçlü stres durumlarına yanıt olarak gelişen akut hücresel bir bozukluktur ve hızla gelişen hücre ATP tükenmesi sonucu oluşan pasif bir süreçtir. Morfolojik olarak hücre yoğunluğunun hızla artışı ve plazma membranının yırtılması ile tanımlanır. Ölen hücrelerin içeriği hücre dışı alana yayılır ve hem komşu hücreleri hem de inflamatuvar hücreleri etkileyerek bölgesel bir inflamasyon yanıtı oluşturur [14. 15].

Bununla birlikte hücre ölüm şeklini belirleyen erken biyokimyasal olaylar henüz kesin tanımlanmamıştır.

Yaşam ve ölüm arasındaki dengeyi etkileyen çeşitli çevresel kuvvetler bulunmaktadır. Bu açıdan serbest radikaller, yaşayan her organizmada bulunabilen en önemli olası tehlikedir. Normal metabolizma sırasında ya da toksik olaylarda, superoksid anyon, hidrojen peroksit, tekil oksijen, hidroksil radikali ve peroksi radikal gibi oksidatif gücü olan reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri oluşabilir [16]. Bu ürünler hücrenin doğal antioksidan savunma sistemi ile yok edilebilir ya da biyolojik makromoleküllerin çoğuna zarar verebilir. Oksidatif stres, prooksidan-antioksidan dengenin bozulması ile tanımlanan ve hücre hasarına yol açan bir

süreçtir. Bu süreç, yaşlanma, inflamasyon, karsinogenez, iskemi-reperfuzyon, gibi biyolojik ve patolojik süreçler yanında, Parkinson, Huntington koreası, amyotrofik lateral skleroz, katarakt gibi hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir [17]. Apoptotik süreçte oksidatif stresin rolü, iyonize radyasyon ve kemoterapötik ilaçların toksisite çalışmalarında sorgulanmıştır [18].

Hücre içinde glutatyon azalması ile birlikte ROS üretiminin sürmesinin hücreyi apoptoza götürdüğü gözlenmiştir [19]. Katalaz ve N-asetil sistein (NAC) gibi antioksidanlarla, ilaçlarla uyarılmış apoptoz engellenebilir [20]. Bcl-2 ve baculovirus protein p35 gibi antiapoptotik proteinlerin aynı zamanda antioksidan etkili oldukları bildirilmiştir [21]. Yüksek ROS yoğunluğunda apoptotik hücre ölümünün çeşitli hücrelerde uyarıldığı gösterilmiştir [22]. Tüm bu göstergeler, apoptotik olaylarda oksidatif stresin önemli bir payı olduğunu göstermektedir.

Oksidatif stresin hücre içi kaynakları, homeostasis kaynaklıdır. Mitokondriler solunumları sırasında aktif olarak ve sürekli ROS üretirler. Elektron transport zinciri hücresel enerjiyi üretirken  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  ve ortamda demir olduğunda hidroksil ( $\cdot OH$ ) radikallerini de üretir. Oksijen toksisitesinin ilk savunma basamağı süperoksit dismutaz (SOD) enzimleridir. Manganez SOD (MnSOD), mitokondri, bakır ve çinko SOD' lar (Cu, Zn SOD), sitozol ve hücre dışı (EcSOD) yerleşimlidir. Ancak, MnSOD yoksunluğunda oluşan oksidatif stres nedeniyle oluşan apoptoz durumunda sitozol enzimleri mitokondri içine girerek bu duruma karşı hücreyi koruyabilirler [23]. Hücre içi ROS üretiminde, mitokondri dışındaki önemli kaynaklar; araşidonik asid kaskatı, prostoglandinler, lökotrienler, sitokrom p-450 izoenzimleri, askorbik asid otooksidasyonu, düşük ağırlıklı tiyoller, adrenalin, flavin koenzimleri, sitozolik glutatyonun nötralizasyonu gibi olaylardır [24].

Hücrenin önemli bir oksidatif stres molekülü nitrik oksit (NO), farklı metabolizmaların ürünüdür. NO hücre membranlarını kolaylıkla geçebilen gaz formunda bir serbest radikaldir. Üç farklı gen tarafından kodlanan, üç farklı izoformu bulunan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından, L-arjininin guanido azotundan üretilir. Çok farklı hücre fonksiyonlarında yer alan yolaklarda işlev görmektedir [25]. Nöronal yapısal NOS (nNOS), tarafından düşük düzeyde üretilen NO, kısa süreli etkili bir nörotransmitterdir [26]. Endotelial kaynaklı NOS (eNOS) tarafından üretilen NO, trombosit agregasyonu ve vazodilatasyonun

düzenlenmesinde fizyolojik bir role sahiptir [27]. Çok miktarda NO üreten enzim, uyarılabilir NOS (iNOS) olarak bilinir. Ağırlıklı olarak makrofaj ve nötrofil gibi vücudun immun savunma hücreleri tarafından üretilir ve mikroorganizma ve tümör hücrelerine karşı, vücudun ilk savunma basamağını oluşturur [28, 29]. NO kaynaklı sitotoksosite ile ilgili olaylar hala tartışma konusudur. Öncelikle, akonitaz gibi demir-sülfür taşıyan enzimlerle, demir-nitrozil kompleksleri oluşarak mitokondri fonksiyonları bozulabilir ve enerji üretimi durur. NO doğrudan deaminasyon ve çapraz bağ oluşumu nedeniyle kromatin hasarı oluşturarak mutajenezi arttırabilir. NO, süperoksit radikali ile daha toksik olan peroksinitrit oluşturabilir. NO, katalaz, glutatyon peroksidaz, SOD gibi antioksidan enzimlerle etkisiz kılınabilir [30, 31, 32, 33, 34].

Bunun yanında, Fas sistemini uyarması, kaspaz 3 uyarılmasına neden olan seramid artışı ile, mitokondri geçirgenliğini artırarak apoptoza yol açtığı bildirilmiştir [35].

Fizyolojik kaynaklar dışında, bazı maddeler de hücre dışı uyarım ile hücre içinde ROS oluşturabilirler. Bunların çoğu hücre içinde süperoksit ve hidrojen peroksit üretimini arttırmırlar. Hücre dışı ROS kaynakları, bir elektronlarını redoks döngüsüne vererek bu elektronun oksijene aktarılması ile serbest radikal oluştururlar [36].

Hücre dışı uyarım ile serbest radikal oluşumunu arttıran olaylardan biri de viral enfeksiyonlardır. Viral enfeksiyon sırasında, süperoksit ve hidroksil radikali yanında, özellikle iNOS tarafından üretilen yüksek miktarda NO üretildiği gösterilmiştir. NO ve O<sub>2</sub>' nin eş zamanlı olarak büyük miktarda üretimi peroksinitritin viral patojenezde baskın serbest radikal olduğunu düşündürmektedir [37, 38].

ROS ile apoptozun uyarılmasını açıklayan birçok mekanizma tanımlanmıştır. Ancak herkesin kabul ettiği bir model henüz oluşmamıştır. Reaktif oksijen ürünlerinin ağırlıklı olarak kaynağı olan mitokondrinin, özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etkisiyle membran bütünlüğü bozulabilir ve sitokrom c sitozole çıkarak kaspaz 9 yolağını uyararak apoptozu tetikleyebilir [39]. Bazı kaynaklar ise apoptozun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile uyarılmasını, Fas/Fas L sisteminin upregülasyonu ile ilişkilendirmiş ve reaktif oksijen ürünlerinin Fas L' i upregüle ettiğini göstermiştir [40, 41, 42]. Bu yolak “death domain” yapıları ile ilişkili olarak kaspaz 8 'i uyararak apoptoza yol

açar. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apoptoz ile ilintili bazı transkripsiyon faktörlerini yönlendirebilir. Bunlar proapoptotik genlerin yada yaşamsal proteinlerin inhibitörlerinin transkripsiyonunun başlatan, p53, NFκB ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörleridir [43, 44].

Serbest radikallerin değişik miktarlar ve koşullarda apoptotik etkilerinin farklı sonuçlara neden olması, bu konudaki ortak kararların daha dikkatli alınmasını gerektirmiştir. Bu tartışmalı konuların başında kaspazların aktif bölgesini etkileyen farklı koşullar gelmektedir.

Kaspazların aktif bölgesinde oksidasyon ya da tiyol alkalizasyonuna eğilimli olan bir sistein bulunmaktadır. Bu nedenle aktiviteleri, indirgen çevre koşullarında optimaldir. Hasarlı bir hücrede bu koşulların değişmesi kaspazların çalışmasını etkileyerek onları inaktive edebilir. Buna örnek olarak, hidrojen peroksidin, hücrenin redoks ve kaspazların sistein kalıntısının oksidasyon durumuna göre, kaspazları hem aktive hem de süprese edebildiği gösterilmiştir [45, 46, 47].

NO grubunun bir sistein sülfidriline, R-S-NO şeklinde aktarılması anlamına gelen S-nitrozilasyonu, hücrede sinyal aktarım kaskadının önemli bir üyesidir. Aktif bölgesinde sistein taşıyan kaspazlar da S-nitrozilasyonunun hedefleri arasındadır. Bu olay kaspazların yanında sistein taşıyan diğer proteinlerin fizyolojik ve biyolojik etkilerini değiştirebilir. Ayrıca, NFκB ve AP-1 gibi sistein taşıyan transkripsiyon faktörlerini de kapsayarak apoptozu düzenleyebilir [48, 49, 50]. NO, kardiyolipin yoğunluğunu azaltarak, mitokondride elektron aktarımını bozarak sitokrom c' nin sitozole çıkmasına neden olabilir [51].

Doğrudan NO etkisiyle ya da iNOS aktivasyonu ile birçok hücrede apoptozun uyarıldığı gösterilmiştir. Bunların çoğunda NO'in etki şekli olarak, kaspazların S-nitrozilasyonu gösterilmiştir. Bu bulgular NO'in kaspazların endojen düzenleyicisi olduğu bulgusunu desteklemektedir. Bunun yanında pro-kaspaz 3'ün katalitik bölgesindeki sisteinin S-nitrozile olması ve denitrozilasyon yolu ile Fas yolağının aktive olması, apoptoz sırasında, nitrozilasyon/denitrozilasyon döngüsünün, fosforilasyon/defosforilasyon gibi düzenleyici bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir [52, 53].

Kanser hücrelerinde, yapısal olarak ROS artışı olmaktadır [54]. ROS bir hücre içi haberci olarak hücre büyümesi ve diferansiyasyonda rol oynar [55]. Tümör hücreleri temelde iNOS ekspresse ederler [56]. iNOS ile NO üretiminin tümör büyümesini kontrol edebildiği bildirilmiştir [57, 58, 59, 60]. NOS inhibitörleri ile NO üretiminin inhibisyonu, deneysel melanoma ve akciğer modellerinde tümör büyümesini uyarmıştır [61, 62]. Ancak bazı tümörlerde NO üretiminin azalması iNOS ekspresyonunu arttırarak hücre hasarına da yol açabilir [63, 64]. Tümör mikroçevresinde oksijen ve L-arjinin azlığı ile asidoz, süperoksid üretimini arttırdığı; ortamda peroksinitrit artışı nedeniyle hücre hasarının olduğu gösterilmiştir [65]. Bununla birlikte, tümör hücresi kaynaklı NO 'in rolü tam aydınlanmamıştır. Eksojen kaynaklı NO ile endojen üretilen NO etkileri birbirine ters düşmektedir [66, 67, 68].

Nöroblastoma çocukluk çağının en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörüdür. Nöral krestten kaynaklanan bu tümörler biyolojik ve klinik olarak farklı özellik gösterebilirler. İyi prognostik özellik taşıyan grupta TrkA ekspresyonu, hiperdiploidi, iyi histoloji görülür; diferansiyasyon ve apoptoza yatkındır. Kötü prognostik özellik gösteren grupta, MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonu, TrkB ekspresyonu egemendir; metastaz ve kötü prognoz sıklıkla gözlenir [69].

Nöroblastoma, doğal olarak spontan regresyona gidebilir. Bu süreçte diferansiyasyon ve /veya programlanmış hücre ölüm yollarının rolü olabileceği tartışılmaktadır. Ancak kanserlerde görülen spontan regresyonların doğası henüz anlaşılamamıştır. Buna karşın nöroblastomada tanımlanan, büyüme faktörleri, retinoidler gibi mikroçevre bileşenlerinin, hücre yüzey reseptörlerinin kompozisyonunu değiştirerek (Trk A,B,C) hücrenin diferansiyasyon, apoptoz ya da proliferasyon yollarından birine geçişini düzenledikleri gösterilmiştir [70].

Epitelyal karsinomaların etyolojileri serbest radikaller ile ilişkilendirilmektedir. Larinks karsinoma hücrelerinde hücre içi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> artışının mitokondriyal hasar sonucu apoptozu arttırdığı gösterilmiştir [71]. Servikal karsinoma hücre dizilerinde ROS ile hücre ölümünün arttığı gösterilmiştir. Bu yolak transkripsiyon faktörleri ile ilişkilendirilir. Ancak NFkB yolağında, A20 gibi çinko-parmak proteinlerinin karsinoma hücrelerini özellikle kaspaz 9 ile

süren apoptozdan koruduğu bulunmuştur. Bu yolla, NFkB hem yaşamı sürdüren hem durduran sinyalleri iletebilir, hem anti-apoptotik hemde anti-nekrotik genleri uyarabilir [72].

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda mikroçevre bileşenlerinin, hücrenel süreçlere etkili olduğu gösterilmiştir. ROS ve RNS temelli bir mikroçevrede hücrenel süreçlerin nasıl etkilendiği ve olası mekanizmaları henüz tartışma konusudur. Kanser hücrelerinde bu etkileşimler normal hücrelerden farklılaşmaktadır. Apoptotik yolağının bu mikroçevrede işleyişi, üzerinde çalışmaların artarak sürdüğu bir alandır ve sonuçları hala tartışılmaktadır. Mikroçevre bileşenlerinin kanser sağaltımını nasıl etkiledikleri, sınırlı sayıda araştırmanın konusu olmuştur. Bu konuda kliniğe yansımış bir alan hipoksik tümörlerde, oksijenin radyoterapi ve kemoterapi ile birlikte kullanılması ile sınırlı kalmıştır.

Temel bilim çalışmaları ile klinik uygulamalar arasında bir bağ oluşturan, sağaltım süreçlerinde, apoptotik yolakta, RNS ve ROS temelli mikroçevre bileşenlerinin etkileri, sağaltım stratejilerinin gelişmesini ve kemoterapi sağaltımının daha uygun kompozisyonda kullanılmasını amaçlayan yeni bir çalışma alanıdır.

## **GEREC VE YÖNTEMLER**

### **Hücre Kültürü Yöntemleri**

#### *GİRİŞ*

Doku kültür teknikleri, tıp ve endüstrinin alışlagelmiş uygulama alanlarından biridir ve uzun zamandır kullanılmaktadır. Hücresel aktivitenin izlenmesinde üstünlüğü olan bir tekniktir. Ancak bu yöntemin sınırlılıkları da önemle vurgulanmalıdır.

Doku kültürünün en önemli üstünlüğü, fizikokimyasal çevre (pH, ısı, ozmotik basınç, oksijen, CO<sub>2</sub> yoğunlukları, vb.) ve fizyolojik koşulların ölçülebilir düzeyde kontrol edilebilir ve kontrollü bir düzeyde değiştirilebilir olmasıdır.

Doku örnekleri bir heterojenlik taşırlarken, hücre hatları uniform ya da homojendir. Bu aynı koşullarda hücresel aktivite ve yanıtların özdeş olmasını sağlar. Özdeş yanıtlar, hücre yaşamı gibi çok sayıda etkenden ve aktiviteden gelen karmaşık sonuçları yorumlamada araştırmacıya üstünlük sağlar, deneylerin yinelenebilirliğini artırır.

Madde etkilerinin incelenmesinde, *in vivo* çalışmalarda verilen maddenin % 90' ı vücut dağılımı ve boşaltım nedeniyle kaybedilir, buna karşın hücre kültüründe çok düşük yoğunluklarda ve istenilen hücre grubunda etki oluşturulabilir. Bu nedenle ekonomiktir.

Doku kültürünün en önemli sınırlılığı, tekniğin uzmanlık gerektiren birçok koşulu içermesi ve çok kontrollü aseptik ortamlarda uygulanma zorunluluğudur. Bu nedenle seçilen koşullarda yinelenebilirlik izlenmeli ve deney koşulları bir deneyden diğerine değişmez şekilde kurgulanmalıdır.

Kültür hücrelerinin deneyler dışında sürdürülmesi zorunluluğu bir diğer sınırlılıktır. Bu emek yoğun bir uzmanlık ve ek maliyet gerektirir.

Kararsız *aneuploid* kromozomsal yapılarına bağlı olarak uzun süreli kültürlerde genetik yapı değişebilir. Bu nedenle deneyler aynı ya da yakın pasaj sayılı hücre gruplarında yapılmalıdır. Hücre hatları belirli aralıklarla alt grup oluşumları açısından taranmalıdır.

## *GEREÇ VE CİHAZLAR*

### *Hücre kültür ortamları:*

Temel Besleyici Ortam Eagle (with L-Glutamine (EMEM) BioWhittaker Europe (Cat. No.BE 12-611F), Dulbecco' nun Fosfatla Tamponlanmış Tuzlu Suyu (PBS) (Cat.No.L1823), Dulbecco' nun Değiştirilmiş Eagle' ın Ortamı (DMEM Cat. No. F4813) ve RPMI 1640 (Cat. No. F4813 Biochrom Germany). Foetal Bovine Serum (FBS) (Cat. No. S0113), Penisilin/ Streptomisin (Cat. No. A2213), Tripsin/ EDTA %0, 25/0, 02 (Cat. No. L2163), L-Glutamine (Cat. No. K0281) (Seromed Germany); Hoechst 33258 (cat. No. 33217), Riedel-de Haen; 0. 4% trypan blue (cat. No. T8154) (Sigma USA).

### *Hücre kültüründe kullanılan plastik malzeme:*

25 cm<sup>2</sup> (Cat No.690 160), 75 cm<sup>2</sup> (Cat. No.690 170) doku kültür flaskleri 96, 24, 6 gözlü çok gözlü plaklar (Cat No.; 662 160; 657 160; sırasıyla Greiner Germany); 8 göz odacıklı lam (Cat. No. 177445 Nalge Nunc International, Corp. USA). 1-mL, 2-mL, 10-mL pipetler (Greiner), 15-ml, 50-ml plastik konik santrifüj tüpleri (Cat. No.188 271; 210 261; sırasıyla FALCON, USA) Konik Tüpler 50-mL, 12-mL (Cat.No.164 160), Hücre Kazıyıcı (Cat. No. 541070 Greiner, Germany)

Haemocytometer (Neubauer improved chamber) glasstik lam 10 (HYCOR Biomedical Inc.The KOVA Company), Otomatik pipetler (Eppendorf , GmbH Hamburg, GERMANY)

### *Hücre kültüründe kullanılan cihazlar:*

Katmanlı hava akımlı kabin (The laminar flow cabinet NUAIRE ClassII and KOJAIR Tech Oy, FINLAND, Type: KR-170 BW MSC CL II En 12469)

CO<sub>2</sub> inkübatör (Forma Scientific Model 3194, Thermo Electron Corporation Steri-Cycle CO<sub>2</sub> Incubator HEPA Class 100 (MODEL 381,371) USA)

Otoklav (HIYEREMA (HY-85) ) ve UV lamba (Philips (TUV 30W E30 T8))

İnvert Mikroskop (Carl Zeiss and OLYMPUS CK X 41 phase contrast, JAPAN; İmmünofloresan için JENALUMAR Carl Zeiss mikroskop). Işık Mikroskopu (Carl Zeiss LABOVAL).



+40C, -200C ve -800C soğutucu ve dondurucular (SENOCAK D 400 DF ve UGUR; INDOSIT Tropical Türkiye; JEWETT Inc. Asheville USA) Sıvı Azot Dondurucu (MVEXLC 500, USA)

Santrifüjler (TECHNE Genofuge 16M, Herauss and Sigma 3-16K, GERMANY (-10°C; +40°C.).

*Hücreler:* HeLa; Dr. Aykut Özkul, HEp-2 ve MDBK; Dr. Zafer Yazıcı tarafından sağlanmıştır. KELLY ve SHSY5Y; DSMZ' den alınmıştır.

## YÖNTEM

*Doku kültürü laboratuvarı genel çalışma koşulları*

*Laminar Airflow cabinet (katmanlı hava akımlı kabin)*

Dikey hava akımı sağlayan bir kabin yeğlenmelidir. Yalnız kabin içinde kullanılan bir pipet takımı, hücre ortamlarını aspire edebilecek bir vakum sistemi olmalıdır. Çalışma alanı, %4 diversol ya da eşdeğeri bir dezenfektan ile forsepsler % 70 etanol ile temizlenmelidir. Kullanılan plastik malzeme steril olarak kabin içine alınmalıdır. Kabin dışında yakın alanlarda, atık kapları, nemlendirilmiş CO2 inkübatör, inverted mikroskop phase contrast optikli, klinik tip bench sentrifüj olmalıdır. Kültür ortamları ve hücreler için yalnız bu amaçla kullanılan, buzdolabı, -20°C ve -80°C ve sıvı azot dondurucular bulunmalıdır. Oda havası ve kabin ortamının sterilizasyonu için bir UV lamba (düşük basınçlı cıva buharlı lamba) kullanılmalıdır.

## *Sterilizasyon*

Sıvılar, cam eşya, pipet ucu, gibi malzemelerin, otoklavda ısıyla sterilizasyonu yapılabilir ( 30 dakika- 15lb/ in<sup>2</sup>). Plastik eşyalar, oda havası; ultraviyole ışığı ile germicidal lambalar ile yapılmalıdır. Kabinlerin içinde %4 Diversol ya da eşdeğeri dezenfektan ve %70 etanol bulundurulmalıdır. Gazlı bez, cerrahi malzemeler, cam pastör pipetleri cam petri dishes aluminum folyoya sarılarak kuru ısı fırınlarında (dry heat oven) 90 dakika ve 160 °C ile sterilize edilir.

### *Atıkların yok edilmesi*

#### *Kültür ortamları ve sıvılar*

Enfekte kültür ortamları vakum aspiratör ya da pipet ile dezenfektan içine alınır, otoklavda sterilize edilir (60 dakika 15 lb/in<sup>2</sup>).

#### *Plastik eşya*

Kontamine flask, petri, plastik pipetler; celik taşıyıcı içinde ve otoklav poşetlerinde biriktirilir, otoklavlandıktan sonra laboratuvar güvenlik koşullarına uygun şekilde atılır.

Kesici ve delici malzeme, plastik ve koruyucu kapaklı özel atık kabında biriktirilir, plastik taşıyıcı otoklav poşetine konarak otoklavlanır ve laboratuvar güvenlik koşullarına uygun şekilde atılır.

#### *Cam eşyanın yıkanması*

Günlük kullanımda olanlar; demineralize suyla çalkalanır, 7xPF eşdeğeri bir deterjan ile yıkanır ve bu deterjanın %1 lik soluyonu içinde 2-3 saat bekletilir. Sıcak su ile çalkalanır, iki kez distile su ve bir kez double distile su ile yıkanır. Kuru fırında 160°C de 2 saat tutularak kurutulur. Büyük miktardaki yıkamalar; otomatik bulaşık makinesinde 7xO-matik (ICN flow, Cat. No. 76-675-21) %0.25 lik solusyonu ile yıkanmalıdır.

Biyolojik materyal ile bulaşmış cam malzeme, 7x PF deterjanının % 5lik solusyonu ile otoklavlandıktan sonra günlük kullanımdakiler gibi temizlenir.

#### *Güvenlik*

Biyogüvenlik düzeyi 2 kuralları çerçevesinde, laboratuvar çalışma ve atık kuralları yazılı olarak belirlenir.

#### *Tek tabaka olarak kültürü yapılan hücrelerin özel koşulları*

##### *HeLa (Human cervix carcinoma)*

1951 yılında 31 yaşındaki bir zenci kadındaki serviks karsinomundan elde edilmiştir; tanı daha sonra adenokarsinoma değişmiştir; ilk anaploid sonra da sürekli kültür edilen insan hücre hattıdır.

Morfoloji ve Üreme Özellikler: Tek tabaka halinde üreyen epitelyum benzeri hücreler. Yapışık.

Organizma: Homo sapiens (insan).

Doku : Serviks, epitelyal, adenokarsinom

Ortam: Eagle' ın bikarbonat ve glutamin içeren Temel Besleyici Ortamı (EMEM): +4°C' de saklanır.

İmmunolojisi: Sitokeratin+, desmin-, endothel-, GFAP-, neurofilament-, vimentin+.

Hüresel Ürünler :Keratin; Lizofosfatidilkolin (lyso-PC) AP-1 etkinliğini ve c-jun N-terminal kinaz etkinliğini (JNK1) protein kinaz C' den bağımsız bir yolak ile uyarır.

P53 sunumunun düşük olduğu bildirilmiştir ve pRB (retinoblastoma suppressor) düzeyleri normal bulunmuştur.

Sitogenetiği: İnsan hipertriploid/ hipotetraploid karyotipi (% 15 poliploidi; 82 (77-84) <4n> XXX, -X,-2, -3, -4, +5, +5, +5, +5, -7, -8, -11, -13, -14, -15, -16, add(12)(q23), i(15q), der(19)t(13;19)(q22;p13)X1-2,add(21)(p11),del(?22) (q12).

Kaynak: 26.6.2002 tarihinde DMEM %5 FCS' de (HeLa (Ohio)' da kültüre alınmış hücrelerden pasaj numarası p24/R5), (Dr. Aykut Özkul, Veteriner Fakültesi, Ankara.)

#### *HEp-2 (epidermoid carcinoma of the larynx)*

Bu hücre hattının larinksin epidermoid karsinomundan kaynaklandığı düşünülmektedir, fakat izoenzim çözümlemesi, HeLa gösterge kromozomları ve DNA parmak izi ile HeLa hücre kontaminasyonu ile olduğu bulundu. Hücrelerin immünoperoksit boyaması ile keratin pozitif olduğu gösterildi.

Morfoloji ve Üreme Özellikleri: Yapışık, tek tabaka halinde üreyen epitele benzer hücreler

Organizma: Homo sapiens (insan).

Doku: Larinks, epidermoid karsinomu.

Ortam: Temel Besleyici Ortam (Eagle) (2 mM L-glutamin) ve Earle' ün BSS (1. 5 g/L sodyum bikarbonat)

İmmunolojisi: Sitokeratin+

Hüresel Ürünler: Keratin; G6PD, A.

Sitogenetiği: Rastlantısal *poliploid*. Çeşitli sürelerde birçok gösterge kromozom gözlenmiştir ve 2 büyük kromozom subterminal sentromerlidir.

HeLa Gösterge Kromozomları: Bir M2 kopyası, iki-dört M3 kopyası ve bir M4 kopyası G-bandi paterni ile elde edildi.

DNA Profili (STR): Amelogenin: X; CSF1PO: 9,10; D13S317: 12,13.3; D16S539: 9,10; D5S818: 11,12; D7S820: 8,12; TH01: 7; TPOX: 8,12; vWA: 16,18.

Kaynak: 01.02.2003 tarihinde NIBS' te DMEM %5 FCS' de kültüre alınmış hücrelerden, Dr. Zafer Yazıcı tarafından pasaj numarası p54, Veteriner Fakültesi, Samsun.

#### *MDBK (Bovine kidney cells)*

MDBK hücre3 hattı normal bir erişkin sığırın böbreğinden elde edilmiştir (18 Şubat 1957, S.H. Madin and N.B. Darby). 1973 yılında "Bovine Viral Diarrhea Virus" (BVDV). 1982' de R.A. Van Deusen (USDA, Ames, Iowa) BDVD'den soyutlanarak MDBK hazırlamıştır. Bu hücre hattının da BVDV içermediği gösterilmiştir.

Morfoloji ve Üreme Özellikleri: Yapışık, epitelyum benzeri hücreler

Organizma: Bos taurus (sığır)

Doku: Organ: Böbrek; Hastalık: Normal, erkek.

Ortam: Temel Besleyici Ortam (Eagle) (2 mM L-glutaminli) ve Earle' ün BSS (1. 5 g/L sodyum bikarbonat).

İmmunolojisi: Hücresel keratin için immünofloresan ile pozitif

Hücresel Ürünler: Keratin; bovin olduğu IEF AST, G6PD, NP ile onaylandı

Sitogenetiği: Kromozom Sıklık Dağılımı 50 Hücrede:  $2n = 60$ . Kök hattı kromozom sayısı %5 oluşan 2S bölümü *hipodiploid*. Toplam gösterge kromozomları 11–14 (4–5 metasentrik, 3-4submetasentrik ve 4–5 akro-telosentrik), çoğu hipodiploid metafazlar için ortak. X monosomik idi. Ne HSR kromozomu ne de DM görüldü.

Kaynak: 01.02.2003 tarihinde ETLİK Araştırma Enstitüsünde DMEM %5 FCS' de kültüre alınmış hücrelerden. Dr. Zefer Yazıcı'dan Pasaj Sayısı p17 Veteriner Fakültesi, Samsun.

#### *KELLY (Human neuroblastoma) (Nmyc+)*

Nöroblastomlu bir olgudan ayrıştırılmış: N myc in der (17) hsr x100 kez çoğaltılmış.

Morfoloji ve Üreme Özellikleri: Yapışık, yuvarlaktan iğsi şekle kadar değişen kutupsal nörotik süreç, tek veya çoklu tabaka halinde üreme.

Organizma: Homo sapiens (insan).

Doku: Nöroblastoma.

Ortam: RPMI 1640, %10 FCS.

İmmunolojisi: Sitokeratin-, demsin-, endothel-, GFAP-, neurofilament +, vimentin +.

Hücresel Ürünler: İnsan olarak IEF AST, LDH ve MDH ile onaylanmış

Sitogenetiği: İnsana yakın diploid karyotip (20% poliploidi).

46-47<2n>X, -7,-8, +16, +22, +2mar, del(1)(p34), t(2;7)(p12;q11), add(4)(p15.3), add(5)(p15), add(9)(q34), add(10)(q24), add(11)(q24), add(14)(q32), ins(17;2) (q21; q24hsr)X2; del(1p34) and 2p24hsr son dönem nöroblastom için tipiktir

Parmak izi: Eşsiz ve homozigot DNA profili; pYNH24 tek lokus pr

Genetik fenotip: Kemorezistant.

MYCN 100X amplifikasyonu

Kemoterapiden sonra MDR1 sunumu +.

Ağırlıklı nöroblastik

Herbimisin C ve retinoik aside duyarlı (Farklılaştırma sağaltımına duyarlı)

Kaynak: DSMZ NO: ACC 355

Mikoplasma: kontaminasyon Baytril ile elenmiş, DAPI' de, Mikrobiyolojik Kültürde, RNA hybridization deneylerinde Negatif bulunmuş. Virusler: ELISA: RT-PCR NEGATİVE; EBV-, HBV-, HCV-, HHV8-, HIV-, HTLV-, HTLV2-.de Negatif.

*SHSY5Y (Human neuroblastoma) (Nmyc -)*

SK -N -SN nöroepitelyoma hücre hatlarından elde edilmiştir (metastatik nöroblastoması olan 4 yaşındaki bir kız çocuğunun kemik iliği biyopisinden). SH-SY5Y, 1970' de metastatik bir kemik tümöründen oluşturulan nöroblastoma hücre hattı SK -N -SH' nin üç kez kopyalanmış alt hattıdır. Hücreler ılımlı düzeyde dopamin beta hidroksilaz etkinliği gösterir.

NOT: SH-SY5Y ATCC' de "Memorial Sloan-Kettering Cancer Center" da, June L. Biedler tarafından saklanmıştır. Yalnızca akademik araştırma çalışmaları için kullanılmaktadır.

Morfoloji ve Üreme Özellikleri: Epitelyal, karışık, yapışık veya süspansiyon halinde.

Tek tabaka halinde veya çok yoğun üretilirse hücre kümeleri halinde üreyen epitele benzer

Organizma: Homo sapiens (insan).

Doku: Beyin; metastatik alan: kemik iliği nöroblastoma, dört yaş, dişi

Ortam: Dulbecco' nun MEM, %15 FCS.

İmmunolojisi: Sitokeratin-, demsin-, endothel-, GFAP-, neurofilament+, vimentin+.

Hücresel Ürünler: İnsan AST' nin IEF' si olarak onaylanmıştır. Kan Grubu A-Rh+.

Sitogenetiği: % 1. 8 poliploidisi insana yakın diploid karyotipte 46/47(42–48) <2n>X/X X+7, ins(1)(q32q11q43), add (9)(q34), der(22) t(?17;22) (q22;q13)

Modal sayısı = 47.

DNA Profili (STR): Amelogenin: X; CSF1PO: 11; D13S317: 11; D16S539: 8,13; D5S818: 12; D7S820: 7,10; TH01: 7,10; TPOX: 8,11; vWA: 14,18.

Parmak izi: Eşsiz DNA Profili (Multiplex PCR ile D1S80, D2S44, D17S30 and ApoB)

Genetik fenotip: Kemosensitif.

MAP and Ras etkinliği +, TrkB (-)

Kaspaz 8 silinmesi ( DNA metilasyonu)

DNA hasarı p53 ile yönlendirilen ilaçlarda, mitokondriyal/kaspaz 9 yolağında apoptoz gerçekleşir.

Kaynak: DSMZ NO: ACC 209. Mikoplazma: DAPI, Mikrobiyolojik kültür, RNA hibridizasyon, PCR deneylerinde negatif. Viruses: EBV-, HBV-, HCV-, HHV8-, HIV-, HTLV1-, HTLV2-, ELISA, RT-PCR negatif.

#### *Hücre kültürlerinde kontaminasyon aranması*

Hücre kültürlerini içeren tüm çalışmalarda, kültürler belirli aralıklarla, bakteri, fungi, mikoplazma bulaşları açısından incelenmelidir.

#### *Bakteri ve mantarlar*

Günelik çalışmalarda en sık rastlanan bulaşlar; bakterilerden Pseudomonas species, micrococci, E. Coli, mantarlardan Penicillium, Aspergillus ve Candida species sayılabilir.

İşlem Basamakları:

1. Bu amaçla kültürler antibiyotiksiz ortamda süspanse edilir.
2. Her bir ekim için 0.3 ml örnek hazırlanır.
3. Kanlı agar besiyeri için bir örnek 37°C aerobik koşullarda 14 gün, bir örnek 37°C anaerobik şartlarda 14 gün; Trypticase soy broth, Beyin kalp infüzyon broth için birer örnek 37°C, birer örnek 26°C 14 gün; Sabouraud broth nutrient broth with %2 maya özü için birer örnek 37°C, birer örnek 26°C'de 21 gün gözlemde tutulur. Üreme yoksa kültürler sürdürülür.

## *GÜÇLÜK VE SINIRLAMALA*

En önemli sınırlama hücre hatlarının kontaminasyonudur. Hücre hatlarında kontaminasyon kontrolleri belirli aralıklarla yapılmalıdır. Özellikle kısa süreli deneylerde açılan hücrelerin kontamine olması fark edilemeyebilir. Bu hücre yanıtlarını farklılaştıracaktır. Bu açıdan en fazla gözden kaçan mikoplazma bulaşdır. Çözüm; kaynağın temiz tutulması, çok kontrollü bir sterilizasyon sağlamak ve düzenli aralıklarla kaynak hücre hattını kontrol etmektir.

Büyümenin sağlıklı olmasında birincil önemi olan malzemeler, su ve *fetal calf serum* kalitesidir. Problem oluştuğunda ilk olarak bunlar kontrol edilmelidir.

Çalışma sırasında, kabin içinde hava akımını bozacak davranışlardan kaçınılmalıdır. CO<sub>2</sub> 'li inkübatör, düzenli olarak Diversol ile temizlenmeli, su kaynağı haftada bir kez değiştirilmelidir [73, 74].

## **RNS Ve ROS Temelinde Hücre Mikro çevresinin Deneysel Tasarımı**

### *BİYOKİMYASAL TASARIM TEMEL ALINARAK*

**L-Arginine (L-Arg):** (Alexis Biochemicals cat no: 101-004-G025, QBİOGENE-Alexis Ltd, Nottingham, UK; Sigma-Aldrich Co. cat no: A3784, Deisenhofen, Germany)

[ H-L-Arg-OH]

C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

MW: 174.2; CAS: 74-79-3

Nitrik oksidin (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) ile oluşumunun fizyolojik öncüsü. NO salınımını artırır. Endojen NO sağlayıcısı [75].

**S-Nitroso-L-Glutathione (GSNO):** (Alexis Biochemicals cat no: 420-002-M025, QBİOGENE-Alexis Ltd, Nottingham, UK)

C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S

MW: 336. 3; CAS

Nitric oksit taşıyıcısı. Eksojen NO vericisi [76].

**SIN-1 . hydrochloride (SIN-1):** (Alexis Biochemicals cat no: 420-002-M025, QBİOGENE-Alexis Ltd, Nottingham, UK)

[ 3-Morpholinosydnonimine. HCl]

C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>.HCl

MW: 170. 2. 36.5; CAS: 16142-27-1

SIN-1 damar genişletici molsidominin bir metabolitidir ve peroksinitrit salan bileşik olduğu düşünülür. Moeküler oksijen kullanarak süperoksit ve NO oluşturur, birlikte peroksinitriti oluştururlar [77].

**Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):** (AppliChem GmbH, Germany cat no: A0626; Sigma-Aldrich Co. cat no: H0904, Deisenhofen, Germany)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

MW: 34.0146; CAS: 7722-84-1



Prooksidan, özellikle süperoksit ve hidroksil radikalleri olmak üzere prooksidant eksojen reaktif oksijen türlerinin sağlayıcısı (ROS).

**N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine-methyl ester. HCl (L-NAME)** : (Alexis Biochemicals cat no: 105–003-G005, QBIÖGENE-Alexis Ltd, Nottingham, UK; Sigma-Aldrich Co. cat no: N5751,Deisenhofen, Germany )

C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

MW: 233.2 . 36.5; CAS: 51298–62-5

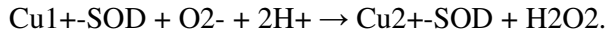
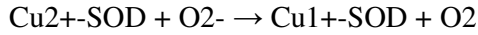
Nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü. NO' nun hücrelerden salınımını baskılar [78].

**Cu/Zn Superoxide Dismutase (bovine erythrocytes) (SOD)**: (Alexis Biochemicals cat no: 202–021-UT50, QBIÖGENE-Alexis Ltd, Nottingham, UK; Sigma-Aldrich Co. cat no: s2515, Deisenhofen, Germany)

MW: ~31kDa; CAS: 9054–89–11; EC: 1.15.1.1

Superoksit dismutaz enzimi (SOD), diperoksidin oksijen ve hidrojen perokside yıkılmasını hızlandırır. Bu neden ile önemli bir antioksidan savunma yaratır.

SOD proteininde taşınan bakır (ve çinkonun) tipik bir tepkimesi şöyledir:



Süperoksit anyon radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) kendiliğinden O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' e hızla yıkılır. Ancak, SOD bilinen bütün enzimler içinde substratını en hızlı yıkan enzimdir. Gerçekte hızı difüzyon ile sınırlıdır. SOD' un varlığının birçok hücre tipini serbest radikal hasarından koruduğu gösterilmiştir.

Süperoksit radikali çöpçüsü [79].

**Ebselen (Eb)**: (Alexis Biochemicals cat no: 270–097-M001, QBIÖGENE-Alexis Ltd, Nottingham, UK)

[2-Phenyl–1–1,2-benzisoselenazol–3-(2H)-one]

C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>OSe

MW: 274.2, CAS: 60940–34–3

Protein kinazın C' nin (PKC), NADPH, 5-lipoksijenaz, siklooksijenaz (COX), ve NADPH oksidazın selenyum tabanlı inhibitörü. Peroksinitritin sinyal zincirinin inhibitörü, peroksinitrit çöpçüsü [80].

**Aminoguanidine. bicarbonate (AG):** (Alexis Biochemicals cat no: 420-004-M100, QBIÖGENE-Alexis Ltd, Nottingham, UK)

CH<sub>6</sub>N<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

MW: 74.1 .62.0; CAS: 2582-30-1

Nitrik oksit oluşumunun ve iNOS inhibitörüdür [81].

### *İşlem Basamakları*

Nöroblastoma hücre dizilerinde, ROS ve RNS temelli mikroçevre modellerinin deneysel tasarımında; ekzojen NO donörü **S-Nitroso-L-Glutathione (GSNO)**, peroxynitrit donörü **SIN-1. hydrochloride (SIN-1)**, ağırlıklı olarak süperoksid ve hidroksil radikali sağlayarak ortamı ROS açısından zenginleştiren **Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** kullanıldı. **S-Nitroso-L-Glutathione (GSNO)** [2.00-0.16mM], **SIN-1. hydrochloride (SIN-1)**, [0.75mM-5.85µM], **Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** [500-3.91µM]; yoğunluk aralıklarında, sekiz farklı konsantrasyonda uygulandı. Her deney ortamında tüm yoğunluklar en az üçer kez yinelendi. Her bir yoğunluk için en az üç farklı deney ortamında testler yinelendi. Tek yoğunluk uygulamalarında; **L-Arginine (L-Arg)**, [0.5 mM], **S-Nitroso-L-Glutathione (GSNO)** [0.5mM], **SIN-1. hydrochloride (SIN-1)**, [0.1mM], **Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** [ 50µM] olarak uygulandı.

Mikroçevrede RNS ve ROS için özgün inhibitörler ya da scavengerlar uygulandı. Bu amaçla; **N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine-methyl ester. HCl (L-NAME)**, endojen NO oluşumunu engelleyen bir NOS baskılayıcı olarak [ 0.5mM]; **Cu/Zn Superoxide Dismutase (bovine erythrocytes) (SOD)**, süperoksid radikal çöpçüsü olarak [100U/mL]; **Ebselen (Eb)**, peroksinitrit çöpçüsü olarak [20µM]; **Aminoguanidine. bicarbonate (AG)**, iNOS baskılayarak nitrik oksit oluşumunu engelleyici olarak [0. 1mM]; kullanıldı. Her deney ortamında en az üçer kez yinelendi. Her biri için en az üç farklı deney ortamında testler yinelendi.

Serviks karsinomu hücre dizilerinde, ROS ve RNS temelli mikroçevre modellerinin deneysel tasarımında; endojen NO üretimini uyardığı bilinen **L-Arginine (L-Arg)**, ağırlıklı olarak süperoksid ve hidroksil radikali sağlayarak ortamı ROS açısından zenginleştiren **Hydrogen Peroxide (H2O2)** kullanıldı. Bu amaçla; **L-Arginine (L-Arg)**, [2.00-0.02 mM], **Hydrogen Peroxide (H2O2)** [500-3.91µM]; konsantrasyon aralıklarında, sekiz farklı konsantrasyonda uygulandı. Her deney ortamında tüm yoğunluklar en az üçer kez yineleni. Her bir yoğunluk için en az üç farklı deney ortamında testler yineleni. Tek yoğunluk uygulamalarında; **L-Arginine (L-Arg)**, [0. 5 mM], **Hydrogen Peroxide (H2O2)** [50 µM] olarak uygulandı.

Mikroçevrede özgün inhibitörler uygulandı. Bu amaçla; **N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine-methyl ester. HCl (L-NAME)**, endojen NO oluşumunu engelleyen bir NOS baskılayıcı olarak [0.5 - 0. 04 mM]; kullanıldı. Her deney ortamında en az üçer kez yineleni. Her biri için en az üç farklı deney ortamında testler yineleni.

#### *VİRAL ENFEKSİYON TEMEL ALINARAK*

Son yıllarda viral enfeksiyonlar sırasında oluşan serbest radikallerin önemi vurgulanmaktadır. *Superoxide* (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve *hydroxyl* (.OH) gibi oksijen radikalleri hastalığı patogenezinde yer almaktadırlar. Diğer bir inorganik radikal olan nitrik oksid (NO), viral enfeksiyona karşı oluşan hücresel savunmada önemlidir. Viral enfeksiyonlarda, uyarılabilir nitrik oksid sentaz (iNOS) etkisi ile çok miktarda ve uzun etkili NO üretimi olmaktadır (yapısal formlarında nNOS ve eNOS ile az miktarda ve kısa etkili daha çok homeostazda işlev gören NO üretimi olmaktadır.). Nitrik oksid ve süperoksid, biyolojik sistemlerde farklı reaktif nitrojen ürünleri verirler, peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>), NO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Peroksinitrit, proteinlerin amino asid kalıntıları ve DNA' nın guanin gurubu ile oksidasyon ve nitrasyon tepkimelerine girer. DNA hasarı ve lipid peroksidasyonundan sorumludur [37].

## *İşlem Basamakları*

### *Virus Suşları*

Bu çalışmada BHV-1 (ATCC Cat No: VR-864) virus suşu kullanıldı. BHV -1 (ATCC Cat No: VR-864); Dr. Zafer Yazıcı tarafından sağlandı. Virus stoğu HEp-2 hücreleri enfekte edilerek ve % 2' lik FCS' li EMEM' de 37°C' de % 5 CO2' de bekletilerek hazırlandı.

Hücreler hergün mikroskopik inceleme ile sitopatojenik etki (CPE) yönünden izlendi, örneğin enfekte hücrelerin yuvarlaklaşması ve çok hücreli dev hücre oluşmasının izlenmesi (%80-100' e erişmesi). Üç kez dondurup çözüldükten sonra hücre eriyikleri alikotlandı ve -80°C derecede virus stoğu olarak saklandı.

### *Virusun UV inaktivasyonu ile Mock enfeksiyonu*

2 mL' lik %2' lik FCS' li EMEM içindeki virus stokları, buz üzerindeki 10 mm çaplı Falcon tüplere yerleştirildi ve 10 cm mesafeden germicidal lambaya (60 Herz) tutuldu, her 2 dakikada bir karıştırılarak 10 dakika UV lambası uygulandı.

### *BHV -1 ile hücre kültürlerinin enfeksiyonu*

HEp-2 hücreleri ve MDBK hücreleri  $1 \times 10^5$  hücre /mL yoğunlukta 24 saatte doku kültür plaklarında (Greiner, Germany) hazırlandı, tek tabaka halindeki hücreler ya Mock ile BHV -1 Cooper suşu ile enfekte edildiler. Ekilen virus hücreler üzerinde 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Ekim materyali uzaklaştırıldıktan sonra, tek tabaka hücre önceden ılıtılmış ortam ile kaplandı (2 mM L-Glutamine ve %2 FCS içeren EMEM veya DMEM) ve 37°C' de % 5 CO2' li inkübatöre alındı. Farklı inkübasyon sürelerinden sonra (0,5; 1; 3, 6 saatler) enfekte hücreler, 1 µM staurosporine içeren ortam ile 24 saat 37°C' de tutuldular. Paralel yapılan deneylerde, önceden belirlenen sürelerde ya Mock enfekte ya da BHV -1 ile enfekte HEp -2 ve MDBK hücreleri, staurosporinsiz ortamda tutuldular. Tek tabaka hücreler yalnızca ortam ile ve 1 µM staurosporine veya 1 µM staurosporine artı BHV -1 enfeksiyonu olmadan 50µM kaspazların olduğu ortamlarda tutulan hücreler de kontrol olarak kabul edildiler.

## GÜÇLÜK VE SINIRLAMALAR

Virüs bulaşı olan tüm materyal, uygun bir dezenfektan ile birlikte otoklavda sterilize edilir (60 dakika 15 lb/in<sup>2</sup>) [82, 83, 84].

## Sağaltım Modelinin Deneysel Tasarımı

### GİRİŞ

Var olan yasalar yeni sağaltıcı etkenlerin, ilaçların kliniğe gelen kadar ağır sitotoksik testlerden geçmesini öngörmektedir. Hayvan deneyleri yerine hücre kültür tekniklerinin geliştirilmesi birincil araştırmalara daha fazla şans tanınmasına yol açmıştır. *In vitro* bir sitotoksosite, *in vivo* toksisite ile doğrudan bağlantılı olmasa da bileşiğin içeriği ile ilgili bir fikir vermekte, seçici bir model oluşturmaktadır. Sitotoksosite deneyleri, çalışmalarda kullanılan maddeler ile ilgili elde edilen bilgilere dayanmaktadır. Hücrenin çoğalması (<sup>3</sup>H timidi bağlanması), hücre metabolizması (boyanın indirgenmesi), hücre canlılığı (boya bozulması, hücre sayımları) gibi birçok parametre araştırılabilir.

### GEREÇ, KEMOTERAPÖTİK VE APOPTOTİK BİLEŞİKLER

*Türk Pediatrik Onkoloji Gurubu tarafından yayınlanan "Nöroblastoma Sağaltım Protokolü" nde yer alan kemoterapötikler (TPOG-NBL 2003 KOORDİNATÖRLER: Dr. Nur Olgun, Dr. Savaş Kansoy, Dr. Serap Aksoylar, Dr. Kamer Uysal)*

### Etoposide (EBEWE Pharma Ges. m.b. H. N AUSTRIA)

Etoposide ebewe; VP-16 (Vepesid)

[4'-Desmethylepipodophyllotoxin 9 (4, 6, 0-ethylidene)-β-D-glucopyranoside] ; VP-16-213

Epipodophyllotoxins; C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub>.

MW: 588.6; CAS:33419-42-0

Topoizomeraz II inhibitörü olarak apoptozu uyarır. İnterkalasyon yapmayan topoizomeraz II zehiri. Epipodofilotoksinler, adamotu bitkisi özlerinde bulunan antimikrotübül bir etken olan podofilotoksinin etkinliğini kanıtlamak için sentezlenmiştir. Daha incelikli bir yapısal değişiklik (podofilotoksinin pandantif aromatic halkasından bir metal gurubun uzaklaştırılması) tubulin bağlanmasını ortadan kaldırır fakat topoizomeraz II toksisitesini artırır. Epipodofilotoksin olan etopozid ve tenipozid, etki mekanizmaları tam

olarak anlaşılmeden önce de klinik kullanımda idiler. İlk çalışmalar bu ilaçların uygulandığı hücrelerde DNA dizilerinde kırıklar oluştuğunu göstermiş olsa da, 1980' lerin başına kadar hedefin topoizomeraz II olduğu tanımlanamamıştı. Epipodofilotoksinlerin düzlemsel polisiklik bileşeni topoizomeraz II –DNA kümelerinin yıkılma bölgelerine etkir. Pandantif halka olarak enzime ya da DNA oluşuna bağlanır [85, 86]

**Vincristine (VCR): (Mayne Pharma Pty Ltd.Victoria, Avustralya)**

Oncovin; Vincristine. sulfate; Leukocristine. Sulfate; *VINCA* alkaloids

$C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$

MW: 825.0 .98.1

CAS: 2068–78-2

Tubuline direkt bağlanarak hücreyi mitoz safhasında durdurur. Vinka alkaloyitleri mikrotübüllerin bozulmasından, proteinlerin ve nükleik asitlerin sentezinin baskılanmasından, oksitlenmiş glutatyonun artmasından, lipit metabolizmasının ve zarların lipit içeriklerinin değişmesinden, siklik adenozin monofosfatın (cAMP) artışından ve kalsiyum–kalmodulin ile düzenlenen cAMP fosfodiesterazın baskılanmasından sorumludur.

Vinka alkaloyitleri, mitotik baskılayıcılar olarak sınıflandırılmaktadır (bölünen hücrede metafazda durma). Mikrotübüller hücrede birçok süreçte, kemotaksiste, salınım ürünlerinin baskılanmasında, hücre iskeletinin bozulması ile zar trafiğinin bozulmasında önemlidir, VCR ' nin, c-Jun N terminal kinaz / stresle etkinleşmiş protein kinaz (JNK/SAPK) ve etkinleşmiş Ras, MAPKKK, ASK–1 (Apoptoz işaretleşmesini düzenleyen kinaz) etkinliğinde rol aldığı bilinmektedir [87, 88, 89].

**Cisplatin (CIS): (David Bull Laboratories, Victoria, Avustralya)**

[cis-Platinum (II) diammine dichloride]

$Cl_2H_6N_2Pt$

MW: 300.0; CAS:15663–27-1.

DNA yapısını bozar.

Isı şok proteini (Hsp) inhibitörü

HSP 90 inhibisyonu yapar, bu Akt-bağımlı survival yolağını bozar.

Platin antitümör etkenler, kovalan özellikte güçlü bağlar oluşturmak üzere nükleofilik (elektrondan zengin) atomlar ile yer değiştirebilen, bağları olan platin kümeleridir. Böylece alkilleyici etkenler gibi, platin etkenler tiyol sülfürler ve proteinler ve nükleik asitlerdeki amino grup azotlar ile güçlü kimyasal bağlar yaratırlar. Hücrenin zehirlenmesi, hücre döngüsünün G2 fazındaki duruşun süresi ile ilişkili olmaktadır [90].

**Adriamycin (ADR): ( Pharmacia Upjohn, Milano, İtalya)**

Adriablastina; Doxorubicin. Hydrochloride; Adriamycin. HCl; 14-Hydroxy-daunomycin. HCl  
C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>. HCl; ANTHRACYCLINES  
MW: 543.5 36.5; CAS: 25316-40.9

DNA sentezini bozar. DNA zincir kırıklarına ve serbest radikal oluşumuna neden olur. Antitümör bir antibiyotiktir. Ters transkriptaz ve RNA polimerazın inhibitörüdür. İmmüno-supresif bir etkidir. Topoizomeraz II' yi engelleyen son derecede etkin bir mikotoksindir. ADR' ler çözüldüde çok etkindir ve biyolojik sistemlerde tam bir etki oluşturur. Hücre üzerindeki zehirli etkisinin temel nedeni topoizomeraz II' yi zehirlemesine ve çift sarmallı DNA' yı bağlamasına ve DNA ve RNA sentazları engelleyecek yapısal değişiklikler oluşturmaya bağlıdır. ADR, ROS oluşturur, buna oksijen serbest radikalleri, hidroksi radikalleri ve DNA, mRNA, proteinler ve lipitlere hasar veren hidrojen peroksit de dahildir [91].

**Carboplatin (CARBO): (David Bull Laboratories, Victoria, Avustralya)**

carboplatin DBL;[cis-Diammine[1,1 cyclobutanedicarboxylato] platinum (II)]  
C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Pt  
MW: 371.3; CAS: 41575-94-4

DNA'yı kovalan bağlayarak yapısını bozan bir cisplatin analogudur. Etki mekanizması alkilleyici ajanlara benzer. Cisplatin analogudur. Antitümör etkidir. Platin antitümör etkenler, kovalan özellikte güçlü bağlar oluşturmak üzere nükleofilik (elektrondan zengin) atomlar ile yer değiştirebilen, bağları olan platin kümeleridir. Böylece alkilleyici etkenler gibi, platin etkenler tiyol sülfürler ve proteinler ve nükleik asitlerdeki amino azotlar ile güçlü kimyasal bağlar yaratırlar. Hücrenin zehirlenmesi, hücre döngüsünün G2 fazındaki duruşun süresi ile ilişkili olmaktadır [90, 92] .

*Apoptozu Farklı mekanizmalarla uyardığı bilinen kimyasallar*

**Actinomycin D (Alexis Biochemicals cat no: 850–235-KI01, QBIÖGENE-Alexis Ltd, Nottingham, UK)**

Actinomycin IV, Actinomycin C1, Dactinomycin

$C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$ ; M.W:1255.5; CAS:[50–76-0]

Actinomycin D, nükleik asit sentezini inhibe eder (RNA) ve antineoplastik bir antibiyotiktir. Aynı zamanda da bir apoptoz uyarıcısıdır. Anti kanser etkinliğe sahip olduğu gösterilmiş ilk antibiyotik idi. Fakat normalde anti kanser etkinliği için kullanılır, son derecede zehirlidir, genetik materyale hasar verir. Genelde hücre biyolojisinde araştırma aracı olarak kullanılır. Actinomycin-D, Dactinomycin adı ile ticarete bulunmaktadır. DNA çiftlerine bağlanır, böylece replikasyon ve transkripsiyon içinde yer alan enzimlerin etkinliğini engeller. Actinomycin-D, sağaltımda yıllardır kullanılmış durumda olan eski kemotrapötik ilaçlardan biridir. Damar içi kullanılan şeffaf, sarı bir sıvıdır ve çeşitli kanserlerin sağaltımında çok sık kullanılmaktadır.

**Camptothecin (Alexis Biochemicals cat no: 850–235-KI01, QBIÖGENE-Alexis Ltd, Nottingham, UK)**

$C_{20}H_{16}N_2O_4$ ; M.W. 348.4; CAS 7689–03–4

Topoizomeraz –DNA kompleksine kovalan bağlanarak ve onu engelleyerek işlev gören bir çekirdek topoizomeraz I inhibitörüdür. Camptothecin, DNA' ya hasar veren bir anti kanser ilaçtır, hücrenin parçalanmasına neden olur. Topoizomeraz I' in etkinliğine engel olur.

**Cycloheximide (Alexis Biochemicals cat no: 850–235-KI01, QBIÖGENE-Alexis Ltd, Nottingham, UK)**

-{(2R)-2-[(1S,3S,5S)-3,5-dimethyl-2-oxocyclohexyl]-2-hydroxyethyl}piperidine-2,6-dione

$C_{15}H_{23}NO_4$ ; M.W.281.3;CAS[66–81–9]

Cycloheximide, prokaryotlarda değil ama ökaryotlarda protein sentezininin inhibitörü olarak işlev gören bir proteindir. Birincil olarak doğal tipteki CAN1, CYH2 ve LYS2 genlerinin seçiminde kullanılmaktadır. Ökaryotik hücrelerdeki protein sentezininin inhibisyonunda kullanılır, 60S ribozomu üzerindeki peptidil transferaz ile etkileşime girerek translasyonel elongasyonu engelleyerek etkisini gösterir.



**Dexamethasone (Alexis Biochemicals cat no: 850–235-KI01, QBI0GENE-Alexis Ltd, Nottingham, UK)**

*9-fluoro–11 $\beta$ ,17,21-trihydroxy-16 $\alpha$ -methylpregna–1,4-diene-3,20-dione*

C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>FO<sub>5</sub>; MW 392.464; CAS 50–02–2

Dexamethasone, hormonların glukokortikoid sınıfının sentetik bir üyesidir. Anti inflamatuvar ve immünosupresan olarak işlev görür. Dexamethasone, olasılıkla hücre içi glukokortikoid alıcısını etkinleştirerek ve bağlayarak apoptozu uyarır.

**Staurosporine (Sigma-Aldrich Co. cat no: S5921, Deisenhofen, Germany)**

C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>; MW 466.5; CAS 62996–74-1

Tirozin kinaz dahil olmak üzere birçok diğer kinazın ve protein kinaz C' nin inhibitörüdür. DNA' dan forfodiester bağların etkin tirozin bölgesine taşınmasını engelleyerek, topoizomeraz II' yi inhibe eder. CHO hücrelerinde 1  $\mu$ M' da apoptozu uyarır.

#### *İşlem Basamakları*

Nöroblastoma hücre dizilerinde, sağaltım modellerinin deneysel tasarımında; Türk Pediatrik Onkoloji Grubu' nun “Nöroblastoma Sağaltım Protokolü” (TPOG-NBL 2003; Koordinatörler, Dr. Nur Olgun, dr. Savaş Kansoy, Dr. Serap Aksoylar, Dr. Kamer Uysal) temel alınarak *in vitro* ortama uyarlandı. Bu amaçla; Vincristine (VCR) [30.00-0.23 nM], Etoposide (ETOP) [17.2–0.13  $\mu$ M], Cisplatin (CIS) [160-1.25  $\mu$ M], Doxorubicin (DOXO) [6.00-0.125nM], Carboplatin (CARBO) [16.00-0.125 nM]; konsantrasyon aralıklarında, sekiz farklı konsantrasyonda uygulandı. Her deney ortamında tüm yoğunluklar en az üçer kez yineleni. Her bir yoğunluk için en az üç farklı deney ortamında testler yineleni.

TPOG-NBL 2003 protokolünde yer alan, Vincristine ve Doxorubicin ((VCR) [30.00-0.23 nM] ve DOXO) [ 3.50-0.03 nM] ); Cisplatine ve Etoposide ((CDDP) [ 160-1.25  $\mu$ M] ve (ETOP) [17.2 – 0.13  $\mu$ M] ); Carboplatin ve Etoposide ((CARBO) [16.00-0.125 nM] ve (ETOP) [17.2 – 0.13  $\mu$ M]) birlikte kullanıldı (Blok tanımları için bkz. Ek.4). Konsantrasyon aralıklarında, sekiz farklı yoğunlukta uygulandı. Her deney ortamında tüm yoğunluklar en az üçer kez yineleni. Her bir yoğunluk için en az üç farklı deney ortamında testler yineleni.

Apoptozu farklı mekanizmalarla uyardığı bilinen kimyasallardan; Actinomycin D [100-0.05µM], Camptothecin [ 20- 0.03 µM], Cycloheximide [ 1.00mM- 0.4µM], Dexamethasone [100–0.05 µM], Etoposide[ 400–0.2 µM]; yoğunluk aralıklarında, sekiz farklı konsantrasyonda uygulandı. Her deney ortamında tüm yoğunluklar en az üçer kez yinelendi. Her bir yoğunluk için en az üç farklı deney ortamında testler yinelendi.

Serviks karsinomu ve larinks epidermoid karsinomu hücre dizilerinde, sağaltım modellerinin deneysel tasarımında, apoptotik sağaltım modellerinin in vitro örneği olan Staurosporin (SS) [3.00- 0.02µM]; yoğunluk aralıklarında, sekiz farklı yoğunluklarda uygulandı. Her deney ortamında tüm yoğunluklar en az üçer kez yinelendi. Her bir yoğunluk için en az üç farklı deney ortamında testler yinelendi.

### *GÜÇLÜK VE SINIRLAMALAR*

Kemoterapötikler ve kimyasal maddeler, uygulama yoğunluklarına getirilirken dilasyonların hata kaynağı olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle deneylerde kullanılan yoğunluklar için ortak bir stok soluyon yoğunluğu seçilerek aynı kaynaktan diluyonlar yapılmalıdır. Stoklar -80°C de saklanmalıdır.

Adriamicin içeren deneyler, ışıktan Cisplatin içerenler ışık ve metalden, Etoposid içerenler, ışıktan korunmalıdır [93, 94, 95, 96, 97].

TPOG-NBL 2003 protokolünde olan ve blok rejimlerinde yer alan, ifosfamide ve cyclofosfamide karaciğerde metabolize edildikten sonra etkin olan ilaçlar olduğu için, in vitro sağaltım modelinde uygulanabilmeleri, etkin ilaç molekülünün bulunabilmesi ya da karaciğer hücreleri veya p450 mikrozomları ile kokültürüne gerek duyulan uygulamalar olmuştur. Ancak laboratuvar şartlarımız ve etkin ilaç molekülü arayışlarımız sonuç vermediği için çalışılmamıştır.

### **Kaspaz Baskılanmasının Deneysel Tasarımı**

#### *GİRİŞ*

Kaspazlar bir gurup sistein proteazdır. Bu enzimlerin diğer protezlardan farklı olarak bir özellikleri vardır: diğer proteinleri bir aspartik asit artığı bırakarak yıkan bir sistein

artırdılar. Kaspaz adı, özelliklerini veren bir moleküler işlevden kaynaklanır: sistein – aspartik – asit – proteaz (cysteine-aspartic-acid-protease). Kaspazlar, erişkin yaşamının gelişimi ve birçok diğer işlevinde programlanmış hücre ölümlerinin bir şekli olan apoptoz için hücrelerde temel bir gereksinimdir.

İki tip kaspaz vardır: başlatıcı kaspaz (kaspaz -8, -9 gibi) ve etkileyici kaspazlar (kaspaz-3 ve -7 gibi). Başlatıcı kaspazlar, etkileyici kaspazların etkin olmayan proformlarını yıkarlar, böylece onları etkin hale getirirler; buna karşılık da etkileyici kaspazlar hücre içindeki diğer protein substratlarını yıkarak apoptotik sürece neden olurlar. Bu zincirleme tepkimenin başlangıcı kaspaz baskılayıcıları ile düzenlenmektedir. Bugüne kadar insanlarda 11 kaspaz tanımlanmıştır.

Kaspazlar post translasyonel düzeyde düzenlenmektedir, böylece hızla etkin hale gelebilmektedirler. Önce etkin olmayan bir “prodomain”, küçük bir alt birim ve bir de büyük alt birim taşıyan prokaspazlar olarak sentezlenirler. Başlatıcı kaspazların prodomaini, etkileyici kaspazlardan daha uzundur. Başlatıcı kaspazların prodomainleri bir “CARD” domaini gibi (kaspaz-2, -9 gibi) gibi veya bir ölüme etkileyen domain (Death Effector Domain=DED) (kaspaz -8, 10 gibi) içerir, böylece de diğer moleküller ile etkileşime girip onların etkinleşmesini düzenlerler. Bu moleküller, etkileyici kaspazların etkinleşmesini sağlayabilecek şekilde onların kendi kendilerine etkin hale gelmesini sağlayan başlatıcı kaspazların bir araya gelmesine neden olan uyarılara yanıt verir.

Kaspaz zinciri kaspaz -3 ve -7’ yi etkin hale getirdiği bilinen T lenfositleri tarafından salınan Granzim B ile; kaspaz -8 ve -10’ u etkin hale getiren ölüm alıcıları (FAS, TRAIL ve TNF gibi) ile; sitokrom c ve kaspaz-9’ u etkin hale getiren Bcl-2 ailesi ile düzenlenen apoptozom ile etkin hale gelebilir. Bu zincir bir kez başladı mı, pozitif bir geri bildirim hücrenin geri dönüşsüz bir şekilde apoptoza gitmesini sağlar, örneğin apoptozom ile etkinleştirilen kaspaz-9 kaspaz-3’ ü etkinleştirir ve yıkar, bu kaspaz-3 hem kendi hedef proteinlerini yıkar hem de daha fazla kaspaz-9’ u yıkar, böylece daha fazla kaspaz-3 etkin hale getirilir...

Kaspazların bazı son hedefleri içinde nükleer laminler, ICAD/DFF45, poli (ADP)riboz polimeraz (PARP) ve PAK2 vardır. Birçok kaspaz substratının yıkımının tam olarak dağılımı, apoptozun biyokimyası ve morfolojisini karmaşık hale getirir. Ancak ICAD/DFF45’ in işlevi

CAD (Caspase Activated DNase) enzimini yeniden etkin hale getirmektir. ICAD/DFF45 ' in bir kaspaz ile yıkılması ve etkinliğinin ortadan kalkması, CAD' nin apoptotik hücrelerde görünen "DNA merdiveni" ne neden olacak şekilde çekirdeğe girerek DNA' yı parçalamasına neden olur

Kaspaz inhibitörleri, normal hücrelerde olduğu gibi, bazı tümör hücre hatlarında apoptozun uyarılmasını inhibe edebilir. Flurometil keton (FMK)' den türetilen peptitler herhangi bir ek zehirleyici etki göstermeden, apoptozu inhibe edebilir. N –terminus ve O- metil uç zincirlerindeki bir benzilkarbonil gurubu ile (BOC veya Z olarak da bilinir) sentezlenen inhibitörler artmış hücresel geçirgenlik gösterirler, böylece in vivo hayvan çalışmalarında olduğu kadar, in vitro hücre kültür çalışmalarında da kullanımlarını kolaylaştırırılar.

#### *Gereç ve İşlem Basamakları*

R&D System, Germany, Cat no: FMKSP01; Biovision Research Products, California, USA Cat no: K220-12-25; Chemicon International, Inc. California, USA cat no: APT135

Kaspaz etkinliğinin geri dönüşsüz baskılayıcıları, son yoğunlukları 50nM den 100µM' a olmak üzere apoptozu baskılamak üzere doku kültürlerinde kullanılırlar. Baskılayıcılar son derecede saf (ACS grade) DMSO kullanılarak hazırlanmalıdır.

Stok çözelti PBS+%1 ' lik BSA veya %5–10 fetal bovin eklenmiş doku kültür ortamı gibi protein içeren bir tampon ile sulandırılmalıdır.

Kaspaza bağımlı apoptozu inhibe etmek için kaspaz inhibitör peptitler; Caspase–1 Inhibitor, Z-YVAD-FMK; Caspase–2 Inhibitor, Z-VDVAD-FMK; Caspase–3 Inhibitor, Z-DEVD-FMK; Caspase–4 Inhibitor, Z-LEVD-FMK; Caspase–5 Inhibitor, Z-WEHD-FMK; Caspase–6 Inhibitor, Z-VEID-FMK; Caspase–8 Inhibitor, Z-IETD-FMK; Caspase–9 Inhibitor, Z-LEHD-FMK; Caspase–10 Inhibitor, Z-AEVD-FMK; Caspase–13 Inhibitor, Z-LEED-FMK; Caspase-Family Inhibitor, Z-VAD-FMK; FMK Negatif Kontrol, Z-FA-FMK kullanılmaktadır.

MDBK, Hep-2, Kelly, SHSY5Y hücreleri 10<sup>5</sup> hücre /mL yoğunlukta 24 gözlü plaklara dağıtılmıştır. Virus veya çeşitli kimyasallar uygulanmadan önce, hücelere 2 saat son

yoğunlukları her mL için 50 µM olacak şekilde kaspaz inhibitörleri uygulanmıştır. Kùltürler 37°C' de % 5 CO2' de 24 saat tutulmuştur. Bu işlemden sonra DNA – bağlayan bir boya olan Hoechst 33342 veya sitotoksik deneyler hücrelere uygulanmıştır.

### *GÜÇLÜKLER ve SINIRLILIKLAR*

DMSO içinde çözünen peptidlerde, son yoğunluk %1 'i geçerse DMSO'nun toksik etkisi, caspase inhibitörlerin etkisini maskeler. Her deney grubunda DMSO kontrolü çalışılması önerilir. Tüm kimyasal ve kemoterapötiklerin etkisinden 2 saat önce, baskılayıcı peptidler uygulanmalıdır [98].

### **Sitotoksiteyi Ölçen Yöntemler**

#### *MTT DENEYİ*

#### *GİRİŞ*

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT), Mosmann tarafından yaşama yeteneği deneyleri için sunuldu. Çok gözlü bir spektrofotometrik plak okuyucusu ile MTT, yarı otomatik yaşama yeteneği deneylerinde kullanılabilir. MTT deneyi hücrenin yaşamını ve çoğalmasını gösteren, canlı hücrelerin soluk sarı substratı (bir tetrazolyum tuzu) kullanma ve daha sonra da mitokondriyal süksinat dehidrogenaz ile lacivert bir formazan ürününe değistirme yeteneğine dayanan, niceliksel kolorimetrik bir deneydir. Tetrazolyum halkası etkin mitokondriya içinde kırılmaktadır, böylece tepkime canlı hücrelerde olur ve oluşan sinyal hücrelerin etkinleşme derecesine bağlı olarak ortaya çıkar. Bu deneyin ana avantajı hızı ve herhangi bir radyoizotopun olmayışdır.

#### *Gereç ve İşlem Basamakları*

Düztabanlı 96 gözlü doku kültür plağı (Greiner).

MikroELISA okuyucu (Microplate Manager 4. 0 Bio-Rad Laboratories, Inc. Organon Teknika reader 230S version 1.23)

Çok kanallı pipet (Eppendorf)

Miniçalkalayıcı, IKA-Works, Inc, USA MS1 model.

MTT stok çözelti: MTT 5mg/ ml in PBS pH 7. 4. Renk oluşma çözeltisi; 0.04 N HCl' lü izopropanol Chemicon International (Cat no: CT01) California, USA.

Hücreleri 96 gözlü mikrotitre plaklarında üretilir (tipik olarak 200 µl içinde 10<sup>5</sup> cells )

Ölüm uyarıcıları ile uygun süre bekledikten sonra, 10 µl stok MTT çözeltisi her göze konur (Hücre sayısına bağlı olarak 7 µl MTT/ 50 µl izopropanol veya 50µl MTT/ 300 µl izopropanol kullanılabilir).

Plak, 37°C' de 4 saate kadar tutulur. Sürenin sonunda canlı hücrelerin olduğu gözlerde tabanında MTT formazanı siyah, donuk kristaller halinde görülür.

Medyum dikkatle dışarı alınır, her göze izopropanol içindeki 100 µl 0.04 N HCl konulur.

Oda sıcaklığında bütün kristallerin çözüldüğünden emin olmak üzere, 5 dakika bekledikten sonra, ölçüm dalga boyu 570 nm ve referans dalga boyu 630 nm olmak üzere bir ELISA okuyucusunda ölçüm yapılır.

#### *GÜÇLÜKLER ve SINIRLILIKLAR*

Yöntem hücre sayısı ile yakın ilişkilidir. Bu nedenle yöntem her hücre ve laboratuvar için en uygun hale getirilmelidir. Çok sayıda hücre, testi kolorimetrik testin değerlendirme sınırları dışına çıkartır. Formazan oluşum süresi kısa tutularak ya da hücre sayısı azaltılarak çözüm bulunabilir.

MTT ile oluşan formazan, zor çözünür. Okuma öncesi mikroskop altında çözünme kontrol edilmelidir. Gerekirse, SDS ya da izopropanol ile oda ısısında ve karanlıkta, gece boyu inkubasyonda tutulabilir [99].

## *XTT DENEYİ*

### *GİRİŞ*

Birçok hücre biyolojisi çalışmasında hücresel çoğalmanın, canlılığın ve etkinleşmenin değerlendirilmesi, önemli alanlardır. Duyarlı, niceliksel, güvenilir, otomatikleştirilmiş yöntemlere olan ihtiyaç, standart testlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Tetrazolyum tuzları 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) ve (sodyum 3'-[1-(fenilaminokarbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis (4-metoksi-6-nitro) benzen sulfonik asit hidrat) (XTT) canlı hücreleri özellikle niceliksel olarak çalışmak için çok uygun testlerdir. Her iki test de, MTT ve XTT, yalnızca metabolik olarak etkin hücrelerin oluşturduğu formazan boyası esasına göre çalışır. Radyoaktif olmayan, XTT' yi kullananan kolorimetrik deney sistemi ilk kez Scudiero, P.A. ve ark. tarafından bildirilmiştir ve daha sonraki yıllarda başka araştırmacılar tarafından da geliştirilmiştir. Deney, radyoaktif izotopları kullanmadan, hücre üremesinin ve canlılığının spektrofotometrik olarak niceliğinin değerlendirilmesidir. XTT – deneyi aynı zamanda, [51Cr] – salınma hücre zehirlenmesi deneyinin de, radyoaktif olmayan alternatifidir.

### *Gereç ve İşlem Basamakları*

Düztabanlı 96 gözlü doku kültür plağı (Greiner)

MikroELISA okuyucu (Microplate Manager 4. 0 Bio-Rad Laboratories, Inc. Organon Teknika reader 230S version 1.23)

Çok kanallı pipet (Eppendorf)

Miniçalkalayıcı, IKA -Works, Inc, USA MS1 model.

XTT hücre üreme kiti II (( sodyum 3'-[1-(fenilaminokarbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis (4-metoksi-6-nitro) benzen sulfonik asit hidrat) işaretleme ayracı, RPMI 1640 içinde (1mg/ml fenol kırmızısız, steril) ve PMS ( N-metil dibenzopyrazin metil sulfat), fosfatla tamponlanmış tuzlu su, elektron-çiftleme ayracı, steril (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Mikrotitre plağına  $1 \times 10^4$  hücre /göz olmak üzere hücreler hazırlanır ve 100 µl çeşitli zehirli etken içeren kültür medyumu konur. Hücre kültürleri 37°C ve % CO<sub>2</sub>' de 24 ila 48 tutulurlar. XTT işaretleme karışımından 50µl eklenir ve 18 saat 37°C ve % 5 CO<sub>2</sub>' de tutulur. Spektrofotometrik optik yoğunluk daha önce tanımlandığı gibi ölçülür

### *GÜÇLÜKLER ve SINIRLILIKLAR*

Yöntem hücre sayısı ile yakın ilişkilidir. Bu nedenle yöntem her hücre ve laboratuvar için optimize edilmelidir. Çok sayıda hücre, testi kolorimetrik testin değerlendirme sınırları dışına çıkartır. Formazan oluşum süresi kısa tutularak ya da hücre sayısı azaltılarak çözüm bulunabilir. Oluşan formazan, MTT formazana göre kolaylıkla çözünür

### **Hücre Ölümünü Değerlendiren Yöntemler**

*Hoechst 33342 / Propidyum iyodid çekirdek boyaması ve floresan mikroskobu kullanarak apoptoz ve hücre ölümünün morfolojik değerlendirmesi*

### *GİRİŞ*

Hücre ölümünün değerlendirilmesi ve niceliksel durumunun ortaya konması, klasik morfolojik ölçütler ve bunlarla birlikte işlevsel yaşamsal boyalar kullanılması temelinde gerçekleştirilir. Hoechst 33342 (bisbenzimid H 33342, Sigma), çift sarmallı DNA' nın AT' den zengin bölgelerine özgü bir boyadır. Bu yöntem, canlı, ölü ve apoptotic hücrelerin hücre zarlarının iki DNA boyası; propidyum iyodid (Sigma) ve Hoechst 33342' e geçirgenliklerinin arasındaki farklılıklara dayanır. Ölü hücreler her iki boyaya da geçirgendir, canlı hücreler her iki boyayı dışarı pompalar ve apoptotic hücreler propidyumu dışarı atabilirken, Hoechst boyasını atamaz. Bu yöntem, zamana dayalıdır.

### *Gereç ve İşlem Basamakları*

Çözelti: Hoechst 33342 stok çözeltisi: 1 mg /ml DMSO

Hoechst 33342 çalışma çözeltisi: 2 mL PBS içinde 10µl stok çözeltisi (5 µg/ml PBS veya medyum içinde)

Propidyum iyodid stok çözeltisi: 1mg /ml PBS



Propidyum çalışma çözeltisi: 2 mL PBS içinde 100 µl stok çözeltisi (50 µg/ml PBS veya medyum içinde)

Metanol / aseton (1:1, v/v) (Sigma)

Olympus BHZ, RFCA Mikroskop (Japan)

Hücreler oda sıcaklığında 20 dakikada PBS içindeki % 1-3' lük formaldehidde tespit edilir. Tespit çözeltisi çekilir, soğuk % 100 metanol eklenir, 20 dakika oda sıcaklığında bırakılır. Metanol çekilir, PBS ile 3 kez yıkanır. Hücreler 37°C' de 15 dakika Hoechst 33342 boyasında tutulur (5 µg/mL PBS). Üç kez PBS ile yıkanır. *Propidium iodide* (50µg/mL PBS) eklenir. Hücreler Olympus BHZ, flüoresan ışık kaynağı eklenmiş, eksitasyon dalga boyu 330 nm ve engel filtresi 420 nm olan RFCA mikroskopu (Japan) ile değerlendirilir (Shacter et al., 2000). Aynı preparattaki hücrelerin en az 200' ü sayılır. Deneyler 3 kez yinelenir ve aşağıdaki ölçütlere göre sınıflandırılır: Canlı hücreler; normal çekirdek, mavi / yeşil organize yapıda soluk kromatinlidir. Apoptotik hücreler; (erken apoptotik hücreler), çekirdek içindeki kromatin yoğunlaşmasının varlığı ile ve bozulmamış çekirdek sınırları ile çok yoğunlaşmış sınırdaki kalan parlak mavi kromatin ile tanımlanabilir; (geç apoptotik hücreler) bozulmamış sitoplazmik zar içinde daha küçük çekirdek cisimlerine çekirdeğin parçalanması görülür, kırmızıya boyanmaz (*Propidium iodide* almaz). Nekrotik hücreler; (erken nekrotik hücreler) tamamen bozulmamış çekirdek ve düz normal bir yapıda ve büyümüş kırmızı çekirdek ve hasarlanmış sitoplazmik zarın varlığı ile tanımlanabilir, (geç nekrotik hücreler) daha az oranda bütün halde kalmış çekirdeğin görüldüğü hasar görmüş sitoplazmik zar ve düzgün normal bir yapısı olan kırmızı büyümüş haldeki çekirdek ile tanımlanabilir ve sitoplazma kaybı ve hasar görmüş / bozulmuş çekirdek zarı ve parlak, kırmızı boyanmış, biraz yoğunlaşmış çekirdek olarak da görülebilir.

### *GÜÇLÜKLER ve SINIRLILIKLAR*

Yöntemde mikroskopi basamağının hemen gerçekleştirilmesi önemlidir. Morfolojik değerlendirmeyi de kapsar. Bu nedenle çok erken dönem apoptozu bir başka yöntemle birlikte değerlendirmek yararlı olacaktır [100,101, 102, 103, 104].

*“in situ TdT-mediated dUTP nick end labeling technique” tekniğine dayanarak, tek bir hücre düzeyinde apoptozun sayılması ve floresan mikroskop ile immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi*

*GİRİŞ*

Hücre ölümünün iki farklı hali olan apoptoz ve nekroz, ölen hücrelerin moleküler, biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerine dayanarak biribinden ayrılabilir. Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, ökaryotik hücre ölümünün en sık rastlanan şeklidir. Bu, homeostazı koruyan bir fizyolojik intihar mekanizmasıdır.

Hücre ölümü homeostaz içindeki normal doku döngüsünde olur. Genelde, apoptoza giden hücreler, plazma zarının hızlı bozulması ve çekirdeğin parçalanması da dahil olmak üzere, çekirdek ve sitoplazmada belirgin örnek oluşturacak şekilde yapısal değişiklikler gösterirler. Çekirdeğin göçüşü, kromatinin ağır hasarı ve kalsiyuma bağlı endojen nükleazların etkin hale gelmesinden sonra DNA' nın oligonükleozomal uzunlukta DNA parçalarına ayrılması ile ilişkilidir. Ancak çok nadir istisnalarda, apoptozun oligonükleozomal DNA yıkımı ile birlikte gitmediği gösterilmiştir.

Apoptotik hücreleri tanımak için birçok yöntem tanımlanmıştır. Çekirdek DNA' sının oligonükleozom boyutunda parçalanması ile sonuçlanan endonükleolizis, apoptozun önemli biyokimyasal olgusu olarak kabul edilir. Böylece bu olgu sıklıkla, elektroforez sırasında agaroz jeller üzerinde tipik “DNA merdiveni” ile değerlendirilmesi için kullanılır. Ancak bu yöntem tek tek hücrelerdeki apoptozu veya apoptozun histolojik yerleşimini veya hücre farklılaşmasındaki ilişkisi ile ilgili bilgi sağlamaz.

Bu, apoptoz ile uyarılmış DNA dizi kırılmasının enzimatik in situ işaretlenmesi ile yapılır. “Terminal deoksinükleotidil transferaz” (TdT) yanında DNA polimeraz, kırılan DNA dizilerine işaretli nükleotidlerin in situ yerleştirilmesinde kullanılmış durumdadır. ISEL (in situ end labeling) veya TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) olarak da tanımlanan TdT kullanarak sonuna takma tepkimesi, DNA polimeraz kullanarak in situ son translasyona (in situ nick translation=ISNT) göre birçok avantaja sahiptir:

Duyarlılığı arttıracak şekilde, apoptotic hücrelerin işaretleme yoğunluğu “ISNT” ye oranla “TUNEL” de daha yüksektir. Nükleotide eklenme kinetiği, “ISNT” ye oranla “TUNEL” da çok hızlıdır. “TUNEL”, nekroza oranla apoptozu daha iyi boyar, böylece apoptozu nekrozdan ve antitümör ilaçlar veya radyasyon sonucu oluşan birincil DNA kırılmalarından ayırır.

#### *Gereç ve İşlem Basamakları*

Yıkama tamponu: fosfatla tamponlanmış tuzlu su (PBS), durdurma çözeltisi: Metanolde % 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tespit çözeltisi: PBS’ te % 4 paraformaldehit, pH 7.4, taze hazırlanmış, geçirgenleştirme çözeltisi: % 0.1 sodyum sitrat içinde % 0.1 Triton X-100, taze hazırlanmış, DNase I, grade I (Roche Applied Science, cat No: 104 132), In situ cell death detection Kit, AP (Roche Applied Science, Cat. No: 1 684 809), nemlendirilmiş ortamda (portatif inkübatör, Cat No. XX63 000 000 Milipore Corporation Bredford, Massachusetts, USA), Lamel (NUNC); Olympus BHZ, RFCA microscope (Japan).

1. 15–25°C’ de 1 saat taze hazırlanmış tespit çözeltisi ile hücreleri tespit et ve kurut,
2. Lamı PBS ile durula,
3. Buz üzerinde geçirgenleştirme çözeltisi ile 2 dakika beklet,
4. Lamı PBS ile iki kez durula,.
5. Örnek çevresindeki alanı kurut,.
6. Örneğin, negatif kontrolün ve pozitif kontrolün üzerine 50µl “TUNEL” tepkime karışımı ekle,
7. Kapağı kapat ve 37°C’ de 60 dakika nemlendirilmiş, karanlık ortamda beklet,
8. Lamı 3 kez PBS ile durula,
9. Eksitasyon dalga boyu 450–500 nm ve tarama dalga boyu 515–565 nm olmak üzere floresan mikroskopunda incele.

#### *GÜÇLÜKLER ve SINIRLILIKLAR*

Alanın ışıktan mutlak korunması gereklidir [105].

## *“Annexin V” işaretleme kullanılarak tek bir hücre düzeyinde apoptozun değerlendirilmesi, sayılması ve nekrotdan ayrılması*

### *GİRİŞ*

Apoptozun erken döneminde değişiklikler hücrenin yüzeyinde oluşur. Plazma zarındaki değişikliklerinden biri, plazma zarının iç bölümünden dışına fosfatidilserinin (FS) translokasyonudur. Böylece FS, hücrenin dış yüzeyinde sergilenir hale gelir. “Annexin V”,  $Ca^{2+}$  ‘ ya bağımlı bir fosfolipit – bağlayan protein olup, FS’ ye karşı yüksek ilgi gösterir. Böylece bu protein, FS’ nin hücre yüzeyindeki varlığını göstermekte duyarlı bir prop olarak kullanılır, ancak doku yüzeyindeki varlığını gösteremez.. Nekrotik hücreler zarlarının bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak FS sundukları için, apoptotik hücrelerden bu şekilde ayrılabilirler. Böylece bir DNA boyası olan “Annexin V” ile pozitif olarak boyanan nekrotik hücreler diğerlerinden ayrılabilirler.

### *Gereç ve İşlem Basamakları*

Annexin-V-Fluorescein, Propidiyum iyodid, HEPES tamponu (Roche Diagnostics GmbH, Germany Cat. No. 1 858 777), PBS, 8 göz odacıklı lam (Nalge Nunc International, Corp. USA Cat. No. 177445), CO2 inkübatör (Forma Scientific Model 3194, Thermo Electron Corporation Steri-Cycle, USA), Nemlendirilmiş ortam (portatif inkübatör Milipore Corporation Bedford, Massachusetts, USA, Cat No. XX63 000 000), Lamel (NUNC), Mikroskop Olympus BHZ, RFCA (Japan).

1. Odacıklı lamlarda üreyen hücrelerin kapaklarını çıkarın,
2. Ortamı uzaklaştırın ve lamları Annexin-V-FLUOS işaretleme çözeltisi ile örtün (20  $\mu$ L Annexin V Fluos, 20  $\mu$ L propidiyum iyodid, 1 ml HEPES) (100 $\mu$ L/odacık).
3. Lamaların üzerine lamelleri koyun ve 15–25°C ‘ de 10–15 dakika bekletin,
4. Floresan mikroskop ile değerlendirin (Eksitasyon dalga boyu 450–500 nm ve tarama dalga boyu 515–565 nm).

### *GÜÇLÜKLER ve SINIRLILIKLAR*

Alanın işiktan mutlak korunması gereklidir [106, 107].

## ***Nitrit Ölçümü***

### ***GİRİŞ***

Griess ayracının varlığını gösterebildiği tek nitriti üreten nitrik oksit sentaz (NOS), uyarılabilir (inducible) nitrik oksit sentazdır (iNOS). Çünkü iNOS-/- ' da hiç bir nitrit saptanamamıştır (Carl Nathan, kişisel iletişim sonucunda). Nitrit, nitrik oksidin (NO) hızlı oksidasyonu sonucunda ortaya çıkar. Nitrit çalışmak için daha önce yayınlanmış bir çalışmadan yararlanılmıştır [108].

### ***Gereç ve İşlem Basamakları***

Naftiletlen - diamin dihidroklorit, o -fosforik asit içinde sulfanilamid, sodyum nitrit (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA) . Mikrotitre plağı (Maxisorb Immunoplate, NUNC). Spektrofotometrik okuyucu (Reader Model 230S; Organon Technica, Microwell System, Holland).

Değerlendirme yapılacak örneklerden alınan 100 µL, eşit miktarda 100 µL Griess Ayracı (A: naftiletlen- diamin dihidroklorit, % 0. 1, 5 mM; B:o-fosforik asit içinde sulfanilamid, % 1, 5 mM) karışımı ile 96 gözlü mikrotitre plağında karıştırılır (Maxisorb Immunoplate, NUNC). Oda sıcaklığında 10 dakika bekledikten sonra, 540 nm dalga boyunda, mikrotitre plak okuyucuda örnekler okutulur (Reader Model 230S; Organon Technica, Microwell System, Holland). Her çalışmada sodyum nitritin 2 kat sulandırılmaları standart eğri için yürütülür (0-128 µM).

### ***İstatistik Analiz***

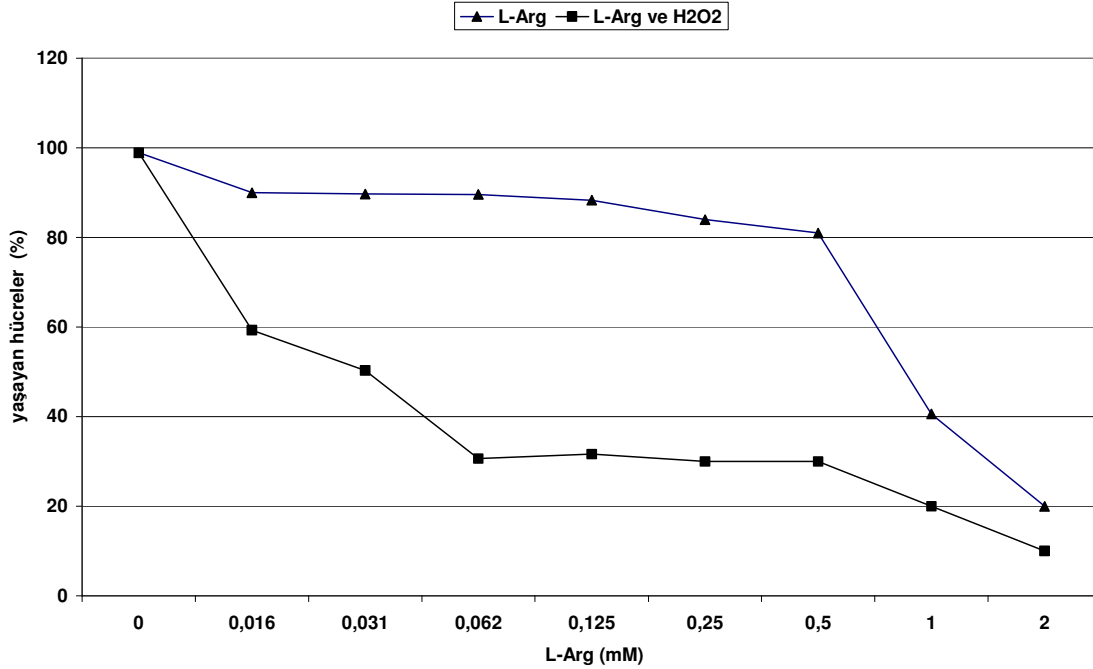
Nitrik oksit değerlendirmeleri, apoptoz -nekroz deneyleri üç gözde ve üç ayrı deneyde yinelenir. İki deney gurubu arasındaki karşılaştırmalar iki-yönlü *t* -test ile yapılır. *P*< 0.05 anlamlı kabul edilir. Farklı deneylerdeki, farklı hücre kültürlerinden elde edilen sonuçlar ortalama ± Standart Deviyasyon olarak ifade edilir.

## **BULGULAR**

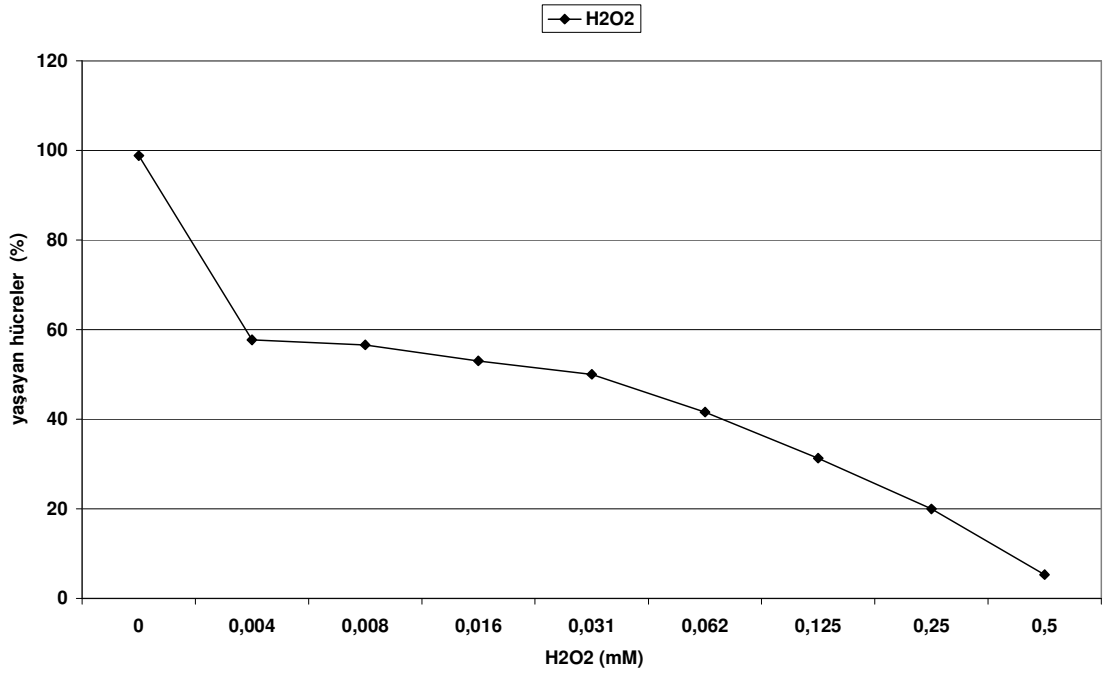
### *HeLa Hücrelerinin Doza Bağlı Değişen Yaşayabilirliği*

L-arginine (L-arg)'in hücre ölümü üzerine anlamlı etkisi 0.5 mM yoğunluğundan sonra başlar ve doza bağlı olarak artar. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), yalnız kullanıldığında, hücre ölümü üzerine anlamlı etkisi 0.004 mM yoğunluğunda başlar, doza bağımlı olarak artar. L-Arg, sabit yoğunluğu 0.01mM olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte kullanıldığında hücre ölümü üzerine sinerjik etki gösterirler ve anlamlı etki 0.01 mM yoğunlukta başlar. NO yanıtları L-NAME ile inhibe edilen grupta hücresel ölüm, yalnızca temel besleyici ortamda yaşatılan kontrol hücreleri ile aynı oranlardadır. Staurosporine (SS) ile oluşturulan sağaltım gurubunda hücresel ölümün anlamlı olarak etkilendiği yoğunluk, 0.04 µM olarak saptanmıştır ( Şekil 1).

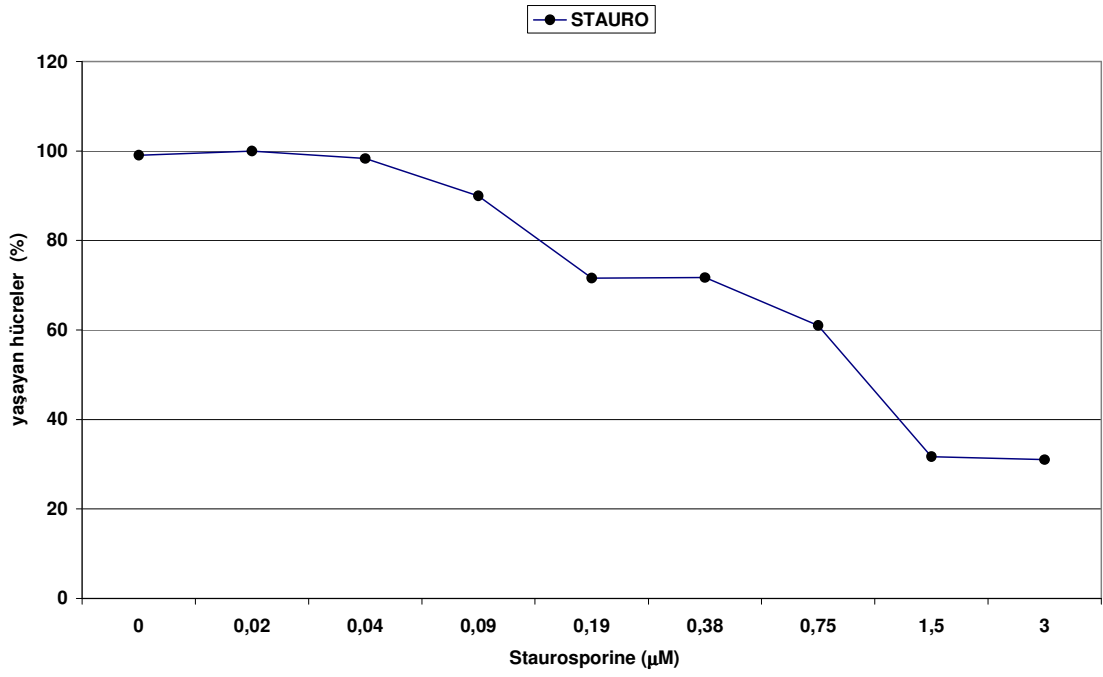
**A:**



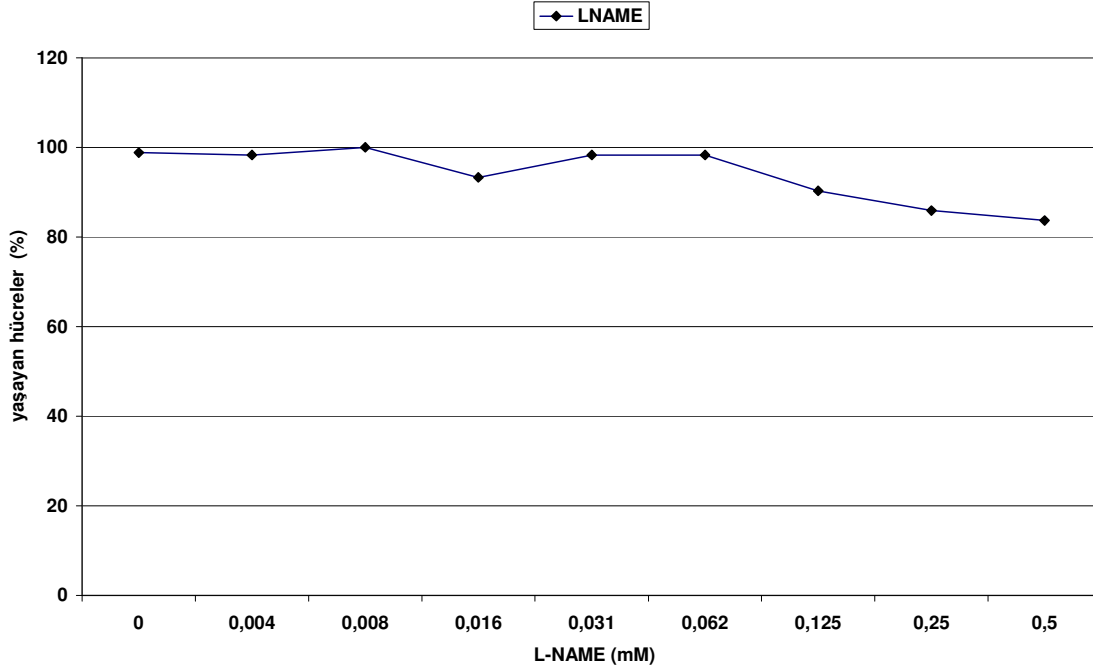
**B:**



**C:**



D:



**Şekil 1. Sağaltım ve mikroçevre etmenlerinin doz-yanıtları.** Sağaltım ve mikroçevre etmenlerinin HeLa hücrelerinde gösterdikleri *in vitro* sitotoksik etkinin ölçülmesinde, 96 gözlü kültür tabaklarında bir yoğunluk eğim şeması oluşturuldu. HeLa hücreleri temel besleyici ortam ile  $1 \times 10^5$  hücre  $\text{ml}^{-1}$  olarak hazırlandı ve her göze  $1 \times 10^4$  hücre  $\text{göz}^{-1}$  olarak ekildi. Hücreler etkenleri içeren besleyici ortamda 24 saat tutuldu. A) L-Arg doz yanıtları için 2.00 - 0.02mM yoğunluk aralığı kullanılmış ve eş zamanlı olarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.01mM) ile birlikte kullanımını karşılaştırılmıştır. B)  $\text{H}_2\text{O}_2$  doz yanıtları için 0.50 - 0.004 mM yoğunluk aralığı kullanılmıştır. C) Staurosporine doz yanıtları için 3.00- 0.02  $\mu\text{M}$  yoğunluk aralığı kullanılmıştır. D) L-NAME doz yanıtları için 0.50 - 0.004 mM yoğunluk aralığı kullanılmıştır ve kontrol hücreleri % 5 temel besleyici ortamda tutulmuştur. Hücrelerin yaşayabilirliği yöntemlerde tanımlanan MTT test ile ölçülmüştür. MTT testi için kullanılan her değer bağımsız üç farklı deneyde ve en az üç gözde yinelenerek elde edilmiştir. Tüm veriler, ortalama  $\pm$  Standart sapma olarak verilmiş, kontrol hücreleri ile karşılaştırma için güven aralığı \*  $p < .05$  olarak seçilmiştir.



HeLa hücrelerinde SS, L-Arg, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve L-NAME için hücresel proliferasyonu yaklaşık olarak % 100 (IC<sub>100</sub>) durduran yoğunlukları içeren bir sitotoksikite testi ile (MTT testi), doz-yanıt eğrileri çizilmiştir. HeLa hücrelerinin yaklaşık IC<sub>50</sub> dozları SS, L-arg, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve L-NAME için sırasıyla, 1. 050 µM, 875 µM, 31 µM ve >500 µM olarak bulunmuştur. Buna göre, servikal karsinoma hücrelerinde, mikroçevrede ROS bulunuyorsa, 28 kez daha düşük yoğunlukta L-Arg kullanımı ile aynı sitotoksik etki elde edilebilmektedir (Tablo 1).

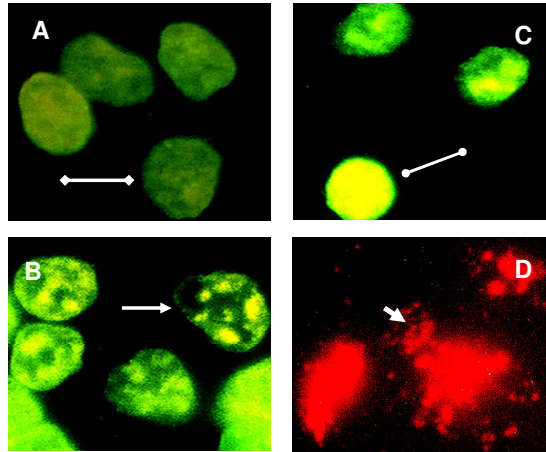
**Tablo 1. Sağaltım ve mikroçevre bileşenlerinin HeLa hücrelerindeki IC<sub>50</sub> dozları.** Etkenlerin yoğunluğuna karşı yaşayan hücrelerin yüzdesi (% yaşayan hücre) olarak grafiklenen her bir değer en az üç ölçüm sonucunda türetilmiştir. Kontrol hücrelerine karşı, hücresel proliferasyonu % 50 durduran etken yoğunluğu (µM) sitotoksik (IC<sub>50</sub>) dozu olarak kaydedilmiştir.

Sağaltım ve mikroçevre bileşenlerinin HeLa hücrelerindeki IC<sub>50</sub> dozları

<i>Etken</i>	<b>Sitotoksik IC<sub>50</sub> dozları (µM)</b>
<i>L-Arg</i>	875
<i>L-Arg</i> +H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10µM)	30
<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	31
<i>Staurosporine</i>	1. 05
LNAME	>500

### *NO donörü L-Arg aracılığı ile oluşan hücre ölümünün özellikleri*

Canlı hücreler, Hoechst 33342 ve Propidium Iodide (HOE/PI) ile boyandıklarında, çekirdekleri olağan, mavi/yeşil soluk boya almış düzenli kromatin yapıları olan bir morfoloji sergilerler (Şekil 2A). İki mM yoğunlukta L-Arg ile 24 saat süresince bekletilen HeLa hücrelerinde, morfolojik değişimler gözlenir ( Şekil 2C). Apoptotik sürecin erken evresindeki hücrelerin çekirdek ve sitoplazma zarları sağlamdır. Ancak çekirdek içinde kromatin yoğunlaşması gözlenir. Hücreler 1 mM L-Arg ile birlikte apoptoz uyarıcı etkisi bilinen SS (1µM) ile bekletildiğinde morfolojik göstergeler apoptozun geç evrelerini tanımlar (Şekil 2B). Apoptozun geç evresinde bulunan bu hücreler, sitoplazmik bir zar ile çevrilmiş küçük çekirdeksel yapılar olarak tanımlanan çekirdeksel parçalanmalar gösterirler. Buna karşın, hücreler; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında, çok sayıda boşluk içeren, soluk, canlı hücrelere karşın daha küçük bir sitoplazma; tamamen sağlam bir çekirdek ile hasarlı bir sitoplazma zarı olarak belirgin nekrotik hücre morfolojisi sergilerler (Şekil 2D)



**Şekil 2. HeLa hücrelerinde görülen morfolojik değişimler.** (A) HeLa hücreleri % 5 temel besleyici ortamda; (B) 1mM L-Arg ve 1µM SS; (C) 2mM L-Arg ve (D) 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ortamlarında 24 saat tutulan hücreler sabitlenip Hoechst 33342 ve PI ile boyanmıştır (yöntemlerde ayrıntılı olarak tanımlanmıştır). Hücre morfolojilerindeki özellikler; köşeli ok

(A): normal yaşayan hücre; uzun ok (B): geç evre apoptotik hücre; yuvarlak ok (C): erken evre apoptotik hücre; ok başı (D): geç evre nekrotik hücre olarak tanımlanmıştır (X40 büyütme).

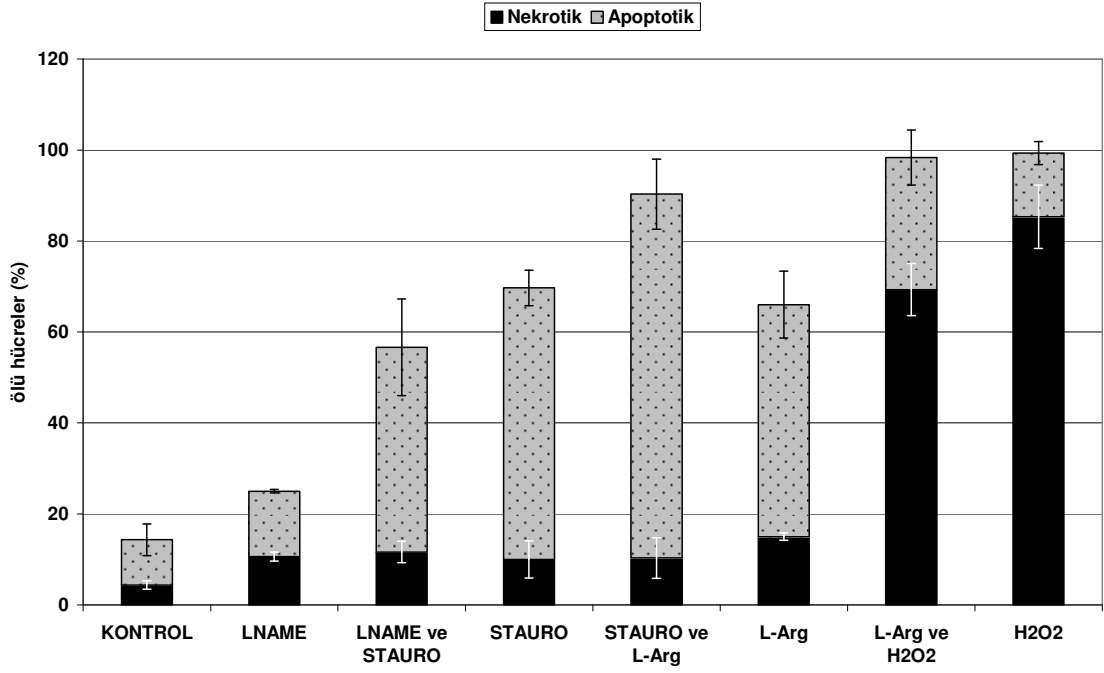
*Nitrik Oksidin Neden Olduğu Apoptotik Hücre Ölümi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Varlığında Nekrotik Hücre Ölümine Değişir.*

Yirmi dört saat süresince 0. 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan oksijen radikallerinden zengin mikroçevre ortamında tutulan HeLa hücrelerinin % 99. 3 ± 4. 1'ü ölmektedir. Bu hücrelerin % 85 ± 6. 9'u nekrotik yolla; % 14 ± 2. 5'u apoptotik yolla ölmektedir. NO donörü L-Arg ile oluşturulan mikroçevrede aynı sürede daha az hücre ölmekte; % 66 ± 9. 2. Ancak bu hücrelerin, % 51 ± 7. 3'ü apoptotik yolla, % 15 ± 0. 8'i nekrotik yolla ölmektedir. İki mM NO donörü L-Arg ile oluşturulan NO' den zengin ortamda gözlenen bu ölüm yüzdesi, ortama 0. 01mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek peroksinitritten zengin bir mikroçevre oluşturulduğunda, % 98. 3 ± 1. 7'ye artar. Üstelik bu hücrelerin % 69. 3 ± 5. 7'i nekrotik yolla ölmektedir (şekil 3A).

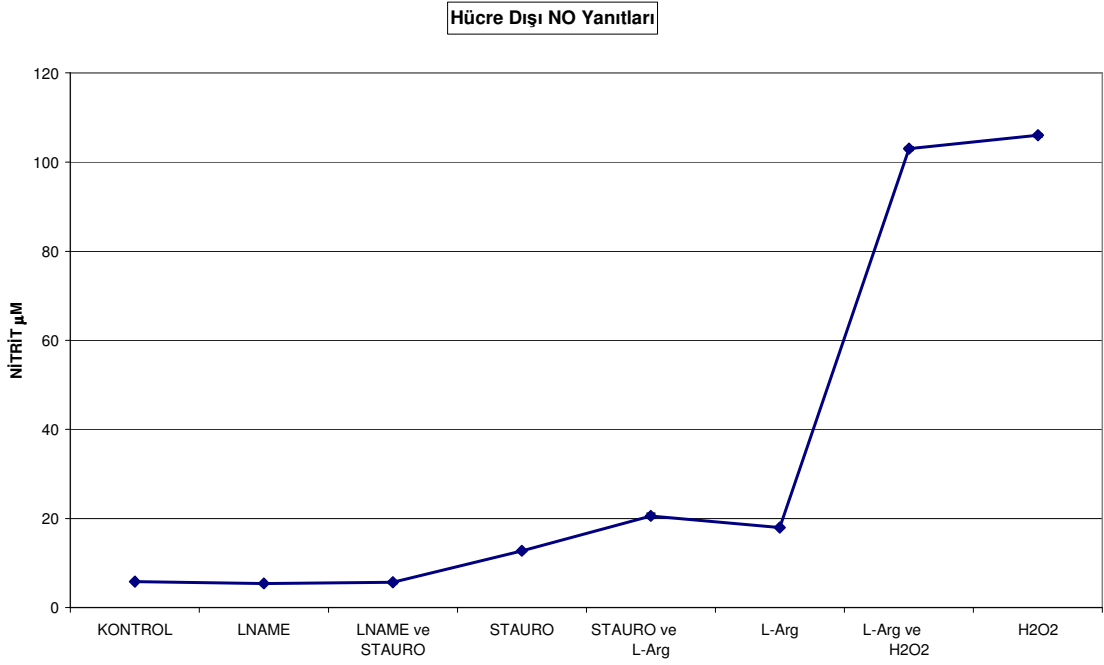
*Staurosporine'in apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi NO zengin mikro çevrede sinerjik olarak artar.*

HeLa hücrelerinde kimyasal bir ajan olan staurosporine (SS) , apoptotik temelli bir sağaltım yaklaşımına model oluşturmak üzere kullanılmıştır. Sağaltım modeli gurubunda hücrelerin % 69. 7 ± 0. 5'i ölmüş, bu ölümlerin % 59. 7± 3. 9'i apoptotik yolla, % 10 ± 4. 0'ü nekrotik yolla olmuştur. Buna karşın NO zengin ortamda SS etkisi ile hücrelerin % 90. 3 ± 4. 5'i ölmüş, bunların % 80. 0 ± 7. 7'si apoptotik yolla olmuştur. Staurosporinin neden olduğu apoptotik hücre ölümü endojen kaynaklı NO üretimi uyarıldığında, % 34 artmıştır. SS ile uyarılan apoptotik hücre ölümü, NOS inhibitörü L-NAME kullanılarak NO üretimi durdurulduğunda ancak % 32 oranında engellenebilmektedir.

L-NAME ile gözlenen hücre ölümünde, kontrol hücrelerinden anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (şekil 3A)



A



B

**Şekil 3. Mikroçevrede yer alan serbest radikallerin staurosporine'in neden olduğu apoptotik hücre ölümü ve hücre dışı NO salınımı üzerine etkileri. (A) Hücreler, 2mM L-arginine (L-Arg); 0.5mM L-NAME (LNM); 1µM staurosporine (SS); 0.1mM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 2mM L-Arg ile eş zamanlı olarak 0.01mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 1µM SS ile eş zamanlı**

olarak 0.5mM L-NAME; 1µM SS ile eş zamanlı olarak 2mM L-Arg içeren besleyici ortamlarda, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> koşullarında, 24 saat tutulmuş ve hücre ölümü Hoechst 33342/propidium iodide çekirdek boyaması ile değerlendirilmiştir. HeLa control hücreleri yalnızca %5 DMEM besleyici ortamında tutulmuştur. (B) Hücre dışı Nitrit birikimini ölçmek için, sure sonunda ilgili gurupların 100 µL besleyici ortamları eşit miktar Griess ayıracı ile karıştırılarak ölçüm yapılmıştır. (◆: hücre dışı NO yanıtını gösterir). Test, üç bağımsız deney ortamında, her biri dört yada sekiz kez yinelenerek gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama±Standart sapma olarak verilmiş ve karşılaştırmalar kontrole karşı \*  $p < .05$  olarak değerlendirilmiştir.

*Hücre dışı bölgede nitrik oksit yanıtlarında görülen değişim, hücrelerin nekrotik ölüm yüzdeleri ile benzeşir.*

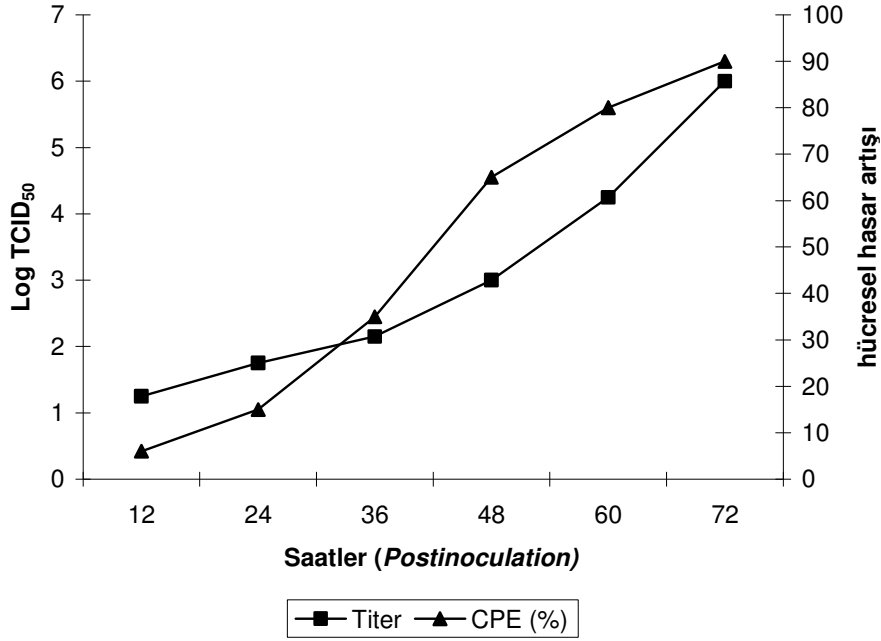
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile mikroçevre ortamı, reaktif oksijen ürünleri (ROS) açısından zenginleştirildiğinde, Hücre ölümleri ağırlıklı olarak (% 85 ± 6. 9) nekrotik yolla olmaktadır. Bu gurubun hücre dışı nitrit içeriği 106 ± 0. 4 µM olarak saptanmış ve tüm guruplar içerisinde nitrit içeriği yanında nekrotik ölüm yüzdesi en yüksek gurup olarak yer almıştır. L-Arg ile endojen NO sentezi uyarılmış ve eş zamanlı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan HeLa hücrelerinde, hücre dışı nitrit içeriği 103 ± 0. 4 µM olarak saptanmıştır. Nekrotik hücre ölümü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan guruptan daha düşük (% 69. 3 ± 5. 7), ancak belirgin olarak baskın olan ölüm şeklidir. L-Arg ile uyarılmış hücrelerde (5. 5 ± 0. 08 µM), L-NAME (5. 45 ± 0. 1 µM) ve kontrol gurubuna (5. 8 ± 0. 08 µM) yakın nitrit değerleri ölçülmüştür. Her üç gurupta da apoptotik ölüm baskındır. SS ile eş zamanlı olarak L-Arg ile uyarılan hücrelerde hücre dışı nitrit miktarı 7. 2 ± 0. 57 µM olarak artmış ancak kontrol grubundan anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu gurupta da apoptotik ölüm baskındır (Şekil 3B)

*Mikroçevrede oluşan viral enfeksiyonun apoptoz üzerine etkileri*

*Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) ile infekte MDBK-normal hücrelerde (Madin-Darby Bovine Kidney ) görülen etkiler:*

BHV-1, MDBK hücrelerinde hızlı bir enfeksiyon yaratır. Bulaşma göstergeleri; yuvarlaklaşma, balonlaşma, sinsidyum oluşumu ile tanımlanan cpe (cyto pathological effects),

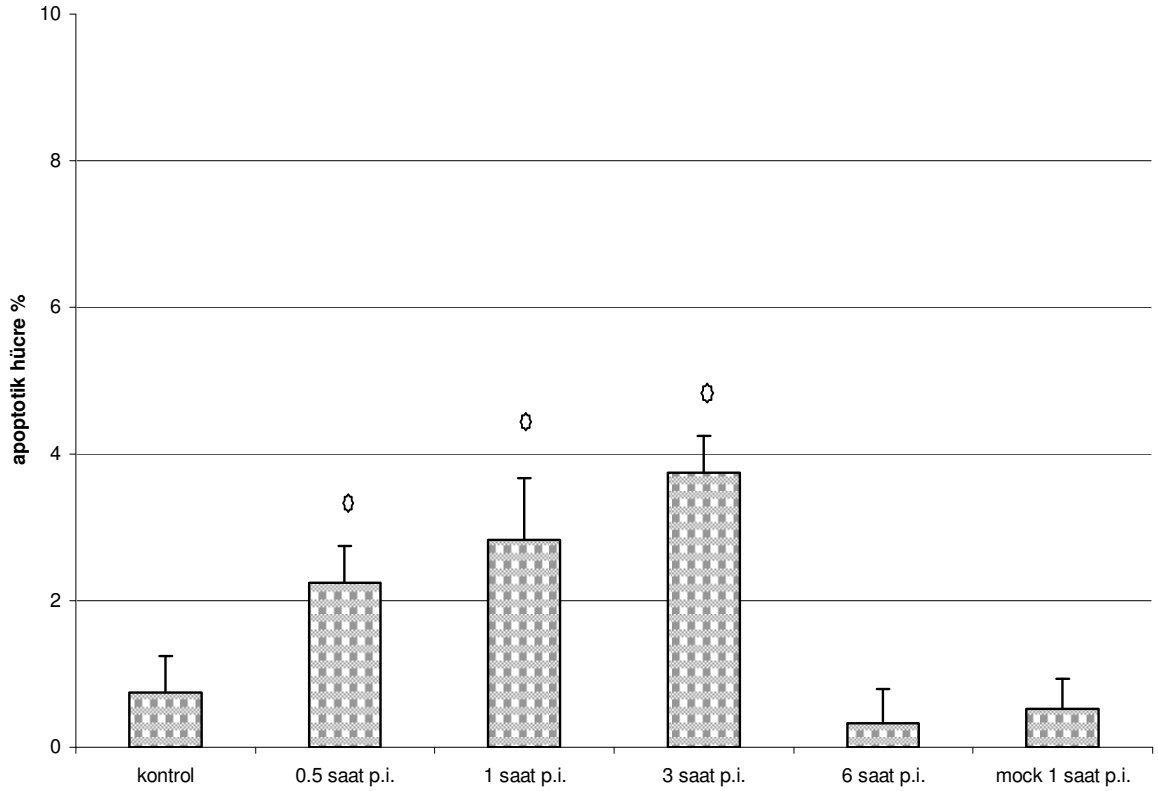
bulaşmadan sonraki (p.i.) altıncı saatlerde başlar; hücrelerin erimesi ile p.i. üçüncü günde sonlanır. Bulaşma yeteneği, (%50 tissue culture infective dose) TCID<sub>50</sub> 10<sup>-6</sup> / 0.1mL (1:1 m.o.i) olarak 72 saat için hesaplanmıştır (Şekil 4).



**Şekil 4. MDBK hücrelerinde BHV-1'in büyüme kinetiği.** Bovine herpesvirus 1 (BHV-1)'in MDBK hücrelerindeki büyüme kinetikleri, TCID<sub>50</sub> yöntemi ile ölçülmüş; oluşan hücresel patoloji ve viral yoğunluğun oranı olarak tanımlanmıştır.

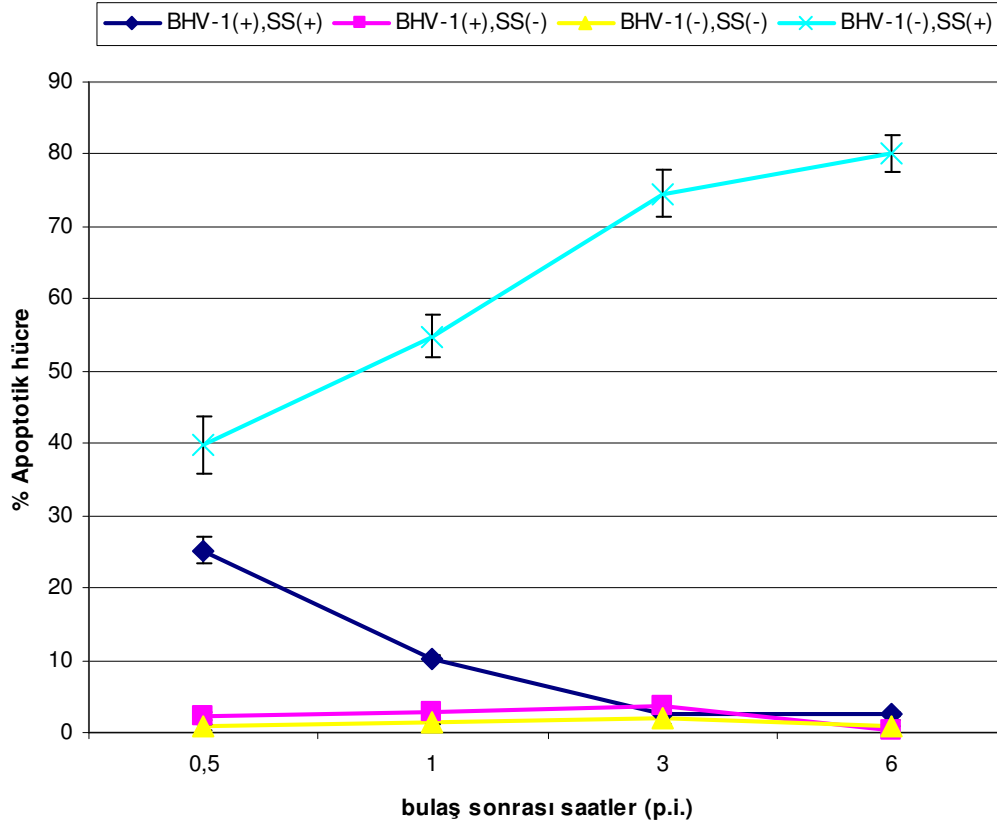
#### *Virus aracılığı ile oluşan hücre ölümünün özellikleri*

BHV-1 bulaşan hücrelerde apoptoza özgü morfolojik değişiklikler, p.i. yarım ile üçüncü saatler arasında gözlenmiştir ( Şekil 5). HOE/PI çekirdek boyama yöntemiyle belirlenen morfolojik değişim oranı p.i. 0. 5, 1 ve üçüncü saatlerde sırasıyla % 2. 25 ± 0. 5, % 2.83 ± 0. 9 ve % 3. 75 ± 0. 5 olarak bulunmuştur. Bulaş sonrası üçüncü saatten sonra apoptotik hücreler azalmaktadır (% 0. 33 ± 0. 5).



**Şekil 5. BHV-1 (Cooper strain) bulaşının MDBK hücrelerinde oluşturduğu apoptotik etkiler.** HOE/PI çekirdek boyaması ile apoptotik morfoloji gösteren hücrelerin yüzde oranı olarak gösterilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \* $p < 0.05$  kontrol hücrelerine karşı istatistiksel olarak anlamlı bulunan sonuçlardır.

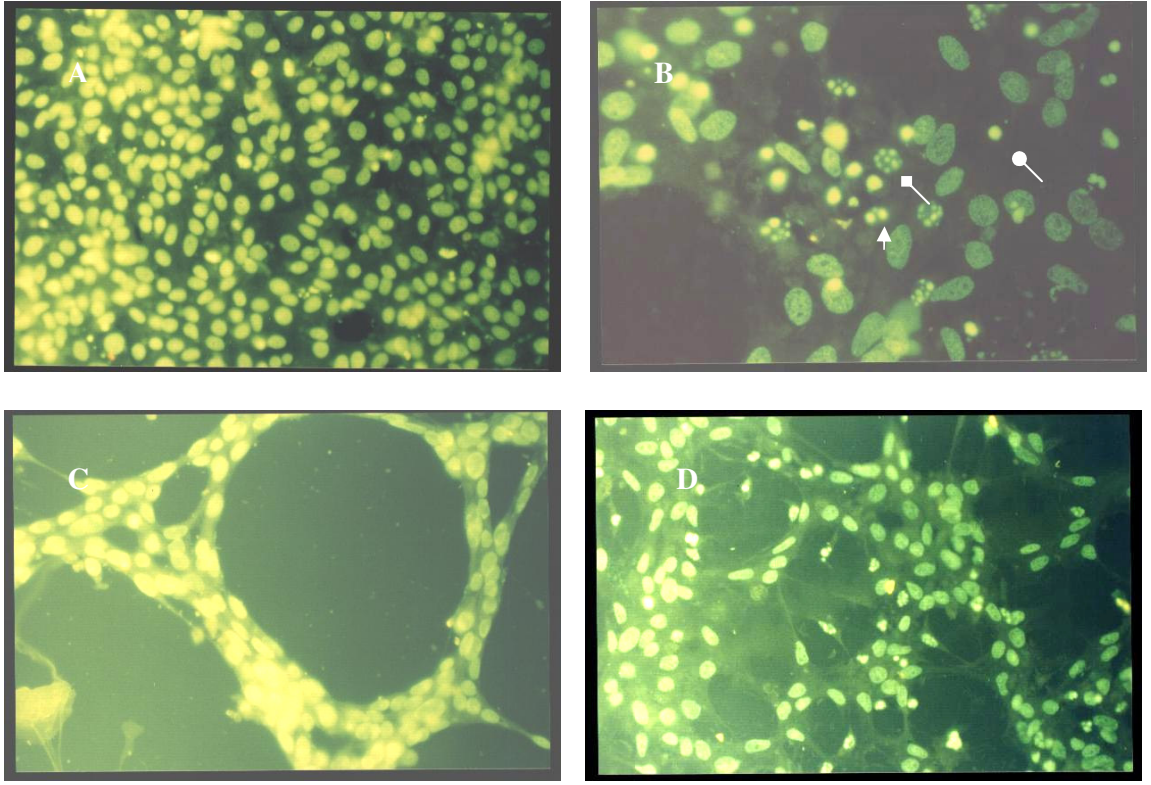
MDBK hücrelerinde, apoptozun uyarıldığı koşullarda BHV-1 etkisi çalışılmıştır. Bulaş sonrası 0.5, 1, 3, 6 saatlerde başlatılan SS ile apoptotik sürecin uyarılması, 24 saat sürdürülmüştür. Bu süre sonunda HOE/PI çekirdek boyaması ile değerlendirilen hücreler, sırasıyla %  $25.2 \pm 1.8$ ,  $10.3 \pm 0.4$ ,  $2.5 \pm 0.4$ ,  $2.5 \pm 0.4$  oranında apoptotik evrede bulunmuştur (Şekil 6). Eş zamanlı olarak (24 + 6 saat) BHV-1 bulaşı olmayan ve SS ile uyarılan hücrelerde apoptotik hücre oranı %  $80.0 \pm 2.5$  olarak değerlendirilmiştir (Şekil 6). SS ile uyarılmamış ve BHV-1 bulaşı olmayan kontrol hücrelerinde aynı sürede gözlenen apoptotik hücreler %  $0.8 \pm 0.8$  oranındadır (Şekil 6).



**Şekil 6. SS ile uyarılmış MDBK hücrelerinde, BHV-1'in antiapoptotik etkisi.** Tek tabaka halindeki MDBK hücreleri BHV-1 bulaşından 0. 5, 1, 3, 6 saat sonrası, 1µM SS ile 37 °C, % 5 CO<sub>2</sub> ortamında 24 saat tutulmuştur. Sabitlenen hücreler HOE/PI ile boyanarak flüoresans mikroskopi ile apoptotik hücre oranları belirlenmiştir.

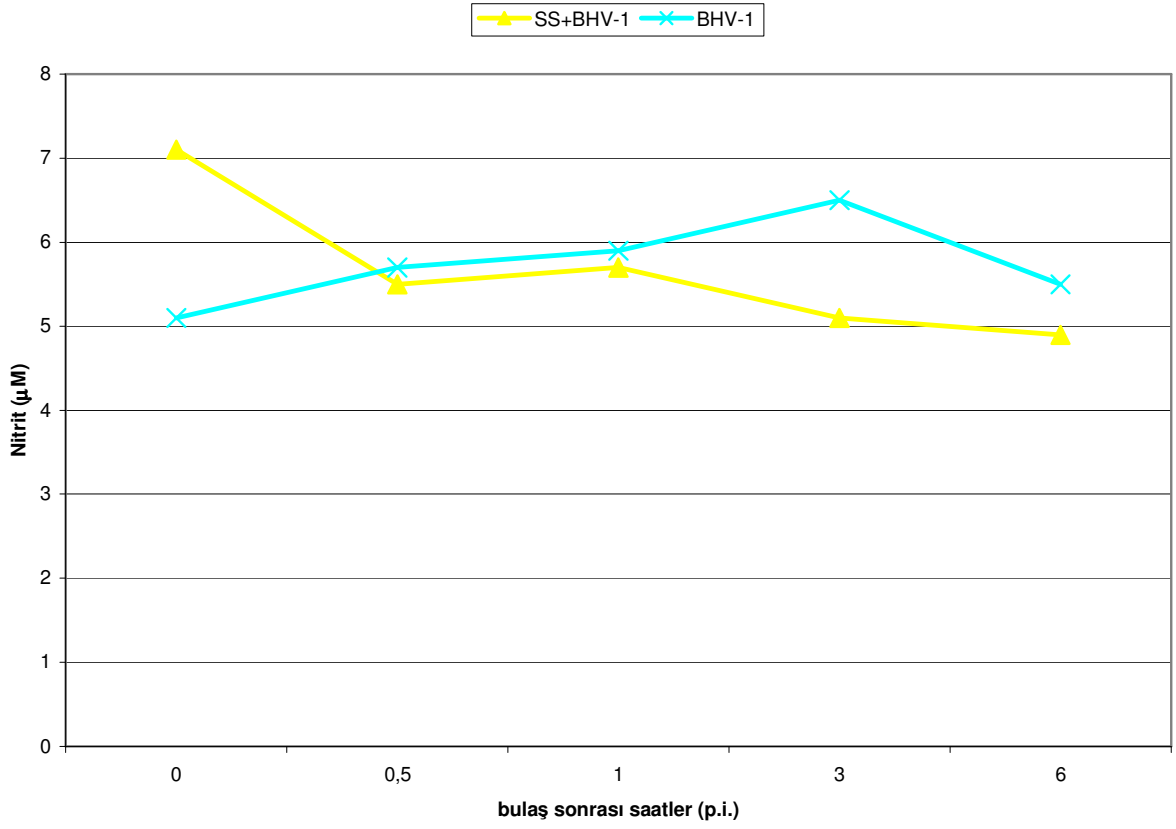
Mikroskobik çalışmalarda belirlenen morfolojik değişimler; SS ile apoptozun uyarıldığı koşullarda, p.i. 0. 5 saatlerinde yüksek olan apoptozun, bulaşın ileri saatlerine azalmakta olduğunu ve SS uyarımı olan ve olmayan koşulda da apoptozun p.i. üçüncü saatlerde engellenmekte olduğunu göstermektedir (Şekil 7).





**Şekil 7.** SS ile uyarılmış MDBK hücrelerinde görülen morfolojik değişimler. A: kontrol hücreleri, B: BHV-1 (-) SS ile 24 saat uyarılmış hücreleri, C: BHV-1 bulaşının 0.5 saatinde olan SS uyarılması olmayan hücreler, D: BHV-1 bulaşının 0.5 saatinde olan SS ile 24 saat uyarılmış hücreleri göstermektedir ( köşeli ok; çekirdek paketlenmesini, ok ucu; mikro çekirdek oluşumunu, yuvarlak ok ucu; kromatin yoğunlaşmasını işaret eder). Fotoğraflar için mikroskopik X20 büyütme (Olympus BHZ-RFCA mikroskobu ) kullanılmıştır.

NO ile apoptoz arasındaki olası ilişkiyi değerlendirmek amacıyla, hücre morfolojisini değerlendirdiğimiz grupların kültür ortamlarında nitrit birikimini ölçtük.



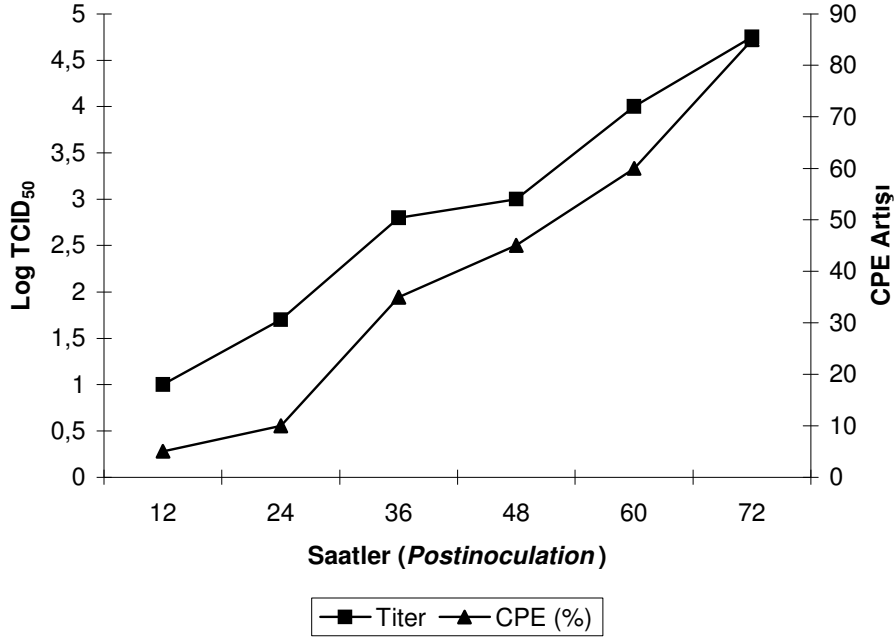
**Şekil 8. MDBK hücrelerinde BHV-1 bulaşının neden olduğu nitrik oksit yanıtları.**

Nitrik oksit ( $\mu\text{M}$  nitrit olarak), MDBK hücrelerinde BHV-1 bulaşının 0.5, 1, 3, 6 saat sonrasında kültür ortamlarında ölçülmüştür.

BHV-1 etkisi ile oluşan NO yanıtları ile apoptotik etki oranı 0.89; SS ile uyarılan koşullarda 0.92 korrelasyon göstermiştir.

*Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) ile infekte HEp-2 (Human Epithel like-Laryngeal epithelial carcinoma) kanser hücrelerinde görülen etkiler*

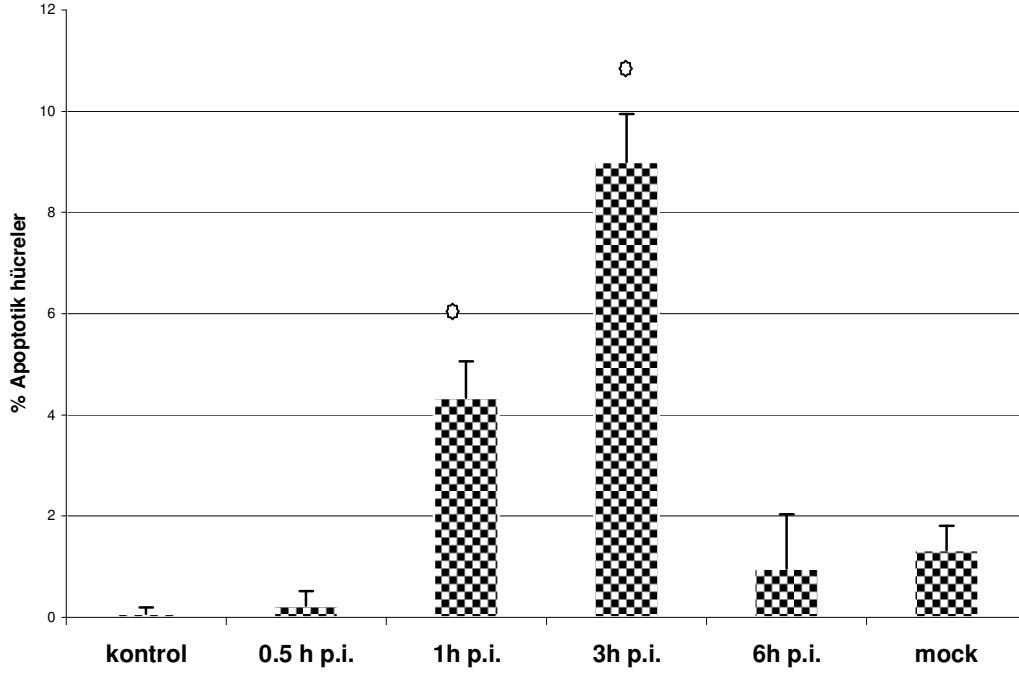
BHV-1, HEp-2 hücrelerinde hızlı bir enfeksiyon yaratır. Bulaşma göstergeleri; yuvarlaklaşma, balonlaşma, sinsidyum oluşumu ile tanımlanan cpe (cyto pathological effects), bulaşmadan sonraki (p.i.) altıncı saatlerde başlar; hücrelerin erimesi ile p.i. üçüncü günde sonlanır. Bulaşma yeteneği, (%50 tissue culture infective dose)  $\text{TCID}_{50} 10^{-4.75} / 0.1 \text{ mL}$  (1:1 m.o.i) olarak 72 saat için hesaplanmıştır (Şekil 9).



**Şekil 9. HEp-2 hücrelerinde BHV-1'in büyüme kinetiği.** Bovine herpesvirus 1 (BHV-1)'in HEp-2 hücrelerindeki büyüme kinetikleri, TCID<sub>50</sub> yöntemi ile ölçülmüş; oluşan hücresel patoloji ve viral yoğunluğun oranı olarak tanımlanmıştır.

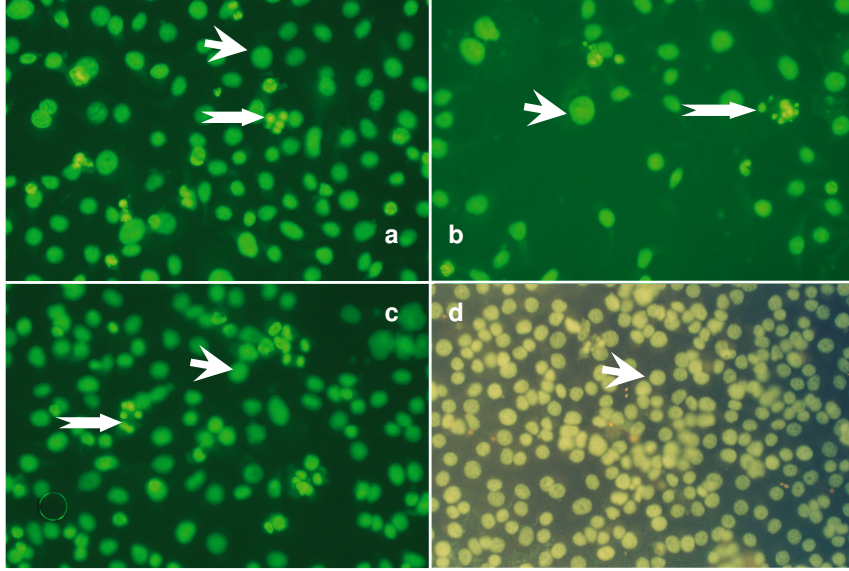
*HEp-2 hücrelerinde BHV-1 bulaşı ile apoptoz, virüs çoğalmasının erken evresinde uyarılır.*

BHV-1 ile bulaşmış hücrelerde, 1 ve 3 saatlik bulaşlarda apoptotik hücreler gözlenmekte ancak mock bulaşlarında kontrol hücrelerinden anlamlı bir fark gözlenmemektedir (Şekil 10).



**Şekil 10. BHV-1 ile HEP-2 hücrelerinde oluşan apoptotik yanıtlar.** BHV-1 (Cooper strain m.o.i. 10) ile bulaşmış tek tabaka HEP-2 hücrelerinde, farklı saatlerde oluşan apoptotik hücre oranları, 1 saatlik mock bulaşı ve BHV-1 bulaşmamış kontrol hücreleri ile birlikte gösterilmiştir. Apoptoz HOE/PI çekirdek boyaması ile fluoresans mikroskopi ile saptanmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak, üç bağımsız deneyin sonuçlarından elde edilmiştir. \* $P < 0.05$  olarak seçilmiştir.

Mock bulaşı olan hücrelerde, kromatin düzgünce boyanırken, BHV-1 bulaşı olan hücrelerde apoptotik morfolojiye özgün kenerlı ve noktalı görünüm baskındır (Şekil 11).



**Şekil 11. BHV-1 bulaşının HEp-2 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimler.** BHV-1 ile bulaşmış HEp-2 hücreleri (a): 0.5, (b): 1, (c): 3 ve (d) : 1 saat mock bulaşı sonrasında görülmektedir. HOE/PI boyaması sonrasında floresans mikroskop ile X40 büyütmede fotoğraflanmıştır. Uzun oklar: apoptotik, kısa oklar normal hücreleri işaret etmektedir.

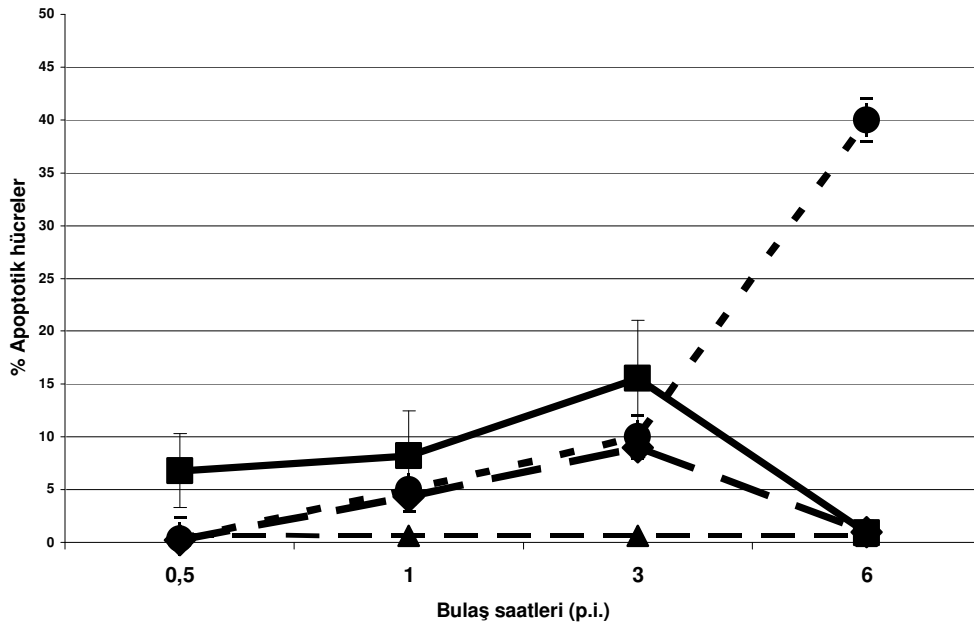
Bir saatlik bulaş sonrasında apoptotik hücreler  $\% 4.33 \pm 0.7$  iken, 3 saatlik bulaş sonrasında artarak  $\% 9.00 \pm 0.9$  olurlar. Kontrol hücrelerinde görülen apoptoz oranı ise  $\% 0.06 \pm 0.1$  olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar BHV-1 bulaşının 1 ve üçüncü saatleri arasında apoptozun açıkça uyarıldığını göstermektedir ( Şekil 10 ve Şekil 11). Altı saatlik bulaş gurubunda hücrelerde görülen apoptotik değişimler azalmaktadır (  $\% 0.96 \pm 1.0$  ).

Diğer yandan, hücreler SS ile uyarıldığında 0. 5, 1 ve 3 p.i. saatlerde apoptotik hücrelerin yüzde oranı, tek başına SS (0.33+0.1, 5.0+0.05, 10.5+0.35 ) ve tek başına BHV-1 bulaşına (0.23 +0.3, 4.33+0.7, 9.0+ 0.1 ) karşın arttığı (6.78+0.3, 8.18+0.4, 15.54+0.55) görülmektedir. HEp-2 hücrelerinde BHV-1 bulaşı ile apoptoz, virüs çoğalmasının erken evresinde sinerjik bir etki ile uyarılmaktadır. Lenfoid hücreler [109] ve nöron hücrelerinde [110] apoptozu uyardığı

gösterilen BHV-1 bulaşının; epitelyal hücrelerde apoptozu, virüs çoğalmasının erken döneminde uyardığı bu çalışma ile gösterilmiştir.

*HEp-2 hücrelerinde BHV-1 bulaşı ile apoptoz, virüs çoğalmasının geç evresinde baskılanır*

HEp-2 hücrelerinde, BHV-1'in apoptotik aktivitesini değerlendirmek amacıyla, Hücreleri apoptotik etkisi bilinen SS ile uyardık. Bir  $\mu\text{M}$  SS ile 24 saat uyarılan hücrelerde yaygın bir apoptoz saptanmıştır (% 97.  $6 \pm 2.05$ ). BHV-1 bulaşı olan HEp-2 hücreleri SS ile uyarıldığında; bulaş sonrası 0.5, 1, 3 ve 6 saatlerde SS ile 24 saat tutulduklarında sırasıyla; %  $0.5 \pm 0.07$ ;  $6.8 \pm 0.34$ ;  $8.2 \pm 0.42$ ;  $15.5 \pm 0.55$ ;  $0.9 \pm 0.12$  oranlarında apoptotik hücre saptanmıştır. Bir saat mock bulaşında %  $1.33 \pm 0.47$  apoptotik hücre bulunmuştur. Bu sonuçlar, BHV-1 bulaşının HEp-2 hücrelerinde, virüs çoğalmasının geç döneminde, p.i. altıncı saatlerde, SS ile uyarılan apoptozu baskıladığını göstermektedir (Şekil 12).

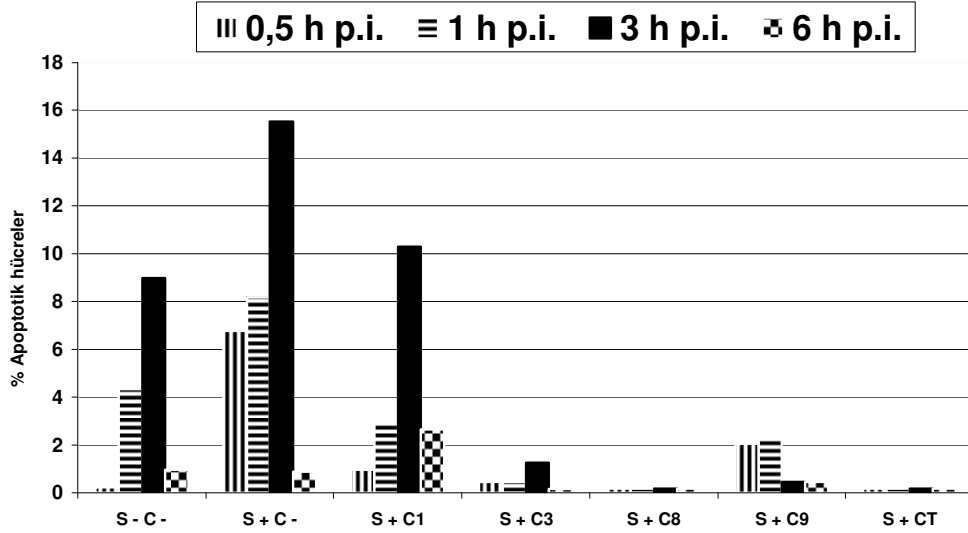


**Şekil 12. BHV-1 bulaşının HEp-2 hücrelerinde oluşturduğu apoptotik etkiler.**

BHV-1 (cooper strain m.o.i. 1) ile bulaşmış HEp-2 hücrelerinde (■) yada mock bulaşı olanlarda (▲) ve 1  $\mu\text{M}$  SS ile uyarılmış (●, ■) yada SS uygulanmamış (▲, ◆) hücrelerde gözlenen apoptoz. HOE/PI çekirdek boyaması ile saptanmıştır. Veriler, bağımsız üç deney sonucunda ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir ( $p < 0.05$ ).

*HEp-2 hücrelerinde BHV-1 ile uyarılan apoptoz üzerine kaspaz baskılayıcı peptidlerin etkileri:*

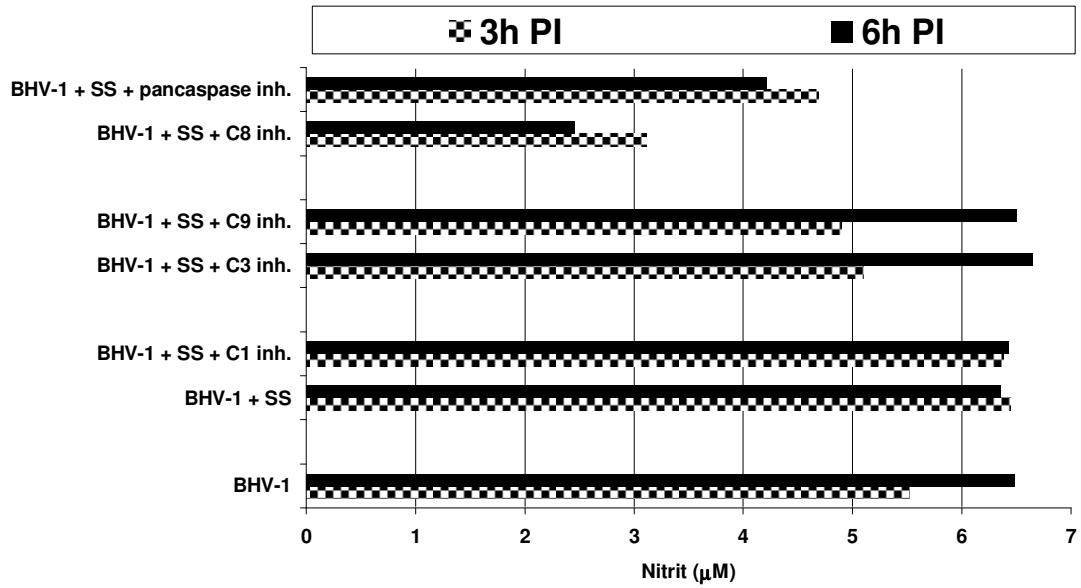
BHV-1 bulaşı öncesinde hücreler, kaspaz 1 baskılayıcı peptid (N-WEHD-FMK), kaspaz 3 baskılayıcı peptid (Z-DEVD-FMK), kaspaz 8 baskılayıcı peptid (IETD-FMK), kaspaz 9 baskılayıcı peptid (LEHD-FMK) ve tüm kaspazları baskılayıcı peptid (Z-VAD-FMK) ile tutulduklarında apoptoz üzerine etkileri değiştirirler. Tüm kaspazları baskılayan peptid, kaspaz 8 baskılayıcı peptid ve kaspaz 9 baskılayıcı peptid, BHV-1 bulaşımının üçüncü saatlerinde görülen apoptozu azaltırlar ( sırasıyla %  $0.17 \pm 0.2$ ;  $0.17 \pm 0.2$  ve  $0.45 \pm 0.1$ ). Kaspaz 3 baskılayıcı peptid ile bulaş sonrası üçüncü saatte (%  $1.25 \pm 0.3$  ), kaspaz 9 baskılayıcı peptid ile yarım (%  $2.05 \pm 0.05$ ) ve birinci saatlerde (%  $2.35 \pm 0.2$ ) apoptoz üzerine kısmi baskılayıcı etki görülmektedir. Kaspaz 1 baskılayıcı peptidin tüm bulaş saatlerinde gözlenen apoptoz üzerine baskılayıcı bir etkisi bulunmamaktadır (%  $0.95 \pm 0.4$ ;  $2.95 \pm 0.4$ ;  $10.3 \pm 0.3$ ;  $2.63 \pm 0.5$ ). Bu bulgular, BHV-1 ile viral çoğalmanın erken döneminde uyarılan apoptozun, kaspaz 1 yolağını kullanmadığını göstermektedir (Şekil 13).



**Şekil 13. BHV-1 ile bulaşmış HEp-2 hücrelerinde kaspaz baskılayıcı peptidlerin etkileri.** Hücreler (1  $\mu$ M) SS varlığında ya da yokluğunda bulaş öncesi (50  $\mu$ M baskılayıcı peptid) Kaspaz 1 baskılayıcı peptid (N-WEHD-FMK); Kaspaz 3 baskılayıcı peptid (Z-DEVD-FMK); Kaspaz 8 baskılayıcı peptid (IETD-FMK); Kaspaz 9 baskılayıcı peptid (LEHD-FMK); ve tüm kaspazları baskılayan peptid (Z-VAD-FMK) ile tutulmuşlardır.

### *BHV-1 ile apoptozun uyarılması ve nitrik oksid yanıtı arasındaki ilişki*

iNOS aktivitesini gösteren nitrit düzeyleri (nitrik oksidin stabil bir ürünüdür) kültür ortamlarından, kolorimetrik bir yöntemle ölçülmüştür. BHV-1 ile bulaşmış hücrelerin NO üretimleri şekil 14'te gösterilmiştir. Hep-2 hücrelerinde BHV-1' in kendisi NO üretimini uyarır. Üçüncü ve altıncı bulaş saatlerinde ölçülen nitrit aralığı  $3.12 \pm 0.02 - 6.65 \pm 0.1 \mu\text{M}$  olmuştur. BHV-1 ile uyarılmış apoptozu baskılayan peptidlerin (tüm kaspaz ve kaspaz 8 baskılayıcı peptidler) varlığında görülen NO yanıtı; viral apoptozu kısmi baskılayan peptidlerin (kaspaz 3 ve 9 baskılayıcı peptidler) varlığında görülen NO yanıtları ve viral apoptoz üzerine etkisiz olan peptid (kaspaz 3 baskılayıcı peptid) ile peptid uygulanmayan grupta ölçülen NO yanıtları; kendi aralarında benzerlik gösterir.



**Şekil 14. HEp-2 hücrelerinde BHV-1 ile oluşan NO yanıtları.** Nitrik oksid yanıtları, nitrit olarak, HEp-2 hücrelerinde BHV-1 bulaşının üçüncü ve altıncı saatlerinde, kaspaz 1, 3, 8, 9 ve tümünü baskılayan peptidlerin ( $50 \mu\text{M}$ ) ön uygulaması sonrasında SS ile ( $1 \mu\text{M}$ ) 24 saatlik apoptoz uyarılması sonrasında ölçülmüştür. Değerler,  $100 \text{ mL}$  kültür ortamında ve üç bağımsız deneyin ortalaması  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Karşılaştırmalar  $p < 0.05$  olarak yapılmıştır.



BHV-1' in neden olduğu apoptozu “tamamen baskılayan peptidler” , p.i. üçüncü saatlerde ( $4.22 \pm 0.08 \mu\text{M}$ ; CT,  $2.45 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ; C8) , altıncı saatlere ( $4.68 \pm 0.06 \mu\text{M}$ ; CT,  $3.12 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ; C8) oranla daha fazla NO üretirler. Bunun tersine, “kısmi baskılayan peptidler” kullanıldığında, bulaş sonrası altıncı saatlerdeki ( $6.5 \pm 0.16 \mu\text{M}$ ; C9,  $6.65 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ; C3) NO yanıtı, üçüncü saatlerden ( $4.9 \pm 0.08 \mu\text{M}$ ; C9,  $5.1 \pm 0.08 \mu\text{M}$ ; C3) fazla olmaktadır.

BHV-1 apoptozu üzerine etkisiz bulunan kaspaz 1 baskılayıcı peptid ile baskılayıcı peptid uygulanmayan grupta üçüncü ve altıncı saatler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( Şekil 14).

*Nöroblastoma sağaltımında yaygın olarak kullanılan ilaçların SHSY5Y ve Kelly hücre hatlarında in vitro hücre ölümü üzerine etkileri*

Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) 2003 nöroblastoma protokolünde yer alan ve bu hastalığın sağaltımında temel olarak kullanılan antikanser ilaçlar etoposide (ETOP), vincristine (VCR), carboplatin (CARBO), doxorubicin (DOXO) ve cisplatinin (CIS) farklı dozları invitro olarak hücre hatlarına uygulanmış ve doz-yanıt eğrileri çizilmiştir. Nöroblastoma hücrelerinin IC<sub>50</sub> dozları Tablo 2' de gösterilmiştir. Bu sonuçlar, SHSY5Y hücrelerinin, NMYC sunumu nedeniyle kötü klinik gidiş beklenen Kelly hücrelerine göre VCR ve CARBO' ya daha az duyarlı olduğunu göstermiştir. Buna karşın SHSY5Y hücreleri DOX, ETOP ve CIS'e karşı daha duyarlı bulunmuştur.

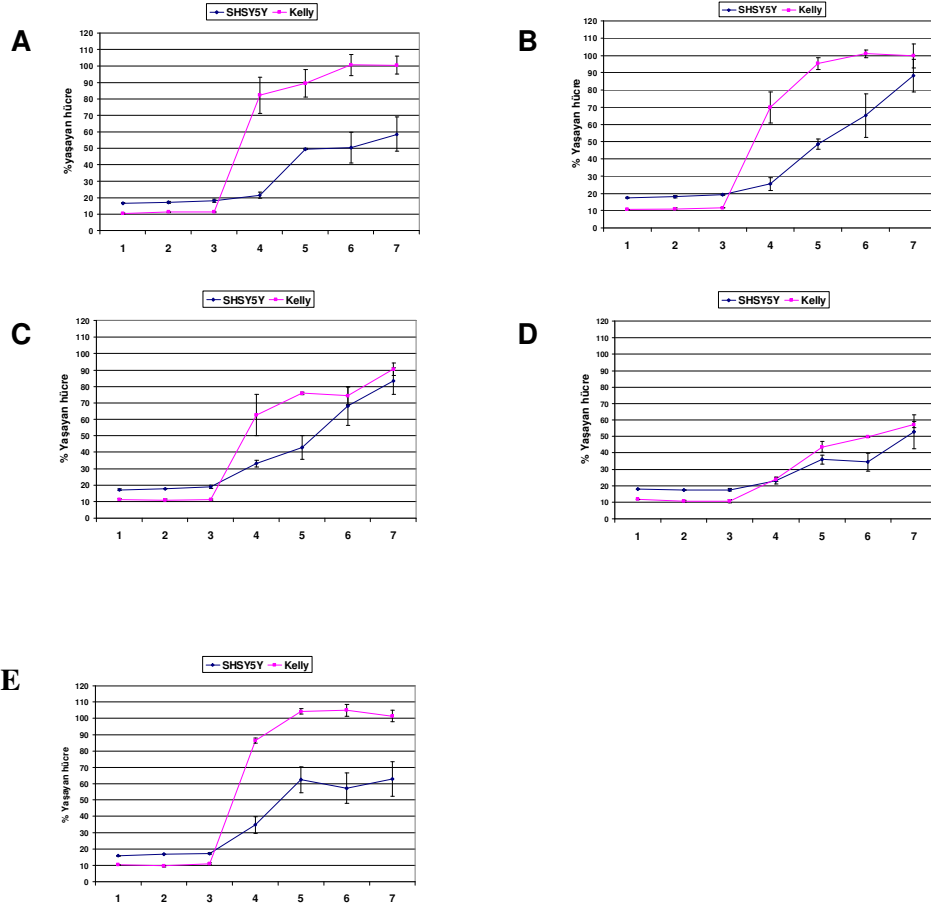
**Tablo 2. Sağaltım bileşenlerinin SHSY5Y ve Kelly hücrelerindeki IC50 dozları.**

Etkenlerin yoğunluğuna karşı yaşıyan hücrelerin yüzdesi (% yaşıyan hücre) olarak grafiklenen her bir değer en az üç ölçüm sonucunda türetilmiştir. Kontrol hücrelerine karşı, hücrel proliferasyonu % 50 durduran etken yoğunluğu (nM) sitotoksik (IC50) dozu olarak kaydedilmiştir.

Sağaltım bileşenlerinin SHSY5Y ve Kelly hücrelerindeki IC <sub>50</sub> dozları		
<i>Etken</i>	<b>Sitotoksik IC<sub>50</sub> dozları (nM)</b>	
	<b>SHSY5Y</b>	<b>Kelly</b>
<i>VCR</i>	1. 62	1. 40
<i>DOXO</i>	27. 58	28. 57
<i>CIS</i>	4160	4600
<i>ETOP (EBEWE)</i>	3900	32000
<i>CARBO</i>	1. 10	0. 77

*Apoptozu Farklı Mekanizmalarla Uyardığı Bilinen Kimyasallarla Etkilenen Nöroblastoma Hücrelerinin Doza Bağlı Yaşayabilirlikleri*

Apoptoz üzerine etki yolları tanımlanmış olan kimyasallar ile oluşturulan doz-yanıt eğrileri Şekil 15' te gösterilmiştir. Antienflamatuvar etkisi bilinen ve glukokortikoid reseptörlerini etkinleştirerek apoptozu yol açan dexamethasone (DEX), Nükleik asid baskılayıcı actinomycin D (ACD), topoizomeraz I baskılayıcı camptothecin (CAMP), protein sentez baskılayıcı cycloheximide (CYH), topoizomeraz II baskılayıcı etoposide (ETOP); uygulanan SHSY5Y ve Kelly hücrelerinin doza bağlı olarak artan hücre ölüm yanıtları olmuştur.



**Şekil 15. Apoptozu uyaran kimyasalların SHSY5Y ve Kelly hücrelerinde gösterdikleri *in vitro* sitotoksik etkiler.** Sitotoksik etkinin ölçülmesinde, 96 gözlü kültür tabaklarında bir yoğunluk eğim şeması oluşturuldu. Hücreler temel besleyici ortam ile  $1 \times 10^5$  hücre  $\text{ml}^{-1}$  olarak hazırlandı ve her göze  $1 \times 10^4$  hücre  $\text{göz}^{-1}$  olarak ekildi. Hücreler etkenleri içeren besleyici ortamda 24 saat tutuldu. A) ETOP doz yanıtları için  $400\text{--}0.55 \mu\text{M}$  yoğunluk aralığı kullanılmıştır. B) CAMP doz yanıtları için  $20\text{--}0.03 \mu\text{M}$  yoğunluk aralığı kullanılmıştır. C) CYH doz yanıtları için  $1000\text{--}1.4 \mu\text{M}$  yoğunluk aralığı kullanılmıştır. D) ACD doz yanıtları için  $100\text{--}0.14 \mu\text{M}$  yoğunluk aralığı kullanılmıştır E) DEX doz yanıtları için  $100\text{--}0.14 \mu\text{M}$  yoğunluk aralığı kullanılmıştır ve kontrol hücreleri % 5 temel besleyici ortamda tutulmuştur. Hücrelerin yaşayabilirliği yöntemlerde tanımlanan MTT test ile ölçülmüştür.

MTT testi için kullanılan her değer bağımsız üç farklı deneyde ve en az üç gözde yinelenerek elde edilmiştir. Tüm veriler, ortalama  $\pm$  Standart sapma olarak verilmiş, kontrol hücreleri ile karşılaştırma için güven aralığı \*  $p < .05$  olarak seçilmiştir.

Yüksek doz etkilerinde göze çarpan önemli bir özellikte SHSY5Y ile Kelly arasındaki duyarlılık farkının belirli bir dozdan sonra tersine değişmesi olmuştur. ETOP için 44  $\mu\text{M}$ , CAMP için 2. 2  $\mu\text{M}$ , CYH için 111  $\mu\text{M}$ , ACD için 3. 7  $\mu\text{M}$  ve DEX için 11. 1  $\mu\text{M}$  ve daha yüksek yoğunluklarda SHSY5Y hücreleri, Kelly hücrelerinden hücreölüme daha dirençli ve bu değerlerden daha düşük dozlarda tersine SHSY5Y hücreleri Kelly hücrelerinden daha duyarlı görülmektedir. Bu literatürdeki ve bizim çalışmamızdaki apoptotik yanıt dozlarında da gözlediğimiz bir olgudur. Nöroblastoma hücrelerinin  $\text{IC}_{50}$  dozları Tablo 3' de gösterilmiştir.

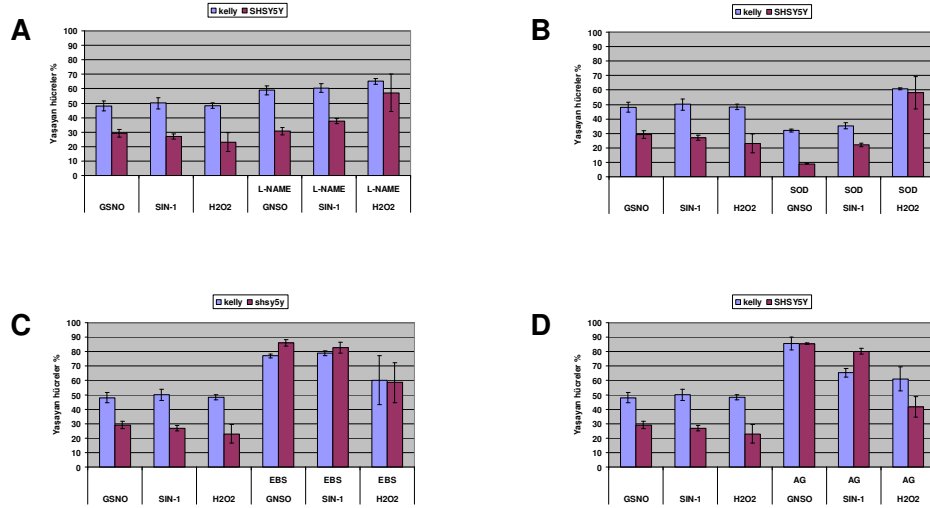
**Tablo 3. Apoptotik kimyasal bileşenlerin SHSY5Y ve Kelly hücrelerindeki  $\text{IC}_{50}$  dozları.** Etkenlerin yoğunluğuna karşı yaşayan hücrelerin yüzdesi (% yaşayan hücre) olarak grafiklenen her bir değer en az üç ölçüm sonucunda türetilmiştir. Kontrol hücrelerine karşı, hücreölüme % 50 durduran etken yoğunluğu ( $\mu\text{M}$ ) sitotoksik ( $\text{IC}_{50}$ ) dozu olarak kaydedilmiştir.

Apoptotik kimyasal bileşenlerin SHSY5Y ve Kelly hücrelerindeki $\text{IC}_{50}$ dozları		
Etken	Sitotoksik $\text{IC}_{50}$ dozları (nM)	
	SHSY5Y	Kelly
DEX	0. 97	2. 11
ETOP	4. 9	29. 4
CAMP	0. 25	0. 53
CYH	2. 90	9. 68
ACD	0. 13	0. 40

*Nöroblastoma hücreleri üzerine mikroçevre bileşenlerinin in vitro etkisi ortamda baskın olan serbest radikal cinsine göre değişir*

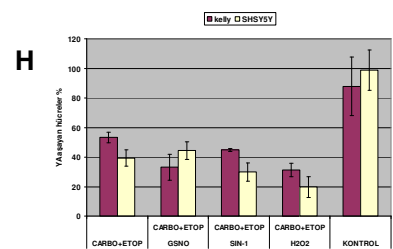
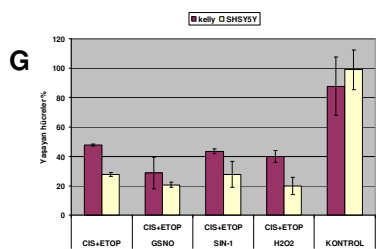
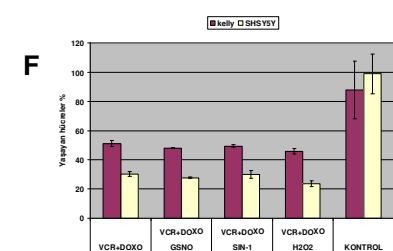
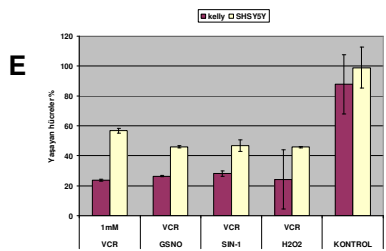
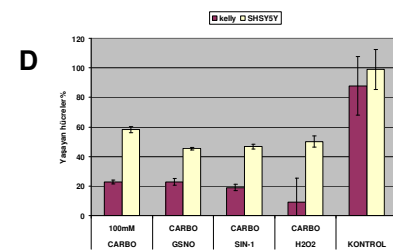
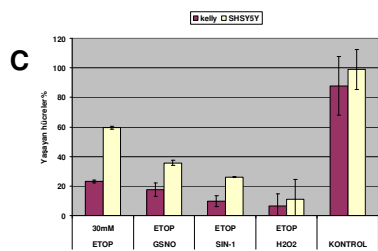
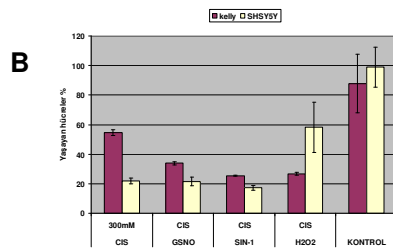
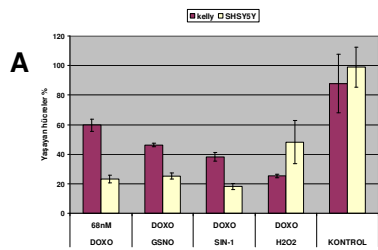
Mikroçevre bileşenlerinin hücre ölümü üzerine etkilerini gözlemlemek üzere, ekzojen NO donörü **S-Nitroso-L-Glutathione (GSNO)**, peroxyinitrit donörü **SIN-1 . hydrochloride (SIN-1)**, ağırlıklı olarak süperoksit ve hidroksil radikali sağlayarak ortamı ROS açısından zenginleştiren **Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** kullanıldı. Radikal sağlayıcılar SHSY5Y hücrelerinde daha belirgin olarak hücre ölümünü arttırdı.

Ancak ortamdan özgün olarak belirli bir radikalın alınması, bu ölüm oranlarını farklılaştırdı. Peroksinitrit çöpçüsü olarak bilinen ebselen (Eb), ekzojen kaynaklı NO'in ve peroksinitrit radikalinin neden olduğu hücre ölümlerinden en fazla korumuştur. iNOS baskılayıcı aminoguanidine (AG), ekzojen kaynaklı NO'in neden olduğu hücre ölümünde en fazla koruyucu etki göstermiştir. Süperoksit radikal çöpçüsü superoxide dismutase (SOD), en fazla koruyucu etkiyi, ortamı süperoksit ve hidrojen radikalleri ile ROS açısından zengin olan grupta göstermiştir. Endojen NO oluşumunu engelleyen N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine-methyl ester.HCl (L-NAME), radikal sağlayıcılar üzerine benzer etki göstermiştir (Şekil 16).



**Şekil 16. Nöroblastoma hücreleri üzerine mikroçevre bileşenlerinin in vitro etkisi.**

Kelly (□) ve SHSY5Y (□) hücreleri, GSNO (2mM), SIN-1 (0.5mM) ve H2O2 (1mM) ile birlikte yöntemlerde açıklandığı gibi, radikal çöpcüler ve baskılayıcılarıyla eş zamanlı olarak A) L-NAME (0.5mM); B) SOD (100U/mL); C) EBS (4µM) ve D) AG (0.1mM) içeren besleyici ortamlarda, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> koşullarında, 24 saat tutulmuş ve yaşayan hücreler XTT yöntemi ile saptanmıştır. Kontrol hücreleri yalnızca %5 DMEM besleyici ortamında tutulmuştur. Tüm veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiş, kontrol hücreleri ile karşılaştırma için güven aralığı \*  $p < .05$  olarak seçilmiştir.



**Şekil 17. Mikroçevrede yer alan radikallerin sağaltım süreçlerine etkileri.** Kelly (□) ve SHSY5Y (□) hücreleri, GSNO (2mM), SIN-1 (0.5mM) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) ile birlikte eş zamanlı olarak yöntemlerde açıklandığı gibi, TPOG-NBL 2003 protokolünde yer alan, A) Doxorubicin (DOXO) [68nM]; B) Cisplatin (CIS) [300µM]; C) Etoposide (ETOP) [30µM]; D) Carboplatin (CARBO) [100µM]; E) Vincristine (VCR) [1µM]; F) Vincristine ve Doxorubicin ((VCR) [30nM] ve DOXO) [3.5nM]); G) Cisplatin ve Etoposide ((CIS) [160µM] ve (ETOP) [17.2µM]); H) Carboplatin ve Etoposide ((CARBO) [16nM] ve (ETOP) [17.2µM]); içeren besleyici ortamlarda, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> koşullarında, 24 saat tutulmuş ve yaşayan hücreler XTT yöntemi ile saptanmıştır. Kontrol hücreleri yalnızca %5 DMEM besleyici ortamında tutulmuştur. Tüm veriler, ortalama ± Standart sapma olarak verilmiş, kontrol hücreleri ile karşılaştırma için güven aralığı \*  $p < .05$  olarak seçilmiştir.

*Mikroçevre buluna radikaller, TPOG sağaltım protokolünde yer alan ilaçların hücre ölümü üzerine olan etkilerini değiştirirler*

TPOG-NBL 2003 protokolünde yer alan, Vincristine (VCR), Etoposide (ETOP), Cisplatin (CIS), Doxorubicin (DOXO), Carboplatin (CARBO), Vincristine ve Doxorubicin, Cisplatin ve Etoposide, Carboplatin ve Etoposide birlikte kullanılarak *in vitro* sağaltım modeli oluşturuldu (Blok tanımları için bkz Ek.4).

*In vitro* sağaltım modelinde, uygulanan ilaç dozlarında, SHSY5Y hücreleri; DOXO, CIS ve blok rejim uygulamalarında, Kelly hücrelerine göre hücre ölümüne daha duyarlı iken; ETOP, CARBO ve VCR uygulamalarında daha az duyarlılık göstermiştir (Şekil 17).

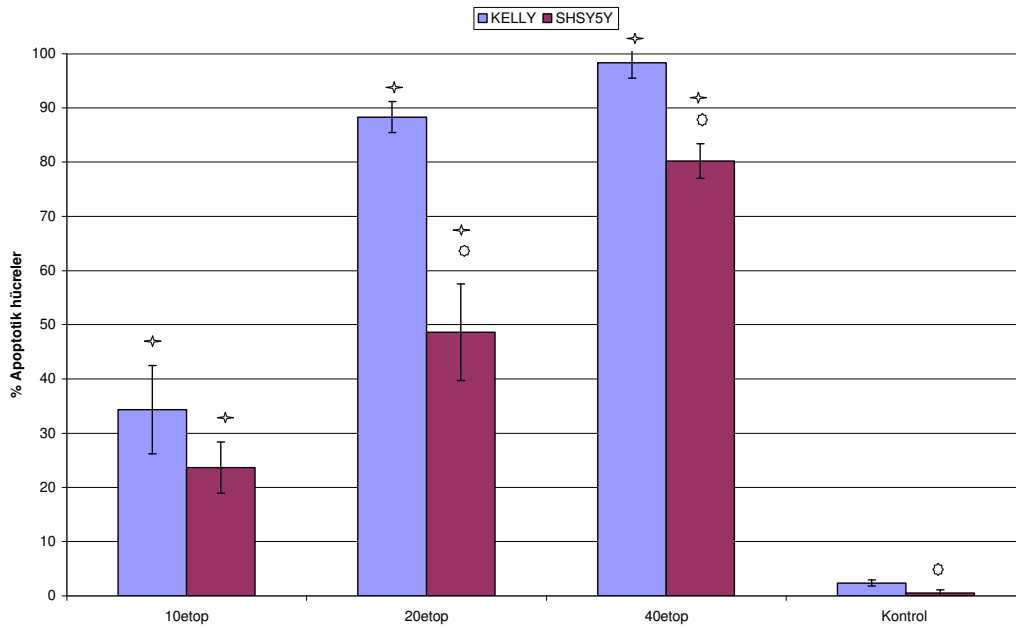
SHSY5Y hücreleri; ekzojen NO (GSNO), peroksinitrit (SIN-1) radikalinin baskın olduğu mikroçevrede, DOXO, CIS, ETOP sağaltım modellerinde anlamlı olarak daha fazla ölmüştür. Süperoksit ve hidroksil radikalleri (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bu hücrelerde, DOXO ve CIS'in etkilerine karşı koruyucu olmuş ve anlamlı olarak daha az hücre ölmüştür. CARBO, VCR ve VCR+DOXO uygulamaları, mikroçevredeki radikallerden anlamlı olarak farklılık yaratacak şekilde etkilenmemiştir. CARBO+ETOP uygulamasında, peroksinitrit ve süperoksit; CIS+ETOP uygulamasında ekzojen NO ve süperoksit hücre ölümünü arttırmışlardır.



Kelly hücreleri; ekzojen NO (GSNO), peroksinitrit (SIN-1) ve süperoksit ve hidroksil radikalleri (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) radikalinin baskın olduğu mikroçevrede, DOXO, CIS, ETOP sağaltım modellerinde anlamlı olarak daha fazla ölmüştür. CARBO uygulamasında, ekzojen NO anlamlı bir fark yaratmazken, diğer radikaller hücre ölümünü arttırmıştır. VCR ve VCR +DOXO uygulamaları, radikallerden etkilenmemiştir. CIS+ETOP uygulaması, ekzojen NO ile birlikte daha fazla hücre ölümüne neden olurken; CARBO+ETOP uygulamasında hem ekzojen NO hem de süperoksit hücre ölümünü arttırmıştır (Şekil17).

*Etoposide'in SHSY5Y ve Kelly hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi farklıdır*

SHSY5Y ve Kelly hücrelerinde anti-kanser bir ajan olan etoposide (ETOP), apoptotik temelli bir sağaltım yaklaşımına model oluşturmak üzere kullanılmıştır. Doza bağlı olarak artan apoptoz, her iki hücre gurubunda da kontrol hücrelerinden anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Etoposide, Kelly hücrelerinde, 20 ve 40 µg/mL yoğunluklarda SHSY5Y hücrelerine göre anlamlı olarak daha fazla apoptoza neden olmaktadır (Şekil 18).



**Şekil 18. Nöroblastoma hücrelerinde etoposide'in apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi.** Kelly (□) ve SHSY5Y (□) hücreleri 10, 20 ve 40 µg/mL etoposide içeren besleyici ortamlarda, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> koşullarında, 24 saat tutulmuş ve hücre ölümü Hoechst

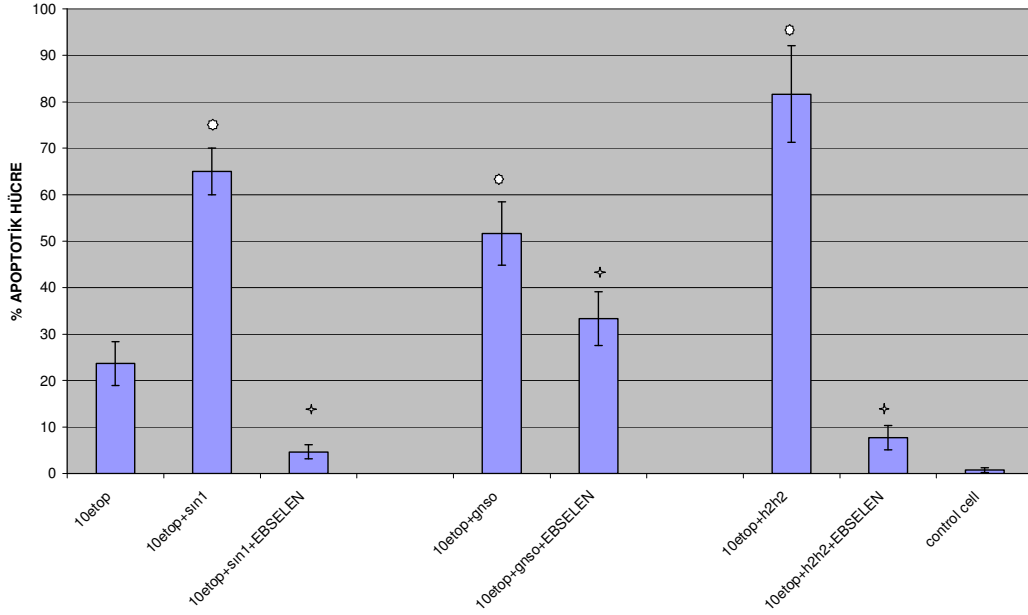
33342/propidium iodide çekirdek boyaması ile değerlendirilmiştir. Kontrol hücreleri yalnızca %5 DMEM besleyici ortamında tutulmuştur. Test, üç bağımsız deney ortamında, her biri dört yada sekiz kez yinelenerek gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama±Standart sapma olarak verilmiş ve karşılaştırmalar kontrole karşı (♦) ve hücreler arasında (\*)  $p < .05$  olarak değerlendirilmiştir.

*Etoposide'in neden olduğu apoptotik hücre ölümü kanser hücresinin mikroçevresinde bulunan serbest radikallerden farklı etkilenir*

Etoposid (10µg/mL) uygulanan SHSY5Y hücrelerinde gözlenen apoptotik hücre ölümü, ortamda peroksinitrit bulunduğunda 2. 74 kat; ekzojen NO bulunduğunda 2. 18 kat; ROS baskın bir ortamda 3. 45 kat artmaktadır. Bilinen bir peroksinitrit çöpçüsü olan ebselen ile ortamdan yalnızca peroksinitrit uzaklaştırıldığında apoptotik ölüm; SIN-1 gurubunda 13. 9 kat; GNSO gurubunda 1. 54 kat; H2O2 gurubunda 10. 54 kat azalmaktadır (Şekil 19). SHSY5Y hücrelerinde H2O2 ile peroksinitritin uyarıldığı, etoposide sağaltımı sırasında da peroksinitrit oluştuğu dolaylı olarak gösterilmiştir. Bu veriler, daha ileri çalışmaları hak eder görünmektedir.

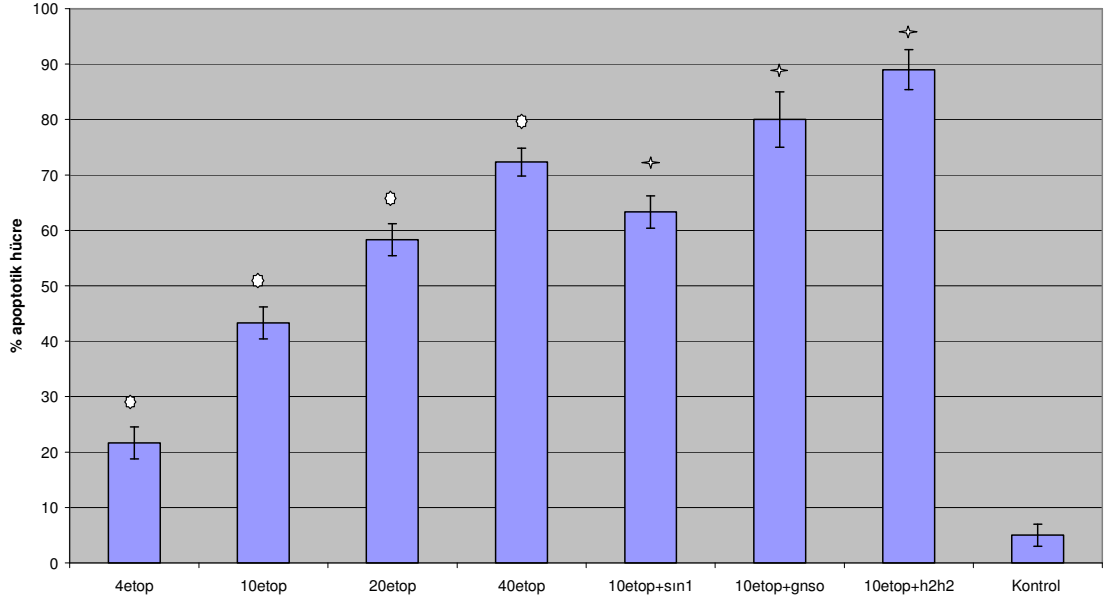
*Etoposide'in neden olduğu apoptotik hücre ölümünü erken döneminde kanser hücresinin mikroçevresinde bulunan serbest radikallerden etkilenir*

SHSY5Y hücrelerinde Annexin V" işaretlemesi kullanılarak tek hücre düzeyinde apoptozun erken dönemi değerlendirildiğinde, etoposide'in doza bağlı olarak apoptozu arttırdığı gözlenmiştir. Etoposide'in neden olduğu apoptoz, mikroçevrede serbest radikallerden peroksinitrit varlığında 1. 46 kat; ekzojen NO varlığında 1. 85 kat; süperoksid varlığında 2. 05 kat artmıştır (Şekil 20).



**Şekil 19. Etoposide kaynaklı apoptotik hücre ölümü üzerine farklı serbest radikallerin etkileri.** SHSY5Y (□) hücreleri, GSNO (2mM), SIN-1 (0.5mM) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) ve, peroksinitrit radikal çöpcüsü ebselen (20µM) ile eş zamanlı olarak etoposide (10µg/mL) içeren besleyici ortamlarda, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> koşullarında, 24 saat tutulmuş ve hücre ölümü Hoechst 33342/propidium iodide çekirdek boyaması ile değerlendirilmiştir. Kontrol hücreleri yalnızca %5 DMEM besleyici ortamında tutulmuştur. Tüm veriler, ortalama  $\pm$  Standart sapma olarak verilmiş, radikal uyarımı için karşılaştırma (\*) ve baskılanma için karşılaştırma (♦)  $p < .05$  olarak değerlendirilmiştir.

#### ANNEXİN V APOPTOZ

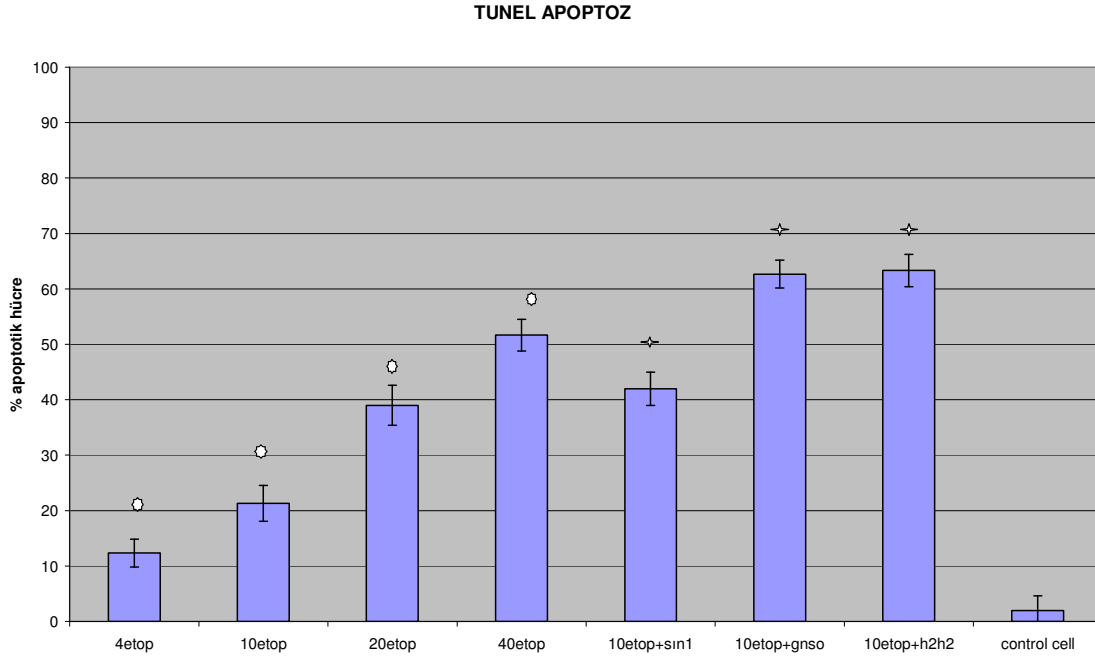


**Şekil 20. Etoposide ve serbest radikallerin apoptozun erken döneminde görülen etkileri.** SHSY5Y(□) hücreleri, GSNO (2mM), SIN-1 (0.5mM) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) ile eş zamanlı olarak etoposide (10µg/mL) ve artan dozlarını (20, 40 µg/mL) içeren besleyici ortamlarda, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> koşullarında, 24 saat tutulmuş ve hücre ölümü Annexin V” işaretlemesi kullanılarak floresans mikroskopide değerlendirilmiştir. Kontrol hücreleri yalnızca %5 DMEM besleyici ortamında tutulmuştur. Tüm veriler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiş, karşılaştırmalar kontrole (\*) karşı ve radikal etkisi için 10µg/mL ETOP içeren hücelere karşı (◆)  $p < .05$  olarak değerlendirilmiştir.

*Etoposide'in neden olduğu apoptotik hücre ölümünü geç döneminde kanser hücrelerinin mikroçevresinde bulunan serbest radikallerden etkilenir*

SHSY5Y hücrelerinde apoptozun geç dönemi “in situ TdT-mediated dUTP nick end labeling technique” (TUNEL) tekniğine dayanarak, tek bir hücre düzeyinde ve floresan mikroskop ile immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde, etoposide'in doza bağlı olarak apoptozu arttırdığı gözlenmiştir. Etoposide'in neden olduğu apoptoz, mikroçevrede

serbest radikallerden peroksinitrit varlığında 1. 97 kat; ekzojen NO varlığında 2. 92 kat; süperoksit varlığında 2. 96 kat artmıştır (Şekil 21).

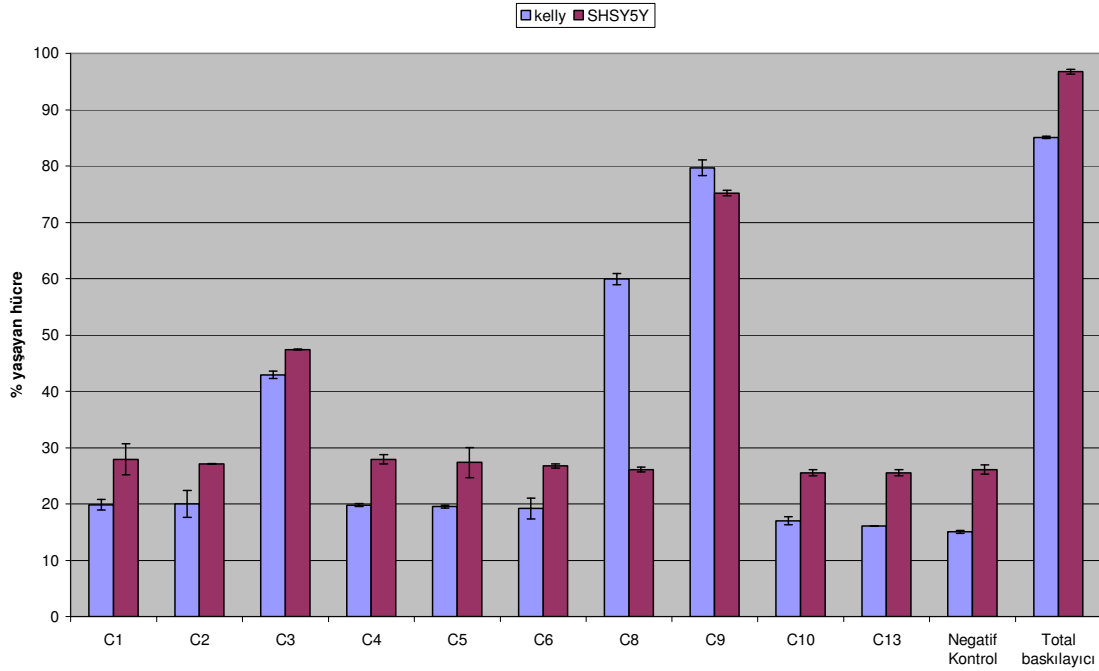


**Şekil 21. Etoposide ve serbest radikallerin apoptozun geç döneminde görülen etkileri.** SHSY5Y(□) hücreleri, GSNO (2mM), SIN-1 (0. 5mM) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) ile eş zamanlı olarak etoposide (10µg/mL) ve artan dozlarını ( 20, 40 µg/mL) içeren besleyici ortamlarda, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> koşullarında, 24 saat tutulmuş ve apoptozun geç dönemi “in situ TdT-mediated dUTP nick end labeling technique” (TUNEL) tekniğine dayanarak, tek bir hücre düzeyinde ve floresan mikroskop ile immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Kontrol hücreleri yalnızca %5 DMEM besleyici ortamında tutulmuştur. Tüm veriler, ortalama ± Standart sapma olarak verilmiş, karşılaştırmalar kontrole (\*) karşı ve radikal etkisi için 10µg/mL ETOP içeren hücelere karşı (◆)  $p < .05$  olarak değerlendirilmiştir.

Apoptotik hücre ölümünün benzer deney şartlarında erken dönemde, geç döneme göre daha fazla olması dikkat çekicidir. Bu nokta daha ileri çalışmaları hak etmektedir.

## Nöroblastoma hücrelerinde etoposide ile uyarılan apoptoz üzerine kaspaz baskılayıcı peptidlerin etkileri

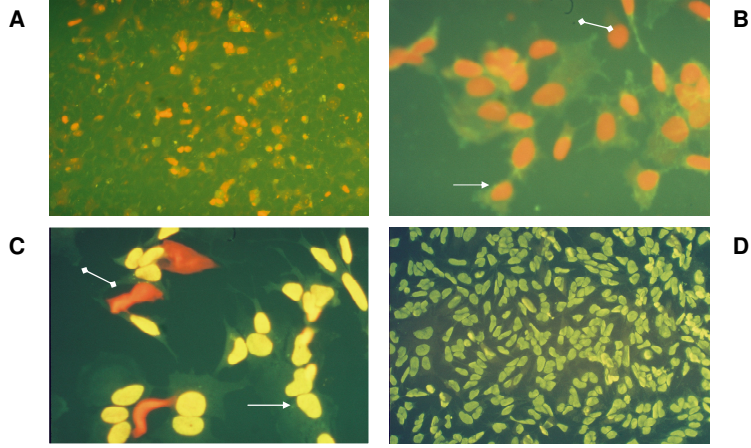
Etoposide ile uyarılmadan önce hücreler, Caspase-1 Inhibitor, Z-YVAD-FMK; Caspase-2 Inhibitor, Z-VDVAD-FMK; Caspase-3 Inhibitor, Z-DEVD-FMK; Caspase-4 Inhibitor, Z-LEVD-FMK; Caspase-5 Inhibitor, Z-WEHD-FMK; Caspase-6 Inhibitor, Z-VEID-FMK; Caspase-8 Inhibitor, Z-IETD-FMK; Caspase-9 Inhibitor, Z-LEHD-FMK; Caspase-10 Inhibitor, Z-AEVD-FMK; Caspase-13 Inhibitor, Z-LEED-FMK; Caspase-Family Inhibitor, Z-VAD-FMK; FMK Negatif Kontrol, Z-FA-FMK; ile korunduğunda apoptoz üzerine etkileri değiştirirler. Etoposide'in neden olduğu apoptozun (% 25. 79 ± 0. 45 yaşayan hücre), SHSY5Y hücrelerinde ağırlıklı olarak kaspaz 9 (% 75. 21 ± 0. 52 yaşayan hücre) ve kısmen kaspaz 3 (% 47. 42 ± 0. 17 yaşayan hücre) yolağını kullandığı; Kelly hücrelerinde ise kaspaz 9 (% 79. 67 ± 1. 30 yaşayan hücre) ve kaspaz 8 (% 59. 93 ± 1. 01 yaşayan hücre) yolağının birlikte etkilendiği, kısmen kaspaz 3 (% 42. 92 ± 0. 64 yaşayan hücre) yolağının etkili olduğu söylenebilir.



**Şekil 22. Nöroblastoma hücrelerinde etoposide kaynaklı apoptotik ölümün kaspaz yolağı ile olan etkileşimi.** SHSY5Y ve Kelly hücreleri  $10^5$  hücre /mL yoğunlukta 96 gözlü plaklara dağıtılmıştır. Etoposide (20 $\mu$ M) uygulanmadan önce, hücelere 2 saat son yoğunlukları her biri için 50  $\mu$ M olacak şekilde kaspaz inhibitörleri uygulanmıştır. Kùltürler 37°C' de % 5 CO2' de 24 saat tutulmuştur. Hücrelerin yaşayabilirliğı yöntemlerde tanımlanan XTT test ile ölçülmüştür. XTT testi için kullanılan her değer bağımsız üç farklı deneyde ve en az üç gözde yinelenerek elde edilmiştir. Tüm veriler, ortalama  $\pm$  Standart sapma olarak verilmiş, kontrol hücreleri ile karşılaştırma için güven aralığı \*  $p < .05$  olarak seçilmiştir.

*Etoposide'in neden olduğu apoptozun morfolojik özellikleri*

Apoptozun erken döneminde plazma zarındaki değişikliklerdinden biri, plazma zarının iç bölümünden dışına fosfatidilserinin (FS) translokasyonudur. Böylece FS, hücrenin dış yüzeyinde sergilenir hale gelir ve dış yüzeyinde yeşil floresans verirler (Şekil 23-B). Apoptoza girmeyen hücreler yalnızca ikinci boyama ile belirlenir ve PI nedeniyle kırmızı floresans verirler (Şekil 23-A). Apoptoz ile uyarılmış hücrelerde, kırılan DNA dizilerine işaretli nükleotidlerin in situ yerleştirilmesi sonucu yeşil floresans verirler (Şekil23-D). Apoptoza girmeyen hücreler için ikinci bir boyama PI ile yapılmıştır ve kırmızı floresans verirler (Şekil 23-C).



**Şekil 23. Nöroblastoma hücrelerinde Etoposide'in neden olduğu apoptozun morfolojik özellikleri.** 10  $\mu$ M etoposide ile uyarılan nöroblastoma hücreleri 4 saat sonra Annexin V ile boyanmışlar ve 24 saat sonra TUNEL yöntemi ile değerlendirilmiştir. Beyaz ok apoptotik; köşeli ok normal hücreleri sergiler. A) kontrol, B) Annexin V ve PI ile boyalı etkilenmiş hücreler, C) TUNEL ve PI ile boyanmış etkilenmiş hücreler, D) Yalnızca TUNEL ile boyanmış etkilenmiş hücreleri göstermektedir.



## **TARTIŞMA**

Servikal karsinoma hücre hattında mikroçevre değişikliğine yanıtın araştırıldığı deneylerde, L-Arg (endojen NO donörü), doza bağımlı olarak, apoptotik yolağı uyarmıştır. Ortamda süperoksid bulunduğu durumlarda, NO uyarıldığında, hücresele ölüm sinerjik olarak artmıştır. Endojen NO uyarımı ile oluşan hücresele ölüm apoptotik ölümken, süperoksid ve NO'in birlikte bulunduğu durumlarda baskın olan ölüm şekli nekrotik ölüm olmuştur. Bu sonuçlar, NO'in hücresele ölüm şeklini (ortamda baskın olan radikale bağılı olarak) yönlendirmede temel bir rol oynadığını göstermiştir.

Bilimsel kaynaklarda, insan meme hücre hatlarında, redoks homeostazı değiştiğinde, nekrotik hücre ölümünün arttığı [111], yoğunluk ve hücresele içeriğe bağılı olarak örneğin ROS üretimi [112], süperoksid anyon oluşumu ya da glutatyon tükenmesinin hücreleri NO ile yönlendirilmiş apoptoza duyarlı kılabilceğı [113] bildirilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, NO donörü L-Arg ile yönlendirilmiş hücresele ölümün, apoptotik özellik olduğunu, bunun doza bağımlı bir şekilde arttığını göstermiştir.

Staurosporin ile uyarılan apoptotik hücre ölümünde, endojen NO ile sinerjik artışı ve NOS baskılayıcı ile NO üretimi durdurulduğunda staurosporin etkisinde görülen azalma, staurosporinin neden olduğu apoptotik hücre ölümünde NO yolağının etkili olduğunu göstermiştir. İnsan serviks karsinom hücre dizilerinde, apoptotik temelli sağaltım süreci, ortam NO miktarına göre farklılaşmıştır. Roche ve ark., NOS inhibitörlerinin NO ile uyarılmış apoptozun *in vitro* olarak melanom hücrelerinde baskılandığını daha önce bildirmişlerdir [114]. NO donörlerinin, insan servikal kanserlerinde iyonize radyasyon uygulamalarında apoptoza duyarlılığı arttırdıkları söylenmiştir [115].

Kültür ortamındaki nitrit artışı, nekrotik hücre ölümleri ile ilişkilendirmiştir. Çok fazla süperoksid ve peroksinitrit oluşabilecek gruplarda nekrotik ölümün artışı peroksinitrit radikalinin hücre ölümü üzerine etkisini daha özgün bir deney sisteminde araştırmamızı gerektirdi. Nöroblastoma gurubunda bu yüzden, peroksinitrit dönör ve çöpçülerini birlikte kullandık. Ortam ROS artışının iNOS sunumunu arttırması [115, 116], yaşamla ilgili süreçlerde NO'in düzenleyici rolünün daha önceki çalışmalarda bildirmesi [117, 118] ve

önceki çalışmalarımızda NO'in çevresel parametrelerin redoks potansiyeline dayalı olarak benzer bir süreci farklı yollara yönlendirebileceğini göstermemiz [119], nitrik oksid kaynaklı radikallerin biyolojik etkilerinin birbirlerinden farklı olabileceğini belirlemiştir.

Kanser sağaltımındaki organ mikroçevresinin düzenlenmesi, NO ile yönlendirilmiş apoptozun yer aldığı yolların daha iyi anlaşılmasına neden olabilecek gelecekteki çalışmalarda klinik olarak uygun olabilir. Çalışmamız, L-Arg ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in HeLa hücrelerinde hücre ölümü sinerjistik olarak arttırdığını ve NO ile uyarılmış apoptotik hücre ölümünün ortamda ROS'un bulunması ile apoptozdan nekroza değiştiğini göstermiştir. Tümör mikroçevresindeki hedeflenmiş NO sunumu, etkili sağaltım için invazif olmayan, gerçekleştirilebilir bir yaklaşım sağlayabilir. Bu, varolan sağaltım stratejilerinde bir gelişmeye neden olabilecek ilerideki çalışmaların önünü açmalıdır.

Birçok virus için, viral çoğalma döngüsünde üç farklı dönem tanımlanmıştır (hemen ilk: immediate early-IE, ilk: early-E, geç: late-L) [120]. Burada virüsün uygun konak hücre alıcıları ile etkileşimden sonra çok hızlı bir penetrasyon ve virus çoğalması gözlenir. Enfekte hücrelerin yüzeyinde viral antijenin görülmesi, enfeksiyon sonrası 3-4 saatte belirginleşir. Döngünün tamamlanması ve hücre dışına yayılım, enfeksiyondan 7-8 saat sonra başlar [121].

Bu farklı dönemler sırasında, virüsler farklı gen ürünleri sunarlar. BHV-1'de ya normal hücre mikroçevrede [122] ya da kanser hücresinde ( Hep-2, epitelyal karsinomadan türetilmiş insan hücre hattı), "E" döneminden "L" dönemine geçiş sırasında sunulan proteinler, staurosporin ile uyarılmış apoptozu bile baskılamaktadırlar. Tersine normal bir hücre mikroçevrede (MDBK) BHV-1 "E" genleri sunulurken apoptoz en fazla uyarılırken, kanser hücrelerinde (Hep-2) "IE" genleri sunulurken apoptoz uyarılmıştır. Hep-2 hücresinde apoptoz, BHV-1 çoğalmasının erken döneminde (3 saat p.i.) en çok uyarılmıştır ve BHV-1 ile enfekte hücrelerdeki morfolojik değişimler enfeksiyon süresi ilerledikçe artmıştır ( 1 saat p.i. % 4.33±0.7 iken; 3 saat p.i.'de % 9.00±0.9 idi). Apoptotik morfolojik ve biyokimyasal özellikler, virüs çoğalmasının erken dönemlerinde de saptanabilir, ancak en fazla p.i. üçüncü saatlerde gözlenmiştir. MDBK hücrelerinde ise apoptoz en fazla p.i. 0. 5 saatlerinde oluşmaktadır. Bu çalışmalar BHV-1'in hücre tipine özgü değişmiş apoptotik yolları da uyurabileceğini göstermiştir. BHV-1 Mock enfeksiyon sonuçları, apoptotik sürecin

uyarılmasında virüsün girişinin yeterli olmadığını gösterdi. Bu sonuç, Hep-2 hücre hattında yapılan Herpes simplex virus 1 (HSV-1) olgusu ile benzerlik göstermektedir [123].

Bir epitel benzeri mikroçevre olarak Hep-2 hücreleri ile BHV-1'in apoptotik ilişkisini saptamada, staurosporin ile uyarılmış apoptoz üzerine BHV-1'in etkisi çalışılmıştır (Şekil 12). Bu sonuçlar BHV-1'in antiapoptotik etkisini göstermiştir.

İlginç olarak sonuçlarımız, enfeksiyondan 6 saat sonra hücreler staurosporin uygulandığında apoptotik morfolojinin gözlenmediğini göstermiştir. Bu sonuç, BHV-1 antiapoptotik genlerinin ve viral çoğalma döngüsündeki erkenden-geçe değişen dönemde sunulan genlerin bir sonucu olarak kabul edilebilir. SS, sitoplazmik ve reseptör tirozin kinazları baskılayabilir [123]. HSV-1'de olduğu gibi [124], enfekte hücrelerde birçok fosforillenmiş BHV-1 proteini olduğu gösterilmiştir [125, 126] ve BHV-1 ile enfekte hücrelerde apoptozu uyarma ya da apoptozdan korunmada viral protein fosforilasyonun rolü olup olmadığını araştırmak ilginç olabilir.

BHV-1 ve SS ile uyarılmış apoptoz, enfeksiyondan sonraki yarım saatten altıncı saate kadar pankaspaz ve kaspaz-8 baskılayıcı peptidlerle tamamen, kaspaz-3 ve kaspaz-9 baskılayıcı peptidlerle kısmen baskılanırken kaspaz-1 baskılayıcı peptitten etkilenmemiştir. Bu sonuçlar BHV-1 apoptozunun kaspaz-8 yolağı ile yani "dış membran reseptör" yolağından oluştuğunu göstermiştir.

Apoptoz sırasında kaspaz etkinleşmesinin önemi literatürde oldukça tartışılmıştır [127]. Birçok kaspaz substratı tanımlanmıştır; bu substratların yıkılması bu işlevi etkisizleştirir ya da programlanmış hücre ölümünü uyarır. Etkinleşmenin kendisi en az iki farklı yolak ile kontrol edilmektedir. Birincisi, kaspaz-8 zinciri ile tetiklenen "dış ölüm reseptörleri yolağı" yolu ile etkinleşmektedir. Bu örnekte proteoliz doğrudan etkinleşir. İkinci yolak, kaspaz-9 zinciri ile "mitokondriyal yolak"tan tetiklenen stres ile etkinleşmektedir. Bu örnekte, proteolitik zinciri etkinleştirecek işaret bcl-2 protein ailesi üyeleri ile mitokondri düzeyinde düzenlenmektedir. Bir kez başlayınca, her iki yolak apoptotik ölümün çoğu görüntüsünden sorumlu olan kaspazları etkinleştirme zincir tepkimeleri ile birleşir (kaspaz-3, 1, 6, 7) [128].

BHV-1 enfeksiyonu kaspaz zincirinin düzenlenmesi ile apoptotik işleyişi yönlendirebilir [129] ve BHV-1 apoptoz ve/ veya hücre yaşamında yer alan genlerin transkripsiyonel düzeydeki düzenlenmesi yolu ile de yönlendirebilir görünmektedir [130].

Çalışmamızda, BHV-1 tek başına ve SS ile birlikte uygulandığında, HEp-2 hücrelerinde NO üretimini uyardı. Kaspaz-8 baskılayıcı peptidin ve SS'in uygulandığı BHV-1 enfeksiyonunda 6 saat sonra NO yanıtları belirgin olarak düşüktü ancak 3 saat sonra belirgin olarak yükseldi. İlginç olarak, NO yanıtları diğer baskılayıcı peptid uygulamalarından göreceli olarak daha yüksekti. Bu sonuçlar, "NO-apoptoz" ilişkisinin, BHV-1 ve SS ile uyarılmış apoptozda kaspaz-8 yolağı üzerinden gerçekleştiğini onaylamıştır. Farklı mikroçevreleri temsil edebilecek invitro modellerde, NO inhibitör ve donörleri kullanarak daha ileri çalışmalar yapılmalıdır. Bu tür modeller viral enfeksiyonların apoptotik yolaktaki NO'nun potansiyel rolünü daha iyi tanımlayabilir. Bizim çalışmamızda nöroblastoma modeli bu bilgiler ışığında yeniden düzenlenmiştir.

Apoptotik zincirin önemli ürünleri olan baskılayıcı peptitler ile kaspazların baskılanması, BHV-1'in normal hücrel bir mikroçevrede ve kanser hücresi mikroçevresinde apoptozun uyarılmasında farklı kaspaz yollarının kullanıldığını gösterdi. Virüs-konak ilişkilerinde önemli bir işaretleme molekülü olan nitrik oksit yanıtları da farklı mikroçevrelerde farklılık gösterdi. BHV-1'in apoptozdaki rolü dört farklı takımın aynı anda oynadığı bir oyuna benzetilebilir: apoptozu uyaran viral olaylar; viral uyarılarla etkinleşen mikroçevreye bağlı hücrel yollar (örn. NO yolağı; apoptozu baskılayan viral gen işlevleri ve apoptozu normal olarak düzenleyen farklı hücrel işlevler. Her takımındaki farklı oyuncuların rolü önemlidir. Bütün bu ilişkiler, her bir katılımcının biyolojik işlevleri hakkında aydınlatıcı ileri çalışmaları hak eder.

Nöroblastoma hücrelerinin, TPOG-NBL 2003 protokolünde olan ve bu hastalığın sağaltımında temel olarak kullanılan ilaçlara farklı duyarlılıkta yanıt vermişlerdir. SHSY5Y hücreleri literatürde Kelly hücrelerine göre daha duyarlı tanımlanmıştır [131]. Bu açıdan VCR ve CARBO' ya daha az duyarlılık göstermesi buna karşın DOX, ETOP ve CIS'e karşı daha duyarlı bulunması özellik göstermiştir. Bu duyarlılığı topoizomerez inhibisyonuna bağlayan yayınlar bulunmaktadır [132]. Apoptotik etkileri bilinen kimyasallarla yaptığımız çalışmada,

etkenlerin yüksek yoğunluklarında SHSY5Y hücrelerinin, Kelly hücrelerinden hücre ölümüne daha dirençli ve bu değerlerden daha düşük dozlarda tersine SHSY5Y hücrelerinin Kelly hücrelerinden daha duyarlı görülmesi, gerçek nedenin doza bağlı bir etkileşim olabileceğini düşündürür.

SHSY5Y hücrelerinde; ekzojen NO (GSNO), peroksinitrit (SIN-1) radikalinin baskın olduğu mikroçevrede, DOXO, CIS, ETOP sağaltım modellerinde, CARBO+ETOP uygulamasında, peroksinitrit ve süperoksit; CIS+ETOP uygulamasında ekzojen NO ve süperoksid hücre ölümünü arttırmışlardır.

Kelly hücrelerinde; ekzojen NO (GSNO), peroksinitrit (SIN-1) ve süperoksit ve hidroksil radikalleri (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) radikalinin baskın olduğu mikroçevrede, DOXO, CIS, ETOP sağaltım modellerinde CARBO peroksinitrit ve süperoksit, CIS+ETOP uygulaması, ekzojen NO ile birlikte, CARBO+ETOP uygulamasında hem ekzojen NO hem de süperoksit hücre ölümünü arttırmıştır (Şekil17).

Sağaltım sürecindeki nöroblastoma hücrelerinde gözlenen apoptotik hücre ölümü, ortamda peroksinitrit bulunduğunda 2.74 kat; ekzojen NO bulunduğunda 2.18 kat; ROS baskın bir ortamda 3.45 kat artmıştır.

Bu sonuçlar, mikroçevrede bulunan serbest radikalın cinsine bağlı olarak sağaltım süreçlerinin etkilendiğini desteklemektedir. Literatürde, HeLa hücrelerinin CIS etkisi altında uyarılan apoptozdan antioksidan etkili bileşiklerin (suramin) kullanılması ile korunduğu bildirilmiştir [133]. Mesane kanser hücrelerinde ise “non steroid anti-inflamatory drugs” NSAID etkisi ile oluşturulan apoptozda, neden olarak bu bileşiğin NO salınımını arttırması gösterilmiştir [134]. Nöroblastoma hücrelerinde sağaltım süreçlerini etkileyen radikal sağlayıcılardan yalnızca dolaylı olarak, fenretinide’in (retinoid analogu) apoptoz üzerine olan etkisini gösteren çalışmada söz edilmiştir. Bu çalışmada retinoidlerin anti kanser ilaçlarla sinerjistik olarak apoptozu uyardığı bildirilmiş, etki mekanizması olarak serbest radikal oluşumu gösterilmiştir [135]. Reaktif oksijen türlerinin değişik hücrelerde, hücre ölümünü, T lenfositlerinde apoptozu arttırdığı; Nitrik oksit bağımlı apoptozun iNOS kaynaklı olabileceği, düşük dozda NO’in endotel hücrelerinde apoptozdan koruyucu etki gösterdiği literatürde

bildirmiştir [136]. Ancak kanser hücrelerindeki rolleri henüz tam anlamıyla tanımlanmamıştır.

NO ile yönlendirilmiş hücre ölüm, tümör ortamındaki birçok etkileşimi de içerecek şekilde karmaşık bir süreç olarak görünmektedir. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin kendi aralarındaki etkileşimleri, hücre mikroiçerisinde karmaşık bir sisteme dayandırılabilir [137]. Bu moleküllerin etkileşimlerinin, HOCl / hidroksil radikalleri ve NO / peroksinitrite dayalı iki temel işaretleşme yolağına ve nitril kloridin alternatif bir başka yolağına bağımlı olduğu bilinmektedir [138, 139]. Ek olarak hücre ölüm sırasında ROS ve RNS etkileşiminin birçok doğal antitümör sisteminde kullanılan genel bir işaretleşme kavramını sergiledikleri görülmektedir [137, 140].

Literatürde, mikroiçerisinde bulunan NO ve ilgili yolları ile ilişkilendirilmemiş; ancak sağaltım süreçlerinde kullanımları sonucu olumlu bulunmuş bazı kimyasallar da tartışılmıştır [141]. Murine nöroblastoma modelinde doğal antitümör sistemlerini uyaran immunoterapi uygulamalarından IL-2 ile birlikte L-Arg kullanılmış, tümör yükünde azalma saptanmıştır. Ancak ne IL-2 ne de L-Arg kullanımı, mikroiçerisinde neden olabilecekleri NO yanıtları ile ilişkilendirilmemiştir.

Mikroiçerisinde bulunan serbest radikal çeşidine göre, nöroblastoma hücrelerinde sağaltımın değişebileceği literatürde henüz tartışılmamıştır. Serbest radikallerin, özellikle peroksinitritin, anti kanser ilaçlarla gösterdiği sinerjik etki, onları nöroblastoma sağaltımında yeni sağaltım arayışları için hedef yapabilir.

Sağaltım süreçlerinde, antrasiklinlerin kardiyotoksik etkileri; cisplatinin ototoksik ve nefrotoksik etkileri tartışılmıştır [142, 143]. Bu toksik yan etkilere, antikanser ilaçların apoptotik etkilerinin neden olabileceği ve buna yönelik yeni sağaltım arayışları gündeme gelmektedir. Demir şelatörlerinin, adriamycinin antikanser etkinliğini azaltmadan, kardiyotoksik etkisini düşürdüğü bildirilmiştir [144]. Desferoksaminin (demir şelatörü), ribonükleotid redüktazı baskılayarak gerçekleştirdiği düşünülen bu etkisi, Haber-Weiss reaksiyonları nedeniyle ortamın oksijen kaynaklı ürünlerine de bağlıdır. Ancak bu yayında da mikroiçerisinde radikal etkisi tartışılmamıştır.

Sağaltım kaynaklı oluşabilecek akut ve geç yan etkilerin nedenleri ve önlemleri konusundaki yeni sağaltım arayışları ve yaklaşımları için de, mikroçevre-serbest radikal ilişkisi önemli bir hedefdir. Ancak literatürde henüz yeterince yer almamıştır.

Tümör mikroçevresindeki radikal kompozisyonunun uygun şekilde kemoterapi ve radyoterapi ile kombine edilmesi, bu sağaltımların etkinliklerinin arttırılması açısından gündeme gelebilir.

## **SONUÇ VE ÖNERİLER**

Servikal karsinoma hücre hattında mikroçevre değişikliğine yanıtın araştırıldığı deneylerde, L-Arg (endojen NO donörü), doza bağımlı olarak, apoptotik yolağı uyarmıştır. Ortamda süperoksid bulunduğu durumlarda, NO uyarıldığında, hücresele ölüm sinerjik olarak artmıştır. Endojen NO uyarımı ile oluşan hücresele ölüm apoptotik ölümken, süperoksid ve NO'in birlikte bulunduğu durumlarda baskın olan ölüm şekli nekrotik ölüm olmuştur. Bu sonuçlar, NO'in hücresele ölüm şeklini (ortamda baskın olan radikale bağılı olarak) yönlendirmede temel bir rol oynadığını göstermiştir.

BHV-1'de ya normal hücresele mikroçevrede ya da kanser hücresinde "E" döneminden "L" dönemine geçiş sırasında sunulan proteinler, staurosporin ile uyarılmış apoptozu bile baskılamaktadırlar. Tersine normal bir hücresele mikroçevrede (MDBK) BHV-1 "E" genleri sunulurken apoptoz en fazla uyarılırken, kanser hücrelerinde (Hep-2) "IE" genleri sunulurken apoptoz uyarılmıştır. BHV-1 apoptozunun kaspaz-8 yolağı ile yani "dış membran reseptör" yolağından oluştuğunu göstermiştir.

SHSY5Y hücrelerinde; ekzojen NO (GSNO), peroksinitrit (SIN-1) radikalinin baskın olduğu mikroçevrede, DOXO, CIS, ETOP sağaltım modellerinde, CARBO+ETOP uygulamasında, peroksinitrit ve süperoksid; CIS+ETOP uygulamasında ekzojen NO ve süperoksid hücre ölümünü arttırmışlardır.

Kelly hücrelerinde; ekzojen NO (GSNO), peroksinitrit (SIN-1) ve süperoksid ve hidroksil (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) radikalinin baskın olduğu mikroçevrede, DOXO, CIS, ETOP sağaltım modellerinde CARBO peroksinitrit ve süperoksid, CIS+ETOP uygulaması, ekzojen NO ile birlikte, CARBO+ETOP uygulamasında hem ekzojen NO hem de süperoksid hücre ölümünü arttırmıştır. Sağaltım sürecindeki nöroblastoma hücrelerinde gözlenen apoptotik hücre ölümü, ortamda peroksinitrit bulunduğu 2.74 kat; ekzojen NO bulunduğu 2.18 kat; ROS baskın bir ortamda 3.45 kat artmıştır.

Bu sonuçlar, mikroçevrede bulunan serbest radikalın cinsine bağılı olarak sağaltım süreçlerinin etkilendiğini desteklemektedir.



Translasyonel çalışmalar için klinikte kullanılan sağaltımların *in vitro* modellerinin oluşturulması çok önemli katkılar sağlayabilir. Bu şekilde bilgiler klinikten laboratuara ve yeniden kliniğe daha etkin dönebilir.

Viral enfeksiyon modelinde, rekombinant virüslerle deney ortamını yineleyerek etkili hedef molekülün (gen/protein) saptanması etki mekanizmasının açıklanması ve sağaltımsal yeni hedeflerin belirlenmesinde katkı sağlayacaktır.

Nöroblastoma sağaltım modelinde, apoptotik yolak, ağırlıklı olarak etoposide temel alınarak çalışılmıştır. Diğer sağaltım rejimlerinin de bu açıdan incelenmesi yararlı olacaktır. Sağaltım rejimleri, mikroçevre temel alınarak yeniden gözden geçirilirse, ilaçların bilinen etkisi dışında serbest radikal oluşumuna katkıları da ortaya konulabilir. Bu veriler, ilaçların daha etkin kullanımını ya da yan etkileri açısından yeniden değerlendirilmelerini sağlayabilir.

## **KAYNAKLAR**

1. Keping Xie and Suyun Huang. Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003; 34 (8): 969–986, Serial Review: Nitric Oxide in Cancer Biology and Treatment Guest Editors: David A. Wink and James B. Mitchell.
2. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with <sup>125</sup>I-5-iodo-2-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst*, 1970; 45: 773–782.
3. Chishima T, Miyagi Y, Wang X, Yamaoka H, Shimada H, Moossa, A R, Hoffman RM. Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res* 1997; 57: 2042–2047.
4. Weiss L. Biomechanical interactions of cancer cells with the microvasculature during hematogenous metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11: 227–235.
5. Weiss L. Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: I–XI, 193–383.
6. Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y. Induction of a common pathway for apoptosis by staurosporine. *Experimental cell research* 1994; 211 (2): 314–321.
7. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456–1462.
8. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 299–306.
9. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:545–551.
10. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96–99.
11. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274: 11549–11556.

12. Saleh A, Srinivasula S M, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 17941–17945.
13. Yang X, Stennicke HR, Wang B, Green DR, Janicke RU, Srinivasan A, Seth P, Salvesen GS, Froelich CJ. Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J Biol Chem* 1998; 273:3 4278–34283.
14. Gores GJ, Herman B, Lemasters JJ. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology* 1990; 11: 690–698.
15. Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin. Sci. (Colch)* 1992; 83: 639–648.
16. Wulf Dröge. Free radical in the physiological control of cell function. *Physiol rev* 2002; 82: 47-95.
17. Chandra J, Samalı A, and Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress, Lars Ernster Commemorative Issue Guest Editors: Enrique Cadenas and Kelvin J. A. Davies *Free Radical Biology & Medicine* 2000; 29 (3/4): 323–333.
18. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin, SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995; 182:367–377.
19. Macho A, Hirsch T, Marzo I, Marchetti P, Dallaporta B, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J Immunol* 1997; 158:4612–4619.
20. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15: 7–10.
21. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 1996; 21:83–86.
22. Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Dröge W, and Schmitz ML. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NFκB. *Oncogene* 1999; 18: 747-757.

23. Wong GH. Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271:205–209.
24. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989;58:79–110.
25. Nathan C, Xi, QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78: 915–918.
26. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 361–374.
27. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem Sci* 1992; 17:399–402.
28. Adams LB, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* 1990; 144: 2725–2729.
29. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989; 169:1543–1555.
30. Stadler J, Schmalix WA, Doehmer J. Inhibition of biotransformation by nitric oxide (NO) overproduction and toxic consequences. *Toxicol Lett* 1995 82–83:215–219.
31. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3030–3034.
32. Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY. Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1995; 270:16487–16490.
33. Dobashi K, Pahan K, Chahal A, Singh I. Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C6 glial cells. *J Neurochem* 1997; 68:1896–1903.
34. Asahi M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, Hori M, Tada M, Fujii S, Taniguchi N. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem* 1995; 270:21035–21039.
35. Bosca L, Hortelano S. Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signal* 1999; 11: 239–244.
36. Nobel CI, Kimland M, Lind B, Orrenius S, Slater AF. Dithiocarbamates induce apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox-active copper. *J Biol Chem* 1995; 270: 26202–26208.

37. Akaike T, Suga M, Maeda H. Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 64-73.
38. Zaki MH, Akta T, and Akaike T. Nitric oxide-induced oxidative stress involved in microbial pathogenesis. *Journal of Pharmacological Sciences* 2005; 98: 117-129.
39. Stridh H., Kimland M, Jones DP, Orrenius S, Hampton MB. Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis. *FEBS Lett* 1998; 429:351–355.
40. Kim CN, Bhalla K, Kreitman RJ, Willingham MC, Hall P, Tagge EP, Jia T, Frankel AE. Diphtheria toxin fused to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and Ara-C exert synergistic toxicity against human AML HL-60 cells. *Leuk Res* 1999; 23:527–538.
41. Cabaner C, Gajate C, Macho A, Munoz E, Modolell M, Mollinedo F. Induction of apoptosis in human mitogen-activated peripheral blood T-lymphocytes by the ether phospholipid ET-18-OCH<sub>3</sub>: involvement of the Fas receptor/ligand system. *Br J Pharmacol* 1999; 127:813–825.
42. Bauer MKA, Vogt M, Los M, Siegel J, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. *J Biol Chem* 1998; 273:8048–8055.
43. Uberti D, Yavin E, Gil S, Ayasola KR, Goldfinger N, Rotter V. Hydrogen peroxide induces nuclear translocation of p53 and apoptosis in cells of oligodendroglia origin. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 65:167–175.
44. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11848– 11852.
45. Nobel CS, Burgess DH, Zhivotovsky B, Burkitt MJ, Orrenius S, Slater AF. Mechanism of dithiocarbamate inhibition of apoptosis: thiol oxidation by dithiocarbamate disulfides directly inhibits processing of the caspase-3 proenzyme. *Chem Res Toxicol* 1997; 10:636–643.
46. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376:37–43.

47. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 1997; 414:552–556.
48. Lipton SA, Rayudu PV, Choi YB, Sucher NJ, Chen H.S. Redox modulation of the NMDA receptor by NO-related species. *Prog Brain Res* 1998; 118:73–82.
49. Lipton SA. Janus faces of NFκ B: neurodestruction versus neuroprotection. *Nat Med* 1997; 3:20–22.
50. Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Curran T, Morgan JI. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature* 1993; 363:166–169.
51. Ushmorov A, Ratter F, Lehmann V, Dröge W, Schirmacher V, and Umansky V. Nitric oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome c release. *Blood* 1999; 93: 2342-2352.
52. Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A, Dimmeler S. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation *in vivo*. *J Biol Chem* 1999; 274:6823–6826.
53. Kiechle LF, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta* 2002; 326: 27-45.
54. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51: 794-798.
55. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001; 11: 173-186.
56. Xie K, Fidler IJ. Gene therapy with the inducible nitric oxide synthase for induction of apoptosis to control tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17:55–75.
57. Shi Q, Xiong Q, Wang B, Le X, Khan NA, Xie K. Influence of nitric oxide synthase II gene disruption on tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2000; 60:2579–2583.
58. Wang B, Xiong Q, Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, Xie K. Intact nitric oxide synthase II gene is required for interferonβ-mediated suppression of growth and metastasis of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61:71–75.

59. Wang B, Xiong Q, Shi Q, Le X, Xie K. Genetic disruption of host interferon-gamma drastically enhances the metastasis of pancreatic adenocarcinoma through impaired expression of inducible nitric oxide synthase. *Oncogene* 2001; 20:6930–6937.
60. Wang B, Xiong Q, Shi Q, Tan D, Le X, Xie K. Genetic disruption of host nitric oxide synthase II gene impairs melanoma-induced angiogenesis and suppresses pleural effusion. *Int J Cancer* 2001; 91:607–611.
61. Yamamoto T, Terada N, Nishizawa Y, Tanaka H, Akedo H, Seiyama A, Shiga T, Kosaka H. Effects of NG-nitro-L-arginine and/or L-arginine on experimental pulmonary metastasis in mice. *Cancer Lett* 1994; 87:115–120.
62. Yamamoto T, Terada N, Seiyama A, Nishizawa Y, Akedo H, Kosaka H. Increase in experimental pulmonary metastasis in mice by L-arginine under inhibition of nitric oxide production by NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Int J Cancer* 1998; 75:140–144.
63. Bellocq A, Suberville S, Philippe C, Bertrand F, Perez J, Fouqueray B, Cherqui G, Baud L. Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages. Evidence for involvement of nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* 1998; 273:5086–5092.
64. Tandler DS, Bao C, Wang T, Huang EL, Ratovitski EA, Pardoll DA, Lowenstein CJ. Intersection of interferon and hypoxia signal transduction pathways in nitric oxide-induced tumor apoptosis. *Cancer Res* 2001; 61:3682–3688.
65. Wang HH, McIntosh AR, Hasinoff BB, Rector ES, Ahmed N, Nance DM, Orr FW. B16 melanoma cell arrest in the mouse liver induces nitric oxide release and sinusoidal cytotoxicity: a natural hepatic defense against metastasis. *Cancer Res* 2000; 60:5862–5869.
66. Mimeault M. New advances on structural and biological function of ceramide in apoptotic/necrotic cell death and cancer. *FEBS Lett* 2002; 530: 9-16.
67. Dong Z, Staroselsky AH, Qi X, Xie K, Fidler IJ. Inverse correlation between expression of inducible nitric oxide synthase activity and production of metastasis in K-1735 murine melanoma cells. *Cancer Res* 1994; 54:789–793.
68. Radomski MK, Jenkins DC, Holmes L, Moncada S. Human colorectal adenocarcinoma cells: differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets. *Cancer Res* 1991 51:6073–6077.

69. Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, Camoratto AM, Evans AE, and Brodeur GM. Advances in Brief Resistance to Chemotherapy Mediated by TrkB in Neuroblastomas1. *Cancer Research* 2002; 62, 6462–6466.
70. Evans AE, Neuroblastoma: A historical perspective 1864-1998, In Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Vaute PA. *Neuroblastoma*, Amsterdam Elsevier Science B.V. 2000. 10-15.
71. Akatov VS, Solov'eva ME, Leshchenko VV, Teplova VV. Oxidative stress in HEp-2 human laryngeal carcinoma cells induced by combination of vitamins B12b and C. *Bull Exp Biol Med.* 2003; 136(3):279-82.
72. Storz P, Döppler H, Ferran C, Grey ST, and Toker A. Functional dichotomy of A20 in apoptotic and necrotic cell death. *Biochem J* 2005; 387(Pt 1): 47 –55.
73. Celis J.E. (1994) "Cell Biology a Laboratory Handbook" Academic Press, California.
74. Freshney I.R. (1987) "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques" 2nd ed. A.R. Liss, New York.
75. Palmer R.M.J. et al. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine; *Nature* 1988; 333: 664-670.
76. Radomski M.W. et al. S-Nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 745 750.
77. Lipton S.A. et al. A redox –based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature* 1993; 364:626-630.
78. Hecker M. et al. On the substrate specificity of nitric oxide syntase: *FEBS Lett* 1991; 294: 221-226.
79. Peskin AV, Winterbourn CC. "A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1)". *Clinica Chimica Acta* 2000; 293: 157–166.
80. Sarker KP et al. *J Neurochemistry* 2003; 87:1345-1353.
81. Misko TP et al. Selective inhibition of the inducible nitric oxide syntase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1993; 233,119-123.
82. Akaike T, Suga M, Maeda H. Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217(1):64-73.
83. Aubert M, O' Toole J, Blaho JA. Induction and prevention of apoptosis in human HEp-2 cells by herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 1999; 73: 10359–10370.



84. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 1938; 27:493-497.
85. Robertson JD et al. Distinct pathways of stimulation of cytochrome c release by etoposide. *J Biol Chem* 2000; 275, 32438.
86. Sawada M et al. Ordering of ceramide formation, caspase activation, and Bax\ Bcl-2 expression during etoposide-induced apoptosis in C6 glioma cells. *Cell Death Differ* 2000; 7: 761-767.
87. Beck WT, Cass CE, Houghton PJ. Chemoyherapeutic Agents, In: Robert C.Bast, Donalt W. Kufe, Raphael E. Pollock, Ralph R Weichselbaum, James F.Holland, Emil Frei III. *Cancer Medicine* ed.5, B.C.Decker Inc. Hamilton, London, 2000, 680-699.
88. Wang LG et al. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44:355-359.
89. Vilpo JA et al. Selective toxicity of vincristine against chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Eur J Haematol* 2000; 65: 370-376.
90. Colvin MD. Chemoyherapeutic Agents, In: Robert C.Bast, Donalt W. Kufe, Raphael E. Pollock, Ralph R Weichselbaum, James F.Holland, Emil Frei III. *Cancer Medicine* ed.5, B.C.Decker Inc. Hamilton, London, 2000, 657-660.
91. Rubin EH, Hait WN. Chemoyherapeutic Agents, In: Robert C.Bast, Donalt W. Kufe, Raphael E. Pollock, Ralph R Weichselbaum, James F.Holland, Emil Frei III. *Cancer Medicine* ed.5, B.C.Decker Inc. Hamilton, London, 2000, 670-674.
92. Pauwels O, Atassi G, Kiss R. Combination of computerized morphonuclear and multivariate analysis to characterize in vitro the antineoplastic effect of alkylating agents. *J Pharmacol toxicol Methods* 1995; 33 (1): 35-45.
93. Kabir J, Lobo M, Zachary I. Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *J Biochem* 2002; 367: 145-155.
94. Yamaki K, Hong J, Hiraizumi K, Ahn JW, Zee O, Ohuchi K. "Participation of various kinases in staurosporine induced apoptosis of RAW 264.7 cells" *J. Pharm. Pharmacol.* 2002; 54(11):1535-44.
95. Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F . "Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>dependent protein kinase" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; 135(2):397-402.

96. Reil TD, Kashyap VS, Sarkar R, Freishlag J, Gelabert HA. Dexamethasone inhibits the phosphorylation of retinoblastoma protein in the suppression of human vascular smooth muscle cell proliferation. *J Surg Res* 2000 ;92(1):108-13.
97. Lin W, Hsu Y, Cycloheximide-induced cPLA(2) activation is via the MKP-1 down-regulation and ERK activation. 2000; 12(7): 457-461.
98. Gáspár Jékely. Caspases Gallery, Hungarian Academy of Sciences Institute of Enzymology Neuroenzymology Group Karolina út 29. ,1113 Budapest, Hungary.
99. Mosmann T. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular growth and survival: Application to proliferation and Cytotoxicity Assays". *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
100. Yang-ja Lee and Emily Shacter. Bcl-2 Does Not Protect Burkitt's Lymphoma Cells From Oxidant-Induced Cell Death. *Blood* 1997; 89(12): 4480-4492.
101. Laxmirarayana R Dextreddy and Clinton J James. *Journal of Virology* 1999; 73(5): 3778-3788.
102. Shacter E., Williams JA, Hinson RM, Senturker S, Lee. Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood* 2000; 96(1): 307-313.
103. Yazıcı Z, Baskın Y, Baskın H, Gecer O, Bahar IH, and Ozkul A. Study of programmed cell death in bovine herpes virus 1 infected MDBK cells and the possible role of nitric oxide in this process. *Acta Veterinaria Hungarica*(2004; 52: 287-297.
104. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, and Zeiger E. HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte culture. *Mutat Res* 2003; 534: 65-75.
105. Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H, Wick G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Gene.* 1994;10(2): 41-2.
106. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995; 182(5):1597-601.
107. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84(5):1415-20.

108. Baskin H, Ellerman-Eriksen S, Lovmand J, Mogensen SC. Herpes simplex virus type 2 synergizes with interferon-gamma in the induction of nitric oxide production in mouse macrophages through autocrine secretion of tumour necrosis factor-alpha. *Journal of General Virology* 1997; 78: 195-203.
109. Winkler MT, Doster A, Jones C. Persistence and Reactivation of Bovine Herpesvirus 1 in the Tonsils of Latently Infected Calves. *J Virol* 2000; 74(11): 5337-5346.
110. Ciacci-Zanella J, Stone M, Henderson G, Jones C. The Latency-Related Gene of Bovine Herpesvirus 1 Inhibits Programmed Cell Death. *J Virol* 1999; 73(12): 9734-9740.
111. Mc Keague AL, Wilson DJ, Nelson J: Staurosporine-induced apoptosis and Hydrogen peroxide-induced necrosis in two human breast cell lines. *British Journal of Cancer* 2003; 88: 125-131.
112. Zorov DB, Bannikova SY, Belausov VV, Vyssokikh MY et al. Reactive oxygen and nitrogen species: friends or foes. *Biochemistry (Moscow)* 2005; 70 (2): 215-221.
113. Steinmann M, Moosmann N, Schimmel M, Gerhardus C, Bauer G. Differential role of extra-and intracellular superoxide anions for nitric oxide-mediated apoptosis induction. *In Vivo* 2004; 18: 293-309
114. Rocha M, Kruger A, Van Rooijen N, Schirmacher V, Umansky V. Liver endothelial cells participate in T-cell-dependent host resistance to lymphoma metastasis by production of nitric oxide in vivo. *Int J Cancer* 1995; 63: 405-411.
115. Park IC, Woo SH, Park MJ et al: Ionizing radiation and nitric oxide donor sensitize Fas-induced apoptosis via up regulation of Fas in human cervical cancer cells. *Oncol Rep* 2003; 10: 629-633.
116. En JP, Liu L, Zeng M, Stamler JS. An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry* 2000; 39 (5): 1040-7.
117. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR: Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 1075-1079.
118. Heigold S, Sers C, Bechtel W, Ivanovas B, and Schafer R, Bauer G. Nitric oxide mediates apoptosis induction selectively in transformed fibroblasts compared to non transformed fibroblasts. *Carcinogenesis* 2002; 23: 929-941.
119. Baskin Y, Baskin H, Guner G, Tuzun E, Oto O. The inversely proportional relation between nitric oxide and lipid peroxidation in atherosclerotic plaque formation in human. *Int J Cardiol* 2003; 9: 53-57.

120. Teodoro JG. and Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 1997; 71: 1739–1746.
121. Ludwig GV and Letchworth GJ. Temporal control of bovine herpesvirus 1 glycoprotein synthesis. *J Virol* 1987; 61: 3292-3298.
122. Yazici Z, Baskin Y, Baskin H, Gecer O, Bahar IH. and Ozkul A. Study of programmed cell death in bovine herpesvirus 1 infected MDBK cells and the possible role of nitric oxide in this process. *Acta Vet Hung* 2004; 52: 287–297.
123. Aubert M, O' Toole J and Blaho JA. Induction and prevention of apoptosis in human HEp-2 cells by herpes simplex virus type 1. *J Virol* 1999; 73: 10359–10370.
124. Golvon V, Roizman B. HSV-1 induced and blocks apoptosis at multiple steps during infection and protects cells from exogenous inducer in a cell-dependent manner. *PNAS USA* 1998; 95: 3931-3936.
125. Shaw A M, Braun L, Frew T, Hurley D J, Rowland RRR and Chase CCL. A role for bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein E (gE) tyrosine phosphorylation in replication of BHV-1 wild-type virus but not BHV-1 gE deletion mutant virus. *Virology* 2000; 268: 159–166.
126. Ren X, Harms SJ and Splitter AG. Tyrosine phosphorylation of bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22 correlates with the incorporation of VP22 into virions. *J Virol* 2001; 75: 9010–9017.
127. Devireddy LR and Jones CJ. Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *J Virol* 1999; 73: 3778–3788.
128. Galvan V, Brandimarti R, Munger J and Roizman B. Bcl-2 blocks a caspase-dependent pathway of apoptosis activated by herpes simplex virus 1 infection in HEp-2 cells. *J Virol* 2000; 74: 1931–1938.
129. Henderson G, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL and Jones D. The latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavages during productive infection. *J Neurovirol* 2004; 10: 64–70.
130. De Martino L, Marfe G, Di Stefano C, Pagnini U, Florio S, Crispino L, Iovane G, Macaluso M and Giordano A. Interference of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in sorbitol-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 2003; 89: 373–380.

131. Evans AE, Neuroblastoma: A historical perspective 1864-1998, In Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Vaute PA. Neuroblastoma, Amsterdam Elsevier Science B.V. 2000. 1-7.
132. Karin Svensson and Christer Larsson. A protein C $\beta$  inhibitor attenuates multidrug resistance of neuroblastoma cells. BMC Cancer 2003; 3:10-15.
133. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. J Biol Chem 2000; 275: 39435-39440.
134. Fabbri F, Briigliadori G, Ulivi P, Tesei A, Vannini I, Rosetti M, Bravaccini S, Amadori D, Bolla M and Zoli W. Pro-apoptotic effect of a nitric oxide-donating NSAID, NCX 4040, on bladder carcinoma cells. Apoptosis 2005;10:1095-1103.
135. Lovat PE, Ranalli M, Bernassola F, Tilby M, Malcolm AJ, Pearson ADJ, Piacentini M, Melino G and Redfern CPF. Synergistic induction of apoptosis of neuroblastoma by fenretinide or CD437 in combination with chemotherapeutic drugs, Int J Cancer 2000; 88: 977-985.
136. Monterio HP, Silvia EF, Stern A. Nitric oxide; a potential inducer of adhesion related apoptosis-anoikis. Nitric Oxide 2004; 10: 1-10.
137. Bauer G: Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. Anticancer Res 2000; 20: 4115-39.
138. Tews DS. Cell death and oxidative stress in gliomas. Neuropathology and Applied Neurobiology 1999; 25: 272-284.
139. Toomey D, Condron C, Wu QD et al. TGF-beta1 is elevated in breast cancer tissue and regulates nitric oxide production from a number of cellular sources during hypoxia reoxygenation injury. Br J Biomed Sci 2001; 58: 177-183.
140. Engelmann I, Bauer G. How can tumor cells escape intercellular induction of apoptosis? Anticancer Res 2000; 20: 2297-306.
141. Lieberman MD, Nishioka K, Redmond P, Daly JM. Enhancement of IL-2 immunotherapy with L-Arginine. Ann Surg 1992; 215 (2): 157-165.
142. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S, Çetingül N et al. Experience of the İzmir Pediatric Oncology Group on neuroblastoma IPOG-NBL-92 Protocol. Pediatric Hematology and Oncology 2003; 20 (3): 211-8.
143. Sastry J, Kellie SJ. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high dose cisplatin and amifostine. Pediatric Hematology and Oncology 2005; 22 (5): 441-5.

144. Herskol L. Control of disease by selective iron depletion: a novel therapeutic strategy utilizing iron chelators. *Baillieres Clin Heamatol* 1994; 7 (4): 965-1000.

Ek 1. Etik kurul raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ -  
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU  
Tarih ve Sayı: 28.11.2002/ 154

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.M.Feza AKGÜR  
Prof.Dr.Hale AKPINAR  
Prof.Dr.Derya ERÇAL  
Prof.Dr.Mehmet ERGİN  
Prof.Dr.Hüseyin GÜLAY  
Doç.Dr.Hüray İŞLEKEL  
Yrd.Doç.Dr.Ayşe KARCI  
Prof.Dr.Emine OSMA  
Doç.Dr.Özgül SAĞOL  
Doç.Dr.Arzu SAYINER  
Doç.Dr.Semih ŞEMİN

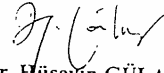
Etik Kurul Başkanı  
Prof.Dr.Hüseyin GÜLAY

Etik Kurul Sekreteri  
Deniz YÜCESAN

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 28 Kasım 2002 tarih ve 02/24/01 nolu toplantısında Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü, Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Doktora Program Öğrencisi Dr.Yasemin BASKIN'ın sorumlu olduğu 241 protokol numaralı "İn Vitro Ortamda Erişkin ve Çocuk Kanseri Sağaltım Modelinde, Mikroçevrenin Apoptotik Yolak Üzerine Etkileri" isimli projenin uygulanmasında etik yönden sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

  
Prof. Dr. Hüseyin GÜLAY  
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları  
Etik Kurul Başkanı

E.İ.K.Kur. Sekr.  
28/11

**STUDY OF PROGRAMMED CELL DEATH  
IN BOVINE HERPESVIRUS 1 INFECTED MDBK CELLS AND  
THE POSSIBLE ROLE OF NITRIC OXIDE IN THIS PROCESS**

Z. YAZICI<sup>1</sup>, Yasemin BASKIN<sup>2</sup>, H. BASKIN<sup>3\*</sup>, Ozlem GECER<sup>4</sup>, I. H. BAHAR<sup>3</sup>  
and A. ÖZKUL<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Kurupelit, 55139, Samsun, Turkey; <sup>2</sup>Oncology Institute and <sup>3</sup>Department of Microbiology and Clinical Microbiology, School of Medicine, Dokuz Eylül University, Inciralti, Izmir, Turkey; <sup>4</sup>Department of Virology, Regional Institute of Hygiene, Ministry of Health, Göztepe, 35350 Izmir, Turkey; <sup>5</sup>Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Diskapi, 06110, Ankara, Turkey

(Received September 6, 2003; accepted March 2, 2004)

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is the aetiological agent of many disease types and may predispose infected animals, possibly through immunosuppression, to secondary bacterial infections. Immunosuppression may directly be associated with the induction of programmed cell death (PCD) in some virus-infected cells. Nitric oxide (NO) has an important mediating role against fungal, bacterial, protozoal, viral pathogens and tumours. BHV-1 induced apoptosis between 0.5–3 h postinfection (PI) in MDBK cells; however, between 3 and 6 h PI the PCD response was found to be decreased. It was interesting to see that BHV-1 inhibited staurosporin-induced PCD after 1 h. These results showed similarities with those obtained from herpes simplex type 1 infections in human epithelial cells. PCD response decreased 1 h following caspase-3 inhibitor applications, whereas NO response increased 3 h following infection in the presence of caspase-8 and -9 inhibitory peptides. In conclusion, BHV-1 inhibited the staurosporin-induced apoptotic response and also the NO response. We propose that this inhibition is caspase-3 dependent.

**Key words:** Bovine herpesvirus 1, nitric oxide (NO), programmed cell death

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1), a member of the *Alphaherpesvirinae*, is the aetiological agent of infectious bovine rhinotracheitis, infectious pustular vulvovaginitis, abortion, and fatal neonatal systemic infections as described earlier (Roizman et al., 1992; Tikoo et al., 1995). In addition to initial respiratory infections, BHV-1 may predispose infected animals, possibly through immunosup-

\*Corresponding author: Huseyin Baskin, MD, PhD; E-mail: huseyin.baskin@deu.edu.tr; Fax: +90 (232) 259 0541



**SELECTIVE APOPTOTIC BEHAVIOUR OF BOVINE  
HERPESVIRUS 1 IN AN EPITHELIAL-LIKE  
MICROENVIRONMENT**

Yasemin BASKIN<sup>1</sup>, Z. YAZICI<sup>2</sup>, H. BASKIN<sup>3\*</sup>, A. OZKUL<sup>4</sup>, Nur OLGUN<sup>1</sup> and I. H. BAHAR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Oncology Institute and <sup>3</sup>Department of Microbiology and Clinical Microbiology,  
School of Medicine, Dokuz Eylul University, Inciralti, 35340 Izmir, Turkey;  
<sup>2</sup>Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University,  
Kurupelit, Samsun, Turkey; <sup>4</sup>Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine,  
Ankara University, Diskapi, Ankara, Turkey

(Received October 7, 2004; accepted April 18, 2005)

Apoptosis seems to play an important role in the pathogenic profile of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) infection. Nitric oxide (NO) is also important as a signal molecule. In this study, apoptosis was selectively induced in HEp-2 cells in the early stage [1–3 h postinfection (PI)] of BHV-1 multiplication, and this apoptotic process was realised through the caspase-8, and partially through the caspase-3, pathway. BHV-1 infection inhibited staurosporine- (SS-) induced apoptosis only if the SS was added at 6 h PI. The results of this study showed that the 'NO–apoptosis' relation was realised through the caspase-8 pathway ('outer membrane receptor' pathway) at a later stage of infection in apoptosis induced by BHV-1 + SS. Our previous report (Yazici et al., 2004) and this study together showed that BHV-1 might induce and inhibit cell-type-specific pathways of apoptosis.

**Key words:** Bovine herpesvirus 1, apoptosis, nitric oxide, HEp-2 cells

Bovine herpesvirus (BHV-1) is an important viral pathogen of cattle. It belongs to the *Alphaherpesvirinae* subfamily and shares many biological properties with herpes simplex virus 1 (HSV-1) and HSV-2 (Jones, 1998).

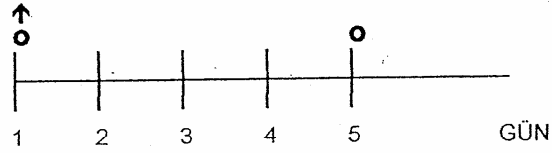
The pathogenic profile of the viral infection includes the development of an inflammatory response to the cytolytic action of natural killer cells, the antiviral activities of cytokines, and apoptosis (De Martino et al., 2003). Programmed cell death (PCD), also known as 'apoptosis', is the process whereby individual cells of multicellular organisms undergo systemic self-destruction in response to a wide variety of stimuli (Teodoro and Branton, 1997). Successful viral replication requires not only the efficient production and spread of progeny, but also the evasion of host defence mechanisms that limit replication by killing infected

\*Corresponding author: Huseyin Baskin; E-mail: huseyin.baskin@deu.edu.tr;  
Fax: +90 (232) 278 6895

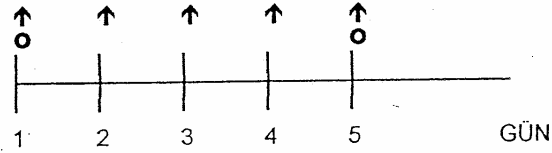
## 9. KEMOTERAPİ

A <sub>1</sub> BLOK: (PV)	İLAÇ	DOZ	GÜN	UYGULAMA
	(↑) Cisplatin	2y>100mg/m <sup>2</sup> 2y<20mg/m <sup>2</sup>	1. gün 1-5 gün	5 st'lik inf. 30-45 dk. inf.
	(○)VCR	1.5 mg/m <sup>2</sup>	1.ve 5. gün	IV

### A<sub>1</sub> BLOK (>2yaş)

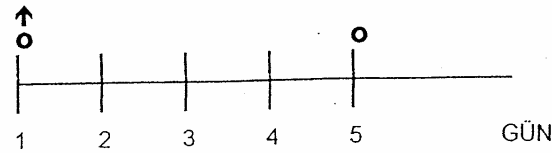


### A<sub>1</sub> BLOK (<2yaş)



A <sub>2</sub> BLOK: (IV)	İLAÇ	DOZ	GÜN	UYGULAMA
	(↑) İfosfamid +mesna	2 g/m <sup>2</sup> %100	1.	24st'lik infüzyon
	(○)VCR	1.5 mg/m <sup>2</sup>	1. ve 5.	IV puşe

### A<sub>2</sub> BLOK (IV)

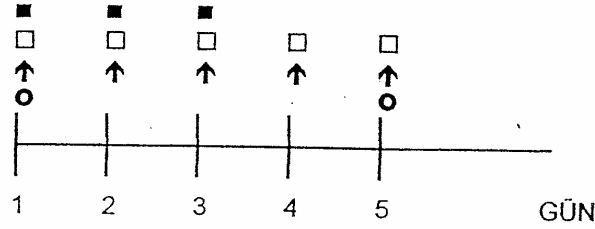


\* <1 yaş veya <10 kg olan hastalarda doz kg başına olarak hesaplanır.  
Kg başına doz= M<sup>2</sup> başına doz / 30

**A<sub>3</sub> BLOK:  
(VIDA)**

İLAÇ	DOZ	GÜN	UYGULAMA
(○)VCR	1.5 mg/m <sup>2</sup>	1. ve 5.	IV puşe
(↑) İfosfamid +mesna	1.8 g/m <sup>2</sup> %100	1-5 1-5	24 st'lik infüzyon 24 st'lik infüzyon
(□)DTIC	250 mg/m <sup>2</sup>	1-5	30 dk.IV infüzyon
(■) Adriamycin	20 mg/m <sup>2</sup>	1-3	IV 4 saatlik infüzyon

**A<sub>3</sub> BLOK (VIDA)**

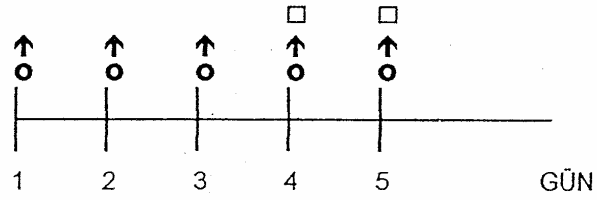


- A3 blok bitiminden 24 saat sonra "hematopoietic growth faktör" başlanır. (G-CSF / GM-CSF)

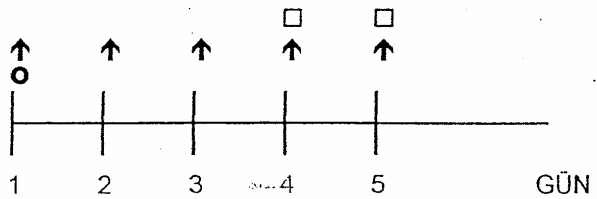
\* <1 yaş veya <10 kg olan hastalarda doz kg başına olarak hesaplanır.  
Kg başına doz= M<sup>2</sup> başına doz / 30

A <sub>4</sub> BLOK: (PCVP)	İLAÇ	DOZ	GÜN	UYGULAMA
	(○)Cisplatin	2y↑100 mg/m <sup>2</sup> 2y↓20 mg/m <sup>2</sup>	1. 1-5	5 st'lik infüzyon IV puşe
	(↑)Cyclophosphamid +mesna	200 mg/m <sup>2</sup> %60 doz	1-5	IV 1 saatlik infüzyon
	(□)VP-16	150 mg/m <sup>2</sup>	4. ve 5.	45 dk. infüzyon

#### A<sub>4</sub> BLOK: (<2yaş)



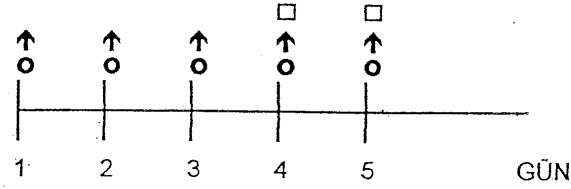
#### A<sub>4</sub> BLOK: (>2yaş)



- <1 yaş veya <10 kg olan hastalarda doz kg başına olarak hesaplanır.  
Kg başına doz= M<sup>2</sup> başına doz / 30

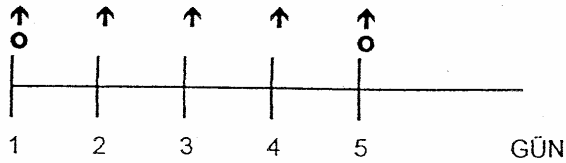
A <sub>5</sub> BLOK:	İLAÇ	DOZ	GÜN	UYGULAMA
	(●)Cisplatin	30 mg/m <sup>2</sup>	1-5	24 st'lik infüzyon
	(↑)Cyclophosphamid +mesna	300 mg/m <sup>2</sup> %60 doz	1-5	IV 1 st'lik infüzyon
	(□)VP-16	150 mg/m <sup>2</sup>	4. ve 5.	45 dk. infüzyon

A<sub>5</sub> BLOK:



A <sub>6</sub> BLOK :	İLAÇ	DOZ	GÜN	UYGULAMA
(CV)	(↑)Cyclophosphamid	5 mg/kg	1-5 gün 1,4,7,10. hft	IV puşe
	(●) VCR	0.75 mg/m <sup>2</sup>	1,5. Günler 1,4,7,10 hft	IV puşe

A<sub>6</sub> BLOK :

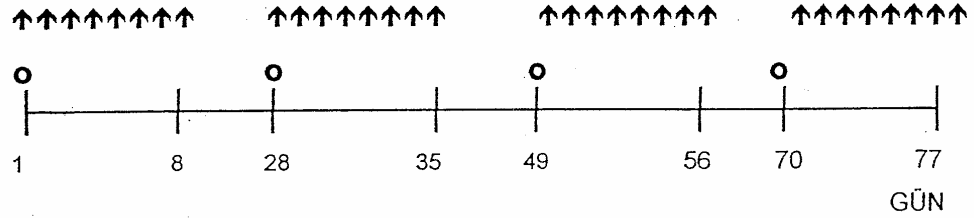


\* <1 yaş veya <10 kg olan hastalarda doz kg başına olarak hesaplanır.  
Kg başına doz= M<sup>2</sup> başına doz / 30

### İDAME TEDAVİSİ :

İLAÇ	DOZ	GÜN	UYGULAMA
İDAME : (↑)Cyclophosphamid +mesna	150 mg/m <sup>2</sup> %60 doz	1-8 1-8 1,4,7 ve 10. haftalar	PO PO
(○)VCR	1.5 mg/m <sup>2</sup>	1. gün 1,4,7 ve 10. haftalar	IV Puşe

### İDAME:

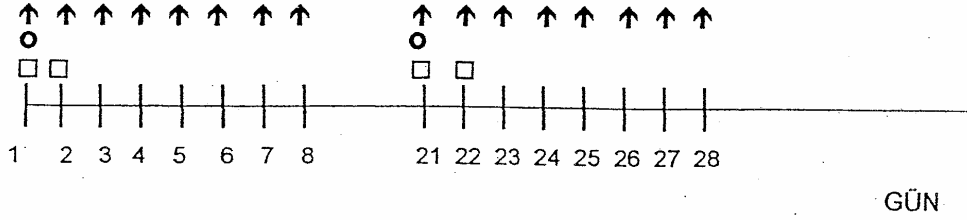


\* <1 yaş veya <10 kg olan hastalarda doz kg başına olarak hesaplanır.  
Kg başına doz= M<sup>2</sup> başına doz / 30

### GÜÇLENDİRİLMİŞ İDAME TEDAVİSİ :

İLAÇ	DOZ	GÜN	UYGULAMA
G.İDAME : (↑)Cyclophosphamid +mesna	150 mg/m <sup>2</sup> %60 doz	1-8 1-8	PO PO
(●)VCR	1.5 mg/m <sup>2</sup>	1	IV Puşe
(□)CARBOPL.	150 mg/m <sup>2</sup> 3 hf. ara ile	1, 2.	IV 1 st'lik infüzyon

### GÜÇLENDİRİLMİŞ İDAME:



### 13-cis Retinoik Asid :

- Transplantasyon sonrası 90. gün veya idame tedavisi ile birlikte başlanır
- Doz: 160 mg/m<sup>2</sup>/Gün 2 dozda PO 14 gün süre ile devamlı verilir. 28 günde bir (14 gün aradan sonra tekrar), toplam 6 kür (6ay) uygulanır. (Roaccutane 10 ve 20 mg cap)

**Not.** CCG'nun önerdiği doz ve uygulama bu şekildedir. Ancak yan etkiler nedeniyle hastalar bu uygulamayı tolere etmekte zorlanırsa doz 100 mg/m<sup>2</sup>'e azaltılabilir.

\* <1 yaş veya <10 kg olan hastalarda doz kg başına olarak hesaplanır.  
Kg başına doz= M<sup>2</sup> başına doz / 30

## 13. YÜKSEK DOZ KEMOTERAPİ VE OTOLOG PERİFERİK KAN KÖK HÜCRE NAKLİ

Nöroblastomada, daha hızlı hematolojik düzelme, daha az maliyetli hücre kontaminasyonu ve azalmış morbidite nedenleriyle otolog periferik kan kök hücre nakli yeğlenmektedir. Allojenik transplantasyonların nöroblastomada bir üstünlüğü bulunmamaktadır.

### 13.1. Endikasyon :

Aşağıdaki koşulların hepsine sahip olgular otolog PKHT programına alınır.

1. Protokole göre yüksek risk grubuna giren olgular
2. 2. kür (4 blok) kemoterapi sonrası yapılan yanıt değerlendirilmesinde en az PR, VGPR ve CR sağlanan olgular (KT'e yanıtız hastalarda faydası gösterilememiştir)
3. Aile onayı alınanlar

### 13.2. Zamanlama :

- 2 kür (4 blok) kemoterapi sonrası yapılan yanıt değerlendirilmesinde; en azından parsiyel yanıt sağlanan hastalarda da 4. ve gerekirse 5. blok kemoterapi sonrası otolog kök hücre ürünü toplanır.

- 3 kür (6 blok) kemoterapi sonrası klinik değerlendirme yapılır. Gerekirse ikincil cerrahi ve ardından primer tümör bölgesine RT uygulamasının ardından ve son kemoterapiden maksimum 4-6 hafta sonra OPKHT uygulanır.

### 13.3. Kök hücre ürünü toplama protokolü :

- Hastaya 4. blok kemoterapi (A<sub>5</sub>) bitiminden 24 saat sonra 10µg/kg/gün tek dozda SC büyüme faktörü (G-CSF ) başlanır.



- Büyüme faktörü uygulamasının 7-12 günleri arasında periferik kan total lökosit sayısı  $\geq 2000$  değerinin elde edildiği ilk gün ürün toplanır (ya da CD34 + hücre sayısı procount olarak bakılabiliyorsa periferik kanda  $20 /\mu\text{l}$  olduğu gün). İlk gün toplanan üründe yeterli hücre sayısına ulaşılamadığı durumda büyüme faktörü devam edilerek ertesi gün bir kez daha ürün toplanır. (Ürün toplandığı gün GF ürün toplamaya başlanmadan en az 2 saat önce uygulanmalı ).
- 4. blok kemoterapi sonrası ardarda 2 uygulama ile halen yeterli hücre sayısına ulaşılamazsa aynı işlem 5. blok sonrası hedef hücre sayısına ulaşana dek yinelenir.
- Hastanın kendi kemoterapi blokları sonrası yeterli hücre toplanamadıysa uygun bir zamanda (6. blok sonrası olabilir) Cyclophosphamide ( $2.4 \text{ gr/m}^2$  IV 1 saat) tek ilaç olarak verilir ve 24 saat sonra aynı doz GF ile hücre toplaması tamamlanır.

**Minimum hedef hücre sayısı:**  $4 \times 10^8 / \text{kg}$  MNH ve /veya  $4 \times 10^6 / \text{kg}$  CD 34 (+) hücre

Tanıda Kİ tutulumu olan olgularda olanak varsa CD 34(+) hücre seleksiyonu veya diğer purging metodlarından birisinin yapılması önerilir.

#### 13.4. Hazırlama Rejimi :

Carboplatin  $300 \text{ mg/m}^2 / \text{gün}$  : -7,-6,-5,-4. Günler (total  $1200 \text{ mg/m}^2$ ) 24 h IV infüzyon

Etoposid  $200 \text{ mg/m}^2 / \text{gün}$  : -7,-6,-5,-4. Günler (total  $800 \text{ mg/m}^2$ ) 24 h IV infüzyon

Melphelan  $50 \text{ mg/m}^2 / \text{gün}$  : -7,-6,-5,-4. Günler (total  $200 \text{ mg/m}^2$ ) 30 dk IV infüzyon

-3, -2 ve -1. Günler : Dinlenme

0. gün : Otolog periferik kan kök hücre ürününün verilmesi

*Not : 1 yaş veya 12 kg altındaki çocuklarda dozlar kg başına olarak modifiye edilir.*

### 13.5. Destek Tedavi :

- Antiviral profilaksi
- Antimikotik profilaksi
- Barsak dekontaminasyonu
- IVIG profilaksisi
- Büyüme faktörü : 10µg/kg/gün tek dozda SC veya IV, 0. gün ürün verilmesinden 4 saat sonra başlanır. 3 gün ardarda ANS>1000/mm<sup>3</sup> oluncaya kadar sürdürülür.
- Antiemetik tedavi