

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

CB1954 İLAÇ ÖNCÜL MADDE VE
NİTROREDÜKTAZ (NTR) ENZİM
KOMBİNASYONLARININ KANSER
HÜCRELERİNE ETKİSİ

Esra KAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

GEBZE

2013

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

CB1954 İLAÇ ÖNCÜL MADDE VE
NİTROREDÜKTAZ (NTR) ENZİM
KOMBİNASYONLARININ KANSER
HÜCRELERİNE ETKİSİ

Esra KAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Nil SAYDAN

GEBZE

2013

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: CB1954 İLAÇ ÖNCÜL MADDE VE NİTROREDÜKTAZ (NTR) ENZİM KOMBİNASYONLARININ KANSER HÜCRELERİNE ETKİSİ

YAZAR ADI : Esra KAYA

Son yıllarda kanser tedavilerinde önemi artan enzim/ilaç öncül terapisi (Enzyme/Prodrug Therapy-EPT) dışarıdan gönderilen enzim aracılığıyla ilaç öncü maddesinin aktifleşmesi sonucu kanser hücrelerinin DNA'sının hasara uğrayıp hücrenin ölmesi prensibine dayanır. Nitroredüktazlar (NTR) bu amaç doğrultusunda kullanılan enzimlerdir. Nitroredüktazlar, aktif olmayan ilaç öncül maddesini sitotoksik DNA çapraz bağlayıcı ajan olan aktif forma dönüştürürler.

Enzim odaklı kanser terapilerinde en bilinen örnek *E.coli* NTR ile CB1954 (5-aziridinyl-2,4-dinitrobenzamid) kombinasyonunun kullanılmasıdır. NTR tarafından CB1954 aktivasyonu sonucu hidroksilamin türevleri oluşmakta ve bunlar asetil CoA gibi tiyoesterlerle daha fazla reaksiyona girerek DNA reaktif maddelerini oluşturmaktadır.

Tez çalışmasında, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü'nde ilk kez *S. saprophyticus* suşundan izole edilmiş olan Nitroredüktaz enziminin CB1954 ilaç öncü maddesi ile kombinasyonları serviks epitelyal kanser hücrelerine (HeLa hücreleri) uygulanmış ve sitotoksik etkisi doz ve zamana bağlı olarak incelenmiştir. Farklı enzim ve ilaç öncü konsantrasyonlarının kullanıldığı EPT uygulamaları ardından yapılan hücre canlılığı deneyleri sonucunda, ilaç öncü konsantrasyonu arttığında doz bağımlı sitotoksosite gözlenmiştir. Sitotoksosite deneylerine göre 100 µM CB1954'ün 10 µM'dan daha etkili olduğu bulunmuştur. EPT uygulamaları ardından apoptozis tayininde ise Akan Hücre Ölçer (Flow Cytometry) kullanılmıştır. Anneksin V antikorusunun apoptozise uğrayan hücrelerin membranına bağlanma potansiyelinin tespit edildiği yöntemde, sitotoksosite deneyleriyle benzer sonuçlar elde edilmiştir. İlaç öncülünün konsantrasyonu 10 µM iken %46,3 oranında apoptozis tetiklenirken, 100 µM iken %63,6 oranında tetiklenmektedir. Sonuç olarak

NTR/CB1954 kombinasyonları doz artışına bağlı olarak HeLa hücrelerinde apoptozis ve sitotoksisiteyi tetiklemiştir.

Anahtar kelimeler: Enzim/ilac öncü terapisi, ilac öncü madde, nitroredüktaz, CB1954

SUMMARY

TITLE of THESIS: THE EFFECT OF CB1954 PRODRUG and NITROREDUCTASE ENZYME COMBINATIONS on CANCER CELLS

AUTHOUR : Esra KAYA

Enzyme/Prodrug Therapy (EPT) is a novel approach of cancer therapy in recent years depends on activation of an administered prodrug by an exogenous enzyme which is capable of converting prodrug to active drug causing DNA damage and cell death of cancerous cells. Nitroreductases (NTR) are enzymes used for this purpose. Nitroreductases converts inert prodrug to a DNA cross-linking agents are cytotoxic and active in tumors.

NTR isolated from *E.coli* and CB1954 (5-aziridinyl-2,4-dinitrobenzamid) combination is the most known pattern focusing enzyme cancer treatment. CB1954 activation by NTR generates hydroxylamine derivatives producing DNA reactive matters by further reactions with thioesters such as Acetyl Coenzyme A.

In our study, we investigated dose and time related cytotoxic efficiencies of NTR enzyme supplied from Biochemistry Department, Gebze Institute of Technology combined with prodrug CB1954 on cervical ephitelial cancer cells (HeLa cells). The NTR enzyme have been isolated and purified from *S. saprophyticus* strain and used in enzyme/prodrug therapy for the first time. According to the results dose dependent cytotoxicity have been observed from different combinations and concentrations of enzyme and prodrug by cell viability experiments. Cytotoxicity experiments show that 100 μ M concentration of CB1954 has better cytotoxic efficiency than that of 10 μ M. On the other hand, Flow Cytometry analysis is used for programmed cell death (apoptosis) detection after application of EPT. Binding potential of Annexin V to the apoptotic cell membrane is determined by Flow Cytometry giving the similar results to cell viability assay. When 100 μ M concentration of prodrug is combined with enzyme apoptosis is induced much more effectively (%63,6) than 10 μ M prodrug concentration (%46,3)

on HeLa cells. As a result apoptosis and cytotoxicity is induced by NTR/CB1954 combination depending on dose increase.

Keywords: Enzyme/prodrug therapy, prodrug, nitroreductase, CB1954

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren, karşılaştığım problemlerin çözümünde her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen, Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Nil SAYDAN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca laboratuvarının kullanımı ve uygulamış olduğum enzimin temin edilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ayhan ÇELİK'e ve Proje Asistanı Gülden YETİŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen sayın bölüm başkanımız Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda önemli yeri olan akan hücre ölçer (Flow Cytometry) analizleri yapabilmemiz için gerekli laboratuvar koşullarını sağlayarak bana destek olan sayın hocam Doç. Dr. Gülderen YANIKKAYA DEMİREL'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca cihaz kullanım ve analiz değerlendirmelerinde yardımcı olan Yeditepe Üniversitesi çalışanlarından Fatma Tuba AKDENİZ'e ve Özgür ALBAYRAK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmalarımda her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen arkadaşlarımdan Elif SIRMA, Ceyda KETENCİ, Veysel SÜZERER, Pelin BALÇIK ERÇİN, Arş. Gör. Metin ÇETİN, Arş. Gör. Zeynep GİRGİN ERSOY, Aybike YEDEKÇİ, Merve ŞAHAN, Serkan KARABABA ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma dostluk ve dayanışmalarından dolayı teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca benden maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve her türlü kararında yanımda olan sevgili anneciğim Suna KAYA, babacığım Yetiş KAYA, ablacığım TUBA KAYA ve kardeşim Kaan KAYA'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
SEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser Nedir ?	2
1.1.1. Kanser Hücresinin Özellikleri ve Kanser Oluşumu	2
1.1.2. Kanser Hücreleri Arası Birleşmeler ve Bağlantı Kompleksleri	4
1.1.2.1. Gap Bağlantı Kompleksleri (Gap Junction)	5
1.2. Kanser Terapileri Sonrası Hücre Ölüm Mekanizmaları	6
1.2.1. Otofaji	6
1.2.2. Nekrotik Hücre Ölümü	7
1.2.3. Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis)	7
1.2.3.1. Apoptozisin Moleküler Mekanizması	11
1.2.3.2. Apoptozisin Düzenlenmesi	12
1.2.3.3. Apoptozisi Tetikleyen Faktörler	13
1.2.3.4. Kaspazların Aktivasyonu	14
1.2.3.5. Apoptozis Tayininde Kullanılan Yöntemler	14
1.2.3.5.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri	15
1.2.3.5.2. Histokimyasal yöntemler	16
1.2.3.5.3. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	16
1.2.3.5.4. Akan Hücre Ölçer (Flow Cytometry)	17
1.3. Kanser Tedavi Yöntemleri	20
1.3.1. Enzim/İlaç Öncü Terapisi (EPT)	22
1.3.2. Enzimlerin Özellikleri	24

1.3.3. Nitrobileşikler ve Nitroredüktazlar	25
1.3.3.1. Oksijen hassasiyeti Olan (Tip II) ve Olmayan (Tip I) Nitroredüktazlar	26
1.3.3.2. Nitroredüktazların Fizyolojik Görevi	28
1.3.3.3. Nitroredüktazların Kanser Tedavisindeki Yeri	29
1.4. İlaç Öncü Madde	29
1.4.1. İlaç Öncü Madde Dizaynı ve Özellikleri	29
1.4.2. CB1954'ün Kimyasal Yapısı	30
1.4.3. CB1954'ün Aktivasyonu	31
1.4.4. Nitroredüktaz/CB1954 Terapi Sonrası Hücre Ölümü	33
1.4.4.1. Direkt Hücre Ölümü (Programlı Hücre Ölümü)	33
1.4.4.2. Hücreler-Arası Komşuluk Etkisi (Bystander Effect) Sonucu Hücre Ölümü	34
2. MATERYAL ve YÖNTEM	
2.1. Materyal	36
2.1.1. Kimyasal Maddeler	36
2.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler	36
2.1.3. Kullanılan Solüsyonlar	37
2.2. Yöntem	38
2.2.1. Hücre Kültürleri	38
2.2.1.1. Alt Kültürleme	39
2.2.1.2. Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	39
2.2.1.3. Hücre Sayımı	40
2.2.2. <i>In vitro</i> Enzim/ İlaç öncü Terapi Uygulamaları	41
2.2.2.1. Nitroredüktaz/CB1954 Reaksiyon Hazırlanışı ve İnkübasyonu	41
2.2.2.2. Nitroredüktaz/ CB1954 Uygulaması	42
2.2.2.3. Nitroredüktaz/ CB1954 Terapi Sonrası Morfolojik Görüntülerin İncelenmesi	43
2.2.2.4. Nitroredüktaz/ CB1954 Terapi Sonrası Hücre Canlılığının Belirlenmesi	43
2.2.2.5. Nitroredüktaz/CB1954 Terapi Sonrası Apoptozis Tayini	44
3. BULGULAR	46

3.1. Nitroredüktaz/CB1954 Terapisinin Hücre Canlılığına Etkisi	46
3.1.1. Nitroredüktaz (Ntr) Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisi	47
3.1.2. İlaç Öncü Madde (CB1954) Kombinasyonlarının Hücre Canlılığının Etkisi	49
3.2. Nitroredüktaz/CB1954 Terapisi Ardından Sağ Kalım Oranları	52
3.3. Akan Hücre Ölçer (Flow Cytometry) Analizleri	57
3.3.1. Nitroredüktaz/CB1954 Terapisi Ardından Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis) Tayini	57
3.3.1.1. Apotozis Belirteci Fosfotidilserine Bağlanan Toplam Hücre Sayısının Tespiti (Histogramlar)	58
3.3.1.2. Nokta Alan Grafikleri (Dot-plot)	60
3.4. Nitroredüktaz/CB1954 Terapisi Sonrası Morfolojik Görüntülerin İncelenmesi	65
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	68
KAYNAKLAR DİZİNİ	74
ÖZGEÇMİŞ	86

SİMGELER ve KISALTMALAR

5-FC	: 5-Florositozin
ADEPT	: Antikor aracılı enzim ilaç öncü terapisi
Apaf-1	: Apoptozis proteaz aktifleştirici faktör
CAD	: Kaspaz aktifleştirici DNaz
c-AMP	: siklik Adenozin mono fosfat
CB1954	: 5-(aziridinil)-2,4-nitrobenzamid
CD	: Sitozin deaminaz
CDEPT	: Clostridium aracılı enzim ilaç öncü terapisi
Cx	: Konneksin
Da	: Dalton
DAPI	: 4,6-diamidine-2'-phenylindole
DISC	: Ölümü tetikleyen sinyal kompleksi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EPT	: Enzim İlaç Öncü Terapisi
ER	: Endoplazmik Retikulum
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
FADD	: Fas-İlgili ölüm alanı
FasL	: Fas Ligand
FBS	: Fetal Bovin Serum
FITC	: Fluorescein isothiocyanat
FMN	: Flavın mononükleotid
FSC	: İleri Saçılım Kanal Detektörü

GDEPT	: Gen güdümlü enzim ilaç öncü terapisi
HIV	: İnsan Bağışıklı Yetmezliği Virüsü
ICAD	: Kaspaz aktifleştiren DNase inhibitörü
IHC	: İmmüno histokimya
Mg	: Magnezyum
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
NTR	: Nitroredüktaz
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
SSC	: Yana Saçılım Kanal Detektörü
TdT	: terminal deoksinükleotidil transferaz
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TNFR-1	: Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü-1
TRADD	: TNFR-1 ile ilgili hücre ölüm zinciri
TUNEL	: Terminal dUTP Nick End-Labeling
VDEPT	: Virüs aracılı enzim ilaç öncü terapisi
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Karsinogenezin oluşum süreci	3
1.2. Gap bağlantı kompleksinin şematik gösterimi	5
1.3. Apoptozda morfolojik özelliklerin değişim süreci	8
1.4. Apoptotik olayların şematik gösterimi	11
1.5. Apoptotik süreç	12
1.6. Tipik bir akan hücre ölçer (Flow Cytometry) cihazının şematik görünümü	17
1.7. Akan hücre ölçerde verilerin gösterim biçimleri	19
1.8. Tip I ve tip II nitroredüktazların genel mekanizması	27
1.9. CB1954'ün kimyasal yapısı	31
1.10. CB1954'ün <i>E.coli</i> nitroredüktazı ile biyoaktivasyonu	32
1.11. CB1954'ün DT Diaforaz enzimiyle aktivasyonu	32
1.12. Komşuluk etkisinin şematik gösterimi	34
2.1. MTS tetrazolyum tuzunun ve ürünü olan formazanın yapısı	43
3.1. Ntr'nin (0.1 mg/ml) tek başına, 10 µM NADH ve 10 µM CB1954 ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının HeLa hücre canlılığına etkisi	47
3.2. Ntr'nin (0.1 mg/ml) tek başına, 100 µM NADH ve 100 µM CB1954 ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının HeLa hücre canlılığına etkisi	48
3.3. Ntr'nin (0.45 mg/ml) tek başına, 10 µM NADH ve 10 µM CB1954 ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının HeLa hücre canlılığına etkisi	49

3.4. Ntr'nin (0.45 mg/ml) tek başına, 100 μ M NADH ve 100 μ M CB1954 ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının HeLa hücre canlılığına etkisi	49
3.5. 10 μ M CB1954 konsantrasyonunun 0.1 mg/ml enzim varlığında hücre canlılığına etkisi	50
3.6. 10 μ M CB1954 konsantrasyonunun 0.45 mg/ml enzim varlığında hücre canlılığına etkisi	51
3.7. 100 μ M CB1954 konsantrasyonunun 0.1 mg/ml enzim ile hücre canlılığına etkisi	51
3.8. 100 μ M CB1954 konsantrasyonunun 0.45 mg/ml enzim ile hücre canlılığına etkisi	52
3.9. 0.1 mg/ml Ntr enzimi, CB1954 ve NADH ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının 24 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları	53
3.10. 0.1 mg/ml Ntr ile CB1954 ve NADH ikili ve üçlü kombinasyonlarının 48 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları	54
3.11. 0.45 mg/ml Ntr ile CB1954 ve NADH ikili ve üçlü kombinasyonlarının 24 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları	54
3.12. 0.45 mg/ml Ntr ile CB1954 ve NADH ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının 48 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları	55
3.13. 10 μ M CB1954'ün Ntr ve NADH ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının 24 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları	55
3.14. 10 μ M CB1954'ün Ntr ve NADH ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının 48 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları	56

3.15. 100 μ M CB1954'ün Ntr ve NADH ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının 24 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları	56
3.16. 100 μ M CB1954'ün Ntr ve NADH ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının 48 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları	57
3.17. Enzimin tek başına uygulandığı histogram sonuçları	58
3.18. 0.1 mg/ml enzim varlığında üçlü kombinasyonların kontrol hücreleriyle karşılaştırmalı histogram grafikleri	59
3.19. 0.45 mg/ml enzim varlığında üçlü kombinasyonların kontrol hücreleriyle karşılaştırmalı histogram grafikleri	60
3.20. 0.1 mg/ml Ntr'nin 10 ve 100 μ M CB1954 ve NADH ile hücre ölümüne etkisi	62
3.21. 0.45 mg/ml Ntr'nin 10 ve 100 μ M CB1954 ve NADH ile hücre ölümüne etkisi	63
3.22. 0.1 mg/ml Ntr, 10 μ M CB1954 ve NADH'ın HeLa hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	65
3.23. 0.1 mg/ml Ntr, 100 μ M CB1954 ve NADH'ın HeLa hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	66
3.24. 0.45 mg/ml Ntr, 10 μ M CB1954 ve NADH'ın HeLa hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	66
3.25. 0.45 mg/ml Ntr, 100 μ M CB1954 ve NADH'ın HeLa hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler	67

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Apoptozisin ve nekrozisin karşılaştırılması	10
1.2. EPT’de kullanılan enzim ve enzimlerin substratları olan ilaç öncül maddeler ve ilgili aktif ilaçların listesi	23
3.1. Ntr/CB1954/NADH uygulamasından sonra akan hücre ölçer analizinde canlılık ve hücre ölümü yüzdeleri	64

1. GİRİŞ

Konvansiyonel ilaçla tedavi yöntemlerinin aksine Enzim/İlaç öncü terapisi (EPT), doz sınırlaması olmayan ve sistemik toksisiteyi en aza indirgeyen yeni bir kanser tedavi yaklaşımıdır. Hedeflenen bölgede aktif olmayan ilaç öncülünü aktif forma dönüştürecek enzimin ekspresyonunu gerektiren bu yöntemde prensip; normal dokuya zarar vermeden kanser hücrelerini öldürmektir [Palmer et al., 2002; Vass et al., 2009]. Bu olay son derece spesifik gen iletimi ve ekspresyonunu birleştiren gen terapi ile sağlanabilmektedir [Rosenberg et al.,1990]. İlaç öncülünü aktiveleyen enzimler genler aracılığıyla [Prosser et al., 2010] veya viral yolla [Green et al., 1997] hedefe iletilerek hücre içi aktivasyon sonucu hücre ölümüne yol açmaktadır. Enzimlerin antikorlar aracılığıyla [Dalmazzo et al., 2011] hedefe iletilmesi sonucu ise hücre dışı ortamda aktivasyon gerçekleşerek hücre ölümü sağlanmaktadır.

Bugüne kadar ilaç öncülünü aktiveleyecek olan çok sayıda enzimler çeşitli organizmalardan elde edilmiş ve uygun ilaç öncü maddeler ise enzim-substrat ilişkisine göre dizayn edilmiştir [Palmer et al., 2002]. Bunlardan, timidin kinaz/gansiklovir [Fillat et al., 2003], sitozin deaminaz/5-florourasil [Mullen et al.,1992] ve nitroredüktaz/CB1954 [Knox, 1992] enzim/ilaç öncü terapilerinde kullanılan kombinasyonlara örnek olarak verilebilir.

EPT’de oldukça yaygın kullanılan nitroredüktaz enzimleri, aromatik nitro grupları hidroksilamin türevlerine indirgemektedir. Nitroredüktazların klinik ve *in vitro* çalışmalara göre 5-aziridinyl-2,4-dinitrobenzamid (CB1954) ilaç öncülünü DNA ile çağraz bağlar yapan sitotoksik ajana dönüştürerek hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir [Knox, 1992; Anlezark et al., 2002].

Tez çalışmasında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü’nde *S. saprophyticus* suşundan ilk kez izole edilmiş ve saflaştırılmış olan Nitroredüktaz (Ssap-Ntr) enziminin *in vitro* çalışmalarda Enzim/İlaç öncü terapideki etkinliğini saptamak amaçlanmıştır. Ssap-Ntr’nin CB1954 ilaç öncü maddesi ile kombinasyonları serviks epitelyal kanser hücrelerine (HeLa hücreleri) uygulanmış, sitotoksik etkisi doz ve zamana bağlı olarak incelenmiş ve terapi sonrası hücrelerin ölüm mekanizmaları tanımlanmaya çalışılmıştır.

1. 1. Kanser Nedir?

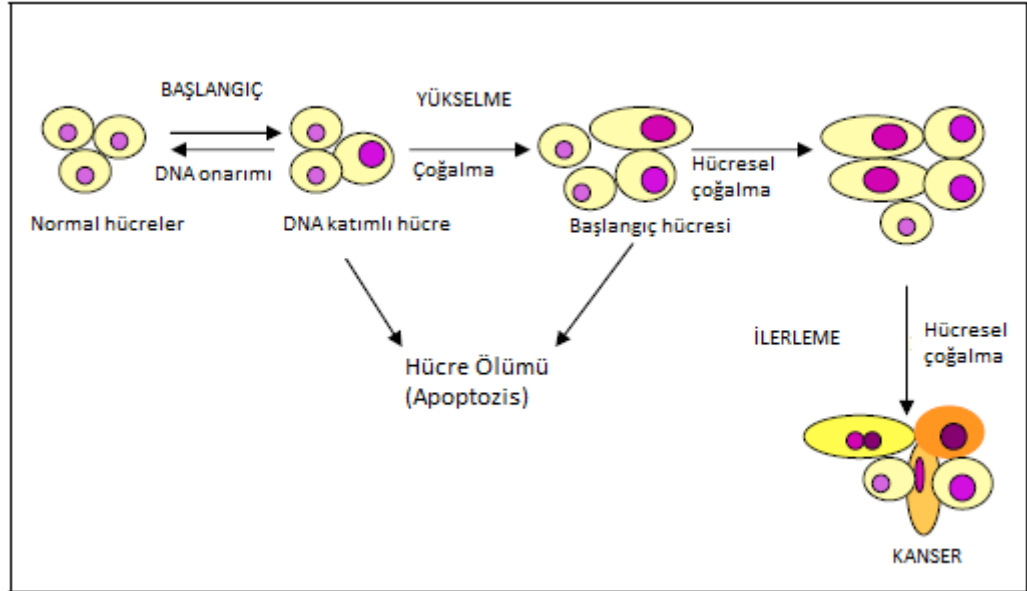
Kanser kelimesi ilk olarak Yunan hekim Hippocrates (M.Ö. 460-370) tarafından yengeç şekline benzemesinden dolayı ve Yunancada yengeç anlamına gelen *carcinus* kelimesini ülser oluşturmeyen tümörler için, *carcinoma* kelimesini ise ülser oluşturan tümörler için kullanılmıştır. Celsus (M.Ö. 28-50) ise bu Yunanca terimi *cancer* kelimesine çevirmiş, Galen (M.S. 130-200) ise Yunancada şişme anlamına gelen *oncos* kelimesini tümörleri tanımlarken kullanmıştır [American Cancer Society, 2012].

Kanser hücreleri kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalan, diğer dokulara yayılma özelliği gösterebilen hücrelerdir [Alberts et al., 2008]. Tümörler; iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere iki grupta incelenir. Malign tümörler tümör anjiyogenezi denen damarlanma sürecinde kendi kanlarını temin edebilirler [Naumov et al., 2006]. Ayrıca malign tümörler kendi kendine çoğalarak farklılaşır ve komşu dokulara saldırarak metastaz yapar. [Hanahan and Weinberg, 2000]. Benign tümörler ise daha yavaş büyür, metastaz yapmaz ve genellikle normal doku fonksiyonunu etkilemez [Player et al. 2004]. Kanserler, türevlendiği doku veya hücre tipine göre sınıflandırılır. Karsinomalar; insan kanserlerinin %80'ini oluşturan epitel hücrelerden türevlenen kanserlerdir. Sarkomlar; kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokudan gelişen solid tümörlerdir. Lösemi ve lenfomalar ise insan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturan, kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişirler [Alberts et al., 2008].

1.1.1. Kanser Hücresinin Özellikleri ve Kanser Oluşumu

Tümör oluşumu çok sayıda genetik, epigenetik ya da somatik değişimler gerektiren çok aşamalı bir süreçtir. Hanahan ve Weinberg, kanser hücresini normal hücrelerden ayırt edebilecek birçok fenotipik özellik sıralamıştır. Bunlardan bazıları büyüme sinyallerine bağlı olmadan gelişmesi, büyümeyi inhibe edici faktörlere hassas olmaması, apoptoza dirençli olması, sınırsız bölünme potansiyeli, anjiyogenezin artması, komşu dokulara yayılım yaparak metastaza sebep olması kanser hücrelerinin temel özelliklerinden bazılarıdır [Hanahan and Weinberg, 2000].

Milyarlarca hücreden oluşan kanser tek bir hücreden orijin alıp çeşitli mutasyonlar sonrası programlı hücre ölümünden (apoptozis) kaçarak neoplastik hücreleri oluşturur. Karsinogenezin oluşum süreci başlangıç (initiation), yükselme (promotion), ilerleme (progression) olmak üzere 3 aşamadan oluşur (Şekil 1.1) [Pitot and Dragan, 1991].



Şekil 1.1: Karsinogenezin oluşum süreci [Oliveira, 2007].

Karsinogenezin başlangıcındaki hücre neoplastik değildir ancak başarılı mutasyonlar sonucu genotipik veya fenotipik değişikliklere uğraması ve hücrenin çoğalmasıyla karsinogenez başlar [Trosko, 2003]. Başlangıç hızlı ve geri dönüşümü olmayan bir süreçtir ve hasara uğrayan DNA'nın onarımı gerçekleşmediği takdirde klonal yayılmayla hücre çoğalmaya başlar ve yavru hücrelere hasarlı DNA aktarılır [Farber, 1984; Oliveira et al., 2007]. Başlangıç aşaması, hedef kök hücrenin asimetrik bölünmesini inhibe eder, sadece simetrik hücre bölünmesi gerçekleşir bu da başlangıç hücresinin bölünmeye her an uyarılacağını ve farklılaşmış yavru hücrenin aksine benzer tipte iki hücre oluşumunu uyarır. Eğer bu hücreler çevre hücreler tarafından baskılanırsa tümör oluşmaz. Diğer yandan çevre hücrelerin baskılayıcı etkisini ortadan kaldıran ajanlar tetiklenirse, farklılaşmayan başlangıç hücresi çoğalarak dokuda birikir. Bu aşamaya karsinogenik sürecin yükselme evresi (promotion) denir [Trosko et al., 1996; Trosko 2003]. Geri dönüşümü olan yükselme aşamasında, promotör bileşenleri direkt olarak DNA ile etkileşim halinde değildir fakat oksidasyon ile DNA'ya zarar verebilir. Ancak promotörlere maruz kalan her

hücre neoplazi oluşturmaz, hücrenin farklılaşmadan bölünmeye uyarılması ve apoptozdan kaçması malign oluşumu tetikler [Oliveira et al., 2007; Trosko, 2001].

Son olarak başlangıç hücrelerine diğer genetik ve epigenetik değişimlerin de eklenmesiyle, başlangıç hücresi birikir ve diğer dokulara metastaz yapabilir. Karsinogenezin bu malign aşaması ilerleme (progression) olarak kaydedilmiştir [Pitot et al., 1981]. İlerleme aşamasında hücre proliferasyonu uyarıdan bağımsızdır ve bu aşamanın karakteristik özellikleri hızlı gelişim, invazyon, metastaz, anjiyogenez, biyokimyasal, metabolik ve morfolojik özelliklerde değişim olarak sıralanabilir [Folkman, 2002].

Kanser hücre seçiliminde oksijen ve besin azlığı en önemli faktörlerdendir. Enerji kaynağı olarak anaerobik glikoliz yapan hücreler oksijen azlığına (hipoksi) ve asidik şartlara dirençlidir. Bu sayede oksijen azaldıkça glikoza olan istek artar (Warburg effect) [Folkman, 2002; DeBerardinis, 2008]. İstenmeyen koşullar altında yaşamını sürdüren bu hücreler kendi kan damarlarına ihtiyaç duymasıyla VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) gibi proanjiyogenik faktörlerin salınımıyla ya da antianjiyogenik faktörlerin azalmasıyla tümör damarlanması başlar. Bu durum, metalloproteinaz gibi ekstraselüler matriksi degrade eden ve endotel hücrelerin göçünü kolaylaştıran proteinlerin varlığıyla da hız kazanır. Yeni oluşan kan damarlarıyla besin ihtiyacını karşılayan tümör hücreleri hızla büyür ve neoplastik hücrelerin bulunduğu tümör yığını oluşturur [Folkman, 2002].

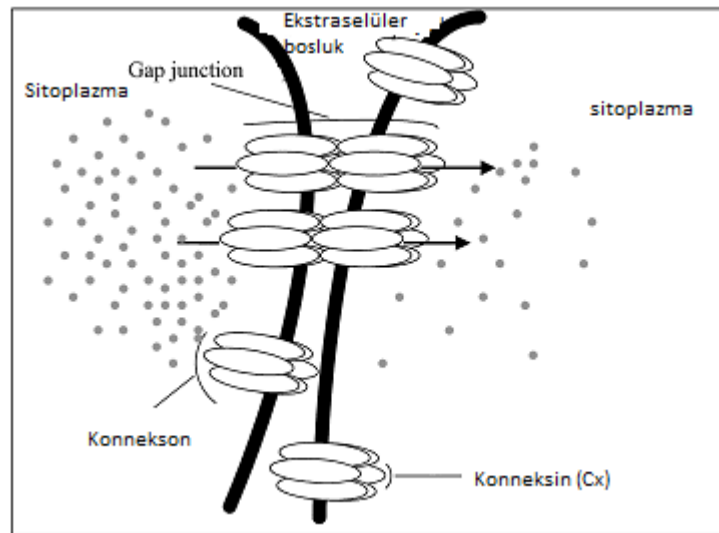
1.1.2. Kanser Hücreleri Arası Birleşmeler ve Bağlantı Kompleksleri

Çok hücreli bir organizmada homeostasi sağlayacak temel iletişim sistemleri bulunmaktadır. Ekstraselüler iletişim (hormonlar, büyüme faktörleri, nörotransmitterler, sitokinler) ve ikincil mesajlarda değişimler aracılığıyla intraselüler iletişim (Ca^{++} , diacylglycerol, pH, ceramides, c-AMP, reactive oxygen species) hücreler arası iletişimi sağlar. İnterselüler iletişim olan iletişimi düzenleyen sinyal iletim sistemleri ise gap bağlantılarıyla (gap junction) sağlanır [Trosko et al., 1993].

Bu iletişimler tümü hücrel gelişimi sürdürebilmek için birbiriyle bağlantılı şekilde, hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını, cevap verme kabiliyetlerini ve apoptozisi etkiler [Trosko and Ruch, 1998].

1.1.2.1. Gap Bağlantı Kompleksleri (Gap Junction)

Gap bağlantıları komşu hücreleri direkt olarak birbirine bağlayan kanallardan oluşur. Yetişkin memelilerde birçok hücre tipinde gap bağlantıları bulunurken, iskelet-kas fiberlerinde, bazı nöronlarda ve dolaşımdaki bazı kan hücrelerinde bulunmaz [Loewenstein, 1981; Bennett et al., 1991]. Her bir gap bağlantı bölgesi plasma membranda bir hemikanal ya da konnekson ile diğer hücrenin konneksonuna ayna simetrisiyle bağlanır (Şekil 1.2). Konnekson, konneksinlerin (Cx) bir araya gelerek oluşturduğu bir heksamerdir [Carystinos et al., 2001].



Şekil 1.2: Gap bağlantı kompleksinin şematik gösterimi [Carystinos et al., 2001].

Gap bağlantı kanalları yaklaşık 1.5-2 nm çapındadır ve iyonlar, su, şeker, amino asit, yağ asidi, küçük peptidler, ilaçlar ve karsinojenler gibi küçük moleküllerin (<2000 Da) direkt olarak pasif difüzyonu bu kanallar aracılığıyla sağlanır [Loewenstein, 1981]. Musil ve Goodenough'ın çalışmalarına göre maddelerin gap bağlantılarıyla bir hücreden diğerine geçmesi golgi aygıtında 6 tane Cx43 altbirimi konneksona oligomerize olduktan sonra plazma membranına gönderilir. Bu noktada konneksonlar hücrel içeriğin sızıntısını ve ekstraselüler maddelerin hücre içine girmesini önlemek için kapanır ve diğer hücrenin

konneksonuna uç uca eklenerek tam bir kanal oluşturarak açılırlar [Musil and Goodenough, 1991].

Neoplastik hücrelerde ise normal hücrelere göre daha az miktarda gap bağlantıları bulunur ve konneksin ekspresyonu düşüktür. Fakat bazı neoplastik hücreleri normal seviyede veya daha fazla miktarda gap bağlantıları içerir. Bu sebeple bu hücrelerde hücreler arası iletişim bağlantı kompleksleriyle sürdürülebilir [Loewenstein, 1979]. Gap bağlantılarının oluşumunu engelleyen birçok faktör bulunur. Gap bağlantılarını önleyen faktörlerden biri olan tümör promotörleri kimyasal olarak çok çeşitlidir ve pestisit (DDT, dieldrin, lindan), farmasötik madde (fenobarbital, diazepam), gıda katkı maddesi (sakkarin), peroksizom proliferatörleri (klofibrat) gibi bileşikler içerirler. Ras, Neu, Src gibi onkogen ürünleri, epidermal büyüme faktörü, platelet büyüme faktörü, temel fibroblast büyüme faktörü de gap bağlantılarının oluşumunu engeller [Ruch, 1994; Trosko et al., 1998].

1.2. Kanser Terapileri Sonrası Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hücrelerin yaşam süresi hücrelerin tipine göre değişir. Miyokard kası hücreleri ve nöronlar ömrümüzün sonuna kadar yaşarlarken bağırsak hücreleri 3-5 gün, deri epidermal hücreleri ise 20-25 gün yaşarlar. Bazı hücrelerimizin ömür boyu yaşamalarına rağmen, ömrümüzün sonuna doğru bu hücrelerin %10-15 ini kaybederiz [Kerr et al., 1972]. Hücre ölümü otofaji, nekrozis ve apoptozis olmak üzere üç temel mekanizmayla gerçekleşir.

1.2.1. Otofaji

Otofajik hücre ölümünde en belirgin morfolojik değişiklik, sitoplazmada oluşan iki veya daha fazla katmanlı zarla çevrili, sitoplazma parçaları ve/veya mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) gibi organelleri içeren veziküllerin varlığıdır. Bu vesiküller lizozoma kaynaşır, içlerinde taşıdıkları yüklerinin lizozomal enzimler tarafından parçalamasını sağlarlar [Gözüaçık, 2013]. Apoptozun mümkün olmadığı durumlarda, uyarıcının miktarı, türü ve uzunluğu gibi değişkenlere bağlı olarak, otofajik hücre ölümü meydana gelir. Clarke'ın tanımladığı otofajik hücre ölümünde kromatin yoğunlaşması gibi çekirdeğe özgü değişiklikler, apoptotik hücre

ölümüyle karşılaştırıldığında daha sonra meydana gelmektedir. Ölüm kaspaz etkinliğine bağlı olmadığından, DNA merdiveni ve apoptotik cisim oluşması gözlenmemektedir. Ayrıca, otofajide ölü hücrelerin fagositoz tarafından temizlenmesi apoptozda görüldüğünden çok daha sonra ve rastgele olmaktadır [Gözüaçık, 2013].

1.2.2. Nekrotik Hücre Ölümü

Nekrozis genellikle dışardan gelen inflamasyon iskemik veya toksik yaralanmalar gibi toksik faktörlere yanıt olarak meydana gelen pasif, katabolik ve patolojik hücre ölüm şeklidir. Apoptozisin aksine fizyolojik şartlar altında gerçekleşmez. Nekrozun en karakteristik özelliği mitokondrinin şişmesi, plazma membranının dağılması, dağınık görünümde olan kromatin ve intak yapıda olan proteinin yıkıma uğramasıdır [Wu et al., 2001]. Nekrotik hücre plazma membranı bütünlüğünü kaybedince hücre içi materyal hücre dışına göç eder ve bu durum inflamasyonun uyarılmasına neden olur. Daha sonra hücre lizize uğrayarak patlar ve hücre içeriği ortama yayılır [Ulukaya, 2003].

1.2.3. Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis)

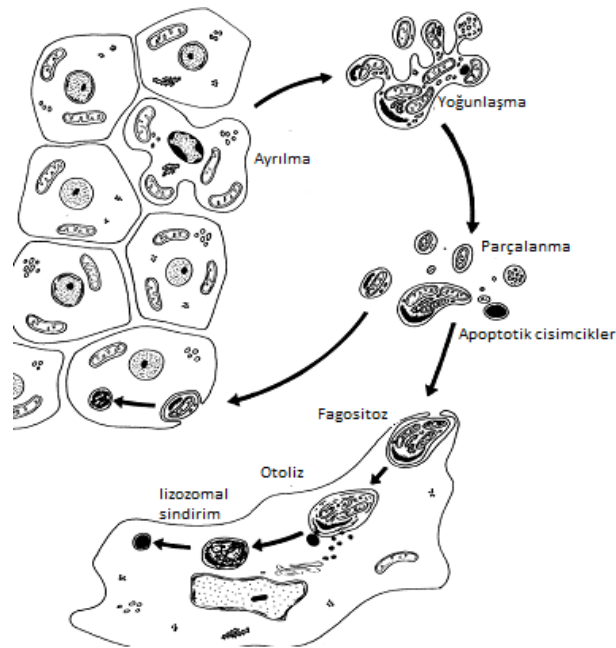
Apoptozis birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (= ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir [Özvaran, 2004]. Apoptozis ilk olarak 1972 yılında John Kerr tarafından programlı olarak hücre ölümüne giden hücre veya dokuların meydana getirdiği morfolojik değişiklikler olarak tanımlanmıştır [Kerr et al., 1972; Curtin and Cotter, 2003].

DNA'nın düzenli parçalara ayrılması [Wyllie, 1980] ve hücre membranında bulunan fosfolipidlerin denilen lipidin apoptotik hücre yüzeyinde oluşumu [Fadok et al. 1992] gibi apoptozise özgü biyokimyasal olayların keşfedilmesi daha sonraki yıllarda gerçekleşmiştir.

Apoptozise giden hücrelerin yapısal değişiklikleri iki ayrı aşamada gerçekleşir (Şekil 1.3). İlk aşamada membranla çevrili sitoplazma, yuvarlak veya oval küçük fragmanlara ayrılır. Meydana gelen bu fragmanlar apoptotik cisimcikler olarak

adlandırılır. İkinci aşamada ise apoptotik cisimcikler ya komşu hücreler tarafından ya da makrofaj gibi fagositoz yapan hücreler tarafından alınır ve otoliz edilir ya da lizozomal enzimlerle parçalanır [Kerr et al., 1972]. Bu nedenle apoptotik cisimcikler inflamasyona sebep olmazlar [Ulukaya, 2003].

Kümeler halinde intraselüler boşlukta oluşan apoptotik cisimciklerin içeriği sitoplazmik bileşenlere bağlıdır, küçük cisimcikler genellikle yoğunlaşan kromatinin neredeyse tamamını içerirken, diğer cisimcikler sadece sitoplazmik sıvıyı içerirler [Kerr et al., 1972].



Şekil 1.3: Apoptozda morfolojik özelliklerin değişim süreci [Kerr et al., 1972].

Apoptozisin en belirgin özelliklerinden biri de DNA'nın internükleozomal bölgelerinden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsünün (ladder pattern) ortaya çıkmasına neden olur. Diğer yandan yaklaşık 50 kilo bazçifti (kbp) boyutunda DNA fragmentasyonu da gerçekleşebilir. Bu durum hücre tipine bağlıdır. Ca/Mg-bağımlı bir endonükleaz ile birlikte DNase I ve II de DNA parçalanmasından sorumludur. Apoptozisde hangi enzimin yer alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir [Ulukaya, 2003].

Apoptotik hücrelere özgü belirgin özelliklerden biri de fosfatidilserinin, membranın dışına transloke olmasıdır. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar. Ayrıca bu durum akan hücre ölçerinde (Flow cytometry) kalsiyum-bağımlı bir aşamayla florokrom işaretli Anneksin V denilen antikorun fosfatidilserine bağlanması belirtici bir unsur olarak kullanılır [Vermes et al., 1995; Zhang et al., 1997; Ulukaya, 2003].

Fosfatidilserinin lipit bilayerden dış kısma göç etmesi hızlıdır ve pasif difüzyon yerine kolaylaştırılmış difüzyon aracılığıyla gerçekleşir. Bu olay, kalsiyum ile aktifleşen, ATP-bağımsız bir protein olan skramblaz aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir [Verhoven et al, 1995].

Fosfatidilserin translokasyonu ile ilgili iki mekanizma ileri sürülmüştür. İlk mekanizmaya göre membran proteini olan aminofosfolipid translokaz, fosfatidilserinin iç kısımdan dış kısma transfer edilmesini sağlar [Zachowski, 1993; Williamson and Schlegel, 1994]. Bu proteinin apoptotik hücrelerde belirli konsantrasyonlarda Ca^{+2} ile inhibe olabilen Mg^{+2} -ATPaz proteini olduğu düşünülmektedir. İkinci mekanizma ise fosfatidilserinin membran iskelet proteinlerine (fodrin gibi) bağlandığını öngörmektedir [Fadok et al., 1998].

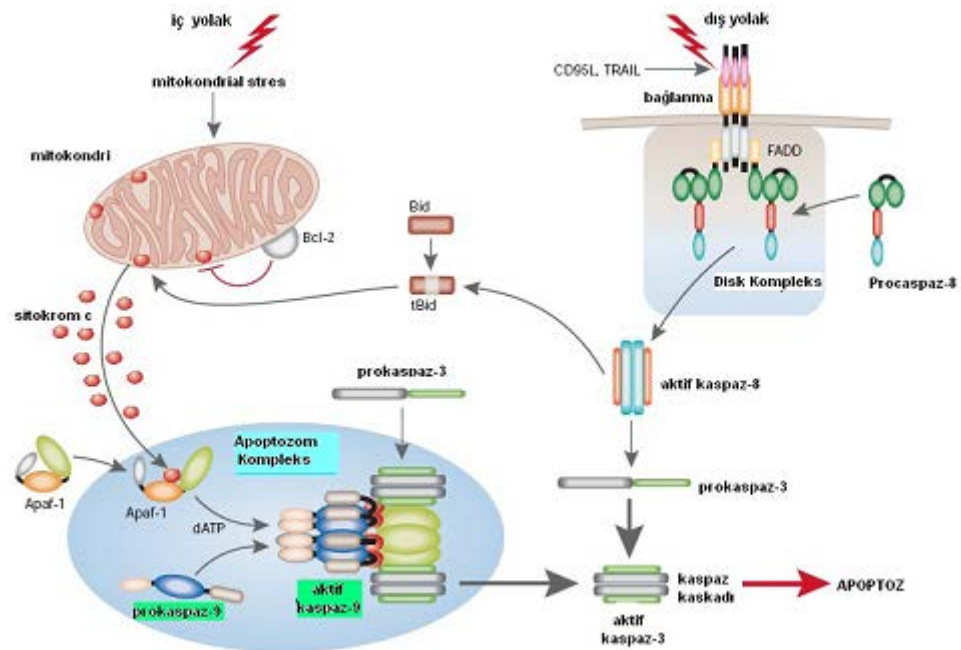
Programlanmış hücre ölümü (apoptozis) erken ve geç olmak üzere iki aşamada incelenebilir [Allen et al., 1997]. Erken apoptozda mitokondriyal membran potansiyelinde azalma, fosfatidilserinin yer değiştirmesi, polarite kaybı, kromatin kondensasyonu oluşurken geç apoptozda ise DNA fragmentasyonu ve membran hasarı sonrasında hücrede sitoplazmik çıkıntılar meydana gelir [Metivier et al., 1998; Zwaal and Schroit, 1997].

Tablo 1.1: Apoptozisin ve nekrozisin karşılaştırılması [Ulukaya, 2003].

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması "Senescence" HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
Morfolojik özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin "flocculation"u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücrenin intact mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümün geç safhasında)	İyi kontrollu, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C'de gerçekleşmez) DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirteci) Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

1.2.3.1. Apoptozisin Moleküler Mekanizması

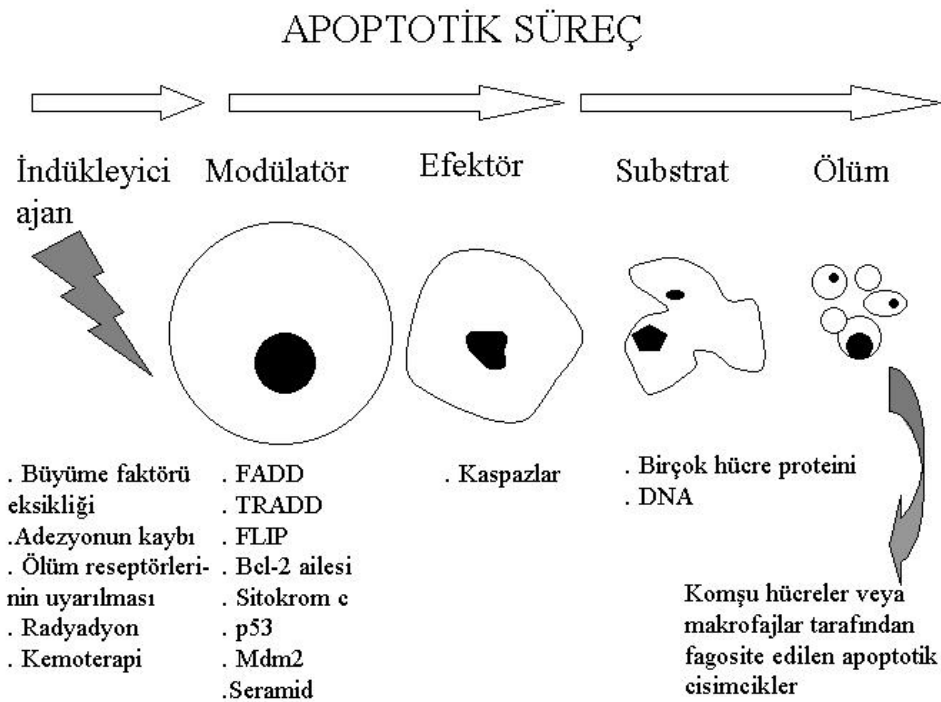
Apoptozis mekanizması oldukça karmaşık, enerji bağımlı moleküler olaylar kaskadıdır. Bugüne kadar tanımlanmış iki önemli apoptotik yolak vardır. Bunlardan birincisi dış nedenler (extrinsic) aracılığıyla uyarılan ölüm reseptörleri yolağıdır. Diğeri ise iç nedenler (intrinsic) aracılığıyla uyarılan mitokondriyal yolağıdır. Bu iki yolak birbirine bağılıdır ve yolakların birindeki moleküller diğeri etkileyebilir [Igney and Krammer, 2002]. Başka bir yolak ise T-hücre aracılı sitotoksisiteyi içeren perforin/granzim yolağıdır. Bu yolakta ya granzim A ya da granzim B aracılığıyla apoptozis indüklenir. Granzim A yolağı kaspaz bağımsız apoptoz ile sonuçlanırken diğeri yolaklar kaspaz-3'ün yıkılması, DNA fragmentasyonu, hücre iskeletinin ve nüklear proteinlerin parçalanması, apoptotik cisimciklerin oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligand sentezi ve son olarak apoptotik cisimciklerin fagosite edilmesiyle sonuçlanır (Şekil 1.4) [Polat, 2008].



Şekil 1.4: Apoptotik olayların şematik gösterimi [Polat, 2008].

1.2.3.2. Apoptozisin Düzenlenmesi

Apoptotik süreç birbirini takip eden üç aşamadan meydana gelir. Apoptozun tetiklenmesi (indüklenmesi), apoptotik sinyallerin düzenlenmesi ve sinyallerin ilgili moleküllere aktarılarak apoptozisin meydana gelmesi aşamalarını kapsar (Şekil 1.5). Apoptozisi tetikleyen faktörler patolojik ya da fizyolojik (büyüme faktörü eksikliği, ölüm reseptörlerinin uyarılması, DNA hasarı, sitokinlerin azalması) olabilir. Düzenleyici faktörler ise gelen ölüm sinyallerinin etkisinin antiapoptotik uyarılara karşı arttırılmasından sorumludur. Düzenleyici faktörlerin efektörleri aktifleştirmesiyle de apoptozis geri dönüşümü olmayan sürece girer [Wu et al., 2001].



Şekil 1.5: Apoptotik süreç. İndükleyici ajanlarla tetiklenmeyi, modülörler aracılığıyla düzenlenmeyi ve kaspazlar aracılığıyla da geri dönüşümü olmayan programlı hücre ölümünü kapsar [Ulukaya, 2003].

Apoptozis bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) tarafından düzenlenen bir mekanizmadır. Apoptotik süreç boyunca hücre içine kalsiyum girişi olur. Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağımlı endonükleaz aktivitesiyle DNA 180-200 baz çiftlik fragmentlere ayrılır [Bortner et al., 1995].

1.2.3.3. Apoptozisi Tetikleyen Faktörler

Apoptozisi başlatan çeşitli nedenler vardır. Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi sonucu tetiklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. TNF reseptör ailesi sistein bakımından zengin ekstraselüler bölgeleri ve 80 amino asitlik sitoplazmik ölüm bölgeleri içerirler. Fas'ın ilgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve doğal katil hücrelerinde (natural killer cells) bulunur [Ulukaya, 2003; Ashkenazi and Dixit, 1998].

Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein etkileşimlerinden geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (death domain) adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain) ve FADD (Fas associated death domain) ile etkileşime girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8 ile ölüm efektör bölgesinin dimerizasyonu aracılığıyla birleşerek ölüm indükleyen sinyal kompleksini (DISC-death inducing signaling complex) oluşması ve prokaspaz-8'in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanır [Ulukaya, 2003; Kischkel et al., 1995].

Apoptozisin düzenlenmesinde Bcl-2 protein ailesi büyük bir öneme sahiptir. Pro-apoptotik (apoptozu başlatan) ya da anti-apoptotik (apoptozu baskılayan) etkiye sahip Bcl-2 protein ailesi mitokondriyal membran geçirgenliğini yönetir. Bcl-2 ailesinde bugüne kadar toplam 25 gen tanımlanmıştır. Bunlardan pro-apoptotik olanlara Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk anti-apoptotik olanlara ise Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG örnek olarak verilebilir. Bcl-2 protein ailesi mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirerek mitokondriden sitokrom c salınımını düzenlediği düşünülmektedir [Elmore, 2007]. Fas yolağında mitokondri hasarı Bid'in kaspaz-8 kırığı aracılığıyla olur [Li et al., 1998]. Bad'ın serin fosforilasyonu fosfoserin bağlanma molekülleri tarafından sitosolde tutulmasına sebep olur. Ancak Bad fosforillenmezse mitokondride translokasyonu sonucu sitokrom c salınımı uyarılır [Zha et al., 1996].

1.2.3.4. Kaspazların Aktivasyonu

Apoptozisi tetikleyici faktörlerin hepsi mitokondrinin iç zarında değişikliklere yol açar. Mitokondriyal geçirgenlik zarının açılmasıyla transmembran potansiyelinde kayıp olurken, intermembran boşluktan da iki temel pro-apoptotik protein sitosole salınır [Saelens et al., 2004].

Birinci grupta Sitokrom c, Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi proteinleri kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive eder. Sitokrom c, Apaf-1'e ve prokaspaz-9'a bağlanır ve aktive eder sonucunda ise apoptozom denilen yapıyı oluşturur [Chinnaiyan, 1999]. İkinci grupta ise apoptoz sırasında mitokondriden salınan pro-apoptotik proteinler olarak AIF, endonükleaz G and CAD bulunur. AIF nükleusa taşınır ve DNA'nın 50-300 kbp'lik parçalara ayrılmasına ve kromatinin nükleus periferinde yoğunlaşmasına neden olur. AIF gibi kaspaz bağımsız olan Endonükleaz G de kromatin yoğunlaşmasına sebep olur. CAD ise mitokondriden salınır ve kaspaz-3 ile kırıldığında oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna ve kromatinin daha çok yoğunlaşmasına sebep olur [Enari et al., 1998; Le et al., 2005; Susin et al., 2000]. Herhangi bir başlangıç kaspazı (kaspaz-8, kaspaz-9 veya kaspaz-10) ile aktive edilebilen ve en önemli kaspazlardan biri olarak düşünülen kaspaz-3, endonükleaz CAD'ı spesifik olarak aktive eder. Hücreler çoğalırken CAD, inhibitörü ile (ICAD) kompleks halindedir. Apoptotik hücrelerde ise aktive olan kaspaz-3 ICAD'ı kırarak CAD'ı serbest bırakır. CAD ise kromozomal DNA'yı parçalar ve kromatin yoğunlaşmasına sebep olur [Sakahira et al., 1998].

1.2.3.5. Apoptozis Tayininde Kullanılan Yöntemler

Apoptozisin belirlenmesinde morfolojik görüntüleme yöntemleri, immunohistokimyasal yöntemler, biyokimyasal yöntemler, immunolojik yöntemler ve western blotlama gibi moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmaktadır.

1.2.3.5.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

Hücrelerin morfolojik yapısını incelemek için ışık mikroskobu, floresan mikroskobu, elektron mikroskobu ve faz kontrast mikroskobu kullanılabilir.

Işık mikroskobu çok eski yöntemlerden biri olup apoptozisin morfolojik tayininde kullanılır. Hematoksilen-Eosin, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi olarak sayılabilir. Fakat apoptozis başlangıcını takiben 30-60 dakika içerisinde fagositler tarafından apoptotik hücreler hızlıca uzaklaştırıldığı için ışık mikroskobu bir deavantaja sahiptir [Kerr et al., 1972]. Diğer bir boyama yöntemi olan Giemsa ise, hematoksilen-eozin ile boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır [Güleş ve Eren, 2008].

Floresan mikroskobu ile apoptozis tayininde, Hoechst boyası, DAPI “4,6-diamidine-2'-phenylindole”, propidium iyodür, akridin orange, etidyum bromür, FITC (fluorescein isothiocyanate) gibi floresan maddeleri kullanılır. DNA'ya bağlanabilen floresan boyalar sayesinde hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelir. Bu yöntem canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanırken, ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayırımını yapabilmek için hematoksilen boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılır [Ulukaya, 2003; Doonan and Cotter, 2008].

Faz kontrast mikroskobu sadece hücrelerin kültür ortamında, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları yüzeyden ayrılacakları için besiyeri içinde yüzmeye başlarlar bu sayede faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler [Güleş ve Eren, 2008].

Elektronmikroskobu apoptozis tespitinde morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilir [Doonan and Cotter, 2008].

1.2.3.5.2. Histokimyasal Yöntemler

En sık kullanılan histokimyasal yöntemler; Anneksin V, TUNEL ve kaspaz-3 yöntemleridir. Apoptozise giden hücrelerde hücre membranının dış yüzeyine transfer eden fosfatidilserine, FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenen Anneksin V proteininin bağlanması apoptotik hücrelerin görünür hale gelmesini sağlar. TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling) yönteminde ise, apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) enzimi kullanılarak, DNA'nın işaretlenmesi esasına dayanır. Konvensiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretleme ardından floresan görüntüleme yapılır [Elmore, 2007]. Kaspaz-3 yöntemiyle ise sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 IHC metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu methodla tespit edilebilirler [Ulukaya, 2003].

1.2.3.5.3. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

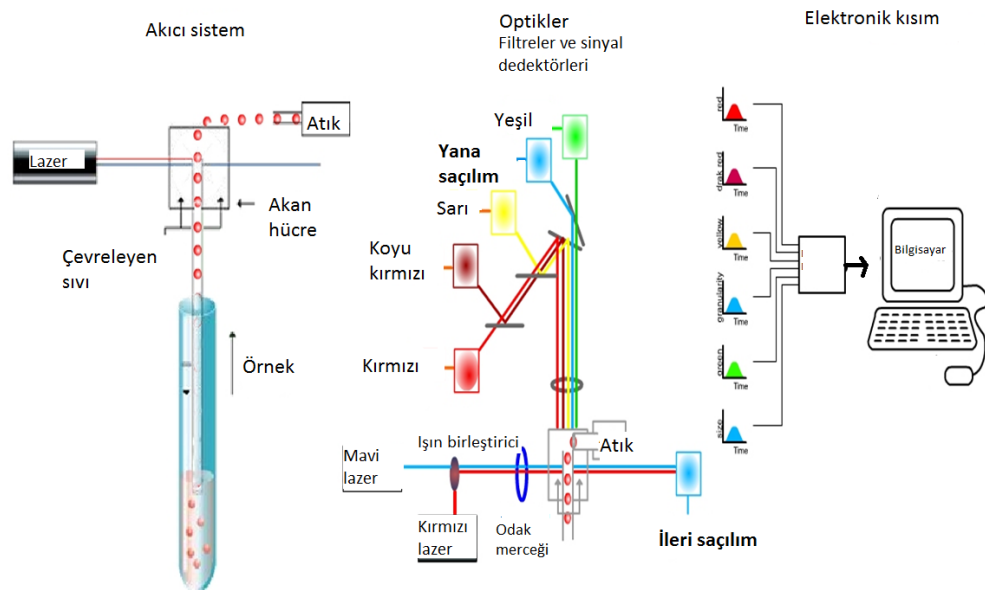
Apoptozis tayininde en çok kullanılan moleküler biyoloji yöntemi Western blot yöntemidir [Ulukaya, 2003]. Western blotlama ya da immunoblotlama denilen bu işlem, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob olarak kullanılarak ilgili protein karışımının içinden saptanabilir [Bardakçı ve Yenidünya, 2007]. Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (bcl-2 gibi) ya da kırılıp kırılmadıklarının (kaspaz-3 gibi) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu methodla belirlenebilir [Güleş ve Eren, 2008].

1.2.3.5.4. Akan Hücre Ölçer (Flow Cytometry)

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Akan hücre ölçerlerde ise süspansiyon halindeki hücreler lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışık önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özelliklerinin yanı sıra, hücreye bağlanan çeşitli florokromları da sinyal kaynağı olarak kullanabilir. Böylece hücrelerin immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktivitesi, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir [Dalva; Dunphy, 2004; Taneli, 2007].

Akan hücre ölçer tekniği son derece hızlıdır, kısa sürede binlerce hücreyi analiz ederek, detaylı sonuç raporları elde edilir. Heterojen bir örnek popülasyonunda, hücrelerin ve bileşenlerinin çok parametrelili kantitatif özellikleri çok kısa bir sürede analiz edilebilir. Akan hücre ölçer tekniği ile 1 saniyede 500 hücre sayılabilir ve ortalama 10 000 hücre 20 saniyede analiz edilebilir [İbrahim ve Engh, 2007].

Akan hücre ölçer cihazı başlıca akıcı (sıvı) sistem, optikler (lazer ışını), filtreler ve sinyal dedektörleri, bilgisayar ve yazılım programları bileşenlerinden oluşmaktadır (Şekil 1.6) [Rahman, 2006].



Şekil 1.6: Tipik bir akan hücre ölçer cihazının (Flow Cytometry) şematik görünümü [Rahman, 2006].

Akıcı sıvı sistemi bir kanaldan oluşur ve örnek buradan cihaza verilir. Merkezdeki örneği içeren sıvı (laminar fluid) ve çevreleyen sıvı (sheath fluid) birbirine karışmadan ilerlemektedir (Şekil 1.6). Hidrodinamik odaklanma etkisiyle partiküller tek bir sıra şeklinde dizilirler. Hücreler lazer ışınının önüne tek sıra halinde taşınmak suretiyle tek hücre analizi yapılır.

Akan hücre ölçerde ışık kaynağı olarak ksenon ve ksenon civa lambalar kullanılırken, sıklıkla argon ve helyum lazer ışık kaynağı da kullanılır [Taneli, 2007].

Akan hücre ölçerde kullanılan filtre ve dedektörler

Hücrelerden gelen ışık saçılımı ve floresan emisyonu filtre ve dedektörlerde dijital sinyallere dönüşür. Her bir dedektör ve filtre farklı bir veri sağlar. Işın öne doğru yayıldığında tipik olarak lazer ışınıyla aynı yönde 20° etrafa yayılan ışınlar İleri Saçılım Kanal Detektörü (Forward Scatter Channel Detector FSC) yardımıyla toplanır. FSC hücre yüzey alanları ve büyüklüğü ile ilgili bilgi verir. Yana Saçılım Kanal Detektörü (Side Scatter Channel Detector SSC) ile eksitasyon çizgisine yaklaşık 90° açıyla yayılan ışık ölçülür. Böylece hücrelerin granüler içerikleri ve iç yapısı hakkında bilgi toplanır. Antikor aracılığıyla antijene bağlanmak için kullanılan renk maddelerine florokrom madde (floresan antikor) denir. Florokrom maddeler sayesinde direkt olarak hedefin tespiti sağlanır. Floresan ölçümler florokromla işaretlenmiş hücre yüzey reseptörleri ya da sitokin ve DNA gibi intraselüler moleküller hakkında bilgi verir. FITC-Anneksin V, negatif yüklü fosfolipid yüzeylere bağlanır, fosfotidilserine yüksek afinitesi vardır, apoptotik hücreleri tanımlamada hassastır ve bağlanma sırasında kalsiyum ve diğer tuzların konsantrasyonu önemlidir [Rahman, 2006].

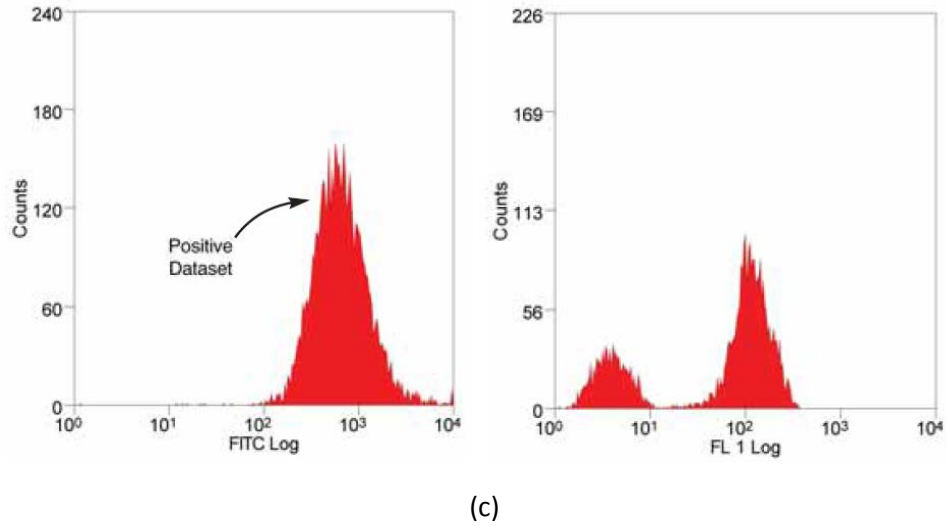
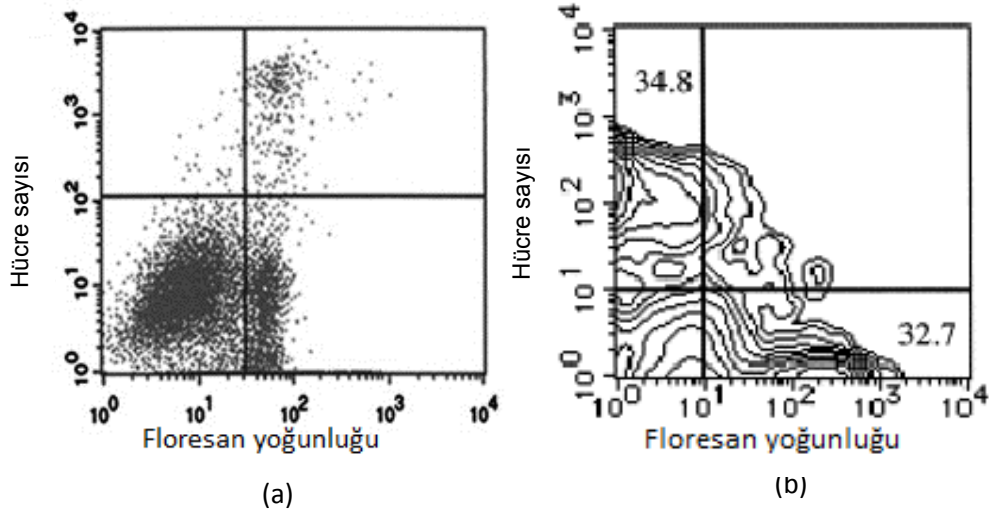
Akan Hücre Ölçerde Verilerin Değerlendirmesi

Elde edilen veriler farklı grafikler kullanılarak gösterilebilir. Bunlardan bazıları nokta alan grafikleri, kontur alan grafikleri, histogram, 3 boyutlu grafik, bölgeler, kapılar ve istatistik olarak sınıflandırılabilir (Şekil 1.7).

Nokta alan grafiği: FSC/SSC grafiği gösterilmektedir. Granülositler, lenfositler ve monositler farklı fiziksel özelliklerine göre grafiğe noktalama tekniğiyle dağılmıştır.

Kontur diyagramı: Dansite haritasına benzer. Benzer sayıdaki hücreleri gösteren noktaların çizgisel olarak birleştirilmesiyle oluşur.

Tek parametrelili histogram: y eksenini hücre sayısını, x eksenini analizi yapılan tek parametrenin floresan şiddetini gösterir. Histogramların istatistiksel verileri otomatik olarak cihaz yazılımlarıyla hesaplanır.



Şekil 1.7: Akan hücre ölçerde verilerin gösterim biçimleri. (a) Nokta alan (dot plot) grafiğinde her bir nokta bir hücreye karşılık gelir (b) kontur grafiği x ve y parametrelerine göre hücre sayısındaki değişimi gösterir (c) histogram grafiğinde saçılan ışık hücre sayısı (counts-number of events) ile ilişkili olarak gösterilir [Yin et al., 2011; Tanahashi et al., 2001; Rahman 2006].

Bölgeler: Histogram ve nokta alanlar içinde popülasyon alt gruplarının istatistiğini yapmak için kullanılırlar.

Kapılar: Bir veya daha çok bölge içerebilir. Başlıca analiz edilen alandaki dışlanmak istenen olguların uzaklaştırılması veya azaltılmasında, ilgilenilen hücre veya partiküllerin izole edilmesinde, renklendirme yapmak amacıyla kullanılabilir.

Erken apotozis döneminde hücredeki büzüşmeye bağlı olarak FSC'de azalma meydana gelirken, SSC'de başlangıçta farklılık gözlenmese de bazı hücrelerde SSC'nin kromatindeki ve sitoplazmadaki yoğunlaşmayı yansıtabilecek şekilde arttığı gözlenir. Hücre büzüşerek geç apoptozise yaklaştığında ise SSC'nin de azaldığı gözlenir. Nekrozis olayında ise şişme gerçekleştiğinden FSC başlangıçta bir artış gösterir fakat plazma membranının yırtılıp sitozolün boşalmasıyla FSC ve SSC'de belirgin bir azalma gerçekleşir [Ward, 1999].

1.3. Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavileri geçmişten günümüze cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve gen terapi ile yapılmaktadır [Oliveira et al., 2010; Krumm and Lamberti, 1993; Kutluk ve Kars, 2001] .

Kemoterapi, kimyasal ajanların kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılmasıdır. Fakat kemoterapinin birçok sınırlaması vardır: bunlardan bazıları; hastaya uygulanacak ilaç miktarının sınırlı olması, ilaca dirençli tümör hücrelerinin varlığı, sistemik toksisiteye sebep olması, tümör hücrelerinin normal hücrelerden ayırt edilememesidir [Oliveira et al., 2010].

Radyoterapi hastanın genel sağlık durumuna, kanserin türüne ve şiddetine göre yüksek enerji ışınları kullanılarak uygulanmaktadır. Uygulanan radyasyon dozu son derece önemlidir. Çünkü tedavi sırasında uygulanan radyasyon dozu over fonksiyonlarını durdurarak geri dönüşümsüz steriliteye neden olabilmektedir. Vajen epitelinde ise eritem, enflamasyon, mukozal atrofi, elastikiyet kaybı ve vajinal dokuda ülserasyona neden olabilmektedir [Krumm and Lamberti, 1993; Wilmoth ve Botchway 1999; Reis, 2003].

Vücutun bağışıklık sistemini uyarmanın kanser tedavisinde etkili olabileceği yolunda kanıtlar vardır. Bağışıklık sistemini bozan çeşitli hastalıklarda daha sık kanser görülmesi de immünoterapinin etkili olacağını düşündürmektedir. Bu amaçlarla interlekin, interferon gibi biyolojik moleküller kullanılmaktadır [Kutluk ve Kars, 2001].

Gen terapi çalışmaları moleküler hücre biyolojisinde bulunan yeni yöntemler sayesinde son yıllarda oldukça hız kazanmıştır. Gen tedavisi hastalığı önlemek ya da tedavi etmek için bir kişinin genlerinin ekspresyonunun değiştirilmesidir [Strachan and Read, 2004]. Toksik olmayan gen aktarım sistemlerinin yetersizliği gen terapi için önemli bir engeldir. Gen terapinin kanser tedavisinde uygulama alanının artması için tedavi genlerinin hücrelere yeterli dozda aktarılabilmesi, kanser hücrelerinin hedeflenebilmesi ve aktarılan genlerin vücutta tutulabilmesi gerekmektedir. Günümüzde gen terapide rutinde kullanılan Gencidine, p53 tümör baskılayıcı geni taşıyan rekombinant adenoviral vektördür ve hepatoselüler kanserlerde kullanılmaya başlanmıştır [Peng, 2005].

1.3.1. Enzim/İlaç Öncü Terapisi (EPT)

Enzim/ilaç öncü terapisi (EPT) ekzojen enzimlerle üretilen sitotoksinler aracılığıyla, hedeflenen kanser hücrelerinin ve komşu hücrelerin yok edilmesini içeren kanser tedavisidir [Hunt et al., 2012].

Sistemik olarak uygulanan ilaç öncü madde, enzim varlığında son derece aktif, sitotoksik ve antikanser ilaca dönüşerek, kanser hücrelerinin ölümüne yol açar [Xu and Mcleod, 2001; Hunt et al., 2012].

Bu terapi ilk aşamada ilacı aktifleştiren enzimin tümör dokuda ekspres ettirilmesi esasına dayanır. İkinci aşamada ise toksik olmayan ve dışarıdan gönderilen (ekzojen) enzimin substratı olan ilaç öncülü sistemik olarak uygulanır [Xu and Mcleod, 2001].

Spesifik aktivasyonları, dokuya özgü enzimin konsantrasyonuna bağlı olan ilaç öncü maddeler, yüksek dozda uygulandığında bile aktif olmayan (etkisiz) fakat hedef dokuda toksik türlere dönüştürülebilen kimyasallardır [Greco and Dachs, 2001].

Tümör hücrelerinin, ilaç öncülünü aktifleştirmeye yeterli miktarda enzimi ekspres etmeleri oldukça zordur. Ayrıca enzimin tümör çeşidine özgü ekspres olmaması da Enzim/ilaç öncü terapilerine çeşitli yenilikler getirilmesine olanak sağlamıştır [Prosser et al., 2010]. Son yıllarda geliştirilen yöntemlerden bazıları gen ya da virüs iletimiyle yönlendirilmiş enzim/ilaç öncü terapisi (Gene-Virus Directed Enzyme Prodrug Therapy-GDEPT ya da VDEPT), antikor-aracılığıyla yönlendirilmiş enzim/ilaç öncü terapisi (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy-ADEPT), Clostridia ile yönlendirilmiş enzim/ilaç öncü terapisi (Clostridia Directed Enzyme Prodrug Therapy-CDEPT). EPT'de en sık kullanılan enzim ve ilaç öncü madde kombinasyonları Tablo1.2'de listelenmiştir [Anlezark, 1992].

Tablo 1.2: EPT’de kullanılan enzim ve enzimlerin substratları olan ilaç öncül maddeler ve ilgili aktif ilaçların listesi [Anlezark, 1992].

Enzim	İlaç öncü madde	Aktif ilaç
Nitroredüktaz	5-(aziridinil)-2,4-nitrobenzamid (CB1954)	5-(aziridinil)-4-hidroksil amino-2-nitrobenzamid
	4-Nitrobenziloksikarbonil türevleri	Eg aktinomisin D, mitomisin C
DT diaforaz	5-(aziridinil)-2,4-nitrobenzamid (CB1954)	5-(aziridinil)-4-hidroksil-amino-2nitrobenzamid
Plazmin	Peptidil-p-fenilendiamin-mustard	Fenilendiamin-mustard
Karboksipeptidaz G2	Benzoik asit hardal glutamatları	Benzoik asit hardal çeşitleri
Timidin kinaz (viral)	Gansiklovir	Gansiklovir trifosfat
	6-metoksipürin arabinonükleosit (araM)	Adenin arabinonükleosid
Sitozin deaminaz	5-Florositozin	5-Florourasil
Glikoz oksidaz	Glikoz	Hidrojen peroksit
Ksantin oksidaz	Hipoksantin	Süperoksit, hidrojen peroksit
Karboksipeptidaz A	Metotreksat-alanin	Metotreksat
α -Galaktosidaz	N-[4-(-D-galaktopiranosil) Benziloksikarbonil]-daunorubisin	Daunorubisin
β -Glukosidaz	Amigdalın	Siyanür
Azoredüktaz	Azobenzen hardalları	Fenilendiamin hardalları
γ -Glutamil transferaz	γ -Glutamil-p-fenilendiamin hardalı	Fenilendiamin hardalı
β -Glukuronidaz	Fenolmustard-glukuronid	Fenolmustard
	Epirubisin-glukuronid	Epirubisin
β -Laktamaz	Vinka-sefalosporin	4-deasetilvinblastin-3-
	Fenilendiamin hardalı-sefalosporin	karboksihidrazid
	Nitrojen hardalı-sefalosporin	Fenilendiamin hardalı Nitrojen hardalları
Alkalın Fosfataz	Fenolmustard fosfat	Fenolmustard
	Doksorubisin fosfat	Doksorubisin
	Mitomisin fosfat	Mitomisin alkol
	Etoposit fosfat	Etoposit
Penisilin amidaz	Palitoksin-4-hidroksifenil-asetamid	Palitoksin
	Doksorubisin-fenoksiasetamid	Doksorubisin
	Melfalan-fenoksiasetamid	Melfalan
Sitokrom P-450	Siklofosfamid	Forfamid hardalı

1.3.2. Enzimlerin Özellikleri

Uygun enzim/ilaç öncü kombinasyonun seçiminde öncelik enzime verilmelidir. Çünkü ilaç öncü maddeler enzimin substrat özelliklerine göre dizayn edilebilir [Connors, 1995]. Bunların ışığında enzimler protein modifikasyonlarına uygun olmalı, monomerik olmalı, moleküler ağırlığı düşük olmalı ve glikosilasyona gerek duymamalıdır [Greco and Dachs, 2001].

Enzimlerin fizyolojik şartlar altında katalitik aktivitesi yüksek olmalı (k_{cat} değeri=katalitik aktivite), substrat düşük konsantrasyonda olsa bile ilaç öncü aktivasyonu hızlı ve etkili olmalı, enzimin tek başına varlığı sitotoksositeye sebep olmamalıdır. Normal dokularda istenmeyen ilaç öncü aktivasyonunun gerçekleşmemesi için reaksiyon yolağı diğer endojen enzimlerden farklı olmalıdır. [Greco and Dachs, 2001].

İnsan orijinli proteinler seçilecek ise hedeflenmeyen dokuda aktivasyonu önlemek için, normal dokularda düşük konsantrasyonda ekspres olmalıdır [Xu and Mcleod, 2001]. İnsan orijinli proteinlerin kullanımı dezavantaj iken bağışıklığın meydana getirebileceği komplikasyonları önlemede avantaj sağlar. Diğer yandan eğer immün yanıt oluşumu kontrol altına alınabilirse, enzimin mikrobiyolojik orijinli olması hedef bölgeye özgü aktivasyonu kolaylaştıracaktır [Han, 2000; Greco and Dachs, 2001].

İnsan tümör dokularında aktifleşen enzimin yeteri kadar yüksek düzeyde ekspres edilememesi ve enzimlerin herhangi bir tümör tipine bağlı olmaması klinik uygulamalarda hayal kırıklığı sonucunu doğurabilir ancak bu sınırlamaların üstesinden gelebilecek yeni yaklaşımların bulunması enzim/ilaç öncü terapilerini gelecekte ümit vaad edici bir noktaya getirmektedir [Han, 2000].

1.3.3. Nitrobileşikler ve Nitroredüktazlar

Nitroaromatik ve nitroheterosiklikler gibi türevleri olan nitrobileşikler heterosiklik veya aromatik nükleusta bulunan bir veya daha fazla nitro grubun varlığına göre sınıflandırılan bileşiklerdir [Race et al., 2005].

Yıllarca nitro-yerdeğiştiren bileşikler yapılandırma aşamalarında antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılmıştır. Son zamanlarda birçok nitro-poliaromatik bileşikler çeşitli yanma proseslerinin yan ürünü olarak tanımlanmışlardır. Bütün bu bileşikler bakteriyel mutajenler, memeli hücre mutajenleri, klastojenler ve fare karsinojenleri olarak birçok nitro türevlerinin tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır [Whiteway et al., 1998].

Nitroaromatik bileşikler (nitrofuran, nitrofiren ve nitrobenzen gibi) farmasötik, antimikrobiyal ajan, katkı maddesi, pestisit, boya ve endüstride ham madde olarak kullanılmakla birlikte doğada yaygınlaşmış ve önemli kirletici maddeler olarak kaydedilmiştir [Spain, 1995; Marco et al., 2009].

Nitroredüktazlar (NTR) ise nitrobileşiklerin (nitrofurozan ve nitrofurantoin gibi) nitro gruplarının indirgenmesinde önemli rol oynayan oksidoredüktaz sınıfı flavoenzimlerdir. Bu nitrobileşiklerin indirgenmesi sonucu protein ve DNA ile etkileşimde bulunabilen hidroksilamin türevleri meydana gelir [Race et al., 2005].

Nitroredüktazlar, korunmuş dizilere sahip protein ailesini oluşturur. Gerçek bakterilerde (eubacteria) keşfedilmiş olan nitroredüktazlar dizi benzerliğine dayalı olarak birlikte sınıflandırılmışlardır. Bu enzimler prostetik grup olarak FMN (Flavin mononükleotid) ya da FAD (Flavin adenin dinükleotid)'ı kullanarak, indirgeyici ajan olarak da NADH (Nikotinamid adenin dinükleotid) ya da NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat)'i kullanarak nitro-yer değiştiren (nitrosubstituted) bileşiklerin indirgenmesini katalizler [Bryant et al., 1981; Oliveira et al., 2010].

Nitroredüktazlar şimdiye kadar çeşitli organizmalardan izole edilmiştir. Bunlardan bazıları *E. coli*'den izole edilen NTR [Anlezark et al., 1992], *B. subtilis*'den izole edilen NfrA [Skreter et al., 2005], *P. pseudoalcaligenes*'den izole edilen NbzA [Prosser et al., 2010], *B. amyloliquefaciens*'den izole edilen YwrO

[Anlezark et al., 2002], *S. saprophyticus*'dan izole edilen ve CB1954'ü aktive ettiği belirlenen Ssap-NtrB'dir [Çelik ve Yetiş, 2012].

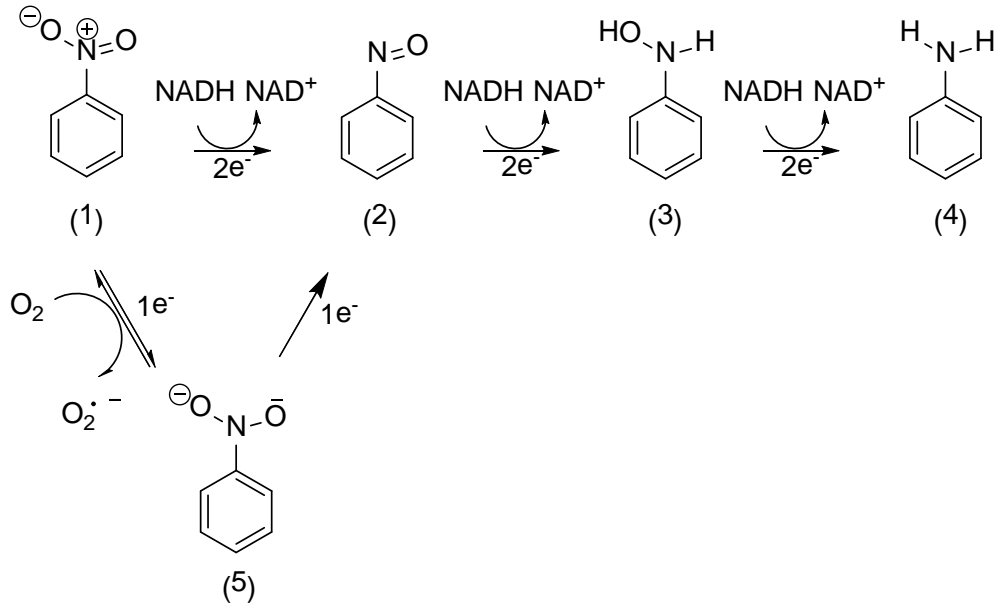
Son zamanlarda bu proteinlerin önemi klinik alanda son derece artmıştır. Tıp alanında kanser gen terapilerinde ilaç öncülünü aktive edici ajan olarak kullanılması NTR protein ailesini değerli hale getirmiştir [Oliveira et al., 2010].

1.3.3.1. Oksijen hassasiyeti Olan (Tip II) ve Olmayan (Tip I) Nitroredüktazlar

Nitro grubundaki oksijen ve nitrojen atomları arasındaki bağ polardır. Çünkü oksijenin elektronegativitesi nitrojeninkinden fazladır ve kısmen pozitif ve negatif kutuplar oluşturmak için nitrojenin elektronlarını çeker. Pozitif kutup elektronları çekmeye yatkındır bu yüzden indirgenmeye de meyillidir [Spain, 1995].

Nitro grupların indirgenmesi bir veya iki elektron transferiyle NTR enzimleri tarafından katalizlenir [Bryant and DeLuca, 1991; Bryant et al., 1981]. Bu sebeple NTR'ler, nitro grupların oksijen hassasiyetine göre bir ya da iki elektron transfer etmesi durumuna göre iki grupta sınıflandırılır (Şekil 1.8) [Oliveira et al., 2010].

Oksijen hassasiyeti olmayan ya da Tip I olarak adlandırılan nitroredüktazlar, oksijen varlığında ya da yokluğunda NAD(P)H'dan elektron çifti alarak nitro-yerdeğiştiren bileşiklerin nitro gruplarını indirgeme reaksiyonlarını katalizleyerek, nitroso ve hidroksilamin ara ürünlerinin oluşmasını ve sonuçta birincil aminlerin meydana gelmesini sağlar. Genellikle Tip I NTR'ler ping-pong bi-bi kinetik mekanizmasını kullanarak önce NAD(P)H kofaktörü flavin kofaktörünü indirgemekte ikinci adım olarak da indirgenmiş flavin nitroaromatik substratı indirgemektedir [Bryant ve DeLuca, 1991; Bryant et al., 1981].



Şekil 1.8: Tip I ve tip II nitroredüktazların genel mekanizması. Herhangi bir nitroaromatik bileşikten (1) tip I nitroredüktazların NAD(P)H'dan bir elektron çifti olarak nitroso (2) ve hidroksilamino (3) ara ürünlerine transfer eder ve sonuçta amino grubu (4) oluşur. Tip II nitroredüktazlar oksijen varlığında meydana gelen süperoksit anyonunun yeniden oluşan nitro grubuna bir elektron transfer ederek nitro anyon radikalini (5) oluşturur [Oliveira et al., 2010].

Nitro grubun indirgenmesini içeren birçok çalışmada hidroksilamino ara ürünlerinin oluşumu başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Fakat nitroso ara ürünleri son derece reaktiftir, ikinci elektron indirgenmesindeki hızları birincisinden yüksek olduğundan izole etmek çok zordur [Spain, 1995; Bryant et al., 1981].

Tip I (oksijen hassasiyeti olmayan) nitroredüktazlar, nitrofuran, nitrobenzen, nitrofenol, nitrobenzoat, nitrotolin (TNT) ve nitroimidazol gibi birçok nitroaromatik bileşiğin indirgenmesinde yer alır [Race et al., 2005]. Tip I nitroredüktazlar, *E.coli* nitroredüktazına benzeme durumuna göre 2 gruba ayrılmıştır: NfsA (grup A) ve NfsB (grup B) [Bryant et al., 1981]. Bunlar sırasıyla majör ve minör oksijen hassasiyeti olmayan nitroredüktazlardır. NfsA (majör) elektron kaynağı olarak NADPH'ı kullanırken, NfsB (minör) hem NADPH'ı hem de NADH'ı elektron kaynağı olarak kullanır [Race et al., 2005; Bryant et al., 1981]. NfsA'nın NfsB'ye göre katalitik etkinliğinin daha yüksek olduğu belirlenmiş fakat HCT-116 insan

kolon kanser hücrelerinde ekspres ettirildiğinde benzer etki gösterdiği saptanmıştır [Prosser et al., 2010].

Hemen hemen bütün NTR'ler benzer biyokimyasal özellikler taşırlar. Genellikle homodimerik proteinlerdir, yaklaşık 30 kDa'dur ve geniş bir substrat spesifitesi vardır. Kofaktör olarak FMN içerirler ve çeşitli nitrobileşiklerin indirgenmesini 2 elektron transferi mekanizmasıyla katalizler [Race et al., 2005; Bryant et al., 1981].

Oksijen hassasiyeti olan Tip II nitroredüktazlar, oksijen varlığında nitro grubun bir elektronunun indirgenmesi sonucu, moleküler oksijenle reaksiyona girerek süperoksit radikallerin ve orijinal nitroaromatik bileşiklerin oluşumunu sağlayan ve nitro anyon radikalleri meydana getiren nitroredüktazlardır. Bu redoks döngüsü fazla miktarda süperoksitleri üreterek oksidatif strese neden olur. Tip II NTR'ler tek elektron reaksiyonları sergiler. Nitro anyon radikallerinin oluşumunu sabitler ve bu enzimler bir elektronu oksijene transfer ederek süperoksit anyonları oluştururlar (Şekil 1.8). Bu yüzden bu enzimler nitroaromatiklerin iki elektron transferiyle indirgenmesini sadece anaerobik şartlar altında gerçekleştirebilirler [Peterson et al., 1979].

Nitroredüktaz proteinleri gerçek bakterilerde (eubacteria) yaygındır, ayrıca NTR benzeri proteinler de arke ve ökaryotlarda bulunur [Bryant et al., 1981].

NTR'ler pek çok klonlama, gen izolasyonu, yapısal analiz ve görev karakterizasyonu gibi birçok çalışmada çeşitli organizmalardan izole edilerek çalışılmıştır [Race et al., 2005].

1.3.3.2. Nitroredüktazların Fizyolojik Görevi

E.coli'den izole edilen nitroredüktaz NfsB'nin proteinlerinin 3-nitrotirozin (3-NT) rezidüsünü indirgeyeceği belirtilmiştir. Fakat Lightfoot ve ark. (2000) çalışmalarında ne NfsA ne de NfsB 3-NT'yi indirgemediğini açıklamıştır [Lightfoot et al., 2000]. Bazı çalışmalarda ise NTR'lerin oksidatif stres yanıtında yer aldıkları ihtimali savunulmuştur. Örneğin, NTR NfsA'yı kodlayan *E.coli* *nfsA* geni SoxRS regulonun bir kısmıdır ve iyi bilinen bir süperoksit üretici olan paraquat tarafından indüklenir. [Lightfoot et al., 2000; Liochev et al., 1999; Hassan and Fridovich, 1978].

Ayrıca *Salmonella typhimurium*'daki *snrA* ve *Rhodobacter capsulatos*'daki *nprA*'da paraquat ile indüklenir ve *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'daki NfsA benzeri proteinler hücrenin tiol-disülfid dengesini sürdürmesine yardım eder [Streker et al., 2005; Nixon et al., 2002].

Bazı NTR'ler metabolik yollarla bağlantılıdır. Örneğin, NTR benzeri BluB, kobalamin kofaktörünün (B12) biyosentezini etkiler [Campbell et al., 2006]. *C. synechocystis*'den izole edilen DrgA proteini ve *E.coli*'deki NfsB proteini demir metabolizmasında önemli rol oynayan ferrik redüktaz aktivitesi gösterir [Takeda et al., 2006]. *S.cerevisiae*'de Frm2p lipid sinyal yolağında rol oynar [McHale et al., 2006].

1.3.3.3. Nitroredüktazların Kanser Tedavisindeki Yeri

Nitroredüktazların CB1954'ü aktive etmesine dayanan terapinin klinik öncesi çalışmalarda ve prostat kanserli hastalarda faz I/II klinik denemelerde antikanser etkisi ortaya çıkmıştır. Sonuçlar direkt sitotoksik etkinin tümöre-özgü bağışıklığı (tumor-specific immunity) uyardığı ve HSP70 (heat shock protein) gibi stres proteinlerinin ekspresyonunu indüklediğini belirlemiştir [Patel et al., 2009].

1.4. İlaç Öncü Madde

“Prodrug” ya da “proagent” terimi ilk olarak Albert tarafından, ilaçların fizikokimyasal özelliklerini değiştirmek ve geçici olarak elverişliliğini arttırmak ya da toksisitesini düşürmek için kullanılan, farmakolojik olarak inaktif kimyasal türevler olarak tanımlanmıştır [Albert, 1958].

İlaç öncül yaklaşımı 1970'li yıllarda ilaç terapisini geliştirmek için bulunan bir yöntemdir. Bu güne kadar, ilaç terapilerinde karşılaşılan birçok sorunun üstesinden gelebilmek için birçok ilaç öncül madde tasarlanmıştır [Han, 2000].

1.4.1. İlaç Öncü Madde Dizayını ve Özellikleri

İlaç iletimini optimize etmek için ilaç öncü maddenin dizayını oldukça önem taşımaktadır. Klinik ilaç uygulamalarında birçok terapötik ilacın, hedef bölgeye özgü olmaması, kimyasal stabilitesinin düşük olması, oral ilaç emiliminin düşük olması ve

toksositeye sebep olma ihtimali gibi istenmeyen özellikleri farmakolojik, farmasötik ve farmakokinetik bariyerleri oluşturmaktadır [Higuchi and Stella, 1975]. Bütün bunların üstesinden gelebilmek için ilaç öncü maddeler özel enzimlere göre enzim substrat ilişkisi düşünülerek dizayn edilmektedir [Han, 2000].

Enzimin substratı olan ilaç öncü maddeler, intraselüler aktivasyon için tümör hücrelerinde serbestçe difüze olabilmelidir. Ekstraselüler ortamda aktifleşen ilaç öncü maddeler ise aktivite sonrası hücre içine kolaylıkla geçebilmelidir. Yüklü ilaç öncü maddeler hücreye giremediklerinden dolayı hücre dışı aktivasyona örnek olarak verilebilir ve toksik olabilmeleri için enzim tarafından aktifleştirilerek hücre içine difüze olması gerekmektedir [Haisma et al., 1992; Greco and Dachs,2001].

İlaç öncü maddeler, sistemik toksositeye sebep olmamak için normal dokuda endojen enzimlerle aktifleşmemelidir. Dokuya özgü aktivasyon için enzimin belirli bir dokuya özgü olması ya da diğer dokulara göre daha yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Ayrıca fizyolojik şartlar altında kimyasal yapısı bozulmamalıdır [Xu and McLeod, 2001; Stella and Himmelstein, 1982; Han 2000].

İlaç öncül maddenin aktifleşmesiyle meydana gelen toksik ajanın yarı ömrü enzimin ekspres edilmediği hücrelere yayılabilecek kadar uzun olmalıyken, dolaşıma sızma ihtimalinde de inaktif olacak kadar kısa olmalıdır. Belirgin bir terapötik etki için salınan aktif ilaç, ilaç öncülünden en az 100 kat daha toksik olmalıdır. Ayrıca, çok sayıda tümör hücre popülasyonlarını öldüren tetiklenmiş sitotoksosite, hücre döngüsünden ve hücre proliferasyondan (çoğalmadan) bağımsız olmalıdır [Greco and Dachs, 2001].

1.4.2. CB1954'ün kimyasal yapısı

Moleküler formülü $C_9H_8N_4O_5$ olan CB1954 molekülü, NAD(P)H kinon oksidoredüktaz-2 sınıfı enzimlerle aktifleşen moleküler ağırlığı 252.18 Da olan antineoplastik kimyasal ajan olarak kanser terapilerinde kullanılmaktadır [Knox et al., 2000].



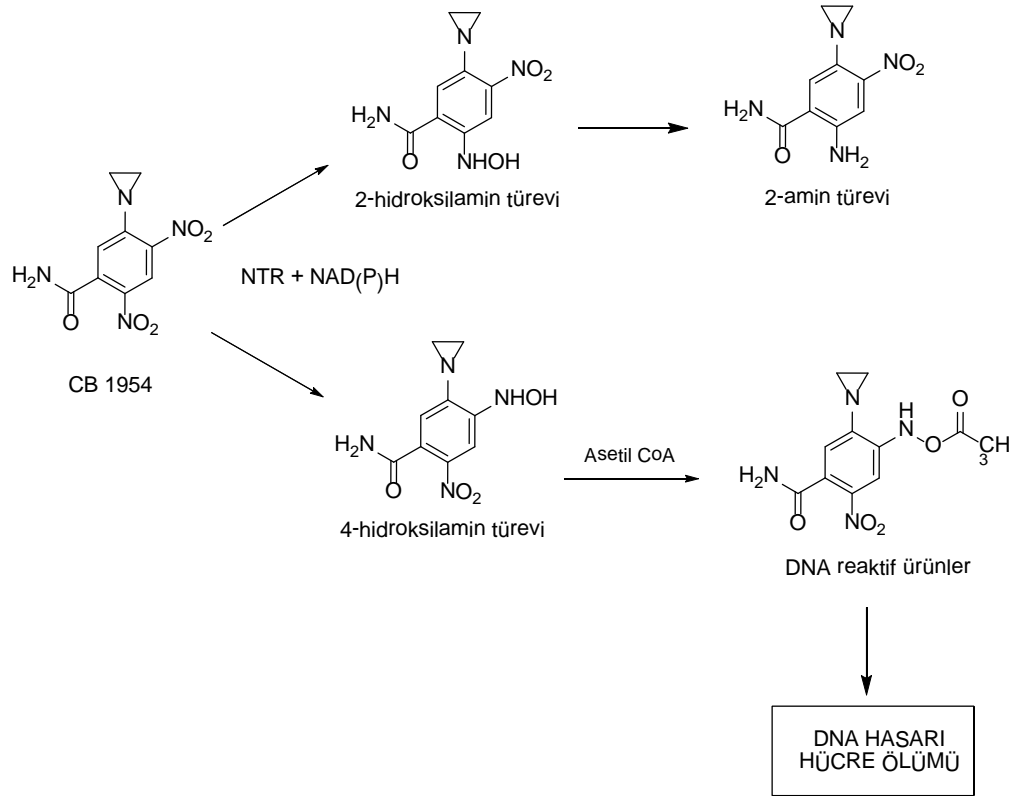
Şekil 1.9: CB1954'ün kimyasal yapısı.

CB1954 (5-aziridinil 2,4-dinitrobenzamid) dinitrobenzamid ilaç öncü ailesinin prototipidir [Prosser, 2010]. Bu ajan memelilerde bulunan DT-diaforaz enzimi tarafından aktifleştirilir ve sıçanlarda Walker-256 kanserinin minimum toksik yan etkiyle tamamen yok edildiğinde keşfedilmiştir [Cobb et al., 1969].

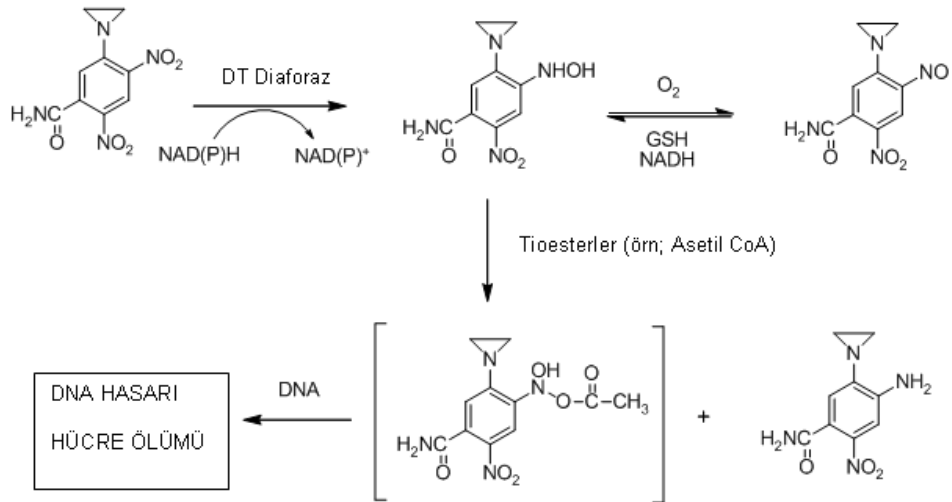
CB1954, klinik denemeleri 1970'lerde başlamıştır. İnsanda ve farede bulunan DT-diaforaz enzimi arasında yapısal ve katalitik aktivite farklılıkları bulunmaktadır. Bu da DT-diaforaz enziminin CB1954'ü aktifleştirme kapasitesinin farelerde insanlardakinden daha fazla olduğu sonucunu doğurmaktadır [Boland et al., 1991; Anlezark et al., 1992]. Diğer yandan *Escherichia coli*'den izole edilen Nitroredüktaz NfsB enziminin insan tümörlerinde CB1954'ü DT-diaforaza göre daha hızlı toksik forma dönüştürdüğü ve yaklaşık 100 kat daha etkili olduğu bulunmuştur [Anlezark et al., 1992].

1.4.3. CB1954'ün Aktivasyonu

CB1954'ün Nitroredüktazlar (NTR) aracılığıyla 4-nitro bölgesinden indirgenmesi, sitotoksik 4-hidroksilaminin oluşumuyla sonuçlanır. Daha sonra Asetil Coenzim A (CoA) gibi tioesterlerle reaksiyona girerek DNA alkilasyon ajanını oluşturur. Son derece sitotoksik olan bu ajan DNA ile çapraz bağlar yapar. CB1954'ün 2-nitro grubunun indirgenmesi, sitotoksik olan 2-hidroksilamin ya da 2-amin ürünlerinin oluşmasını sağlar (Şekil 1.10) [Xu and McLeod, 2001; Prosser et al., 2010]. CB1954'ün DT-diaforaz ile indirgenmesinde nitroredüktazdan farklı olarak son ürün N-asetoksi türevi oluşur (Şekil 1.11).



Şekil 1.10: CB1954'ün *E.coli* nitroredüktazı ile biyoaktivasyonu. CB1954'ün NTR ile reaksiyonu sonucu 4-hidroksilamin meydana gelir. Oluşan 4-hidroksilaminin Asetil Koenzim A gibi tioesterler ile reaksiyona girmesiyle DNA ile çapraz bağlar yapan toksik ajanlar oluşur [Tang et al., 2005].



Şekil 1.11: CB1954'ün DT Diaforaz enzimiyle aktivasyonu. İlk aşamada CB1954'ün indirgenmesiyle oluşan hidroksilamin türevi tioesterler aracılığıyla DNA reaktif türleri oluştururlar. Bakteriyal nitroredüktazın indirgediği reaksiyondan farkı son ürün olarak N-asetoksi türevinin oluşmasıdır [Knox and Connors, 1997].

1.4.4. Nitroredüktaz/CB1954 Terapi Sonrası Hücre Ölümü

1.4.4.1. Direkt Hücre Ölümü (Programlı Hücre Ölümü)

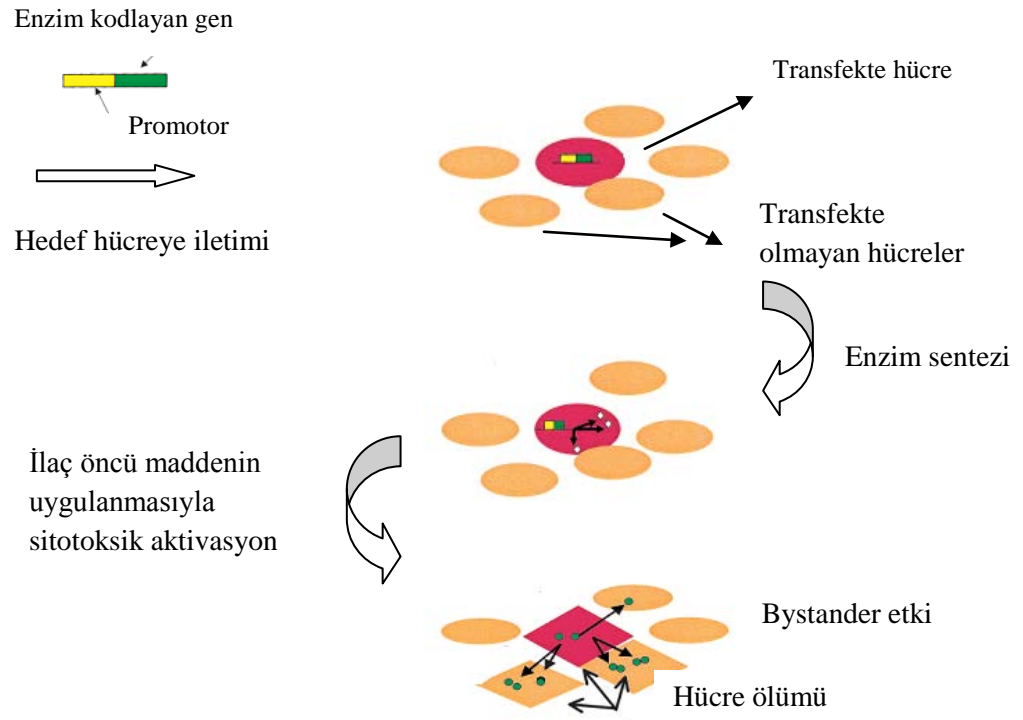
Kanser terapileri sonucu programlı hücre ölümünü birçok yolak tetikleyebilmektedir [Hickman, 1992]. NTR/CB1954 uygulamasında ise hücre ölümü CB1954'ün nitroredüktaz tarafından indirgenmesi, bifonksiyonel alkilatör ajanların oluşması prensibine dayanır. Bu ürünlerin hücresel tioesterler ile daha fazla reaksiyona uğraması tamiri zayıf olan DNA ile çapraz-bağlar yapan hidroksilamin türevlerini oluşturur [Knox et al., 1988]. Bu çapraz bağların onarımı zayıftır ve bölünen ve bölünmeyen hücrelerde p53-bağımsız apoptoz yolağıyla hücre ölümüne yol açar [Cui et al., 1999].

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü daha önce giriş bölümünde belirtildiği gibi, kromatin yoğunlaşması, hücre büzüşmesi, nüklear fragmentlerin ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi morfolojik değişimleri kapsamaktadır [Drabek et al., 1997]. Yapılan çalışmalarda, NTR/CB1954 uygulaması sonrasında DNA çapraz bağları ve DNA ipliğinde kırıkların oluşumu sebebiyle timositlerde ve meme epitel hücrelerinde morfolojik değişimlerin incelenmesi sonucu apoptozisin tetiklendiği kaydedilmiştir [Clark et al., 1997]. Ayrıca fare L hücrelerinde yapılan çalışmalarda DNA sentezinin, RNA ve protein sentezinin de engellenmesini takip eden olaylar sonucu çok çekirdekli hücrelerin oluşumu gibi morfolojik değişimler gözlenmiştir [Drabek et al., 1997].

NTR aracılığıyla hücre ölümünde tümör baskılayıcı protein olan fonksiyonel p53 gerekmemektedir ayrıca hücre ölümü proliferasyondan bağımsızdır. Yani hem çoğalan hem de çoğalmayan hücrelerin ölümüne sebep olabilmektedir. Aktifleşen CB1954 DNA'ya çapraz bağlar yapması sonucu apoptozis kaskadını tetikler bu da kısa süre içinde hücre ölümüyle sonuçlanır. Fare hücrelerinde yapılan *in vivo* çalışmada p53 proteininin ekspres edilmediği hücrelerde CB1954 enjeksiyonundan 7 saat sonra p53-bağımsız hücre ölümünün başladığı kaydedilmiştir [Cui et al., 1999].

1.4.4.2. Hücreler-Arası Komşuluk Etkisi (Bystander Effect) Sonucu Hücre Ölümü

İlk olarak Moolten (1986) tarafından tanımlanan komşuluk etkisi, aktif ilacın öldürme etkisinin transfekte olmayan ya da hedeflenmeyen komşu hücelere de yayılmasıdır (Şekil 1.12) [Moolten, 1986].



Şekil 1.12: Komşuluk etkisinin şematik gösterimi. Gen iletim sistemiyle hedeflenen kanser hücelerinde aktifleşen ilacın, hedeflenmeyen komşu hücelere de yayılması sonucu hücre ölümü gerçekleşir [Greco and Dachs, 2001].

Komşuluk etkisi iki temel kategoride belirlenmiştir: lokal ya da immun aracılığıyla. Lokal yolla komşu hücelerin ölümü toksik metabolik ürünlerin iletimiyle gerçekleşir. Bu toksik metabolitler ya gap junction yoluyla [Marconi et al., 2000; Mesnil and Yamasaki, 2000] ya apoptotik veziküller aracılığıyla [Freeman et al., 1993] ya da çözünebilen toksik metabolitin difüzyonu ile [Huber et al., 1994] iletilir.

Bystander etki sayesinde hedeflenen hücelerin %5-10 dahi terapötik geni ekspres etmesi durumunda, tümörün yok olması söz konusudur. Örneğin, 5-FC (5-florositozin) tedavisi sonrası, tümör popülasyonunun sadece %4'ünün sitozin deaminaz enzimini ekspres etmesi durumunda tümör gerilemesi gözlenmiştir [Huber

et al., 1994]. Klinik denemelerde benimsenen protokoller, transfeksiyon etkinliğinin %10'dan fazla olduğu çalışmalardır. Bu sebeple komşuluk etkisi, enzim yüksek oranda üretilse dahi enzimin tek başına sitotoksitesinin düşük olmasını gerektirir [Greco and Dachs, 2001].

Bazı tümör dokularında hücreler arası bağlantılar zayıfladığından hücre ölümünü sadece gap junction gibi hücreler arası bağlantılara dayandırmak kısıtlayıcı olur [Mesnil et al., 1996]. Serbestçe difüze olabilen türlerde ise belirgin bir komşuluk etkisi gözlemlenmek için ilacın yarı ömrü önemlidir. Tümörlerde difüzyon aralığı 1 dakikada 100-200 µm kabul edilmektedir [Patterson and Harris,1999]. Apoptotik faktörlerin transferine bağlı olarak ölü veya ölmekte olan hücrelerin iletişimi ile lokal komşuluk etkisi indüklenebilir [Freeman et al., 1993].

Hayvan modellerinde ise (*in vivo*) komşuluk etkisinin indüklenmesinde sistemik immün yanıtın önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. EPT sistemiyle tedavi edilmiş immüno-kompetant hayvan tümörlerinin gerilemesi, şiddetli inflamatuvar sızıntının varlığı ile tanımlanmıştır. Timüs bezi ve T hücreleri olmayan farelerde ışınlama sonrası komşuluk etkisi belirgin ölçüde azaldığı gözlenmiştir [Pavlovic et al., 1996; Greco and Dachs, 2001].

Son zamanlarda yapılan çalışmaların çoğunun, transfekte olmayan çevredeki hücrelerin ölümünü arttırmaya yönelik olması, gen terapisi stratejilerinde komşuluk etkisinin önemli olduğuna işaret etmektedir. Örneğin gap bağlantısı aracılı komşuluk etkisini arttırmak için konneksin üretiminin düzenlenmesinin hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda hücreler arası iletişimin ve toksik ajanların iletiminin arttığı gözlenmiştir [Greco and Dachs, 2001; Ghomari et al., 1998].

Bystander etkiyi arttıracak önemli diğer bir faktör de HSV1 (Herpes Simplex Virüs 1) virion proteini VP22'dir. İnfekte hücrelerde birkez sentezlendiğinde, VP22 golgiden bağımsız bir yolakla etkili bir şekilde çevredeki infekte olmayan hücrelere gap bağlantı bölgelerine ihtiyaç duymadan yayılır ve özellikle çekirdekte toplanır [Elliott and O'Hare, 1999].

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler

DMEM (HyClone), Fetal Bovin Serum (PANBIOTECH, HyClone), 10X PBS Dulbecco's (PANBIOTECH), Penisilin/Streptomisin (HyClone), Tripsin-EDTA (HyClone), Dimetil sülfoksit (AppliChem), The CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega), Sodyum bikarbonat (Merck), Sodyum klorür (AppliChem), FITC Annexin V Apoptosis Kit I (BD Pharmingen).

2.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler

CO₂ inkübatörü (Thermo Forma), Işık mikroskobu (Optech Inverted Microscope), Sıcak su banyosu (Nüve), 2-200 µl Mikropipetör ve uçları (Gilson), 200 µl Multi pipetör (Gilson), Elisa Reader (Thermo Varioskan Flash), Santrifüj (Beckman Coulter microfuge 18, Nüve NF 800), Laminar kabin (Herasafe), Otoklav (Hirayama, Hiclive, HVE-50), Akan Hücre Ölçer (Beckman Coulter Cytomics FC 500), Buzdolabı (+4°C, -20°C ve -80°C derin dondurucu), Sıvı azot tankı (Union Carbide), Manyetik karıştırıcı (Isolab), Vorteks (VWR), Pipet tabancası, ELISA plakları (Tpp), Kültür kapları, 15 ml ve 50 ml santrifüj tüpleri, Dondurma tüpleri, Petri kapları, Thoma lamı (Burker-Turk), Enjektör (5-20cc), Cam pipet ve pastör pipetleri (Iso-Lab), 0.22 µm'lik şırınga filtresi, 0.22 µm'lik, 150 ml hacimli vakum filtresi (Nalgene), V-şekilli hücre solüsyonu küvetleri (VWR), 1.5 ml'lik ependorf tüpleri (VWR).

2.1.3. Kullanılan Solüsyonlar

1. **10X DMEM:** 13.38 g DMEM üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.
2. **10X NaHCO₃ (Sodyum bikarbonat):** 3.7 g NaHCO₃ üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.
3. **DMEM Besiyeri:** 50 ml FBS (Fetal Bovine Serum), 50 ml 10X DMEM, 50 ml 10X NaHCO₃ (sodyum bikarbonat) ve 5 ml penisilin/streptomisin üzerine steril distile su eklenerek toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. 1 M NaOH ve %20 HCl kullanılarak pH 7.2-7.4'e ayarlanmıştır. Besiyeri +4°C'de saklanmıştır.
4. **1X Tripsin-EDTA Solüsyonu:** Ticari olarak satın alınan 1X Tripsin-EDTA solüsyonu +4°C'de saklanmıştır.
5. **1 M NaOH:** 4.0 g NaHCO₃ steril distile suda çözülerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Solüsyon 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.
6. **%20'lik HCl:** %37'lik stok solüsyonu halinde bulunan HCl'den 54 ml alınarak, steril distile su üzerine damla damla eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilen solüsyon +4°C'de saklanmıştır.
7. **1X PBS (Phosphate Buffered Saline):** 10X PBS steril distile su ile %10 seyreltilmiştir. Solüsyon 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilen solüsyon +4°C'de saklanmıştır.
8. **Ethanol (%70'lik):** %96'lık stoktan alınan 70 ml ethanol'e 30 ml distile su eklenerek +4°C'de saklanmıştır.
9. **%5 DMSO:** 150 µl DMSO, 2 ml besiyerine tamamlanmıştır.
10. **50 mM Sodyum Fosfat Tamponu (NaPi) :** $pH=pK_a+\log \frac{[baz]}{[asit]}$ formülüne göre 16.69 mM asit (Na₂HPO₄.H₂O), 33.31 mM baz (Na₂HPO₄.2H₂O) 50ml steril distile suya tamamlanmıştır. pH %20'lik HCl ya da 1 M NaOH kullanılarak 7.5'ayarlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.
11. **5000 µM CB1954 solüsyonu:** 0,34 mg CB1954 tartıldıktan sonra toplam hacmin %5'i kadar DMSO ile çözüldükten sonra toplam hacim besiyeri ile

(DMEM) 270 μ l'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan 5000 μ M stoktan 100 ve 1000 μ M dilüsyonlar %5 DMSO ile yapılmıştır. Her deney için yeniden hazırlanmıştır.

12. Enzim stok: Nitroredüktaz (Ntr) enzimi stokta 1.3 mg/ml konsantrasyonunda 50 mM NaPi (sodyum fosfat) tampon çözeltisinde (pH=7.5) ve %50 gliserol içeren çözeltide -20°C'de saklanmıştır.

13. 0.45 mg/ml Ntr: 1.3 mg/ml stoktan 31 μ l alınarak toplam hacim 50 mM NaPi ile 400 μ l'ye tamamlanmıştır. Her deney için yeniden hazırlanmıştır.

14. 0.1 mg/ml Ntr: 1.3 mg/ml stoktan 138 μ l alınarak toplam hacim 50 mM NaPi ile 400 μ l'ye tamamlanmıştır. Her deney için yeniden hazırlanmıştır.

15. 5000 μ M Kofaktör (NADH) Stok Solüsyonu: 3,4 mg Kofaktör (NADH) tartılarak ve steril distile su ile toplam hacim 1 ml'ye tamamlanmıştır. -20°C'de saklanmıştır. Hazırlanan 5000 μ M stoktan 100 ve 1000 μ M dilüsyonlar steril distile su ile yapılmıştır.

16. 1X Bağlanma tamponu (binding buffer): 10X bağlanma tamponundan 1 ml alınarak toplam hacim 10 ml steril distile suya tamamlanmıştır.

2. 2. Yöntem

Bu bölümde HeLa hücrelerinin kültüründe kullanılan protokoller, alt kültürleme, hücrelerin dondurularak saklanması ve dondurulmuş hücrelerin çözülmesindeki protokoller, *in vitro* Enzim/İlaç öncü madde uygulamaları ve bu uygulamaların sitotoksik etkisinin ve hücre ölüm mekanizmalarının belirlenmesinde kullanılan yöntemler anlatılmıştır.

2. 2. 1. Hücre Kültürleri

Enzim/İlaç Öncü terapisinin *in vitro* koşullarda etkisini incelemek için ölümsüz HeLa hücre hattı kullanılmıştır. HeLa hücre hattı Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nden, tez danışmanı Yrd. Doç. Dr. Nil Saydan aracılığıyla sağlanmıştır.

2.2.1.1. Alt Kültürleme

Hücre kültüründe temel olarak iki tip büyüme şekli vardır. Bunlardan biri süspansiyon hücrelerinin besiyerinde serbestçe yüzerek büyümesi, diğeri ise cam ya da plastik yüzeye yapışarak büyüyen monolayer hücrelerdir. Deneylerimizde kullandığımız HeLa hücreleri cam ya da plastik yüzeye yapışarak büyüyen hücrelerdir. Devamlı (immortal) hücre hatları, kültürdeki substratın tamamını tükettiğinde alt kültürleme yapılması gerekir. Kültür flaskına yapışan hücreler ile substratın arasındaki bağın tripsin gibi enzimler aracılığıyla kırılması ile oldukça nazik bir şekilde, hücre hasarının en aza indirildiği bir yöntem ile kültür flaskından kaldırılır. Hücre süspansiyonu daha sonra uygun dilüsyon yapılarak başka bir kültür kabına alınır [Ryan].

Çalışma boyunca HeLa hücre hattı için rutin olarak yapılan alt kültürlemede izlenen protokol şu şekildedir:

- 1) Kültürdeki besiyeri uzaklaştırılır.
- 2) 1X PBS ile yıkama yapılır.
- 3) 1X Tripsin-EDTA ile muamele edilen hücreler 37°C'de, %5 CO₂ inkübatöründe hücreler yüzeyden ayrılana kadar 5-10 dakika inkübe edilir.
- 4) Taze besiyeri (DMEM) kullanılarak enzimatik reaksiyon durdurulur ve hücre süspansiyonu falkon tüplere alınır (harvesting=toplama).
- 5) 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- 6) Süpernatant uzaklaştırılır, pellet besiyerinde çözülür ve hücre sayımı yapılır.
- 7) Taze besiyeri (DMEM) içeren 25 cm² veya 75 cm²'lik flasklara, 1x10⁵ hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi yapılır ve hücreler %5 CO₂, %95 hava içeriğine sahip, nemli CO₂ inkübatöründe, 37°C'de büyütülür.
- 8) Yeniden pasajlama 96 saatte bir tekrarlanır.

2.2.1.2. Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

Alt kültürleme kısmında bahsedildiği gibi hücreler toplandıktan sonra (harvest), 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan

sonra pellet 10^6 hücre/ml olacak şekilde %10 DMSO içeren FBS (Fetal Bovine Serum) ile süspansiyon edilmiş ve süspansiyon 2.0 ml'lik kriyo tüplere alınmıştır. Hücreler 24 saat boyunca -80°C 'de inkübe edilmiş, ardından ileride çözümlenerek kullanılmak üzere -196°C 'deki sıvı azot tanklarında depolanmıştır.

Dondurulmuş hücreleri çözme işlemi ise 37°C 'de hızlı bir şekilde çözümlenerek yapılmıştır. Çözünmüş haldeki hücre süspansiyonuna besiyeri ilave edilerek 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelere toksik olan DMSO'nun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet tekrar DMEM ile çözümlenerek taze besiyeri içeren 25 cm^2 'lik kültür flaskına ekimleri yapılmıştır. Daha sonra kültür flaskı %5 CO_2 , %95 hava içeriğine sahip, nemli CO_2 inkübatöründe, 37°C 'de inkübe edilmiştir. Hücreler flask yüzeyine yapıştıktan sonra besiyeri değiştirilerek hücrelerin konfluent (yüzeyi yaklaşık %90 kaplaması) hale gelene kadar 96 saat aralıklarla besiyeri değiştirilmiştir.

2.2.1.3. Hücre Sayımı

Çalışma boyunca canlı hücrelerin sayısını belirlemek için hasat ve santrifüj işlemleri ardından elde edilen pellet, besiyerinde süspansiyon edildikten sonra $20\ \mu\text{l}$ alınarak hücre sayım lamına (Thoma lamı) aktarılmıştır. Thoma lamında 16 büyük kare, her bir karede ise 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 adet küçük kare bulunmaktadır. Sayım bu karelerde yapılır. Bir küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi $0,00025\ \text{mm}^3 = 1/4000\ \text{mm}^3$ 'tür. Toplam sayım alanının hacmi ise $0,1\ \text{mm}^3$ 'tür. Thoma lamında sayım $A \times SF \times 10000$ formülü ile hesaplanır. Burada $A=16$ büyük karede sayılan hücre adedi, SF ise seyreltme faktörüdür. 10000 ise $0,1\ \text{mm}^3$ 'deki sayım sonucunu 1 ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir ($1\text{ml} = 1\text{cc} = 1\text{cm}^3 = 10000 \times 0,1\ \text{mm}^3$). Thoma lamında büyük kare sınırları ara çizgi olarak adlandırılan ve her 5 küçük kareyi ortasından bölen bir çizgi ile belirlenir. Ara çizgi ile 25 küçük kareden oluşan büyük kare alanı belirlenmesi zor olursa pratik olarak ara çizgiler arasında kalan 16 küçük kare bir büyük kare olarak nitelendirilebilir. Ancak bu şekilde toplam $25 \times 16 = 400$ küçük kare yerine $16 \times 16 = 256$ küçük karede sayım yapıldığı için

yukarıdaki formül ile bulunan sonuç $400/256=1,5625$ ile çarpılarak 1 ml'deki sayı bulunur [Ayanoglu, 2007].

2.2.2. *In vitro* Enzim/ İlaç öncü Terapi Uygulamaları

Bu bölümde Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde, Biyokimya ABD'da *Staphylococcus saprophyticus* suşundan izole edilmiş olan oksijen hassasiyeti olmayan NtrB benzeri nitroredüktaz enzimi (Ssap-NtrB) kullanılmıştır. Aktivasyon çalışmalarında bu nitroredüktaz (NTR) enziminin nitroaromatik ilaçların (nitrofurozan) ve kanser ilaçlarının (CB1954 ve SN23862) iki elektronunu NADH ya da NADPH kullanarak 3-20°C optimum sıcaklık aralığında hidroksilamin türevleri meydana getirdiği saptanmıştır [Çelik ve Yetiş, 2012]. Nitroredüktaz ilaç öncülü olarak CB1954 ve kofaktör olarak NADH tek başına ya da kombinasyonları HeLa hücrelerine değişik konsantrasyonlarda uygulanmış, 24 saat ve 48 saatlik inkübasyon süreleri ardından sitotoksik etkiyi belirlemek üzere MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) boya indirgeme yöntemi kullanılmıştır. Hücrelerin hangi yolla (apoptozis ya da nekrozis) öldüğünü saptamak için ise Akan hücre ölçer (Flow Cytometry) cihazı yardımıyla işlem görmüş örnekler analiz edilmiştir.

2.2.2.1. Nitroredüktaz/ CB1954 Reaksiyon Hazırlanışı ve İnkübasyonu

Nitroredüktaz, CB1954 ilaç öncülünün nitro grubunu indirgemedeki kofaktör olarak kullandığı NADH ile birlikte çeşitli konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda +4°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. %50 gliserol ve sodyum fosfat tamponunda bulunan nitroredüktaz enzimi, %5 DMSO'da çözünen CB1954 ilaç öncülü [Vass et. al, 2009] ve steril distile suda çözünen NADH kofaktörü tek başına, ikili ve üçlü kombinasyonlar halinde inkübe edilmiştir. Çözücü maddelerin toksik etkisini ortadan kaldırmak için her grup tek başına ya da ikili kombinasyon halinde inkübe edilirken, inkübe edilmeyen maddelerin de çözücülerini içerir. Nitroredüktaz enzimi tek başına inkübe edilirken, CB1954'ün çözüldüğü %5 DMSO ve NADH'ın çözüldüğü steril distile suyu da üçlü kombinasyonlarda bulunduğu miktarlar kadar içerir. CB1954 tek başına inkübe edilirken, nitroredüktazın sodyum fosfat tamponu ve NADH kofaktörünün çözüldüğü steril distile su üçlü kombinasyonda bulunduğu miktar kadar eklenir. NADH tek başına inkübe edildiğinde ise, nitroredüktazın sodyum

fosfat tamponu ve CB1954'ün çözüldüğü %5 DMSO'yu da üçlü kombinasyonda bulunduğu miktar kadar içerir. İkili kombinasyonlarda da aynı protokol uygulanarak, diğer maddenin çözücüsü de eklenerek inkübasyona bırakılır.

2.2.2.2. Nitroredüktaz/ CB1954 Uygulaması

Tez çalışmasında 96 kuyulu plaklara, plağın bir kuyusunda 5×10^3 hücre/100 μ l olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler lag fazına geldiğinde *in vitro* Ntr/CB1954 ve kofaktörün (NADH) çeşitli dozlarda kombinasyonları uygulanmıştır. CB1954 ilaç öncü madde konsantrasyonu 10 μ M ve 100 μ M olmak üzere ikişer tekrarlar halinde hücrelere tek başına, Ntr ile ya da kofaktör (NADH) ile birlikte ikili kombinasyonlar halinde veya Ntr ve kofaktör ile birlikte üçlü kombinasyon halinde hücrelere uygulanmıştır. Kofaktör konsantrasyonu bütün uygulamalarda CB1954 ile eşit konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Kofaktör hücrelere tek başına, CB1954 ile ya da Ntr ile birlikte ikili kombinasyonlar halinde veya CB1954 ve Ntr ile birlikte üçlü kombinasyon halinde hücrelere uygulanmıştır. Ntr ise 0.45 mg/ml veya 0.1 mg/ml oranında hücrelere tek başına, CB1954 ile ya da kofaktör (NADH) ile birlikte ikili kombinasyonlar halinde veya CB1954 ve kofaktör ile birlikte üçlü kombinasyon halinde hücrelere uygulanmıştır. Her deney birbirinden bağımsız üç farklı tekrar içermektedir.

Hücrelere madde uygulamasından sonra, 96 kuyulu plaklar 24 saat ve 48 saat %5 CO₂, %95 hava içeriğine sahip, nemli CO₂ inkübatöründe, 37°C'de inkübe edilmiştir.

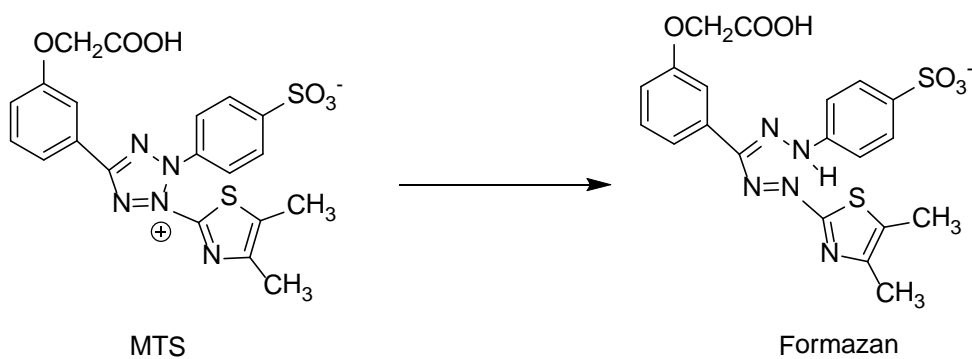
Ayrıca enzimi saklarken kullanılan stok solüsyonda bulunan gliserolün ve CB1954'ü çözmek için kullanılan DMSO'nun (C₂H₆SO) hücrelere olan toksisitesini belirlemek için çeşitli konsantrasyonlarda hücrelere uygulanmıştır. 96 kuyulu plaklara, plağın bir kuyusunda 5×10^3 hücre/100 μ l olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra %0.5, %1, %5, %10, %50 oranlarında gliserol steril distile su ile seyreltilerek her kuyuya üçer tekrarlar halinde uygulanmıştır. Kuyudaki final gliserol konsantrasyonları %0.05, %0.1, %0.5, %1 ve %5 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca tez çalışması boyunca kullanılan nitroredüktaz enziminin içerdiği maksimum gliserol miktarı %17 (kuyudaki maksimum oran %1.7) olarak hesaplanmış ve bu oran hücrelere uygulanmıştır.

2.2.2.3. Nitroredüktaz/CB1954 Terapi Sonrası Morfolojik Görüntülerin İncelenmesi

HeLa hücre hattına Ntr/CB1954/NADH kombinasyonlarının etkisini gözlemlemek için 96 kuyulu plaklara 5×10^3 hücre ekilmiş 24 saat sonra madde uygulanmıştır. Hücrelere 0.1 ve 0.45 mg/ml Ntr enzimi 10 ve 100 μ M CB1954 ve NADH varlığında üçlü kombinasyonlar uygulanmış 24 saat sonunda mikroskop altında 40X'lik büyütmede hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.2.4. Nitroredüktaz/CB1954 Terapi Sonrası Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Canlı hücrelerin sayısını belirlemede kullanılan, kolorimetrik bir yöntem olan hücre proliferasyon analizi, Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) protokolü uygulanarak belirlenmiştir. Bu yöntem tetrazolyum bileşiğini [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS] ve elektron taşıyıcı olarak enzimatik reaksiyonlarda görev alan PMS (phenazine methosulfate) belirtecini içerir. MTS, metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan dehidrogenaz enzimi tarafından besiyerinde çözünebilir formazan ürününe dönüştürülür (Şekil 2.1). Oluşan formazan ürününün miktarı 490 nm absorbans ile ölçülerek canlı hücre sayısı belirlenir.



Şekil 2.1: MTS tetrazolyum tuzunun ve ürünü olan formazanın yapısı.

Protokolde belirtildiği gibi 96 kuyulu plağın her bir kuyusuna 20 μ l MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) eklenmiş ve plaklar 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu deneyde canlı

ve aktif hücreler tarafından tetrazolium bileşiği metabolize edilir ve renkli bir ürün olan formazan oluşur. Bu renk değişimi 2 saat sonra Elisa okuyucusunda, 490 nm dalga boyunda absorbans ile belirlenmiştir.

Her bir Ntr/CB1954/NADH uygulaması için ikili tekrarlar birbirinden bağımsız üçer kez tekrarlanan deneyleri içermektedir. CB1954, NADH ve Ntr konsantrasyonuna bağlı absorbans değişimi grafikleri, 490 nm’de okunan absorbans değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak oluşturulmuştur. Hücre canlılığında azalmanın yüzde olarak ifade edildiği grafiklerde ise sağ kalım, EPT uygulanmış hücrelerin absorbans değerleri ortalamalarının, EPT uygulanmamış kontrol hücrelerinin absorbans değerleri ortalamasına bölünmesi ile elde edilmiştir. Belirli dozda CB1954, NADH ve Ntr uygulandığında hücrelerin % 50’sinin ölümüne sebep olan CB1954/Ntr/NADH konsantrasyonlarının (LD=Lethal Dose) belirlenmesinde de sağ kalım grafiklerinden faydalanılmıştır.

Tez çalışmasında Ntr/CB1954/NADH uygulamalarına ait deneysel verilerin istatistiksel analizi “ANOVA” çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde güvenilirlik derecesi $p \leq 0.05$ olarak belirlenmiştir.

2.2.2.5. Nitroredüktaz/CB1954 Terapi Sonrası Apoptozis Tayini

Tez çalışmasında, hücre canlılığı deneylerinde Ntr/CB1954/NADH kombinasyonunun sitotoksik etkisinin yüksek olduğu aynı zamanda tek başına uygulandıklarında toksisitenin en az olduğu tespit edilen konsantrasyonların, HeLa hücrelerinde apoptozisi tetikleme potansiyelleri incelenmiştir. Apoptozis tayininde Beckman Coulter Cytomics FC 500 Akan hücre ölçer cihazı kullanılmıştır.

FITC-Anneksin V, apoptozise giden hücrelerin membran asimetrisini kaybetmesiyle membranın iç kısmından dış kısmına göç eden fosfolipidlerin fosfolipitlerine bağlanmasıyla apoptozis ile ölen hücrelerin yüzde olarak ifade edildiği bir yöntemdir. Çalışmada Akan hücre ölçerde apoptoz analizi için “FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen)” kullanılmış ve önerilen protokol uygulanmıştır. HeLa hücreleri 6 kuyulu üç ayrı plağa ikişer tekrar halinde her kuyuda 25×10^4 hücre/3 ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat boyunca plaklar %5 CO₂, %95 hava içeriğine sahip, nemli CO₂ inkübatöründe, 37°C’de

hücrelerin lag fazına gelmeleri beklendikten sonra CB1954 ve NADH konsantrasyonu 10 ve 100 μ M, Ntr oranı ise 0.1 ve 0.45 mg/ml olacak şekilde kombinasyonlar uygulanarak aynı şartlarda tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra plaklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. 37°C su banyosunda ısıtılan 1 ml 1XPBS ile hücreler yıkandıktan sonra her kuyuya 250 μ l Tripsin-EDTA eklenmiştir. 37°C'de 5 dakika inkübe edilerek hücrelerin yüzeyden kalkması sağlanmış, 37°C su banyosunda ısıtılan 1 ml besiyeri (DMEM) ile toplanan hücreler ayrı tüplere alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellete 1 ml soğuk 1XPBS eklenerek nazikçe süspanse edilmiştir. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülmüş ve pellete 100 μ l bağlanma tamponu (binding buffer) eklenmiştir. Hafifçe sallanarak süspanse olması sağlanmış, bütün tüplere sırayla 5 μ l Annexin V ve 5 μ l PI (Propidium Iodide) eklenmiş ve hafifçe sallanmıştır. 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra bütün tüplere 400'er μ l bağlanma tamponu eklenerek 10 dakika bekledikten sonra Becton Dickinson Akan hücre ölçer cihazına yerleştirilmiş ve okuma yapılmıştır.

3. BULGULAR

Bu bölümde HeLa hücrelerine çeşitli konsantrasyonlarda Nitroredüktaz (Ntr) enzimi, ilaç öncülü (CB1954) ve kofaktör (NADH) tek başına, ikili ve üçlü kombinasyonları uygulanarak hücre canlılığına etkisi ve programlı hücre ölümü (apoptozis) analizlerinden elde edilen sonuçlar gösterilmiştir.

3.1. Nitroredüktaz/CB1954 Terapisinin Hücre Canlılığına Etkisi

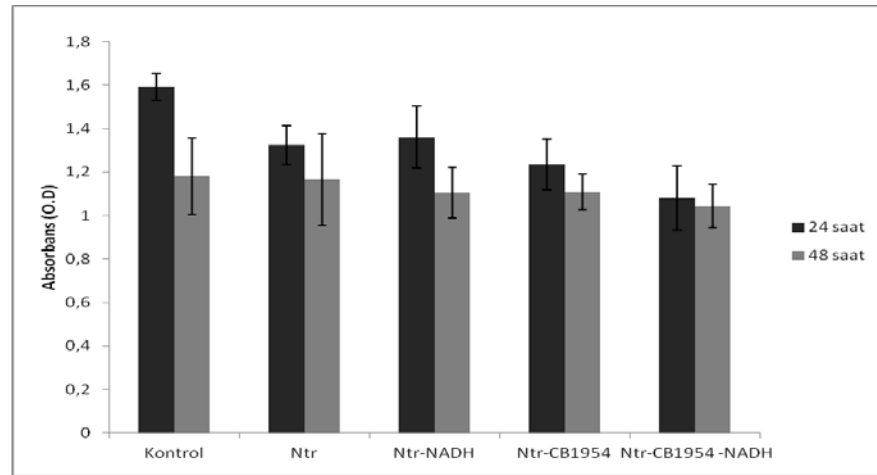
In vitro Enzim/İlaç öncü terapilerinde kullanılan CB1954 ilaç öncülü, sitotoksik olduğu bilinen DMSO'da çözünmektedir. CB1954'ün çözünebileceği en düşük [Vass et al., 2009] toksik olmayan konsantrasyon %0.5 (w/v) olduğu MTS yöntemiyle saptanmıştır [Tunçer, 2007].

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde saflaştırılmış Ssap-Ntr enzimi -20°C'de %50 gliserol içerisinde muhafaza edilmektedir. Tez çalışmasında kullanılan 0.45 mg/ml enzimin içerdiği maksimum final gliserol oranı %1.7 iken 0.1 mg/ml enzimin içerdiği gliserol oranı %0.38 olarak hesaplanmıştır. Bu yüzden hücrelere %5, %1.7, %1, %0.5, %0.1 ve %0.05 (v/v) oranında gliserol steril distile su ile seyreltilerek hücrelere uygulanmış ve %5 (v/v) gliserol konsantrasyonunun dışında diğer konsantrasyonların toksik olmadığı saptanmıştır.

Materyal ve Yöntem kısmında detaylı şekilde bahsedildiği gibi, Ntr/CB1954/NADH uygulamasının hücrelere olan sitotoksik etkisi, MTS yöntemiyle saptanmış ve elde edilen grafikler bu bölümde detaylıca açıklanmıştır.

3.1.1. Nitroredüktaz (Ntr) Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisi

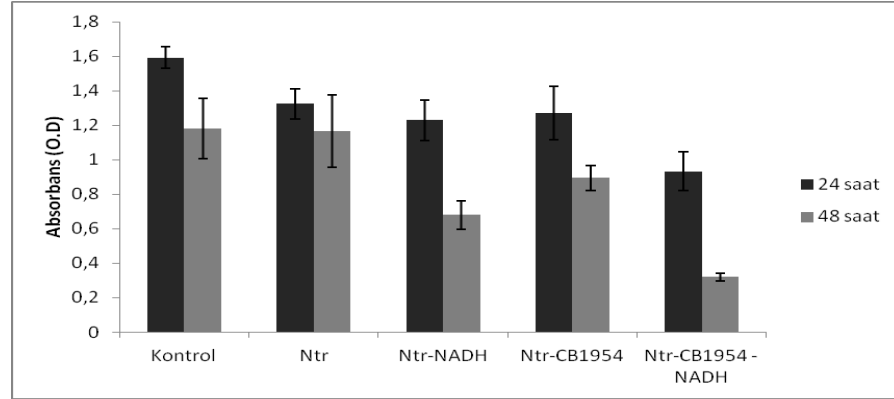
Şekil 3.1’de görüldüğü gibi Ntr’nin (0.1 mg/ml) HeLa hücreleriyle 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucunda hücrelere toksik olmadığı saptanmıştır. Ntr’nin 10 μ M NADH ile ikili kombinasyonunun (Ntr-NADH) ve 10 μ M CB1954 ilaç öncülüyle ikili kombinasyonunun da (Ntr-CB1954) hücre canlılığına etkisi olmadığı görülmektedir. Ntr’nin üçlü kombinasyonun ise (Ntr-CB1954-NADH) 24 saat inkübasyonu hücrelerin %32.2’sinin öldüğü saptanmıştır. Ancak 48 saat inkübasyon belirgin bir sitotoksik etki göstermemiştir ($p \leq 0.05$) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Ntr’nin (0.1 mg/ml) tek başına, 10 μ M NADH ve 10 μ M CB1954 ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının HeLa hücre canlılığına etkisi. *Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.*

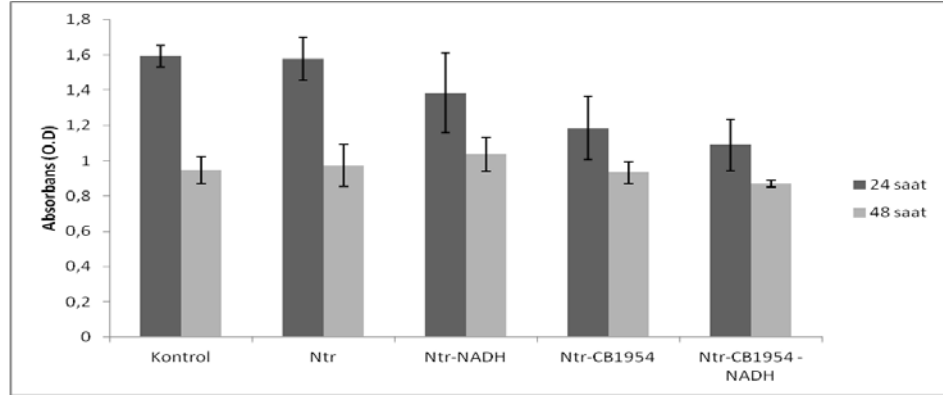
CB1954’ün 100 μ M konsantrasyonu 0.1 mg/ml Ntr ile kombinasyonunda (Ntr-CB1954) 24 saat ve 48 saat inkübasyon sonucunda hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlenmemektedir. 0.1 mg/ml Ntr’nin 100 μ M NADH ile kombinasyonu (Ntr-NADH) 24 saat inkübasyon sonucunda toksik etki göstermemiştir fakat aynı kombinasyonun 48 saat inkübasyonu sonucunda hücre canlılığında azalma gözlenmektedir. 0.1 mg/ml Ntr’nin 100 μ M CB1954 ve 100 μ M NADH (Ntr-CB1954-NADH) HeLa hücreleriyle 24 saat inkübasyon sonrası absorbans değeri 1.6’dan 0.9’a düşmüştür. Hücrelerin aynı kombinasyonla (Ntr-CB1954-NADH) 48

saat inkübasyonu sonucunda absorbans değeri 1.2'den 0.3'e düşmüştür ($p \leq 0.05$) (Şekil 3.2). Enzim konsantrasyonu sabit kalmasına rağmen CB1954'ün konsantrasyonunun artırılması canlılık üzerinde belirgin etki yaptığını göstermektedir (Şekil 3.1 ve 3.2).

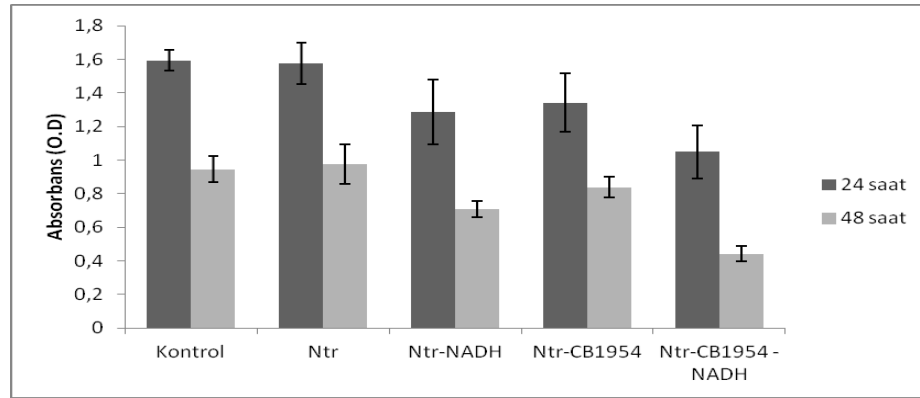


Şekil 3.2: Ntr'nin (0.1 mg/ml) tek başına, 100 μ M NADH ve 100 μ M CB1954 ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının HeLa hücre canlılığına etkisi. *Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.*

Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te belirtildiği gibi enzim konsantrasyonu 0.45 mg/ml olarak hücrelere tek başına uygulandığında 24 ve 48 saat inkübasyon sonucu hücrelere sitotoksik etki göstermemiştir. Enzimin (0.45 mg/ml) 10 μ M CB1954 (Ntr-CB1954) ya da NADH ile (Ntr-NADH) ikili kombinasyonu da sitotoksik etki göstermezken 10 μ M CB1954 ve NADH ile üçlü kombinasyonu (Ntr-CB1954-NADH) hücrelere 24 ve 48 saat inkübasyon sonucu belirgin bir sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 3.3) ($p \leq 0.05$). Şekil 3.4'te CB1954 konsantrasyonu 100 μ M olarak uygulandığında ise enzimin CB1954 ya da NADH ile ikili kombinasyonlarında 24 saat ve 48 saat inkübasyon sonunda sitotoksik etki gözlenmemiş, üçlü kombinasyonun 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucunda belirgin bir sitotoksik etki gözlenmiştir ($p \leq 0.05$).



Şekil 3.3: Ntr'nin (0.45 mg/ml) tek başına, 10 μ M NADH ve 10 μ M CB1954 ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının HeLa hücre canlılığına etkisi. *Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.*

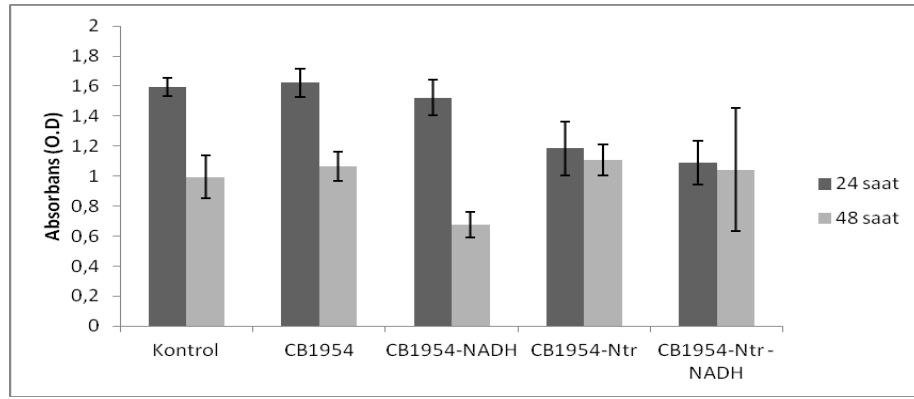


Şekil 3.4: Ntr'nin (0.45 mg/ml) tek başına, 100 μ M NADH ve 100 μ M CB1954 ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının HeLa hücre canlılığına etkisi. *Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.*

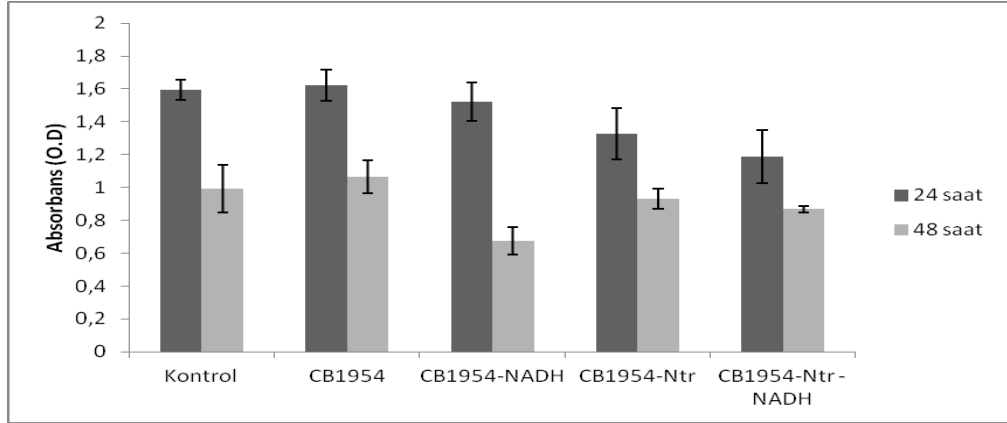
3.1.2. İlaç Öncü Madde (CB1954) Kombinasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisi

Absorbans grafiklerine göre CB1954 ilaç öncülü tek başına uygulandığında 10 μ M ve 100 μ M konsantrasyonda dahi hiçbir uygulama yapılmayan kontrol hücrelerine göre 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası sitotoksik etki göstermemiştir (Şekil 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8).

CB1954'ün NADH ile ikili kombinasyonları (CB1954-NADH) 10 ve 100 μM için 24 saat inkübasyonlarda absorbansın azalmadığı dolayısıyla sitotoksik etkinin gözlenmediği sonucuna varılmaktadır. Ancak aynı konsantrasyonların 48 saat inkübasyonları sonucunda özellikle ilaç öncü madde konsantrasyonu 100 μM 'a yükseldiğinde belirgin bir sitotoksik etki gözlenmiştir ($p \leq 0.05$). CB1954'ün Ntr ile kombinasyonları (CB1954-Ntr) hiçbir konsantrasyonda 24 ve 48 saat inkübasyon sonucu absorbansda belirgin bir azalma saptanmamıştır. Bu durum sitotoksik etkinin olmadığına işaret etmektedir. Üçlü kombinasyonlarda (Ntr-CB1954-NADH) ise 0.1 mg/ml enzim ve 10 μM CB1954 konsantrasyonu 24 saat inkübasyon sonucunda sitotoksik etki gözlenirken, 48 saat inkübasyon sonucunda belirgin bir sitotoksik etki görülmemektedir ($p \leq 0.05$) (Şekil 3.5 ve 3.6).

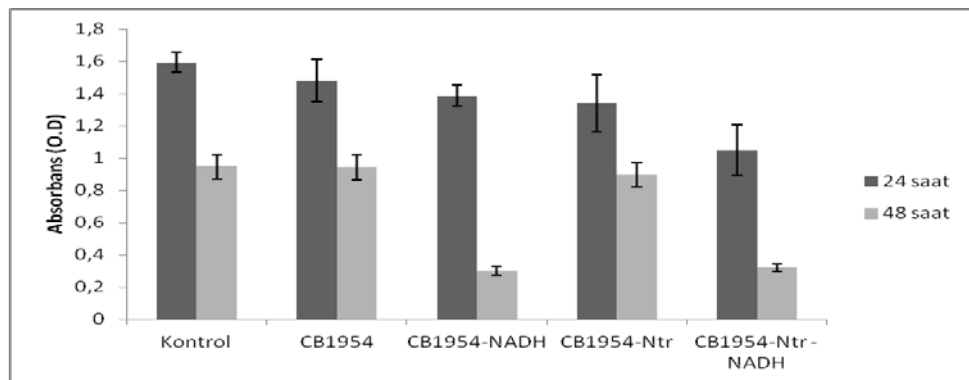


Şekil 3.5: 10 μM CB1954 konsantrasyonunun 0.1 mg/ml enzim varlığında hücre canlılığına etkisi. HeLa hücrelerine CB1954 tek başına, 10 μM NADH ile ikili (CB1954-NADH), 0.1 mg/ml Ntr ile ikili (CB1954-Ntr) ve üçlü kombinasyonlar (Ntr-CB1954-NADH) uygulanmış 24 ve 48 saat süresince uygulanmıştır. *Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.*

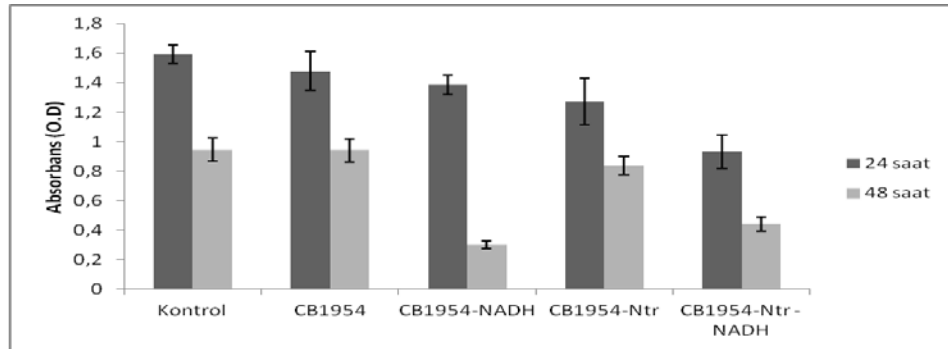


Şekil 3.6: 10 µM CB1954 konsantrasyonunun 0.45 mg/ml enzim varlığında hücre canlılığına etkisi. HeLa hücrelerine CB1954 tek başına, 10 µM kofaktör ile ikili (CB1954-NADH), 0.45 mg/ml enzim ile ikili (CB1954-Ntr) ya da üçlü kombinasyonlar (Ntr-CB1954-NADH) 24 ve 48 saat süresince uygulanmıştır. *Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.*

CB1954-Ntr-NADH üçlü kombinasyonlarının 100 µM ilaç öncülü uygulamalarında 0.1 ve 0.45 mg/ml enzim konsantrasyonlarında inkübasyon süresinin 24 saatten 48 saate artmasıyla orantılı olarak sitotoksik etkinin de arttığı görülmektedir (Şekil 3.7 ve 3.8).



Şekil 3.7: 100 µM CB1954 konsantrasyonunun 0.1 mg/ml enzim ile hücre canlılığına etkisi. HeLa hücrelerine tek başına, 100 µM kofaktör ile ikili (CB1954-NADH), 0.1 mg/ml enzim ile ikili (CB1954-Ntr) ve üçlü kombinasyonlarının (Ntr-CB1954-NADH) 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. *Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.*



Şekil 3.8: 100 μ M CB1954 konsantrasyonunun 0.45 mg/ml enzim ile hücre canlılığına etkisi. HeLa hücrelerine tek başına, 100 μ M kofaktör ile ikili (CB1954-NADH), 0.45 mg/ml enzim ile ikili (CB1954-Ntr) ve üçlü kombinasyonlarının (Ntr-CB1954-NADH) 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. *Barlar üç deneye ait standart sapmaları belirtmektedir.*

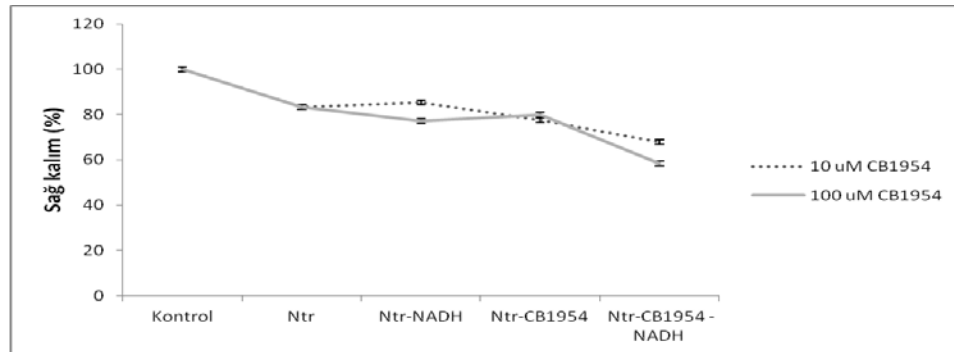
Sonuç olarak, Ntr enzimi, CB1954 ilaç öncülü ya da NADH kofaktörü tek başına HeLa hücrelerine 24 saat ve 48 saat süresince uygulandığında hücreler üzerinde sitotoksik etki gözlenmemiştir. Uygulamalar sonrası elde edilen absorbans değerlerinin hiçbir uygulama yapılmayan kontrol HeLa hücrelerinin absorbans değerleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark oluşturmadığı ANOVA çoklu karşılaştırma testine tabi tutularak istatistiksel olarak hesalanmıştır. Ancak kofaktörün, Ntr enzimiyle ya da CB1954 ilaç öncülüyle ikili kombinasyonlarının ve üçlü kombinasyonlarının absorbans değerlerinin düşmesi sitotoksik etkinin olduğuna işaret etmektedir.

3.2. Nitroredüktaz/CB1954 Terapisi Ardından Sağ Kalım Oranları

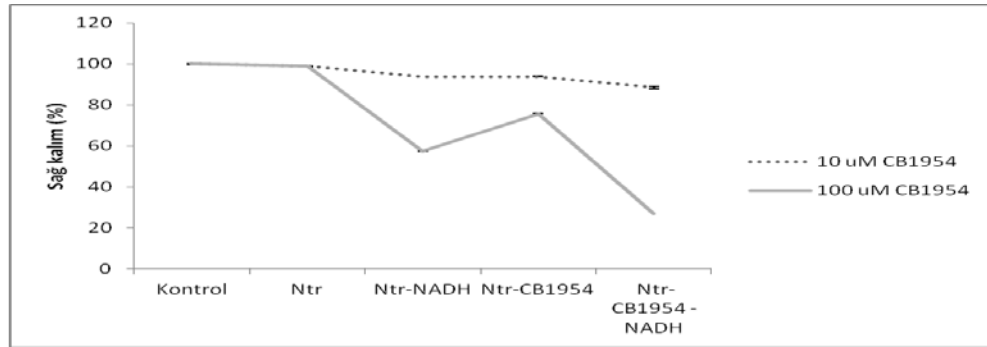
Bu bölümde uygulama yapılan HeLa hücrelerinin MTS indirgenme metoduyla 490 nm'de ölçülen absorbans değerleri uygulama yapılmayan kontrol absorbans değerleriyle karşılaştırılarak yüzde oranları saptanmış ve sağ kalım grafikleri elde edilmiştir.

Nitroredüktaz enzim konsantrasyonu 0.1 mg/ml iken 10 μ M CB1954 ve NADH üçlü kombinasyonu 24 saat inkübasyon sonucunda hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubuna göre HeLa hücrelerinin canlılığının %67,8'e düşmesine sebep olurken (Şekil 3.9) aynı konsantrasyonda 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığı %88,3'dir (Şekil 3.10). CB1954 ve NADH konsantrasyonu 100 μ M'a yükseltildiğinde 0.1 mg/ml enzim varlığında üçlü kombinasyonu 24 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin canlılık oranını %58,5'e düşürürken, 48 saat inkübasyonu %27'ye düşürmektedir (Şekil 3.9 ve 3.10). Aynı konsantrasyondaki enzimin 100 μ M CB1954 ilaç öncülüyle uygulanması sırasında inkübasyon süresinin artırılması hücre canlılığını daha fazla düşürmüştür. Ntr (0.1 mg/ml)-NADH (100 μ M) ikili kombinasyonu 48 saat inkübasyon sonucunda canlılık oranını %57,6'ya düşürmektedir ancak bu oran aynı şartların üçlü kombinasyonunun düşürdüğü canlılık oranından (%27) daha fazladır (Şekil 3.10).

İlaç öncülünün düşük konsantrasyonu (10 μ M) yeterli aktif ilacı oluşturmadığı için 24 saat sonrası hücre sağ kalımındaki oran %67,8'dir. Bu durum bystander etkinin yeterince gerçekleşmediğini göstermektedir. 100 μ M ilaç öncülünün ise yeteri kadar aktif ilacın oluşmasına yol açarak hücre ölümünü tetiklemekte ve hücre sağ kalımını %58,5'e indirmektedir.

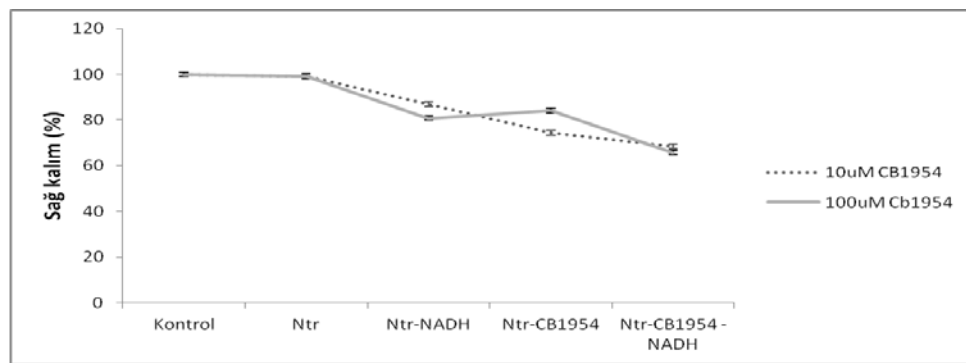


Şekil 3.9: 0.1 mg/ml Ntr enzimi, CB1954 ve NADH ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının 24 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları.

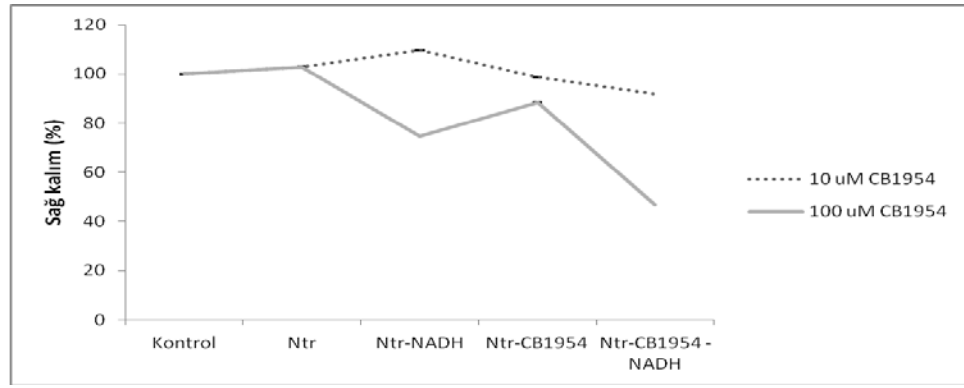


Şekil 3.10: 0.1 mg/ml Ntr ile CB1954 ve NADH ikili ve üçlü kombinasyonlarının 48 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları.

Enzim konsantrasyonu 0.45 mg/ml olduğunda 10 μ M CB1954 ve NADH konsantrasyonu HeLa hücrelerine uygulandığında hücrelerin canlılık oranı 24 saat sonunda %68,3'e (Şekil 3.11) 48 saat sonunda ise %92'ye (Şekil 3.12) düşmektedir. Hücre ölümü 10 μ M ilaç öncülü ve 0.45 mg/ml enzim varlığında inkübasyon süresinin artmasıyla daha fazla tetiklenmemiştir. Bu sonuçlar bystander etkinin yeterince gerçekleşmediğine işaret etmektedir. Ancak ilaç öncülü ve kofaktör konsantrasyonu 100 μ M'a yükseltildiğinde hücre canlılığı 24 saat sonunda %65,8'e 48 saat sonunda ise %46,7'ye düşmektedir (Şekil 3.11 ve 3.12). Böylece 100 μ M uygulamada inkübasyon süresinin artması hücre ölümünü de arttırmaktadır.

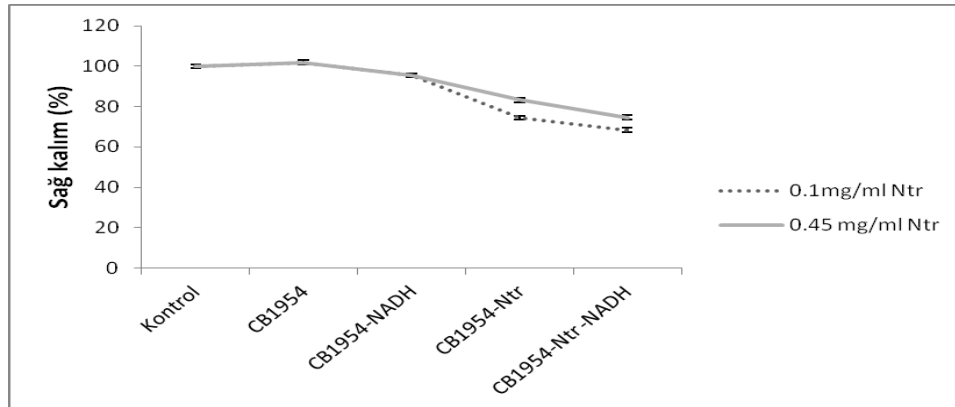


Şekil 3.11: 0.45 mg/ml Ntr ile CB1954 ve NADH ikili ve üçlü kombinasyonlarının 24 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları.

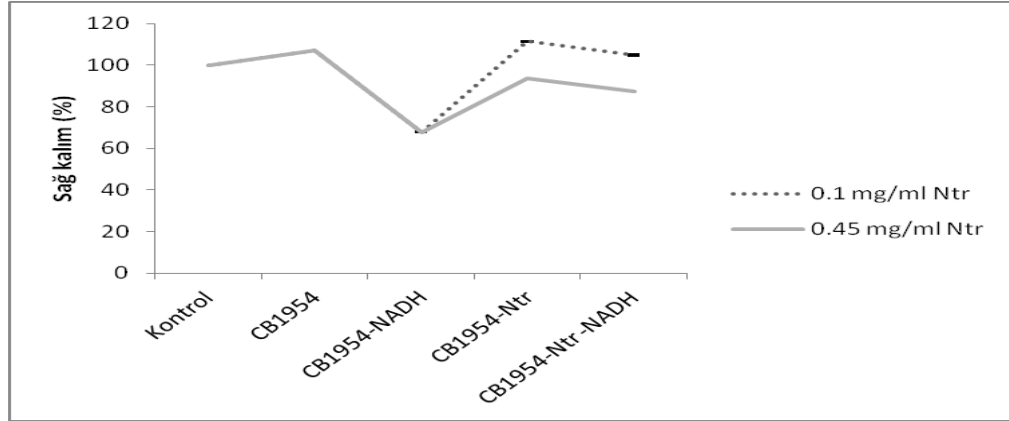


Şekil 3.12: 0.45 mg/ml Ntr ile CB1954 ve NADH ikili ve üçlü kombinasyonlarının 48 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları.

CB1954'ün tek başına ikili (CB1954-Ntr, CB1954-NADH) ve üçlü kombinasyonlarının (CB1954-Ntr-NADH) etkisinin incelendiği uygulamalarda CB1954 konsantrasyonu 10 µM olarak sabit tutulmuştur. CB1954'ün 10 µM NADH ile birlikte 24 saat uygulanması hücre canlılık oranını belirgin şekilde düşürmezken (Şekil 3.13), aynı konsantrasyonun 48 saat inkübasyonu canlılık oranını %67,8'e düşürmüştür (Şekil 3.14). 0.1 mg/ml Ntr'nin 10 µM CB1954 ve NADH ile üçlü kombinasyonu ise 24 saat sonunda canlılık oranını %68,3'e 0.45 mg/ml Ntr ile üçlü kombinasyonu ise %74,5'e düşürmüştür (Şekil 3.13 ve 3.14).

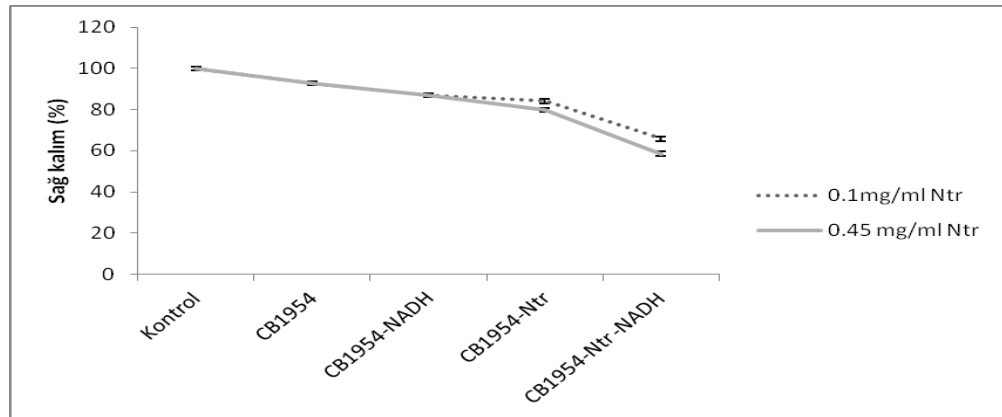


Şekil 3.13: 10 µM CB1954'ün Ntr ve NADH ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının 24 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları.

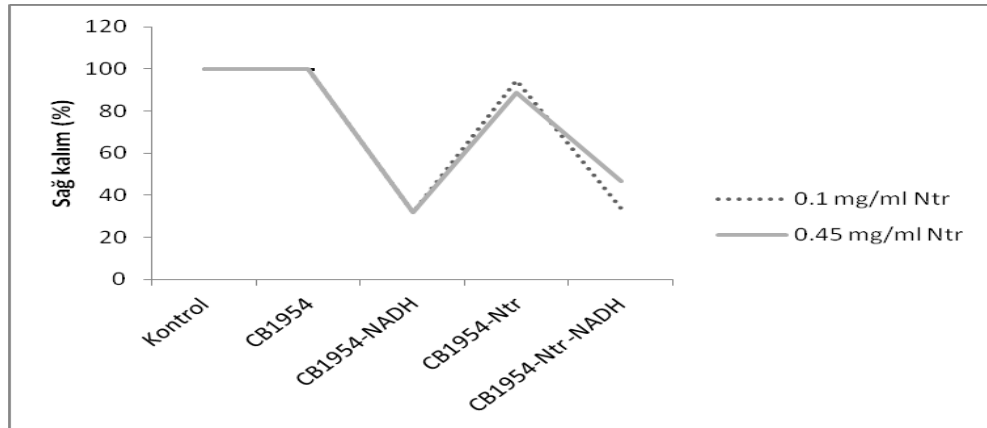


Şekil 3.14: 10 µM CB1954'ün Ntr ve NADH ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının 48 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları.

100 µM CB1954'ün 100 µM NADH ile 24 saat uygulaması sonrası canlılık oranı %87'dir (Şekil 3.15). Aynı kombinasyonun 48 saat inkübasyon sonucu hücre canlılık oranı %31,7'dir (Şekil 3.16). Üçlü kombinasyonlarda ise 24 saat sonrası 0.1 mg/ml enzim varlığında hücre canlılığı %65,8'e, 0.45 mg/ml ise %58,5'e inmektedir. İnkübasyon süresi 48 saate çıkarıldığında 0.1 mg/ml Ntr varlığında sağ kalan hücre % 33,8 iken, 0.45 mg/ml Ntr varlığında sağ kalan hücre oranı %46,7 olarak saptanmıştır.



Şekil 3.15: 100 µM CB1954'ün Ntr ve NADH ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının 24 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları.



Şekil 3.16: 100 µM CB1954'ün Ntr ve NADH ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının 48 saat inkübasyon sonucunda sağ kalım oranları.

Sonuç olarak 0.1 mg/ml enzim varlığında 100 µM ilaç öncü madde ve 100 µM kofaktör kombinasyonunun 48 saat süresince hücelere uygulanması hücre sağ kalımını %27'ye düşürmüştür. Bu değerden yola çıkılarak CB1954'ün hücelere 48 saat uygulanması sonucu, hücrelerin yarısını öldüren CB1954'ün LD₅₀ (Letal Doz) değeri 54 µM'dır.

3.3. Akan Hücre Ölçer (Flow Cytometry) Analizleri

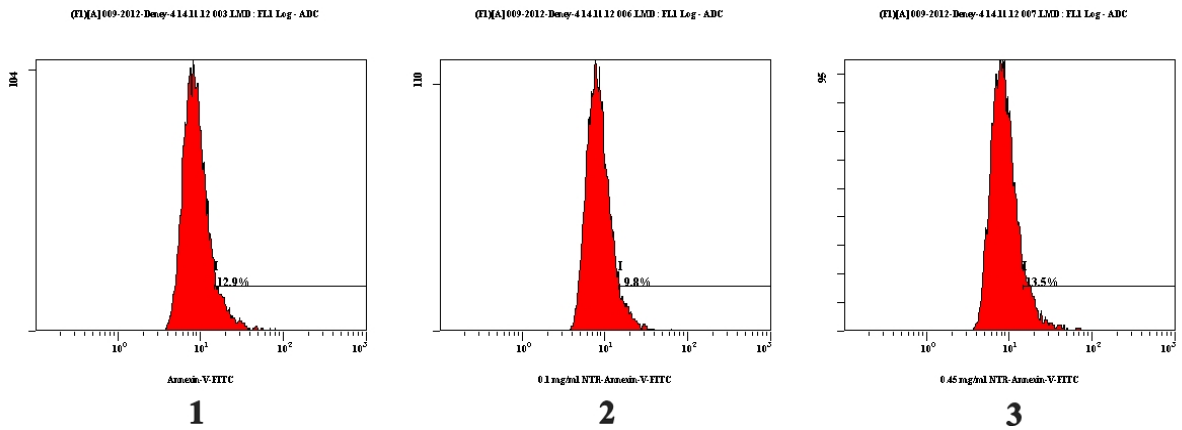
3.3.1. Nitroredüktaz/CB1954 Terapisi Ardından Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis) Tayini

Nitroredüktaz, CB1954 ve kofaktör kombinasyonlarının HeLa hücre hattının hücre ölüm mekanizmalarına doz bağımlı etkisini incelemek amacıyla Materyal ve Yöntem kısmında belirtildiği gibi hücreler 6 kuyulu plaklara her kuyuda 25×10^4 hücre olarak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat sonra 0.1 ve 0.45 mg/ml enzim tek başına ve CB1954 ve NADH'ın 10 ve 100 µM konsantrasyondaki kombinasyonlarıyla hücelere ikili tekrarlar halinde uygulanmış, 24 saat sonra ise akan hücre ölçer cihazıyla apoptotik ya da apoptotik olmayan hücre ölüm oranları saptanmıştır.

3.3.1.1. Apoptozis Belirteci Fosfotidilserine Bağlanan Toplam Hücre Sayısının Tespiti (Histogramlar)

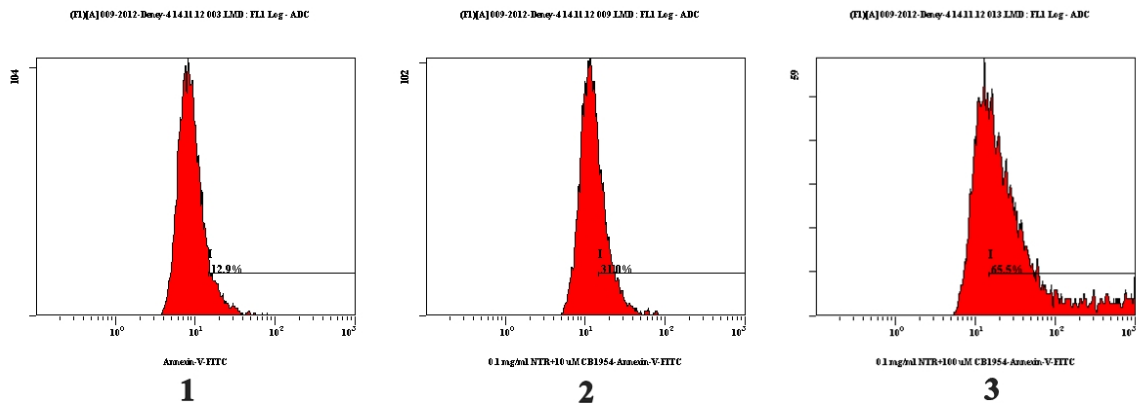
Akan hücre ölçer analizlerinde, toplam apoptozis oranını yüzde olarak ifade eden histogram grafiklerinde x eksenini Annexin V antikoruna bağlı olan FITC florokromun yaydığı floresanı, y eksenini ise toplam hücre sayısını ifade etmektedir. Dolayısıyla FITC'nin yaymış olduğu floresan oranı apoptozis ile doğru orantılıdır.

Akan hücre ölçer cihazının diğer bir üniversitede bulunması, analizi yapılacak örneklerin ulaşımı esnasında kısmen de olsa hücre ölümü tetiklenebilmektedir. Bu nedenle EPT uygulanmayan kontrol hücrelerine de Annexin V-FITC ve PI muamelesi yapılmıştır. Apoptozis belirteci olan membranın dış yüzeyine göç eden fosfotidilserinlere Annexin V proteini bağlanır. Annexin V proteinine bağlı olan FITC'nin yaymış olduğu floresana göre kontrol hücrelerinin ölüm oranı %12.9 olarak saptanmıştır (Şekil 3.17-1). 0.1 ve 0.45 mg/ml enzim tek başına hücrelere uygulandığında ise, hiçbir uygulama yapılmayan kontrol hücreleriyle kıyaslandığında sırasıyla % 9.8 ve % 13.5 oranında apoptozis gözlenmektedir (Şekil 3.17-2,3). Böylece nitroredüktaz enzimi tek başına uygulandığında kontrol hücrelerine oranla belirgin bir fark gözlenmemektedir.



Şekil 3. 17: Enzimin tek başına uygulandığı histogram sonuçları. Annexin V antikorunun bağlı olduğu FITC florokromun floresan yayılımını gösteren histogram grafiklerinde artan enzim konsantrasyonuna göre apoptotik hücre oranları gösterilmektedir. Kontrol hücreleri (1), 0.1 mg/ml nitroredüktaz uygulanan hücreler (2) ve 0.45 mg/ml nitroredüktaz enzimi uygulanan hücrelerin (3) floresan yoğunluğu oranları histogram grafiklerinde görülmektedir. *X* eksenini: FITC floresan yoğunluğunu, *Y* eksenini: hücre sayısını belirtmektedir.

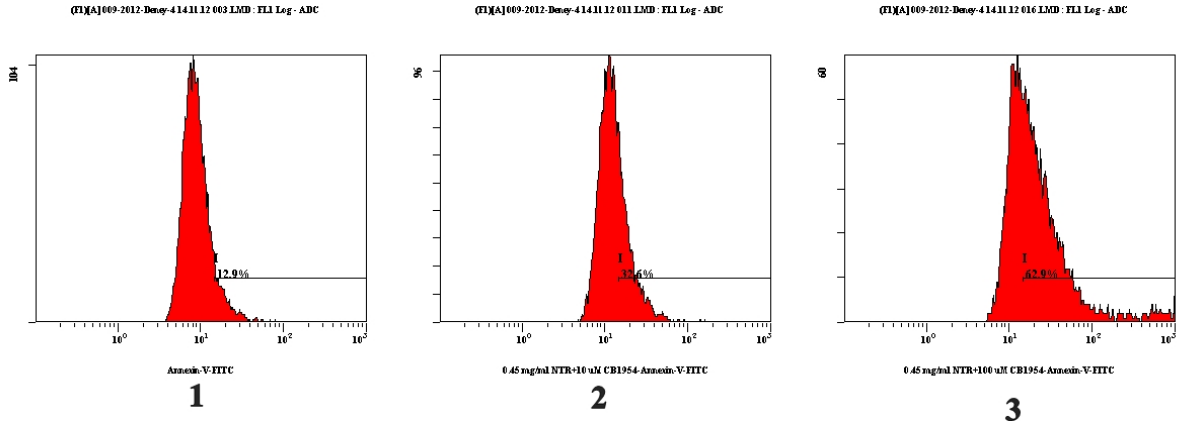
Nitroredüktaz enzim konsantrasyonu 0.1 mg/ml olarak sabit tutulduğunda CB1954 ve NADH'in birlikte uygulandığı kombinasyonlarda doz bağımlı apoptozisin tetiklendiği Şekil 3.18'de açık bir şekilde görülmektedir. EPT uygulaması yapılmayan kontrol (Şekil 3.18-1) hücrelerinde %12.9 apoptozis gözlenirken, CB1954 ve NADH konsantrasyonunun 10 μ M'dan 100 μ M'a çıkarıldığında apoptozis oranı da % 31'den % 65.5'e yükselmiştir (Şekil 3.18-2,3). Dolayısıyla CB1954 konsantrasyonu artırıldığında apoptozis oranının da 2 kattan daha fazla tetiklendiği görülmektedir.



Şekil 3.18: 0.1 mg/ml enzim varlığında üçlü kombinasyonların kontrol hücreleriyle karşılaştırmalı histogram grafikleri. EPT uygulaması yapılmayan kontrol hücreleri (1), 10 μ M (2) ve 100 μ M (3) CB1954 ve NADH varlığında 0.1 mg/ml nitroredüktaz enzimiyle birlikte meydana gelen apoptozis oranları histogram grafiklerinde floresan yoğunluğu ile gösterilmiştir. *X eksen:* FITC floresan yoğunluğunu, *Y eksen:* hücre sayısını belirtmektedir.

Şekil 3.19'da nitroredüktaz enzimi 0.45 mg/ml olarak sabit tutulduğunda, CB1954 ve NADH konsantrasyonunun 10 μ M'dan 100 μ M'a yükseltile uygulama sonucunda doz bağımlı olarak apoptozisin tetiklendiği görülmektedir. 10 μ M CB954 ve NADH konsantrasyonunda % 32.6 apoptozis oranı gözlenirken (Şekil 3.19-2), 100 μ M konsantrasyonda % 62.9 oranında apoptozis görülmektedir (Şekil 3.19-3). CB1954 ve NADH konsantrasyonu 10 μ M olarak sabit tutulduğunda Ntr'nin 0.1 mg/ml'den 0.45 mg/ml'ye yükseltilmesi apoptozis artışında belirgin bir fark

oluşturmamıştır. Aynı durum 100 μM CB1954 ve NADH konsantrasyonu sabit tutulduğunda da gözlenmektedir.



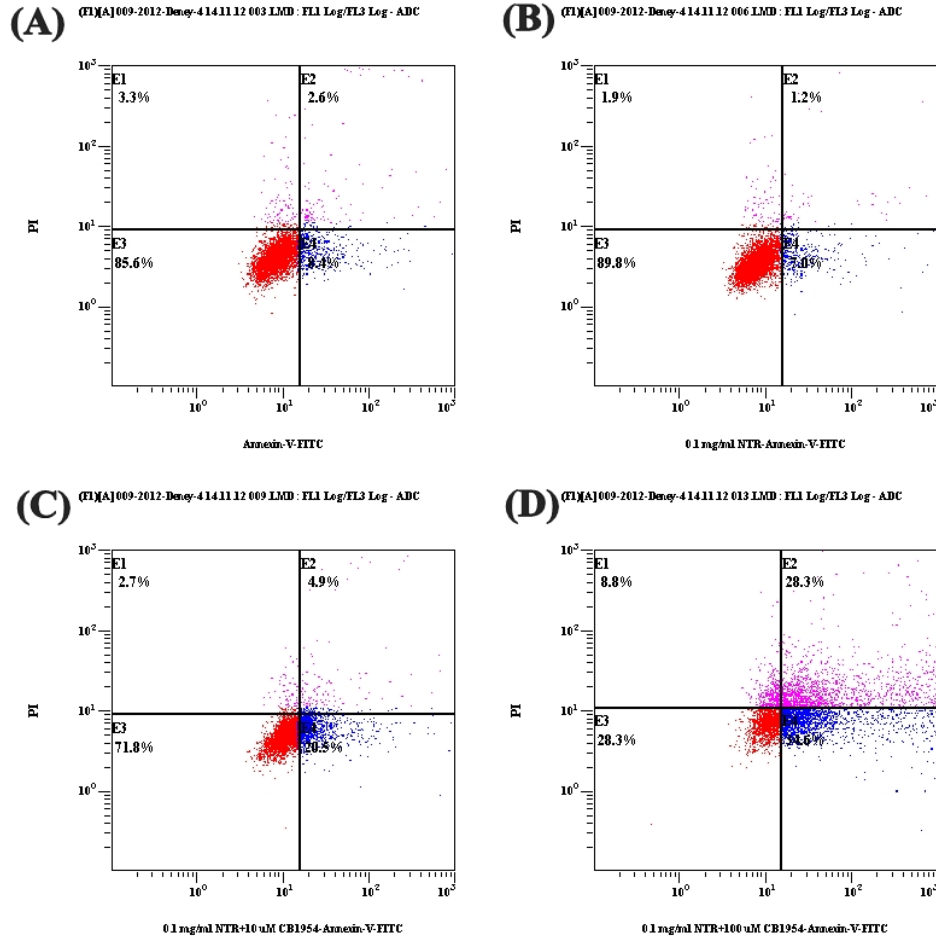
Şekil 3.19: 0.45 mg/ml enzim varlığında üçlü kombinasyonların kontrol hücreleriyle karşılaştırmalı histogram grafikleri. EPT uygulaması yapılmayan kontrol hücreleri (1), 10 μM (2) ve 100 μM (3) CB1954 ve NADH varlığında 0.45 mg/ml nitroredüktaz enzimiyle birlikte hücrelerde oluşturduğu apoptozis oranları görülmektedir. *X* eksen: FITC floresan yoğunluğunu, *Y* eksen: hücre sayısını belirtmektedir.

3.3.1.2. Nokta Alan Grafikleri (Dot-plot)

Akan hücre ölçerde her noktanın bir hücreyi gösterdiği dot plot analizlerinde Anneksin V'e bağlı FITC'nin ve Propidyum iyodürün (PI) yaymış olduğu floresan yoğunluğu saptanabilmektedir. Böylece erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre oranlarını canlı hücre oranıyla karşılaştırmak mümkündür. Dot plot analizlerinde *X* eksen Anneksin V-FITC'nin, *y* eksen ise PI'nın yaydığı floresanı göstermektedir. Sadece PI ile boyanan hücreler dot plotlarda E1 bölgesinde yer alıp, apoptotik olmayan hücre oranını yani nekrotik hücre oranını belirtmektedir. E2 bölgesindeki hücreler, hem Anneksin V hem de PI ile boyanan hücreler olup, geç apoptotik hücre oranını belirtmektedir. Sadece FITC ile boyanan hücreler E4 bölgesinde yer almakta ve erken apoptozise uğrayan hücre oranını göstermektedir. Bu aşamada hücre membranının iç kısmında bulunan fosfotidilserinler dış kısma göç etmiştir ve Anneksin V antikorunun bağlanmasına olanak sağlamıştır. Bu da hücrelerin apoptozis ölüm yolağına girdiğini göstermektedir. Hücre ölümü

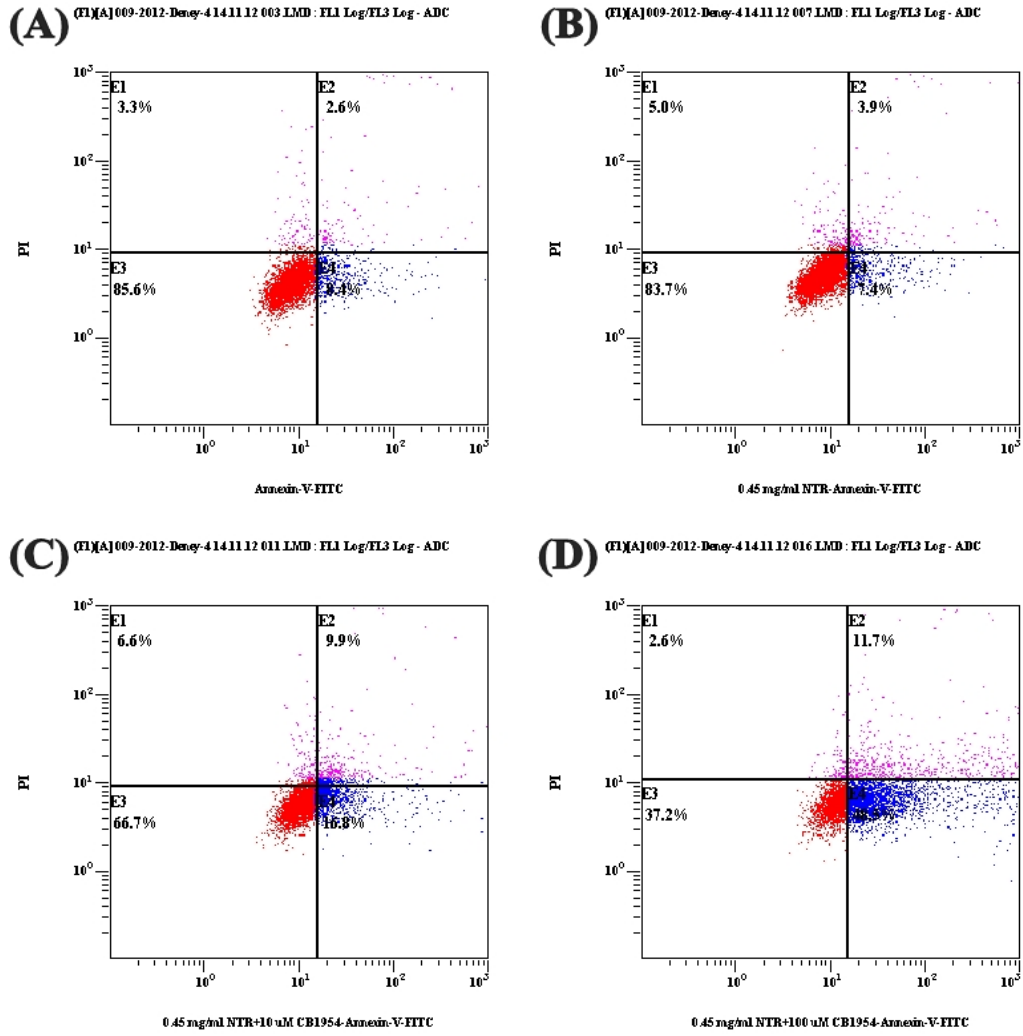
gerçekleşmediği için membran yapısı bozulmayan dolayısıyla hiçbir boya ile boyanmayan hücreler E3 bölgesinde canlı hücre oranını ifade etmektedir (Şekil 3.20).

Enzim konsantrasyonu 0.1 mg/ml olarak sabit tutulduğunda hiçbir uygulama yapılmayan kontrol hücreleriyle (Şekil 3.20-A) enzimin tek başına uygulandığı hücreler (Şekil 3.20-B) karşılaştırıldığında canlı hücre oranında (E3 bölgesi) belirgin bir fark yoktur. Bu oran kontrol hücrelerinde %85.6 iken Ntr'nin tek başına uygulandığı durumda %89.8'dir. Buradan enzimin tek başına hücrelere toksik olmadığı sonucuna varılmaktadır. Ancak Ntr/CB1954/NADH kombinasyonunda CB1954 konsantrasyonu 10 μ M iken canlı hücre oranı %85.6'dan %71.8'e (Şekil 3.20-C) düşmüştür. CB1954 konsantrasyonu 100 μ M olan kombinasyonda ise canlı hücre oranı %28.3'e (Şekil 3.20-D) inmiştir. EPT uygulanmayan kontrol hücrelerinde toplam hücre ölüm oranı %14.4'dür. CB1954 ve NADH konsantrasyonu 10 μ M olduğunda 0.1 mg/ml enzim varlığında hücre ölümü %28.2'ye, CB1954 ve NADH'in konsantrasyonu 100 μ M olduğunda 0.1 mg/ml enzim varlığında ise %71.7'ye yükselmiştir. Bu sonuçlardan nitroredüktaz enziminin tek başına hücrelere toksik olmadığı ancak CB1954 ve NADH ile birlikte uygulandığında doz bağımlı olarak programlı hücre ölümüne yol açtığı görülmektedir. 10 μ M CB1954 uygulamasında (Şekil 3.20-C) erken apoptozda, geç apoptoz ve nekrozise göre belirgin bir fark gözlenmesi kısmen de olsa apoptozisin tetiklendiğini göstermektedir. Ancak CB1954 konsantrasyonu 100 μ M olduğunda (Şekil 3.20-D) hem erken (%34.6) hem de geç apoptozda (%28.3), nekrozise (%8.8) göre belirgin bir fark oluşmaktadır. Grafiklerde ifade edildiği gibi 100 μ M ilaç öncülünün enzim ve kofaktör ile kombinasyonu apoptozisi %62.9 oranında tetiklediği görülmektedir.



Şekil 3.20: 0.1 mg/ml Ntr'nin 10 ve 100 μ M CB1954 ve NADH ile hücre ölümüne etkisi. Kontrol (A), 0.1 mg/ml enzim tek başına (B), 10 μ M (C) ve 100 μ M (D) CB1954 ve NADH kombinasyonları dot plot grafikleriyle gösterilmektedir.

Enzim konsantrasyonu 0.45 mg/ml olarak sabit tutulduğunda ise, enzimin tek başına uygulandığı grafikde (Şekil 3.21-B) canlı hücre oranı %83.7 iken, kontrol hücrelerinde bu oran %85.6'dır (Şekil 3.21-A). Ancak CB1954 ve NADH'in 10 μ M konsantrasyonu canlılığı %66.7'ye (Şekil 3.21-C) 100 μ M konsantrasyonu ise %37.2'ye düşürmüştür (Şekil 3.21-D). Toplam hücre ölümü ise 10 μ M için %33.3 ve 100 μ M için de %62.8 olarak saptanmıştır. Ayrıca 10 μ M ilaç öncülü erken apoptozisi (%16.8), geç apoptozis (%9.9) ve nekrozise (%6.6) göre daha fazla tetiklemiştir. Fakat, 100 μ M ilaç öncülünün hem erken (%48.5) hem de geç apoptozisi (%11.7), nekrozise (%2.6) göre belirgin şekilde daha fazla tetiklediği görülmektedir.



Şekil 3.21: 0.45 mg/ml Ntr'nin 10 ve 100 μ M CB1954 ve NADH ile hücre ölümüne etkisi. Kontrol (A), 0.45 mg/ml enzim tek başına (B), 10 μ M (C) ve 100 μ M (D) CB1954 ve NADH kombinasyonları dot plot grafikleriyle gösterilmektedir.

Tablo 3.1: Ntr/CB1954/NADH uygulamasından sonra akan hücre ölçer analizinde canlılık ve hücre ölümü yüzdeleri.

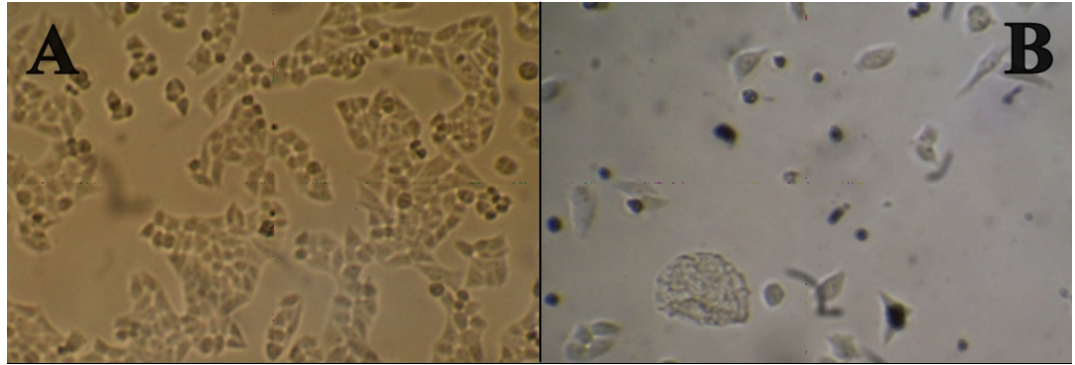
Uygulanan konsantrasyon	Canlı hücre (%)	Erken Apoptotik Hücre (%)	Geç Apoptotik Hücre (%)	Nekrotik Hücre (%)
Kontrol (uygulama yapılmamıştır)	70,7	15,7	7,0	6,7
0.1 mg/ml Ntr	72,2	12,4	7,0	8,1
0.45 mg/ml Ntr	79,9	10,7	5,4	4,0
Ntr:0.1 mg/ml CB1954:10 µM NADH: 10 µM	47,8	27,0	19,3	6,0
Ntr:0.1 mg/ml CB1954:100 µM NADH: 100 µM	22,9	24,5	39,1	13,6
Ntr:0.45 mg/ml CB1954:10 µM NADH: 10 µM	49,4	28,9	15,8	5,9
Ntr:0.45 mg/ml CB1954:100 µM NADH: 100 µM	30,9	26,5	31,6	11,1

Her bir verinin birbirinden bağımsız iki ayrı kuyunun ve birbirinden bağımsız üç farklı deneyin ortalamasını içeren Tablo 3.1’de görüldüğü gibi 0.1 mg/ml ve 0.45 mg/ml nitroredüktaz hücrelere tek başına uygulandığında, uygulama yapılmayan kontrol hücrelerinde olduğu gibi canlı hücre oranı %70 civarında olduğu ve apoptotik hücre oranının ise azaldığı gözlenmektedir. Diğer yandan, CB1954 (100 µM) ve NADH (100 µM)’ın Ntr (0.1 mg/ml) ile kombinasyonu sonucu hücrelerin canlılık oranı %22.9’a, 0.45 mg/ml Ntr ile kombinasyonu ise %30.9’a düşürmüştür. Erken apoptozis oranı şse aynı konsantrasyonlar için sırasıyla %24.5’e ve %26.5’e yükselmiş, geç apoptozis oranı da %31.6’ya yükselmiştir. Akan hücre ölçer sonucunda, üçlü kombinasyon uygulamasının HeLa hücrelerini apoptozis yoluyla öldürdüğü saptanmıştır.

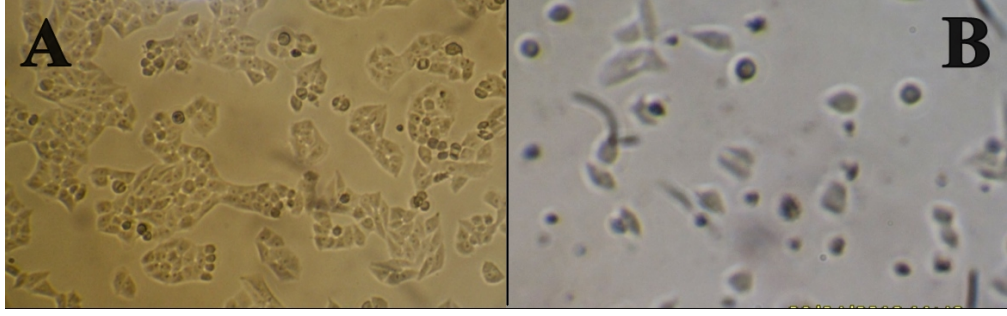
3.4. Nitroredüktaz/CB1954 Terapisi Sonrası Morfolojik Görüntülerin İncelenmesi

EPT uygulamaları sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri ışık mikroskobu kullanılarak gözlemlenmiştir. Nitroredüktaz enziminin 0.1 ve 0.45 mg/ml konsantrasyonda, CB1954 ve NADH'ın ise 10 ve 100 μ M konsantrasyonlarda uygulandığı HeLa hücreleri hiçbir uygulama yapılmayan kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında hücre morfolojilerinin değiştiği gözlenmiştir. Bu morfolojik değişikliklerde hücrelerin küçüldüğü ve yuvarlak hale geldiği gözlenmiştir. Bu tip hücre morfolojilerinin akan hücre ölçer (flow cytometry) sonuçlarına da dayanarak apoptoze özgü olduğunu söyleyebiliriz. Bu değişimler özellikle 100 μ M CB1954 konsantrasyonunda (Şekil 3.25-B) belirgin şekilde görülmektedir.

Enzim konsantrasyonu 0.1 mg/ml iken CB1954 ve NADH'ın 10 μ M konsantrasyonu hücre proliferasyonunu durdurmuş ve oval görünümlü normal hücrelerin yerini yuvarlak görünümlü hücre toplulukları almıştır (Şekil 3.22). Yuvarlak görünümlü hücreler CB1954 dozunun 100 μ M'a arttırıldığında daha net gözlenmektedir (Şekil 3.23).

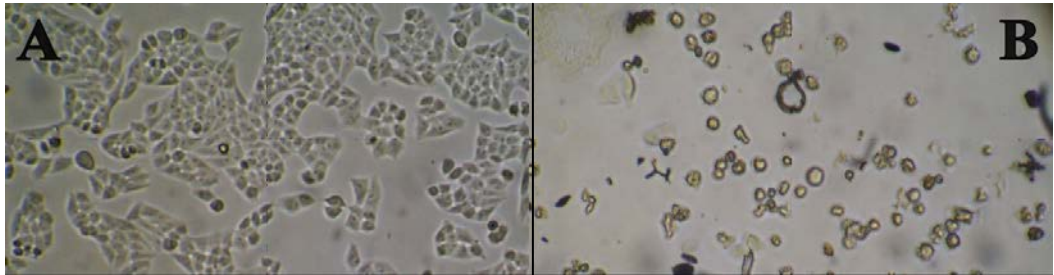


Şekil 3.22: 0.1 mg/ml Ntr, 10 μ M CB1954 ve NADH'ın HeLa hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. (A) Uygulama yapılmayan kontrol hücreleri, (B) EPT uygulanmış hücrelerin 24 saat inkübasyon sonrası görüntüleri (*Büyütme: 40X*).

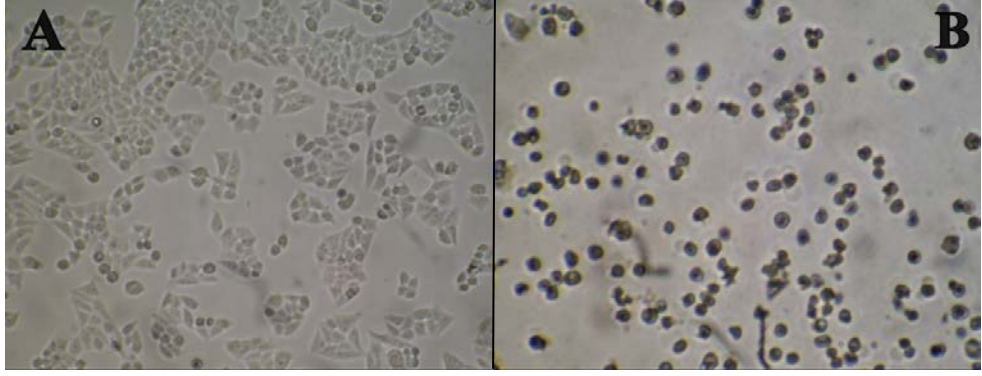


Şekil 3.23: 0.1 mg/ml Ntr, 100 µM CB1954 ve NADH'ın HeLa hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. (A) Uygulama yapılmayan kontrol hücreleri, (B) EPT uygulanmış hücrelerin 24 saat inkübasyon sonrası görüntüleri (*Büyütme: 40X*).

Enzim konsantrasyonu 0.45 mg/ml iken 10 ve 100 µM CB1954 ve NADH konsantrasyonunda (Şekil 3.24-B ve 3.25-B) hücrelerin neredeyse tamamı yuvarlak hale gelmiştir. Bu durum apoptozisin en belirgin özelliği olan çekirdeğin yoğunlaşması ve sitoplazmanın büzüşmesini düşündürmektedir.



Şekil 3.24: 0.45 mg/ml Ntr, 10 µM CB1954 ve NADH'ın HeLa hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. (A) Uygulama yapılmayan kontrol hücreleri, (B) EPT uygulanmış hücrelerin 24 saat inkübasyon sonrası görüntüleri (*Büyütme: 40X*).



Şekil 3.25: 0.45 mg/ml Ntr, 100 µM CB1954 ve NADH'in HeLa hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. (A) Uygulama yapılmayan kontrol hücreleri, (B) EPT uygulanmış hücrelerin 24 saat inkübasyon sonrası görüntüleri (*Büyütme: 40X*).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

İlaç öncülünü aktiveştiren enzimler olarak kullanılan bakteriyal nitroredüktazlar Enzim/ ilaç öncü terapi sistemlerinde birçok avantaja sahiptir. Bunlardan en önemlisi memeli türlerde bu enzimin çok düşük katalitik aktiviteye sahip olması ve yüksek seçicilikte substrata özgü olmasıdır. Bu da enzimin tümör dokusu dışında istenmeyen dokularda ilaç öncü aktivasyonunu engellemiş olur [Çelik ve Yetiş, 2012].

CB1954 ilaç öncülü, kanser terapilerinde nitroredüktaz enzimleriyle birlikte kullanılan anti-kanser ajandır. Nitroredüktazlar tarafından indirgenmesiyle oluşturdukları hidroksilamin türevleri, DNA'ya çapraz bağlar yaparak hücre ölümüne yol açan aktif ilaçlardır [Knox et al., 1992].

NTR/CB1954 uygulamasının bazı dezavantajları vardır. Nitroredüktazın ilaç öncü substratına afinitesi düşüktür, bu sebeple reaksiyon hızı da düşüktür. Bu yüzden diğer substratların kullanımı, diğer organizmalardan izole edilen nitroredüktazların kullanımı ya da enzim yapısında değişiklik yapılması gibi bazı alternatifler araştırılmaktadır [Oliveira et al., 2010]. Bu bilgilerin ışığında, tez çalışmasında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde *Staphylococcus saprophyticus*'dan izole edilen nitroredüktaz enzimi (Ssap-Ntr) ilk kez kanser hücrelerine denenmiş olup, CB1954 ilaç öncülünü aktiveştirerek HeLa hücrelerinde apoptozis yoluyla hücre ölümünü (Tablo 3.1) tetiklemiştir (%63.6).

Enzimin izole edildiği *Staphylococcus saprophyticus* 25°C-40°C sıcaklıkta büyüyen mezofilik bir bakteridir ve düşük sıcaklıkta aktif enzime sahiptir. Bakterinin düşük sıcaklıkta hayatta kalmasının, soğuğa adapte enzimler içerdiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir [Çelik ve Yetiş, 2012]. Ssap-Ntr'nin sıradışı özelliği olan soğukta aktiveleşebilme durumu, optimum sıcaklığı 37°C olan canlı sistemlerde uygulanabilirliğini azaltmaktadır. Maksimum aktivitesini 3-20°C aralığında gösteren enzim protein mühendisliği çalışmalarından yararlanılarak çeşitli biyokimyasal manüpülasyonlarla terapi uygulanacak canlıların fizyolojik koşullarına uygun hale getirilebilir.

Ssap-Ntr enzimi 3-20°C aralığında aktif olduğundan anaerobik koşullarda, 37°C'de büyüyen kanser hücrelerinin ortamında aktif olamayacaktır. Bu nedenle deneylerimizde CB1954 ilaç öncülü 4°C'de Ssap-Ntr tarafından NADH varlığında aktifleştirilmiş ve 45 dakika 4°C'de inkübasyon sonunda hücrelere çeşitli konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Böylelikle, hücre dışı aktivasyon sağlamıştır. Nitroredüktazların ilaç öncülünü aktifleştirmesi için kofaktörlere ihtiyaç duyması deneyler boyunca ilaç öncülüyle eşit konsantrasyonda NADH takviyesini gerektirmiştir. Ancak *in vivo*'da hücre içi aktivasyon çalışmalarında NADH takviyesi gerekmemekte, Ntr enzimi hücre içinde mevcut olan kofaktörleri kullanarak CB1954'ün indirgenmesi reaksiyonunu tamamlayabilmektedir.

Sitotoksosite deneylerine göre, 0.1 mg/ml ve 0.45 mg/ml Nitroredüktaz tek başına uygulandığında 24 saat ve 48 saat inkübasyonlar sonucunda hücre canlılığı sırasıyla 0.1 mg/ml için %83,1 ve %98,7, 0.45 mg/ml için %99'dur. Bu da kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında istatistiki açıdan belirgin bir fark oluşturmamıştır ($p \leq 0.05$). Sitotoksosite deneylerini destekleyen sonuçlar elde ettiğimiz apoptozis deneylerinde ise dot-plot grafiklerine göre toplam canlı hücre oranı 0.1 mg/ml Ntr için %89.8 0.45 mg/ml Ntr için %83.7 olarak saptanmıştır. Bu oran hiçbir uygulama yapılmayan kontrol hücrelerinde ise %85.6 olduğundan apoptozis analizlerine göre de enzimin tek başına uygulanması hücre ölümüne yol açmadığına işaret etmektedir.

Nitroredüktaz enzimi -20°C'de sodyum fosfat tamponunda, %50 gliserol varlığında saklanmıştır. Tez çalışmasında enzim, herhangi bir gen iletim ajanı kullanılmadan direkt olarak hücrelere uygulandığından, gliserolün oluşturacağı sitotoksik etkiyi ortadan kaldırmak için, düşük konsantrasyonda izole edilmiş enzimler sodyum fosfat ile seyreltilerek hücrelere uygulanmıştır. Gliserolün sitotoksik etkisini saptamak için hücrelere Materyal ve Yöntem kısmında belirtilen konsantrasyonlar steril distile su ile seyreltilerek hücrelere uygulanmıştır. Bunlardan final kuyu (100µl) konsantrasyonunun %5 gliserol olduğu durumda toksik olduğu, fakat uygulanan enzimin maksimum konsantrasyonda içerdiği gliserol oranının (%1,7) toksik olmadığı kontrol hücreleriyle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Her deneyde toksik etkinin gliserolden kaynaklanmaması için enzimin içerdiği maksimum gliserol konsantrasyonu kadar hücrelere uygulanmış ve gliserolün oluşturabileceği toksik etki uzaklaştırılmıştır.

CB1954 ilaç öncülü, hücrelere toksik olduğu bilinen DMSO'da çözülmüştür. Yapılan kinetik çalışmalarda, CB1954'ün sulu solüsyonda çözünebilmesi için minimum %5 DMSO içermesi gerekmektedir [Vass et al., 2009]. Tez çalışmasında, %5 DMSO içeren ilaç öncülünün hücrelere toksik olmadığını, tek başına %5 DMSO'yu hücrelere uygulayarak kontrol hücreleriyle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Ayrıca DMSO'nun toksik olma ihtimalini ortadan kaldırmak için her deneyde, CB1954 içermeyen gruplara %5 DMSO içeren taze besiyeri eklenmiştir.

CB1954 ilaç öncülü, absorbans ve sağ kalım grafiklerine göre 10 ve 100 μM olarak hücrelere tek başına uygulandığında sitotoksik etki gözlenmemiştir ($p \leq 0.05$). Bu durumda hücre içinde veya hücreler arası matriksde ilaç öncü maddenin aktifleşmediği sonucuna varılmaktadır.

NADH kofaktörünün hücrelere toksik etki oluşturma ihtimalini saptamak için tek başına uygulanmış ve sitotoksik etki gözlenmemiştir ($p \leq 0.05$). Ancak sağ kalım grafiklerine göre NADH kofaktörü Ntr enzimiyle birlikte uygulandığında 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığını düşürmektedir. 100 μM NADH ile birlikte 0.1 mg/ml enzim hücre canlılığını %57,6'ya, 0.45 mg/ml enzim ise %74,6'ya düşürürken, aynı konsantrasyonlarda 24 saat inkübasyon belirgin bir sitotoksik etki oluşturmamıştır ($p \leq 0.05$). MTS'in dehidrogenaz enzimleri varlığında NADH'ın indirgenerek formazan ürünü oluşumu prensibine dayandığından, dışarıdan uyguladığımız NADH'ın da enzimler aracılığıyla indirgenerek yanlış pozitif sonuç oluşturmuş olabileceğini düşünmekteyiz. NADH kofaktörünün CB1954 ile ikili kombinasyonu da 48 saat inkübasyon sonucu sitotoksik etki gösterirken 24 saat sonunda belirgin bir sitotoksik etki göstermemiştir. Sağ kalım eğrilerinden yola çıkarak hücre canlılığı 10 μM için %67,8'e 100 μM için ise %31,7'ye düşmektedir. Literatürde yer alan bir çalışmada CB1954, NADH kofaktörüyle birlikte uygulandığında DNA çapraz bağların oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir. Bunun sebebi serumda bulunan enzimlerle indirgenen NADH'ın oluşturduğu NRH (nikotinamid ribosid)'in insanlarda bulunan DT-Diaforaz enzimi tarafından kofaktör olarak kullanılması, dolayısıyla CB1954'ün aktivasyonunu tetiklediği düşünülmektedir [Friedlos et al., 1992]. Tez çalışmasında literatürle de uygunluk gösteren sonuçlarımızda NADH tek başına uygulandığında toksik etki göstermezken, CB1954 ve NADH'in beraber uygulanması toksik etkiye sebep olmuştur. Bu durum

besiyeri serumunda bulunan enzimler tarafından ilaç öncülünün aktiveleştirilebileceğini düşündürmektedir.

Tez çalışmasında kullanılan Ssap-Ntr enzimi NADH varlığında CB1954'ü indirgeyerek toksik ajanın oluşumunu sağlamaktadır [Çelik ve Yetis, 2012]. Sitotoksosite deneylerinden ve apoptozis tayininden elde edilen sonuçlara göre Ntr/CB1954 kombinasyonuna ilaç öncülü ile eşit konsantrasyonda eklenen NADH üçlü kombinasyonları HeLa hücrelerine belirgin sitotoksik etki göstermiştir. Özellikle eşit enzim konsantrasyonunda ilaç öncülünün ve kofaktörün dozunun artırılması hücre ölümünü tetiklemektedir. Sitotoksite deneylerine göre 10 µM CB1954 ve NADH canlılığı en fazla %67,8'e düşürürken, 100 µM uygulama %27'ye düşürmektedir. Doz bağımlı sitotoksisiteyi belirlediğimiz *in vitro* çalışmalardan aldığımız sonuçların, *in vivo*'da hayvan tümörleri üzerinde doğrulanmasını hedeflemekteyiz. Bu sonuçlar apoptozis analizleriyle de destenlenmektedir. Enzimin konsantrasyonu sabitken 10 µM CB1954 ve NADH ile kombinasyonu canlı hücre oranının %47,8'e düşmesine, 100 µM CB1954 ve NADH ile kombinasyonu ise %22,9'a düşmesine sebep olmuştur (Tablo 3.1).

Özellikle az sayıda gap bağlantılarına sahip hücrelerde, hücrenin aktif metabolitleri difüzyonla geçirme özelliği hücre dışı aktiveleşen ilaç öncülünün hücre içine geçebilmesi için avantajdır. Ntr/CB1954'ün bystander etkisini (hücreler arası komşuluk etkisini) ortaya çıkarmak için yapılan çalışmalarda, CB1954'ün reaksiyon sonucu oluşturduğu hidroksilamin metabolitlerinin gap bağlantılarından bağımsız hücre zarını serbestçe geçebildikleri saptanmıştır [Xu and McLeod, 2001].

Tez çalışmasının en önemli amaçlarından biri de bystander etkinin başarısını kanıtlamaktır. Aktiveleşen ilaç öncülünün lokal olarak yayılması sonucu bystander hücre ölümü gerçekleşir. Bir tümörde çok az sayıda enzim ekspres eden hücre olmasına rağmen ya da her hücreye dışarıdan gönderilen enzimin ulaşmamasına rağmen bystander etki aracılığıyla yüksek seviyede antitümör etki sağlanabilmektedir. Ntr/CB1954 uygulamasında bystander etkinin başarılı olabilmesi için hücrelerin sadece %10'unun nitroredüktaz enzimini ekspres etmesi yeterlidir [Green et al., 1997]. Ayrıca daha önce yapılan *in vitro* çalışmalarda diğer enzim/ ilaç öncü uygulamalarına göre en güçlü bystander etkinin Ntr/CB1954 uygulamasında olduğu saptanmıştır [Hunt et al., 2012; Nishihara et al., 1998]. Tez çalışmasında

kısıtlı zaman ve ekonomik nedenlerden dolayı hedeflenen hücrelere yönelik taşıyıcı sistemler (gen, virüs gibi) kullanılamamıştır. Hücre dışı ortamda aktifleşen ilaç öncülünü hücrelere uyguladığımızda toksik metabolitlerin hücrelerin neredeyse tamamına difüzyonla ulaşarak yani bystander etkiyi destekleyerek hücre canlılığını %27'ye kadar düşürdüğünü görmekteyiz.

Akan hücre ölçerde Anneksin V/Propidyum iyodür (PI) boyaması ile apoptozis saptanmıştır. Apoptozise giden hücrelerin plazma membran asimetrisi kaybolur ve membranın iç yaprağında bulunan fosfotidilserin rezidüsü membranın dış yaprağına yerleşir [Vermees et al., 1995]. Erken apoptozis olarak adlandırılan bu evrede Anneksin V fosfotidilserine bağlanır. Akan hücre ölçer ile FITC ile işaretlenmiş Anneksin V'in bağlandığı hücre oranını yani erken apoptotik hücre oranını saptamak mümkündür. *In vivo* ortamlarda apoptozis yoluyla ölen hücreler, nekrozis yoluyla ölen hücrelere tercih edilir. Çünkü nekrozise uğrayan hücre parçalanarak hücre içeriği ekstraselüler ortama yayılır ve inflamatuvar yanıt oluşur. Bu durum kanser tedavilerinin başarısı için önemli bir engeldir [Gamrekelashvili et al., 2007].

Akan hücre ölçer analizlerine göre HeLa hücrelerine Ntr/CB1954 uygulamasının toplam apoptozisi tetikleme oranı nekrotik hücre ölümünü tetiklemesine göre daha yüksek olduğu sonucu çıkarılmaktadır. 0.1 mg/ml enzimin 10 μ M ilaç öncülüyle toplam apoptozisi tetikleme oranı %46,3, nekrozisle ölüm oranı %6'dır. 100 μ M ilaç öncülünün aynı konsantrasyonda enzim ile uygulaması toplam apoptozisi %63,6 tetiklerken, nekrozisi %13,6 tetiklemiştir. Bu sonuçlara dayanarak apoptozisin nekrozisten daha fazla tetiklendiği uygulamanın tümör gerilemesine katkıda bulunabileceği sonucuna varmaktayız.

E. coli'den izole edilen NfsA, CB1954 aktivasyonunu, yine *E. coli*'den izole edilen NfsB'ye göre daha etkili katalizler. NfsA 100 μ M ve üzeri dozda CB1954 varlığında koloni oluşumunu inhibe ederken, NfsB 200 μ M ve üzeri dozda CB1954 uygulandığında koloni oluşumunu inhibe eder. NfsA, NADPH ile katalitik aktivitesi NADH'a göre yüksektir. NfsB için ise NADH'da NADPH'a göre küçük bir farkla tercih söz konusudur [Vass et al., 2009]. Ayrıca reaksiyon hızının orantılı olduğu k_{cat}/K_m değerleri NfsA için NfsB'ye göre daha yüksektir. NfsA için 0,15 NfsB için yaklaşık 0,006 (50 μ M kofaktör varlığında NADH ve NADPH) [Vass et al., 2009]. Ssap-Ntr enzimi ise *E.coli*'den izole edilen NfsB nitroredüktazıyla benzerlik

göstermesine rağmen [Çelik ve Yetiş, 2012] CB1954'ü aktifleştirmede 100 µM konsantrasyon yeterli olmaktadır. Deneylemiz sonucuna göre *E.coli* NfsB nitroredüktazıyla karşılaştırıldığında daha düşük konsantrasyonun hücre ölümünü gerçekleştirmeye yeterli olabildiği düşünülmektedir.

NfsA nitroredüktazın bystander etkisi Helsby ve ark. (2004) CB1954 aktivasyonu ile bystander etkinin 4-NHOH ürününden ziyade, 2-NHOH ve 2NH₂ metabolit türevlerinden kaynaklandığını ileri sürmüştür. Çünkü NfsA NTR tercihen CB1954'ün 2-NH₂ grubunu indirger. Bu sebeple NfsA NTR'nin, NfsB'ye göre daha fazla bystander etki oluşturduğu düşünülüyor [Helsby et al., 2004]. NfsA ve NfsB ekspres edilen fare hücrelerine ilaç öncü madde ve IL-2 gibi interlökinler birlikte verildiği tümörlerde gerileme olmuştur [Greco and Dachs, 2001]. Bundan sonraki çalışmalarımızda Ssap-Ntr'nin başka ilaç öncü maddelerle kombinasyonlarını deneyerek karşılaştırmalı olarak hangi uygulamanın daha iyi sonuç doğuracağını moleküler düzeyde çalışmalarla devam etmeyi planlamaktayız. Tez çalışmasında çeşitli alt yapı eksiklikleri ve ekonomik nedenlerden dolayı gen, virüs ya da antikor gibi taşıyıcı sistemler kullanmadan kanser hücrelerine enzimi direkt olarak gönderdik. Ancak ilerleyen çalışmalarımızda virüs, antikor gibi taşıyıcı sistemler kullanarak daha iyi sonuçlar elde edeceğimizi planlamaktayız.

Enzim ilaç öncü terapisinin tıpta uygulanabilir olmasının en önemli sebeplerinden biri çok yüksek konsantrasyonda ilaç öncülü uygulanmasına rağmen herhangi bir enzim tarafından aktifleşmediği sürece hiçbir toksik etki göstermemesidir. Bu nedenle ilaç öncülünün sadece dışardan gönderilecek olan enzim aracılığıyla aktifleşmesi oldukça önemlidir. Tedavinin başarısı burada başlamaktadır ve enzimin katalitik etkinliğinin yüksek olması, aktifleşen ilacın difüzyonu ve yarı ömrünün optimum olması gibi özelliklerle devam etmektedir.

Tez çalışmasında ilk kez kanser hücre serisine uygulanan Ssap-Ntr enziminin gelecek çalışmalarda hücrelerde ekspres ettirilerek kanser hücrelerine yönelik yüksek seçicilik sağlanabileceğini düşünmekteyiz. Bu tez çalışması sonuçlarının ve bu yönde yapılması planlanan daha detaylı araştırmaların enzim ilaç öncü terapisinin başarısını arttıracak ve yeni bakış açıları kazandıracaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Albert A., (1958). Chemical aspects of selective toxicity. *Nature*. 182:421-423.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., (2008) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science; New York and London.
3. Allen R. T., Hunter III W. J., Agrawal D.K., (1997) Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *JPM*. 37:215-28
4. Anlezark G. M., Vaughan T., Fashola-Stone E., Michael N. P., Murdoch H., Sims M. A. (2002) *Bacillus amyloliquefaciens* orthologue of *Bacillus subtilis* ywrO encodes a nitroreductase enzyme which activates the prodrug CB 1954. *Microbiology*. 148:297–306.
5. Anlezark G.M., Melton R.G., Sherwood R.F., Coles B., Friedlos F., Knox R.J., (1992) The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)—I. Purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli*—a potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Biochem Pharmacol*. 44:2289-2295.
6. Ashkenazi A., Dixit V.M., (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 281:1305–8.
7. Ayanoglu K., (2007) *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları* ; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü [http://95.9.113.117/ders_notlari/gida/lab_dersnot/KULTUREL_SAYIM_YONTEMLERI.pdf].
8. Bardakçı F., Yenidünya A. F., (2007). Moleküler biyoloji teknikleri 1:Nükleik asit analiz teknikleri (in) *Moleküler Biyoloji*. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör), 519-553, Nobel Yayın, Ankara).
9. Bennett M. V. L., Barrio L. C., Bargiello T.A., Spray D. C., Hertzberg E., Saez J. C., (1991) Gap Junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 6, 305-320. *Biol*. 11: 199-216.
10. Boland M.P., Knox R.J., Roberts J. J. (1991) The differences in kinetics of rat and human DT diaphorase result in a differential sensitivity of derived cell lines to CB 1954 (5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide). *Biochem Pharmacol*. 41:867-75.

11. Bortner C.D., Oldenburg N.B., Cidlowski J.A., (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*;5:21–6.
12. Bryant C., DeLuca M., (1991) *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, F. Muller (Ed), vol II. CRC Press, Boca Raton, Fla.
13. Bryant D., McCalla D., Leeksa M., Laneuville P., (1981) Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol.* 27:81-86.
14. Campbell R. O., Taga M. E., Mistry K., Lloret J., Anderson P. J., Roth J. R., Walker G.C., (2006) *Sinorhizobium meliloti* bluB is necessary for production of 5,6-dimethylbenzimidazole, the lower ligand of B12. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 4634–4639.
15. Carystinos G. D., Bier A., Batist G., (2001) The Role of Connexin-Mediated Cell–Cell Communication in Breast Cancer Metastasis , *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, Vol. 6, No. 4.
16. Chinnaiyan A. M., (1999) The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.* 1:5–15.
17. Clark A. J., Iwobi M., Cui W., Crompton M., Harold G., Hobbs S., Kamalati T., Knox R., Neil C., Yull F., Gusterson B., (1997). Selective cell ablation in transgenic mice expressing *E. coli* nitroreductase. *Gene Ther* 4:101-110.
18. Cobb L. M., Connors T. A., Elson L. A., Khan A. H., Mitchley B. C., Ross W. C., (1969). 2,4- Dinitro-5-ethyleneiminobenzamide (CB 1954): a potent and selective inhibitor of the growth of the Walker carcinoma 256. *Biochem Pharmacol.* 18:1519–27.
19. Connors T. A., (1995). The choice of prodrugs for gene directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Gene Ther* 2:702-709.
20. Cui W., Gusterson B., Clark A.J., (1999). Nitroreductase-mediated cell ablation is very rapid and mediated by a p53-independent apoptotic pathway. *Gene Ther* 6:764-770.
21. Curtin J. F., Cotter T. G., (2003) Apoptosis: Historical perspectives. *Essays Biochem.* 39:1-10.
22. Çelik A., Yetis G., (2012) An unusually cold active nitroreductase for prodrug activations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 20 3540–3550.
23. Dalmazzo L. F.F., Santana-Lemos B. A., Jácomo R. H., Garcia A. B., Rego E. M., Fonseca L.M., Falcão R. P. (2011) Antibody-targeted horseradish peroxidase

associated with indole-3-acetic acid induces apoptosis *in vitro* in hematological malignancies *Leukemia Research* Volume 35, Issue 5, Pages 657–662.

24. Dalva K. Hematoloji’de akım sitometri kullanımı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Moleküler Hematoloji Ve Sitogenetik Alt Komitesi
25. DeBerardinis R. J., (2008) Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genet Med.* 10(11):767-77.
26. Doonan F., Cotter T. G., (2008) Morphological assessment of apoptosis. *Methods.* 44 200–204
27. Drabek D., Guy J., Craig R., Grosveld F. (1997) The expression of bacterial nitroreductase in transgenic mice results in specific cell killing by the prodrug CB1954 *Gene Therapy* 4, 93–100.
28. Dunphy, C.H., (2004). Applications of Flow Cytometry and immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 128:9, 1004-1022.
29. Elliott G., O’Hare P., (1999). Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins. *Gene Ther* 6:149-151.
30. Elmore S., (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35(4): 495–516.
31. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S., (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391:43–50.
32. Fadok V. A., Bratton D. L., Frasch S. C., Warner M. L., Henson P. M. (1998) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes *Cell Death and Differentiation.* *Stockton Press.* 5, 551-562
33. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M., (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207–2216.
34. Farber E., (1984). The multi-step nature of cancer development. *Cancer Res* 44: 4217–4223.
35. Fillat C., Carrio M., Cascante A., Sangro B. (2003). Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr. Gene Ther.* 3 (1), 13–26.

- 36.** Folkman J., (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 29:15–8.
- 37.** Freeman S. M., Abboud C. N., Whartenby K. A., Packman C. H., Koeplin D. S., Friend D.R., Chang G.W., (1984) A colon-specific drug-delivery system based on drug glycosides and the glycosidases of colonic bacteria. *J Med Chem.* 27:261-266.
- 38.** Friedlos F., Quinn J., Knox R.J., Roberts J.J. (1992). The properties of total adducts and interstrand crosslinks in the DNA of cells treated with CB 1954. Exceptional frequency and stability of the crosslink. *Biochem. Pharmacol.* 43 (6), 1249–1254.
- 39.** Gamrekeshvili J., Krüger C., von Wasielewski R., Hoffmann M., Huster K. M., Busch D. H., Manns M. P., Korangy F., Greten T. F., (2007) Necrotic tumor cell death in vivo impairs tumor-specific immune responses. *J Immunol.* Feb 1;178(3):1573-80.
- 40.** Ghoumari A. M., Mouawad R., Zerrouqi A., Nizard C., Provost N., Khayat D., Naus C.C.G., Soubrane C., (1998). Actions of HSVtk and connexin43 gene delivery on gap junctional communication and drug sensitization in hepatocellular carcinoma. *Gene Ther* 5:114-121.
- 41.** Gözüaçık D., (2013) Otofaji ve Sinyal Yolakları, Biyolojik Bilimler ve Biyomühendislik Programı. dgozuacik@sabanciuniv.edu
- 42.** Greco O., Dachs G.U., (2001) Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives. *J Cell Physiol.* Apr;187(1):22-36.
- 43.** Green N. K., Youngs D. J., Neoptolemos J. P., Friedlos F., Knox R. J., Springer C. J., Anlezark G. M., Michael N. P., Melton R. G., Ford M. J., Young L. S., Kerr D. J., Searle P. F., (1997) Sensitization of colorectal and pancreatic cancer cell lines to the prodrug 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954) by retroviral transduction and expression of the E. coli nitroreductase gene. *Cancer Gene Ther.* Jul-Aug;4(4):229-38.
- 44.** Güleş Ö., Eren Ü., (2008) Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, (2) 73-78.
- 45.** Haisma H. J., Boven E., van Muijen M., de Jong J., van der Vijgh W. J., Pinedo H. M., (1992) A monoclonal antibody- β -glucuronidase conjugate as activator of the prodrug epirubicin-glucuronide for specific treatment of cancer. *Br J Cancer.* 66:474-478.

46. Han H. K., (2000) Targeted Prodrug Design to Optimize Drug Delivery *AAPS Pharmsci*; 2 (1) article 6.
47. Hanahan D., Weinberg R.A., (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*.100:57–70.
48. Hassan H. M., Fridovich I., (1978) Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 253: 8143-8148.
49. Helsby N. A., Ferry D. M., Patterson A. V., Pullen S. M., and Wilson W. R., (2004) 2-Amino metabolites are key mediators of CB 1954 and SN 23862 bystander effects in nitroreductase GDEPT. *Br J Cancer*. 90(5): 1084–1092.
50. Hickman J. A. (1992) Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metas Rev*. 11: 121–139.
51. Higuchi T., Stella V., (1975) Prodrugs As Novel Drug Delivery Systems. ACS Symposium Series. *American Chemical Society*. 1-115.
52. Huber B.E., Austin E.A., Richards C.A., Davis S.T., Good S.S. (1994). Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (17), 8302–8306.
53. Hunt M. A., Li D., Hay M.P., Currie M.J., Robinson B.A., Patterson A.V., Dachs G.U., (2012) Characterization of enzyme prodrug gene therapy combinations in coated spheroids and vascular networks *in vitro*. *J. Gene Med*. 14:62-74.
54. Ibrahim SF, van den Engh G. (2007) Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 106: 19-39.
55. Igney F. H., Krammer P. H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2:277–88
56. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R., (1972) Apoptosis:a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*.26:239-5
57. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R., (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 26, 239–257.
58. Kischkel F. C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P. H., Peter M. E. (1995) Cytotoxicity dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*. 14:5579–88.

- 59.** Knox R. J., Connors T. A., (1997) Prodrugs in cancer chemotherapy, *Pathology oncology research* Vol 3, No 4.
- 60.** Knox R. J., Friedlos F., Jatman M., Roberts J. J. (1988). A new cytotoxic, DNA interstrand cross-linking agent, 5-(aziridin-1-yl)-4-hydroxylamino-2-nitrobenzamide, is formed from 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954) by a nitroreductase enzyme in Walker carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 37:4661-4669.
- 61.** Knox R.J., Friedlos F., Sherwood R.F., Melton R.G., Anlezark G.M. (1992). The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)-II. A comparison of an *Escherichia coli* nitroreductase and Walker DT diaphorase. *Biochem. Pharmacol.* 44 (12), 2297–2301.
- 62.** Knox R.J., Jenkins T. C., Hobbs S. M., Chen S., Melton R.G., Burke P.J. (2000) Bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by human NAD(P)H quinone oxidoreductase 2: a novel co-substrate-mediated antitumor prodrug therapy. *Cancer Res.* 60, 4179.
- 63.** Krumm S., Lamberti J. (1993). Change in sexual behavior following radiation therapy for cervical cancer. *J. Psychosom. Obstet. Gynaecol*, 14:51-63.
- 64.** Kutluk T., Kars A. (2001). Kanser konusunda genel bilgiler. *T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser ve Savaş Daire Başkanlığı*
- 65.** Le G. T., Abbenante G. (2005) Inhibitors of TACE and Caspase-1 as anti-inflammatory drugs. *Curr Med Chem.* 12:2963–77.
- 66.** Li H., Zhu H., Xu C. J., Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94:491–501.
- 67.** Lightfoot R. T., Shuman D., Ischiropoulos H. (2000) Oxygen-insensitive nitroreductases of *Escherichia coli* do not reduce 3-nitrotyrosine. *Free Radic Biol Med.* 28:1132-1136.
- 68.** Liochev S. I., Hausladen A., Fridovich I. (1999) Nitroreductase A is regulated as a member of the *soxRS* regulon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 3537-3539.
- 69.** Loewenstein W. R. (1979) Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim Biophys Acta* 560, 1-65.
- 70.** Loewenstein W. R. (1981) Junctional intercellular communication: the cell-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61, 829-913

71. Marco R., Gilli G., Pignata C., Villani S., Bono R. (2009) Mutagenic properties of PM_{2.5} urban pollution in the northern Italy: the nitro-compounds contribution. *Environ Int.*; 35:905-910.
72. Marconi P., Tamura M., Moriuchi S., Krisky D. M., Niranjana A., Goins W. F., Cohen J. B., and Glorioso J. C., (2000) Connexin 43-Enhanced Suicide Gene Therapy Using Herpesviral Vectors *Molecular Therapy* Vol. 1, No. 1, January.
73. McHale M. W., Kroening K. D., Bernlohr D. A. (1996) Identification of a class of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in fatty acid repression of gene transcription and analysis of the *frm2* gene. *Yeast*. 12: 319-331.
74. Mesnil M, Yamasaki H. (2000). Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gapjunctional intercellular communication. *Cancer Res* 60:3989-3999.
75. Mesnil M., Piccoli C., Tiraby G., Willecke K., Yamasaki H. (1996). Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1831-1835.
76. Metivier D., Dallaporta B., Zamzami N. (1998) Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1 triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluochromes. *Immunol Lett*. 61:157-63.
77. Moolten F. L. (1986). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 46:5276-5281.
78. Mullen C. A., Kilstrup M., Blaese R. M. (1992). Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5 fluorocytosine: a negative selection system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89 (1), 33-37.
79. Musil L. S. Goodenough D. A. (1991) Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 115, 1357- 1374.
80. Naumov G. N., Akslen L. A., Folkman J. (2006) Landes Bioscience Spotlight on Cancer Cell Dormancy Role of Angiogenesis in Human Tumor Dormancy Animal models of the Angiogenic Switch. *Cell Cycle*. 5:16, 1779-1787.
81. Nishihara E., Nagayama Y., Narimatsu M., Namba H., Watanabe M., Niwa M., Yamashita S. (1998) Treatment of thyroid carcinoma cells with four different suicide gene/prodrug combinations *in vitro*. *Anticancer Res*. 18(3A):1521-5.

- 82.** Nixon J. E., Wang A., Field J., Morrison H. G., McArthur A. G., Sogin M.L., Loftus B. J., Samuelson J. (2002) Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell*. 181-190.
- 83.** Oliveira I. M., Bonatto D., Henriques J.A.P., (2010) Nitroreductases: Enzymes with Environmental, Biotechnological and Clinical Importance, *Formatex*.
- 84.** Oliveira P. A., Colaço A., Chaves R., Guedes-Pinto H., De-La-Cruz L. F. P, Lopes C., (2007) Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79(4): 593-616 (Annals of the Brazilian Academy of Sciences) ISSN 0001-376.
- 85.** Özvaran M. K. (2004) Malign mezotelyomada gen tedavisi. *Toraks Dergisi*, 5 (2): 110-115.
- 86.** Palmer D. H., Mautner V., Mirza D. (2002) Virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT): clinical trials with adenoviral nitroimidazole reductase (ad-ntr). *Br J Cancer*. 86(Suppl 1):S30
- 87.** Patel P., Young J. G., Mautner V., Ashdown D., Bonney S., Pineda R. G., Collins S. I., Searle P. F., Hull D., Peers E., Chester J., Wallace D.M., Doherty A., Leung H., Young L.S., James N.D. (2009) A phase I/II clinical trial in localized prostate cancer of an adenovirus expressing nitroreductase with CB1954. *Mol Ther*.17:1292-1299.
- 88.** Patterson A. V., Harris A. L. (1999). Molecular chemotherapy for breast cancer. *Drugs Aging* 14:75-90.
- 89.** Pavlovic J., Nawrath M., Tu R., Heinicke T., Moelling K. (1996). Antitumor immunity is involved in the thymidine kinase-mediated killing of tumors induced by activated Ki-ras(G12V). *Gene Ther* 3:635-643.
- 90.** Peng Z. (2005) Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Human Gene Ther*. 16: 1013-24.
- 91.** Peterson F., Mason R., Hovespian J., Holtzman J. (1979) Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J Biol Chem*. 254:4009-4014.
- 92.** Pitot H. C., Dragan Y. P. (1991) Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J*. 5, 2280-2286.

- 93.** Pitot, H. C., Goldsworthy, T. L. and Moran, S. (1981) The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *J. Supramol. Struct. Cell Biochem.* 17, 133-146.
- 94.** Player A., Barrett J. C., Kawasaki E. S. (2004). Laser capture microdissection, microarrays and the precise definition of a cancer cell. *Expert Rev Mol Diagn* 4: 831–840.
- 95.** Polat D. K., (2008). Retinitis pigmentosa’lı hastalarda bazı enflamasyon ve oksidatif stres belirteçlerinin değişimi, Uzmanlık Tezi.
- 96.** Prosser G. A., Cobb J. N., Syddall S. P., Williams E. M., Smaill J. B., Wilson W. R., Patterson A. V., Ackerley D. F. (2010) Discovery and evaluation of *Escherichia coli* nitroreductases that activate the anti-cancer prodrug CB1954. *Biochem Pharmacol.* 79:678-687.
- 97.** Race P. R., Lovering A. L., Green R. M., Ossor A., White S. A., Searle P. F., Wrighton C.J., Hyde E. I. (2005) Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. *J Biol Chem.* 280: 13256–13264
- 98.** Rahman M. (2006) Introduction to flow cytometry. Serotec Ltd. Oxford (UK): Published by Serotec Ltd.
- 99.** Reis N. (2003) Jinekolojik kanser ve tedavilerinin kadın cinsel sağlığına etkileri, *C.Ü.Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi*, 7 (2).
- 100.** Rosenberg S. A., Aebersold P., Cornetta K., Kasid A., Morgan R. A., Moen R., Karson E. M., Lotze M. T., Yang J. C., Topalian S. L. (1990). Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma using tumor-infiltrating lymphocytes mediated by retroviral transduction. *N Engl J Med* 323:570-578.
- 101.** Ruch R. J. (1994)The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 24, 216-231.
- 102.** Ryan J.A. Introduction to animal cell culture, Technical Bulletin, coming incorporated life sciences.
- 103.** Saelens X., Festjens N., Vande W. L., van Gurp M., van Loo G., Vandenamee P. (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 23:2861–74.
- 104.** Sakahira H., Enari M., Nagata S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 391:96–9.

- 105.** Spain J. (1995) Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu Rev Microbiol.*; 49: 523-555.
- 106.** Stella V. J., Himmelstein K. J. (1982) Critique of prodrugs and site specific delivery. In: Bundgaard H, ed. *Optimization of Drug Delivery*. Alfred Benzon Symposium 17. Copenhagen, Munksgaard. 134-155.
- 107.** Strachan T., Read A. P. (2004) Chapter twenty one: New approaches to treating disease. *New York Garland Science*.
- 108.** Streker K., Freiberg C., Labischinski H., Hacker J., Ohlsen K. (2005) *Staphylococcus aureus* NfrA (SA 0367) Is a Flavin Mononucleotide-Dependent NADPH Oxidase Involved in Oxidative Stress Response. *J Bacteriol.*; 187: 2249-2256.
- 109.** Susin S. A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P., Ferri K. F., Irinopoulou T., Prevost M. C., Brothers G., Mak T. W., Penninger J., Earnshaw W.C., Kroemer G. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 192:571–80.
- 110.** Takeda K., Lizuka M., Watanabe T., Nakagawa J., Kawasaki S., Nimura Y. (2006) *Synechocystis* DrgA protein functioning as nitroreductase and ferric reductase is capable of catalyzing the Fenton reaction. *FEBS Lett.*; 274:1318–1327.
- 111.** 103. Tanahashi M., Yokoyama T., Kobayashi Y., Yamakawa Y., Maeda M., Fujii Y. (2001) Effect of phorbol ester and calcium ionophore on human thymocytes. *Human Immunology*. Volume 62, Issue 8, Pages 771–781.
- 112.** Taneli F., (2007) “Flow” Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 5(2): 75-82.
- 113.** Tang M.H.Y., Helsby N.A., Wilson W.R., Tingle M.D. (2005) Aerobic 2- and 4-nitroreduction of CB 1954 by human liver. *Toxicology*. Volume 216, Issues, 2-3.
- 114.** “The History of Cancer” (2012) American Cancer Society, Erişim; <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/the-history-of-cancer-what-is-cancer>
- 115.** Trosko J. E. (2001) Commentary: Is the concept of “tumor promotion” a useful paradigm? *Mol. Carcinog.* 30, 131-137.
- 116.** Trosko J. E. (2003). The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *Jbiochem Mol Biol.* 36: 43–48.
- 117.** Trosko J. E., Chang C. C., Madhukar B. V., Dupont E. (1996) Intercellular communication: A paradigm for the interpretation of the

initiation/promotion/progress model of carcinogenesis; in *Chemical Induction of Cancer: Modulation and Combination Effects*, Arcos, J. C. (ed.), pp. 205-225, Birkhauser, Boston, Massachusetts.

118. Trosko J. E., Madhukar B. V., Chang C. C. (1993) Endogenous and exogenous modulation of gap junctional intercellular communication: Toxicological and pharmacological implications. *Life Sci* 53, 1-19.

119. Trosko J. E., Ruch R. J. (1998). Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci.* 3:D208–D236.

120. Tunçer S., (2007). Yeni sentezlenmiş ışığa duyarlı maddeler (fotosensitayzırlar) kullanılarak uygulanan fotodinamik terapinin serviks epitelyal karsinoma ve mezotelyoma hücrelerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi (Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü).

121. Ulukaya E., (2003) Apoptozis Ders Notları. Erişim: [<http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf>].

122. van Lochem E.G., van der Velden V.H.J., Wind H.K., te Marvelde J.G., Westerdaal N.A.C., van Dongen J.J.M. (2004) Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 60B:1–13

123. Vass S.O., Jarrom D., Wilson W. R., Hyde E. I., Searle P. F. (2009) E. coli NfsA: an alternative nitroreductase for prodrug activation gene therapy in combination with CB1954. *Br J Cancer.* 100(12):1903-11.

124. Verhoven B., Schlegel R. A., Williamson P. (1995) Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182: 1597-1601

125. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C.P.M. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunol. Methods.* 184: 39-51

126. Ward M. S. (1999). The Use Of Flow Cytometry In The Diagnosis And Monitoring Of Malignant Hematological Disorders. *Pathology* 31, pp. 382–392

127. Whiteway J., Kozłarz P., Veall J., Sandhu N., Kumar P., Hoecher B., Lambert I. B. (1998) Oxygen-Insensitive Nitroreductases: Analysis of the Roles of nfsA and

nfsB in Development of Resistance to 5-Nitrofurantoin Derivatives in *Escherichia coli*. *Journal Of Bacteriology*. Vol. 180, No. 21.

- 128.** Williamson P., Schlegel R. A. (1994) Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells. *Mol. Membr. Biol.* 11(4):199-216.
- 129.** 133. Wilmoth M. C., Spinelli A. (2000). Sexual implications of gynecologic cancer treatments. *JOGNN*, 29(4): 413-421
- 130.** Wu M., Ding H., Fisher D. E. (2001) Apoptosis: Molecular Mechanisms, *Encyclopedia Of Life Sciences Nature Publishing Group*.
- 131.** Wyllie A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284, 555–556.
- 132.** Xu G., McLeod H. L. (2001) Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 7(11):3314-24
- 133.** Zachowski A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J.* 15;294 (Pt 1):1-14.
- 134.** Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S. J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell.* 87:619–28.
- 135.** Zhang G., Gurtu V., Kain S. R., Yan G. (1997) Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 23: 525-531.
- 136.** Zwaal R. F. A., Schroit A. J. (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* 89:1121-32.
- 137.** Yin H., Xie F., Zhang J., Yang Y., Deng B., Sun J, Wang Q., Qu X. , Mao H. (2011) Combination of interferon- α and 5-fluorouracil induces apoptosis through mitochondrial pathway in hepatocellular carcinoma in vitro. *Cancer Letters*. Volume 306, Issue 1, Pages 34–42.

ÖZGEÇMİŞ

Esra KAYA, 26 Eylül 1987 yılında İstanbul'da doğdu. 2005 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi'nde lisans eğitimine başladı. 2010 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra, aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.